

A BIOTECNOLOGIA NA AGROPECUÁRIA

OLÍVIA MARCIA NAGY ARANTES^a
JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO^b

RESUMO

Revisão Bibliográfica do emprego da biotecnologia na agropecuária, mostrando um levantamento das técnicas mais promissoras e de seus principais produtos, tanto em fase experimental como em uso comercial. Pretende-se dar uma visão global do assunto, cronológica e espacialmente, não se prendendo à detalhes, mostrando, em linhas gerais, o que foi feito e o que se faz, atualmente, em biotecnologia. As técnicas e produtos que influenciam a área de genética e melhoramento genético na agropecuária, são enfatizadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Biotecnologia; Engenharia genética; DNA recombinante; Cultura de tecido; Transferência de embriões; Anticorpo monoclonal; Fixação de nitrogênio; Controle biológico.*

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia consiste num conjunto de técnicas, como engenharia genética, fermentação, cultura "in vitro" e outras, utilizadas para explorar o potencial dos microorganismos, animais e vegetais, permitindo mudanças diretas ou indiretas no gene e nas frequências genotípicas. É portanto, interdisciplinar e seus resultados contribui em várias disciplinas tradicionais.

Visa principalmente a obtenção de produtos geradores de bens e serviços. Presente em todos os campos, indústria, agropecuária e saúde, é símbolo do sistema produtivo das próximas décadas.

VIÉGAS & BARROS¹²¹ qualificam a produção intensiva em tecnologia como sendo a indústria do conhecimento. Paralelamente à informática, a biotecnologia caminha, a passos largos, para ocupar o lugar do petróleo como centro de gravidade das sociedades avançadas.

As importantes descobertas que levaram à obtenção controlada do DNA recombinante, na década de 70, deram especial impulso às pesquisas, particularmente à engenharia genética, que se tornou uma das áreas de maior avanço tecnológico nos últimos tempos.

Os mesmos autores, otimistas, apontam a biotecnologia como poderoso elenco de instrumentos, de eficácia comprovada, para a solução de muitos dos nossos maiores problemas, como a fome, as doenças, a crise energética, as calamidades naturais, a degradação do meio ambiente e o desperdício de recursos.

Dado o potencial que a biotecnologia apresenta, se bem

direcionado, terá um grande impacto na oferta de alimentos e na economia dos países subdesenvolvidos.

As novas técnicas poderão não somente aumentar a produtividade, como também representam a possibilidade da introdução, por exemplo, de novos tipos de plantas, que podem ser adaptadas a habitats não convencionais.

Segundo BRILL¹⁴ existem três maneiras principais de se aplicar as técnicas microbiológicas à agricultura tradicional:

1a. Cultivo de microorganismos, em larga escala, em tanques de fermentação, para seu posterior uso em plantas e/ou no solo.

2a. Cultivo de células de tecidos vegetais "in vitro". Nestes cultivos pode-se acelerar a velocidade de mutação, permitindo uma seleção mais rápida e o desenvolvimento de híbridos que não se conseguiria pelas técnicas convencionais de cruzamento e, finalmente a produção, em larga escala, de alguns compostos de origem vegetal, como a digitalina e piretrina.

3a. Introdução de material genético exógeno, na célula vegetal.

Segundo RADKE & LAGARIAS⁹², na pecuária, por outro lado, os últimos avanços na tecnologia de transferência de genes, no desenvolvimento de vacinas, mapeamento gênico, cariótipo e embriologia, têm potenciais aplicações na bioengenharia de animais, inclusive alterando as suas características biológicas como a capacidade reprodutiva.

A produção, mais eficiente e segura, de vacinas, objetivando combater as doenças de maior expressão econômica e o desenvolvimento de antígenos e antisoros, através da

^a. Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas — Departamento de Biologia Geral — CCB/UEL.

^b. Professor do Departamento de Genética — ESALQ/USP.

biotecnologia, já tem produzido resultados nos países desenvolvidos.

A inseminação artificial, já usada aproximadamente desde à década de 50, aliada as técnicas de conservação, transferência de embriões e outras ajudam o melhoramento animal a obter resultados mais rápidos, como o aumento da produtividade e o aproveitamento da rusticidade de raças nativas, atualmente sujeitas ao desaparecimento.

Segundo o programa de biotecnologia, proposto para o banco mundial, em 1983, a bioindústria através das tecnologias que fazem uso de sistemas biológicos, já respondia em valores globais, por aproximadamente 40% da produção mundial.

Os métodos biotecnológicos oferecem vantagens, em relação à química industrial, permitindo a obtenção de produtos e preços menores, com maior pureza e quantidade, com menores cargas poluidoras de rejeitos e menor consumo energético. Além disso, novos produtos, não obtidos por tecnologias clássicas, estão sendo conseguidos pela biotecnologia.

Numerosos países já estabeleceram políticas governamentais, orientadoras dos investimentos na biotecnologia. Destaque especial deve ser feito para àqueles que nos últimos cinco anos, vem tomando iniciativas políticas específicas: Austrália, Bélgica, Canadá, China, Dinamarca, Espanha, EUA, França, Holanda, Índia, Israel, Itália, Japão, México, Inglaterra, Alemanha, Suécia, Suíça e URSS.

Este trabalho objetiva fazer um levantamento das técnicas mais promissoras na biotecnologia e dos principais produtos já utilizados em escala comercial ou em fase experimental.

O trabalho pretende dar uma visão global do assunto, cronológica e espacialmente, não se prendendo à detalhes, mostrando, em linhas gerais, o que foi feito e o que se faz, atualmente, em biotecnologia.

Ênfase será dada às técnicas e produtos que influenciam a área de genética e melhoramento genético.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Técnicas

O trabalho é dividido em técnicas usadas como instrumento na biotecnologia e em produtos obtidos delas.

Este item inclui as técnicas usadas na agricultura e/ou pecuária.

2.1.1. Tecnologia do DNA recombinante

a. Vírus

Os vírus são exemplos naturais de engenharia genética, desde que a infecção viral resulte em novo material genético expresso no hospedeiro.

A maioria dos vírus de plantas tem RNA fita simples, o que dificulta seu uso como vetor.

Atualmente, dois grupos de vírus de plantas são importantes para a engenharia genética (HARRISON et alii⁴⁶:

- Caulimovírus, possuem DNA dupla fita. O mais usado neste grupo é o vírus do mosaico da couve-flor (CaMV).

- Geminivírus, possuem DNA fita simples.

Segundo GARDNER³⁶, os vírus para serem utilizados como vetores em engenharia genética, precisam ter três componentes essenciais:

- Ser capaz de receber fragmentos de DNA exógeno.
- Ser possível de atenuação para que sua virulência, não afete o produto a ser obtido.
- Capacidade para a introdução do material genético dele, na planta ou animal.

HOWELL et alii⁴⁹ usaram o plasmídeo pBR 322, de *E. coli*, para propagar o DNA do CaMV e infectaram nabos. Mostraram que o plasmídeo bacteriano é excisado e o material viral integrado no genoma da planta.

Os autores concluem que progressos tem ocorrido com o encapsulamento e propagação de fragmentos de DNA inseridos. Contudo, estabilidade, limite de tamanho e expressão do DNA exógeno inserido no genoma de CaMV devem ser estudados para estabelecer se este sistema pode ou não ser usado para a transformação de plantas.

Em animais, o DNA do vírus de tumor, SV40, que não tem capa protéica, quando introduzidos em células hospedeiras susceptíveis, são capazes de se multiplicarem e transformar células normais em cancerosas. Entretanto por muitos anos a eficiência desse processo foi muito baixo não permitindo estudos efetivos.

O grande avanço técnico foi dado com a descoberta de que o DNA purificado de adenovírus, quando precipitado com Ca⁺⁺ e adicionado à células normais de ratos, crescendo em cultura, produzia uma frequência de transformação muito maior do que na ausência de Ca⁺⁺ (WATSON et alii¹²⁵).

Genes marcadores têm sido desenvolvidos para permitir que as células como o DNA integrado possam ser identificadas e seletivamente multiplicadas. O marcador melhor caracterizado tem sido o gene para timidina quinase (tk), que produz uma enzima usada na via biossintética da pirimidina.

A presença do tk não é essencial para as células sobreviverem. Assim, mutantes tk⁻ podem, facilmente, serem isolados pelo uso de bromodeoxiuridina (BrUdr). Esse nucleosídeo análogo quando incorporado ao DNA é letal para a célula. BrUdr, entretanto, só é incorporado no DNA se for primeiro fosforilado pela ação do tk. Assim células, com o tk funcional são mortas pelo BrUdr e os raros mutantes tk⁻ sobrevivem.

As células tk⁻ podem morrer num meio denominado HAT, que contém hipoxantina, aminopterina (que bloqueia dCDP dTDP) e timidina. Neste caso, a única fonte de dTTP para a biossíntese do DNA é através da timidina quinase. Introduzindo esse gene na célula, através do SV40, como vetor, as células tornam-se resistentes e não morrem neste meio.

Assim o tk é usado como marcador para a integração de outros genes ligados a ele. Usando a técnica da cotransformação, qualquer segmento de DNA clonado pode ser facilmente introduzido em culturas de células de eucariotos.

WATSON et alii¹²⁵ citam também o vírus do papiloma bovino (BPV), possuidor de um genoma de 8,0 Kb, que transforma certas linhagens celulares de camundongo para o fenótipo maligno.

O gene da insulina também tem sido inserido no BPV e usado para transformar células de camundongos. Altos níveis de produção de insulina foram detectados.

b. Organelas

O DNA de organelas, como mitocôndrias e cloroplastos, é um vetor atraente, por ser naturalmente extracromossômico e portanto possuir os requisitos necessários para a replicação, transcrição e tradução.

A mais óbvia vantagem é a manutenção do balanço gênico nuclear, que é extremamente delicado e que vem sendo um problema até agora sem solução, no uso da engenharia genética para genes nucleares, principalmente em animais.

BELLIARD et alii¹⁰ analisaram plantas regeneradas de fusão de protoplasto entre duas variedades de *Nicotiana tabacum*. Usaram marcas nucleares e citoplasmáticas para identificar, fenotipicamente, os híbridos. Com enzimas de restrição, não detectaram recombinação entre os cloroplastos, mas observaram o aparecimento de DNA mitocondrial novo, em nove híbridos.

Os cloroplastos se comportam de maneira diferente. Os autores observaram eliminação seletiva de um dos cloroplastos paternos.

PRING & LEVING III⁹¹ mostraram, por análise de fragmentos de restrição, em eletroforese, que o DNA mitocondrial de milho com citoplasma normal, fértil e T, C e S (estéril), são facilmente distinguíveis. Os padrões eletroforéticos dos fragmentos foram distintos, provando a diferença entre seus DNAs mitocondriais.

O mesmo estudo, feito com o DNA dos cloroplastos, mostrou padrões eletroforéticos idênticos.

Acredita-se que através das tecnologias disponíveis, o DNA de mitocôndria e cloroplasto, pode ser isolado e usado como vetor de clonagem, sem alguns dos problemas que apresentam o vírus e outros vetores.

Nos últimos anos, o uso de vesículas de fosfolipídios (lipossomos) para introduzir ácido nucléico em células de plantas, tem recebido grande atenção. As suas vantagens inclui: 1. baixa toxicidade e a possibilidade do uso em muitas espécies de plantas; 2. proteção do ácido nucléico; contra a degradação por nucleases presente no meio de cultura; 3. maior facilidade na liberação do ácido nucléico.

FRALEY et alii³⁴, em experimentos com protoplastos de tabaco, encapsularam o RNA do TMV (vírus mosaico do tabaco), em diferentes lipossomos. Quando esses vários lipossomos foram incubados com protoplastos, não detectaram a produção do vírus. Os autores concluíram que: 1. o RNA encapsulado não foi degradado; 2. altos níveis de lipossomos associaram-se aos protoplastos; 3. a viabilidade dos protoplastos não foi reduzida com a exposição dos lipossomos; 4. a falta de produção detectável de vírus foi conseqüência da insuficiência de lipossomos para introduzir uma quantidade significativa de RNA TMV nos protoplastos.

Como em células de mamíferos, a inclusão de glicerol, etilenoglicol e polietilenoglicol, durante a incubação das células com lipossomos tem resultado no aumento da eficiência da inclusão dos lipossomos, esses e outros po-

liálcoois foram testados pelos autores acima citados.

Um outro parâmetro importante na interação protoplasto-lipossomo é a concentração de íons metais divalentes, do tampão para incubação (WILSCHUT et alii¹³¹). Níveis altos de $CaCl_2$ mostrou estimular a produção de vírus TMV. Esse íon atua estimulando a aproximação de protoplasto e lipossomo. Determinaram também que a máxima integração ocorre em pH neutro.

Segundo RUTLEDGE & SIDEL⁹⁸, o material genético da mitocôndria não tem ainda sido muito explorado, em animais domésticos. A produção de híbridos citoplasmáticos pode ser outra fonte de vigor de híbrido.

c. Plasmídios

Numerosos plasmídios naturais ou, geralmente, construídos, vêm sendo usados como veículo para clonagem molecular de genes.

O plasmídio deve conter genes que facilitem sua identificação, tais como genes para a resistência a antibióticos e sítios para enzimas de restrição. Os plasmídios pBR313 e pBR322 têm estas características descritas e estão sendo usados para inserir genes (KADO & KELINHOFS⁵⁶).

Mais recentemente, a redescoberta do plasmídio Ti, da bactéria fitopatogênica *Agrobacterium*, revolucionou o uso de plasmídios como vetores, pois é um plasmídio que, naturalmente se integra nos cromossomos das plantas, quando são infectadas por esta bactéria.

As espécies *A. tumefaciens*, *A. rubi* e *A. rhizogenes* possuem propriedades oncogênicas, isto é, formam tumor no colo da planta, ou produzem desordenadamente raízes adventícias (raiz "em cabeleira").

CHILTON et alii¹⁹ atribuíram a base molecular, do princípio da indução de tumor, à uma região do plasmídio Ti, designado região T, que é transferida e inserida no genoma nuclear da planta.

A doença é caracterizada por multiplicação desordenada da célula, supressão da diferenciação e por produção de metabólitos, denominados opinas, que não estão presentes na planta normal.

Segundo BOMHOFF et alii¹¹ os plasmídios Ti se classificam em:

- Tipo I: dirige a síntese de octopina, que é um produto da condensação de ácido pirúvico e arginina. Sintetiza também monopina e agropina.

- Tipo II: sintetiza somente octopina e induz tumor só em videira.

- Tipo III: dirige a síntese de nopalina, que é produto da condensação entre arginina e ácido α -cetoglutárico; e de agropinopina A e B.

A *A. rhizogenes* possui o plasmídio Ri que é diferente do Ti.

ENGLER et alii³⁰ observaram quatro grandes regiões de homologia entre os plasmídios Ti da octopina e nopalina. Duas delas estão envolvidas com oncogenicidade (A e D), outra corresponde a região de controle replicação (B) e outra codifica funções conjugativas (C). A região A é parte do T-DNA.

A primeira evidência concreta, de que o T-DNA transcreveu na célula de planta foi dada por DRUMMOND et

alii²⁸, que demonstraram que o RNA das células de tumor hibridizaram com fragmentos específicos do plasmídeo Ti.

Sendo o Ti um plasmídeo muito grande, a clonagem direta nele é impossível, portanto a inserção de genes nele é feita via vetor intermediário. Como vetor intermediário tem-se usado o plasmídeo P, de amplo espectro de hospedeiros, capaz de replicar, estavelmente em *Agrobacterium* e o mais comum, o pBR322, da *E. coli*, carregado a região T do plasmídeo Ti (WATSON et alii¹²⁴).

Uma outra limitação do uso do Ti como vetor é que as células transformadas com o T-DNA, normalmente não regeneram a planta.

GREVE et alii⁴⁰ observaram a ocorrência natural de mutantes do T-DNA, que transformam as células de plantas, mas não bloqueiam a rediferenciação delas. Esses mutantes foram chamados "rooty" e mapeados na região do T-DNA.

Inseriram neste T-DNA "atenuado" o gene de levedura que codifica a ADH (álcool desidrogenase) e usaram-no para transformar células de tabaco, que foram depois regeneradas na planta.

As plantas continham múltiplas cópias do ADH-T — DNA em todas as suas células e eram férteis, mas o gene não se expressou.

d. Transposons

Seqüência do DNA transponíveis tem sido extensivamente estudadas, nos últimos 10 anos, particularmente em bactérias, leveduras, *Drosophila* e vertebrados.

Mas os elementos transponíveis foram descobertos em milho e designados elementos controladores, por McClintock.

Em milho, basicamente existem dois grupos de transposons: **Ds**, que permanecem estacionados dentro de um sítio cromossômico, a não ser que, um segundo elemento, **Ac** esteja presente para produzir a sua movimentação.

CHOUREY & NELSON²¹ observaram que no homocigoto recessivo (*sh*), a enzima, que produz o endosperma *shrunken*, está ausente ou altamente reduzido. Esses mutantes são causados pela inserção do **Ds**, no locus *Sh* e portanto puderam isolar o **Ds**-DNA. Por isolamento e comparação da seqüência genética da região *Sh* do tipo selvagem e dos mutantes, foi possível a detecção das seqüências **Ds**.

e. Pólen

Quando se usa o pólen como vetor para introdução de material genético exógeno, ele é incubado e germinado na presença do material que se pretende introduzir. Este pólen é usado em plantas da mesma espécie. O DNA exógeno, introduzido ou aderido ao pólen é transmitido com o crescimento do tubo polínico.

Durante a fertilização é colocado dentro da célula ovo ou fica circundando os tecidos do embrião jovem. Posteriormente as sementes obtidas são testadas (HESS⁴⁷).

Pólen de *Petunia hybrida* tratado com bacteriófago carregando o gene de β -galactosidase de *E. coli* também foi usado para polinização de flores de *Petunia*. Os controles incluíram o uso de pólen tratado com bacteriófagos que

não continham o gene da β -galactosidase e o DNA homólogo de *Petunia*.

A progênie foi testada para crescimento em lactose agar. Os resultados foram quantitativamente, mas não qualitativamente diferentes, isto é, tanto as plântulas tratadas como as controle, cresceram em lactose agar, porém, aquelas que foram tratadas com fago carregando o gene da β -galactosidase cresceram melhor.

2.1.2. Cultura de tecido

Cultura "in vitro" ou cultura de tecido é um termo que descreve o crescimento e a manipulação de células, órgãos completos ou parte deles, sob condições de nutrientes definidas. Pode ser aplicada em:

a. Obtenção de haplóides

A utilidade de plantas haplóides é baseada na suposição que linhagens endogâmicas homocigotas podem ser obtidas rapidamente através delas.

Até 1966, todos os haplóides disponíveis haviam surgido espontaneamente como um resultado de anormalidades ocorridas durante o processo sexual ou a partir de procedimentos experimentais.

Haplóides podem ser obtidos via cultura de anteras e via eliminação de cromossomos. VASIL¹¹⁹ cita que Yamada et alii, em 1963, foram os pioneiros em isolar plantas haplóides de cultura de anteras de *Tradescantia reflexa*.

Em cultura, os micrósporos passam por vários modos de androgênese que levam à formação de haplóides seja diretamente por embriogênese ou indiretamente, via formação de calos (REINERT & BAJAJ⁹⁵).

Quatro principais padrões de haplóides têm sido descritos:

Célula vegetativa: o núcleo do micrósporo passa por uma mitose normal resultando na formação de uma grande célula vegetativa e uma pequena, generativa. Divisões mitóticas contínuas da célula vegetativa dão origem a embrióides haplóides globulares que são liberados pela ruptura da exina.

Célula generativa: a formação de embrióides haplóides por divisão da célula generativa não é comum.

Célula generativa e vegetativa: embrióides polihaplóides podem formar-se pela fusão de núcleos vegetativos e generativos, em estágios diferentes de replicação do DNA.

Micrósporos: é um dos caminhos mais comuns da androgênese. A mitose do micrósporo resulta na formação de duas células iguais e idênticas. Assim, calos ou embrióides são formados por divisões contínuas de duas células idênticas.

Em cevada, monoplóides podem ser produzidas por hibridização interespecíficas seguida da eliminação de cromossomos. O método, segundo JENSEN⁵³, consiste dos seguintes passos: o gameta feminino da cevada cultivada é fertilizado pelo gameta masculino de *H. bulbosum*. A formação de zigoto e embrião é alta, mas durante esse processo os cromossomos de *H. bulbosum* são eliminados, ficando somente o genótipo de cevada cultivada no embrião. Depois, são cultivados "in vitro" como embriões imaturos. Esses podem dar origem a plantas haplóides com

flores férteis que deixam descendentes homozigóticos que podem sofrer duplicação de cromossomos.

O mecanismo da eliminação preferencial de cromossomos ainda não é bem conhecido. Sugere-se quatro hipóteses para tanto:

A eliminação preferencial poderia ser controlada por um mecanismo genético.

Assincronia no tempo do ciclo mitótico devido a diferenças intrínsecas das espécies.

Anormalidades no fuso ou no centrômero.

O DNA exógeno é reconhecido por uma nuclease e pode ser inativado num sistema semelhante ao que ocorre por restrição em bactérias.

b. Cultura de endosperma e embrião

Em 81% das famílias de plantas, o endosperma é resultado da fusão de três núcleos haplóides, sendo dois núcleos polares e um gameta masculino. Portanto contém um número triploide de cromossomos. Uma vez que este tecido é triploide, as plantas dele originadas também serão triploides.

A idade do endosperma na cultura é crítica para seu crescimento "in vitro". Para milho, trigo e cevada tecidos com menos de oito dias a mais de doze dias após a polinização não crescem em cultura (JOHRI et alii⁵⁴).

Em *Ricinus*, *Zea mays* e *Cucumis* a proliferação de tecido do calo é ilimitada, mas a organogênese não ocorre, embora os calos mostrem grupos de células meristemáticas. A indução de organogênese em culturas de endosperma tem sido sempre procurada, mas conseguida apenas em algumas espécies (JOHRI et alii⁵⁴).

Os mesmos autores citam que culturas prolongadas de calos de endosperma mostraram células com diferentes níveis de ploidia. Ocorrência de aneuploidia e poliploidia foi observada em cultura de endosperma de milho, *Lilium*, *Croton* e *Jatropha*.

A excisão de embriões de óvulos e de sementes de plantas superiores e seu cultivo em meio definido, permite investigar os fatores que influenciam o crescimento embriônico sob condições controlada e, por conseqüência, definir a composição química do meio do saco embrionário.

A cultura de embrião pode ser dividida em duas categorias: cultura de embriões de sementes relativamente maduras e diferenciadas e cultura de proembriões. A cultura de embriões de sementes objetiva analisar os vários parâmetros do crescimento embriônico e os aspectos metabólicos e bioquímicos da dormência e germinação. A cultura de proembriões objetiva entender o controle da diferenciação e os requerimentos nutricionais progressivos de pequenos embriões (RAGHAVAN⁹⁴).

Do ponto de vista prático, informações obtidas de culturas de embriões "in vitro" abriram o caminho para a obtenção de plantas a partir de híbridos inviáveis e também sobrepuseram o tradicional tratamento de dormência e aceleraram a germinação em certos tipos de sementes.

RAGHAVAN⁹³ cita que foi Laibach, em 1929, o pioneiro em demonstrar o desenvolvimento da cultura de embrião como instrumento de pesquisa. Utilizou embriões

do cruzamento interespecífico de *Lilium perenne* e *L. austriacum*.

A obtenção de plantas resistentes à doenças também tem sido buscada na hibridização interespecífica e posterior desenvolvimento de tais embriões em cultura. Isto tem sido feito, por exemplo, em tomate (*L. esculentum*) que é, geralmente suscetível a fungos, vírus e nematóides e *L. peruvianum*, espécie selvagem com resistência variada a esses agentes (RAGHAVAN⁹³).

A cultura de embrião pode também ser uma técnica utilizável nos cruzamentos intergenéticos.

A possibilidade de formar "seedlings" de plantas que são tradicionalmente propagadas por meios vegetativos também tem sido explorada através da cultura de embrião. *Musa balbisiana* é um parente selvagem da banana comercial e suas sementes não germinam. Contudo, se os embriões são excisados e colocados em meio de cultura, os "seedlings" rapidamente se desenvolvem (COX et alii^{2,3}).

c. Polinização intraovariana e "in vitro"

Em muitas espécies, obstáculos presentes no estigma ou estilo tornam impossível o crescimento do tubo polínico. Métodos de polinização intraovariana, polinização e fertilização em tubos de ensaio, tentam contornar esta barreira.

KANTA et alii⁵⁷ tiveram sucesso ao conduzirem polinização intraovariana com *Papaver rhoeas*, *P. sommiferum*, *Eschscholzia californica*, *Argemone mexicana* e *A. ochroleuca*. As anteras foram removidas e os botões florais cobertos para evitar polinização. Suspensão de pólen foi preparada em ácido bórico a 1%. A parede do ovário foi perfurada com seringa e a suspensão de pólen foi injetada. Alguns grãos de pólen germinaram e alguns tubos polínicos atingiram a micrópila. A fertilização ocorreu e sementes normais se desenvolveram.

A técnica mais sofisticada de autopolinização "in vitro" é a inoculação de óvulos ou óvulos associados à placenta. Em ambos os casos, os óvulos transferidos são mais tarde diretamente polinizados. A eficiência desta técnica depende da composição do meio que promove a fertilização e o desenvolvimento do embrião e do endosperma.

Os botões florais são emasculados e o pólen é coletado sob condições assépticas. Os ovários são esterilizados e os óvulos excisados e transferidos para um meio. Em muitos casos é aconselhável inocular os óvulos ainda ligados à placenta, pois isto previne a injúria do óvulo e também assegura um melhor suprimento de substâncias nutritivas.

Através da polinização "in vitro" pode-se também originar híbridos interespecíficos e intergenéticos.

A técnica da polinização "in vitro" também vem sendo usada para superar a auto-incompatibilidade.

ZENKTELER¹³⁴ cita o trabalho de Rangaswam e Shivanna, feito em 1971, conduzido em *Petunia axillaris* auto-incompatíveis. Estes autores cultivaram ovários inteiros com a massa de óvulos nas placentas intactas. Subseqüentemente à polinização placentar, muitos óvulos foram fertilizados e, durante os próximos 24 dias, sementes contendo embriões adultos e endosperma normal foram forma-

das. A partir destas sementes diplóides, plantas férteis e auto-incompatíveis foram formadas.

d. Propagação clonal

A propagação clonal de plantas é baseada no conceito de totipotência, ou seja, qualquer parte da planta pode ser dissecada em pequenos fragmentos e estes mantêm a capacidade para formar plantas inteiras.

VASIL & VASIL¹²⁰ citam três principais métodos para a regeneração de plantas "in vitro": formação de meristemas adventícios, formação de botões axilares, embriões adventícios ou formação de embriões.

A formação de meristemas adventícios é que levam à organização de meristemas de raiz ou caule. Os primórdios surgem de um pequeno grupo de células que se desenvolvem em raízes ou caules. Os primórdios podem ser formados a partir de células da superfície ou do interior do tecido do calo. A determinação da formação de raiz ou de caule depende do balanço citocinina/auxina.

Embora um número ilimitado de plantas possa ser rapidamente regenerado por este procedimento, nem todas as espécies respondem ao estímulo hormonal para organogênese. Também pode ocorrer formação de plantas anormais, havendo alta frequência de poliplóides e aneuplóides em culturas de calos.

A segunda técnica é baseada na formação de botões axilares no eixo de folhas jovens ou primórdios foliares. É um processo não tão rápido quanto a formação de meristemas adventícios ou embriões, mas é o procedimento usado na cultura de tecido de propagação comercial. Todas as plantas formadas por este método são geneticamente uniformes, pois surgem diretamente a partir de meristemas pré-existentes ou recém-formados, sem a intervenção do estágio de calo.

Em muitas espécies, embriões adventícios surgem a partir de células vegetativas ou reprodutivas apomiticamente, como uma alternativa à reprodução sexual. Esta estrutura recebe o nome de embrião.

A produção mais prolífica de embriões em cultura de tecidos ocorre em culturas de embriões jovens ou maduros, mas culturas de pecíolo de folha, raízes, células do mesófilo, protoplastos, eixos florais, etc, também embriões.

Os embriões são formados por repetidas divisões mitóticas de células individuais, geralmente localizadas na superfície do calo, ou nas células periféricas da massa celular da cultura em suspensão.

A formação de embriões é limitada a um número pequeno de espécies, mas estas são de suficiente diversidade taxonômica para indicar que, com um melhor entendimento de requerimentos hormonais e nutricionais, esta técnica possa um dia ser amplamente aplicável.

e. Variação Somaclonal

A cultura de tecido é considerada como um método sofisticado e rápido de propagação assexual, o que originaria, teoricamente, cópias exatas da planta parental. Entretanto, variantes fenotípicas são frequentemente observadas entre plantas regeneradas.

LARKIN & SCOWCROFT⁶⁴ propõem o termo variação

somaclonal à variação observada entre plantas derivadas de qualquer forma de cultura de células. Cópias exatas da planta parental ocorre quando a multiplicação é feita a partir do desenvolvimento direto de gemas axilares ou apicais. Neste caso, todas as plantas desenvolvidas, via de regra, são cópias exatas da planta parental. Contudo, quando a formação de brotos se dá a partir de calos, frequentemente ocorrem variantes fenotípicas entre as plantas regeneradas. A frequência destes tipos aberrantes aumenta com a duração do tempo em que o calo é mantido "in vitro".

SCOWCROFT¹⁰⁵ salienta que pode-se esperar uma frequência de variação somaclonal muito maior que aquela onde o propágulo é uma semente, pois nas espécies que se reproduzem sexualmente a gametogênese e a fertilização eliminam as anormalidades cromossômicas que porventura ocorram.

A escolha do explante e o modo em que ele é conservado pode ter um efeito significativo na quantidade de variação gerada. Este pode ser um dos aspectos mais cruciais da cultura de tecido para minimizar a variação para os propósitos da conservação de germoplasma "in vitro".

Algumas fontes de explante e modos de produção de plantas "in vitro", como por exemplo, caules adventícios de explantes de pecíolos e folhas, minimizam a variação da fase de calo.

A cultura de meristemas isolados parece que é a melhor opção para minimizar a variação na cultura. SCHWARTS et alii¹⁰³ usando propagação rápida a partir de meristemas de estolões de moranguinho avaliaram 500 plantas de três cultivares. As variantes incluíram tipos compactos e fêmeas estéreis.

Até o momento, os possíveis mecanismos de variação somaclonal são ainda especulativos. Em algumas culturas os variantes entre os somaclones são conseqüências de mudanças grosseiras no cariótipo, tais como aneuploidia e poliploidia. Na verdade, alterações grosseiras no cariótipo tem, frequentemente, sido observadas em cultura de tecidos.

Em contraste a mudanças grosseiras em número de cromossomos, rearranjos cromossômicos podem ser responsáveis pela variação genética em células cultivadas.

LARKIN & SCOWCROFT⁶⁴ mostram que quebras cromossômicas, translocações, cromossomos multicêntricos têm sido observados em muitos variantes somaclonais. Tais rearranjos cromossômicos podem resultar em variantes fenotípicas.

Outro mecanismo que pode provocar a variação são eventos de transposição. O ambiente da cultura de tecido pode ser altamente favorável para a transposição de seqüências de DNA (LARKIN & SCOWCROFT⁶⁴).

Os mesmos autores admitem que parte da variação somaclonal pode ser explicada em termos de crossing-over somático, que ocorre em células de cultura de tecidos.

2.1.3. Cultura de células e protoplastos

As células dos tecidos podem em meio de cultura, pela influência dos hormônios, dividirem-se e crescerem sem uma organização e especialização definida, dando origem a calos. Estes calos, quando inoculados, produzem

suspensões celulares de células individuais ou de pequenos agregados de células. Uma suspensão obtida pela inoculação de um calo em meio líquido pode ser considerada como sendo uma linhagem celular quando é cultivada em meio líquido fresco.

Quando o tecido diferenciado é induzido a formar calos, acontecem mudanças genéticas. Assim, é possível submeter uma grande população celular a stress físico, químico ou biológico, com a finalidade de selecionar células com as características de resistência a fatores ambientais adversos. Subseqüentemente, pode-se induzir a formação de plantas completas que possuam a característica selecionada ao nível celular (OCHOA-ALEJO⁸³).

Clones de células únicas têm sido usadas também para estudos de crescimento celular, diferenciação, detalhes celulares morfológicos e interações parasita-hospedeiro.

Um dos mais significantes desenvolvimentos no campo da cultura de tecidos, durante os últimos anos, tem sido o isolamento, a cultura e a fusão de protoplastos.

As desvantagens inerentes aos métodos mecânicos do isolamento de protoplastos foram superadas pelo uso, da enzima celulase extraída do fungo *Myrothecium verrucaria*, em isolamento de protoplastos inicialmente, de raízes de tomate.

Como fonte de protoplasto tem-se usado pontas de raízes de "seedling", tecido locular de frutos, folhas, ápices de caules, frutos, raízes, nódulos de raízes, camada de aleurona de grãos de cereais, células mães de micrósoros, micrósoros, tubo polínico. Entretanto a fonte mais comum de protoplastos é o tecido de mesófilo da folha (VASIL & VASIL¹²⁰).

Após o isolamento dos protoplastos e transferência deste para meio contendo todos os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, os protoplastos iniciam a regeneração da parede celular que é considerada como um pré-requisito para a mitose, posteriormente formam colônias que podem ser subcultivadas como cultura de calos. Por diferenciação do calo pode-se obter plantas íntegras (BAJAJ⁸).

A maioria das espécies regeneráveis a partir de protoplastos, pertence à família Solanaceae. Para que esta tecnologia tenha realmente utilidade, para o melhoramento de plantas, é essencial que se consiga regenerar leguminosas e cereais, os dois grupos de plantas mais importantes para a alimentação.

A produção de híbridos somáticos entre espécies que são sexualmente incompatíveis podem ser obtidos através da fusão de protoplastos.

BAJAJ⁸ ressalta que a hibridização somática, em plantas, leva desvantagens sobre a hibridização somática em animais, pois a célula híbrida pode originar uma planta intacta, enquanto que em animais, isto ainda não é possível, como no caso de células híbridas de homem-camundongo.

A fusão de protoplasto, rotineiramente, tem sido feita usando íons Ca⁺⁺, em baixas concentrações e polietileno-glicol (PEG) como molécula aglutinante.

O processo de seleção de híbridos somáticos tem sido, em geral, dificultado pela ausência de mutantes.

Uma das formas de selecionar é através do uso de micros-

cópio ótico (POWER & COCKING⁹⁰). Outro método é através de marcas nutricionais (CARLSON et alii¹⁸), onde, por exemplo, protoplastos híbridos anfidiplóides entre *Nicotiana glauca* e *N. longsdorfii* são capazes de crescer em cultura onde os protoplastos parentais não são.

Em mamíferos, células híbridas somáticas podem ser obtidas rapidamente se as células parentais utilizadas possuírem marcadores como resistência a drogas, mutantes auxotróficos, nutricionais ou temperatura sensíveis (POWER & COCKING⁹⁰).

Segundo MARX⁷⁰, em hibridização de célula animal três resultados podem ocorrer:

O fenótipo de um dos pais não ser expressivo.

O fenótipo dos dois pais ser expresso.

Ativação de um fenótipo que não era expresso em nenhum dos pais.

Na célula híbrida homem-camundongo, há uma eliminação completa dos cromossomos humanos.

Quando se fala em fusão de protoplastos, não se deve pensar unicamente na fusão de núcleos geneticamente diferentes.

SCHIEDER & VASIL¹⁰² realizaram vários experimentos de fusão de protoplastos em tabaco usando mutantes plastidiais em relação à síntese de clorofila e macho esterilidade citoplasmática onde verificaram a formação de "cibrids", ou seja, citoplasmas híbridos, onde genes citoplasmáticos foram combinados, mostrando que através da fusão de protoplastos pode também ocorrer interação do material genético citoplasmático.

2.1.4. Inseminação artificial

A inseminação artificial vem sendo mais comumente aplicada desde a década de 50. Seu uso para gado de leite obteve pleno sucesso e tem sido amplamente usada, já para o gado de corte, seu uso tem sido menos intenso.

Até a metade da década de 50 o sêmen era estocado a 5°C, esta estocagem permitia uma satisfatória fertilidade até cerca de dois dias após a colheita.

Dois novos métodos foram desenvolvidos como o uso de tampão com CO₂, conseguindo-se uma frequência de concepção boa até três a cinco dias após a colheita. Outro método foi a adição de 10% de glicerol, mantendo a temperatura à 5°C. Tanto CO₂ como o glicerol manteve a frequência de concepção do sêmen, usado no terceiro ou quarto dia após a colheita. Inclusão de ácido capróico em tampão de citrato mais nitrogênio é usado até hoje na Nova Zelândia.

Segundo AMANN & SCHANBACKER⁶, a situação da inseminação artificial em ovelhas, cavalos e suínos é bem diferente da situação em bovinos, devido ao número de fêmeas que podem ser inseminadas com uma ejaculação.

Em bovino, um número considerável de fêmeas podem ser inseminadas com apenas uma ejaculação. Em porco, carneiro e garanhão somente cinco a cinquenta fêmeas por ejaculação é possível inseminar. Isto tem reduzido o potencial genético e econômico da inseminação artificial nestas espécies.

Com o advento do congelamento do sêmen, surgiu a produção em larga escala, revolucionando as técnicas de

melhoramento animal. Inicialmente a conservação foi feita em ampolas de 1ml congelado e estocado em álcool e CO₂.

Entretanto a disseminação da técnica e a exportação do sêmem somente ocorreu após o desenvolvimento do uso do nitrogênio líquido, que produz temperatura até -196°C, dando uma frequência de concepção muito maior do que quando estocado em álcool, onde era conseguido temperatura mínima de -79°C.

A introdução de pallets, em 1964, para o armazenamento do sêmem, resultou numa maior eficiência de estocagem, reduzindo a perda de esperma durante a inseminação e aumentando ligeiramente a frequência de concepção (PICKETT & BERNDTSON⁸⁸). Hoje o sêmem é embalado em pallets de 0,25ml e 0,5ml.

AMANN & SCHANBACKER⁹ salientam que por melhor que seja o processo de congelamento e descongelamento, cerca de 20% dos espermatozoides perdem a mobilidade. Isto se deve provavelmente a interação de dois fatores físicos:

a. formação de cristais de gelo que danificam o espermatozoide.

b. aumento na concentração, por ocorrer perda de água pela cristalização do solvente extracelular.

A inseminação artificial é usada em primeiro plano para a produção de machos superiores e num segundo plano, para obtenção de fêmeas mais produtivas, principalmente em bovino leiteiro, sendo também potencialmente vantajosa para bovino de corte.

O maior problema que envolve a produção de reprodutor, é o alto custo da identificação de germoplasmas superiores. O método usado para identificar genótipos superiores é o teste de progênie, que envolve muitos animais e muito tempo.

As principais dificuldades para o desenvolvimento de um efetivo teste de progênie, em gado são:

a. O teste de progênie de um único touro envolve cinco anos ou mais.

b. É essencial a identificação precisa, permanente, de toda a progênie, de todos os touros testados.

c. A melhor performance deve ser tomada de uma amostra ao acaso, da progênie.

d. Deve-se registrar a performance de progênies grandes para que o erro de amostragem seja baixo.

e. Um grande número de touros não aparentados devem ser testados, de modo que a seleção intensa entre eles não restrinja seriamente a base genética.

Segundo McDANIEL & DENTINE⁷², o ganho genético na produção de leite por monta não excede 0,5 à 0,6% ao ano, usando a inseminação artificial esse ganho é superior à 2% ao ano. Entretanto esse ganho genético só é possível se antes houver precisa e intensa seleção.

A inseminação artificial, combinada com a análise dos registros e subsequente seleção é provavelmente a metodologia mais poderosa disponível para muitos aspectos do melhoramento animal.

2.1.5. Superovulação

O aumento da taxa de ovulação pode ser produzido por

vários tratamentos com gonadotrofina.

Segundo RUTLEDGE & SEIDEL⁹⁸, o método para superovulação varia com a espécie, mas há indicações que os óvulos, produzidos por esta técnica, são diferentes em alguns aspectos, dos óvulos vindos de ovulação natural.

Os autores mencionam que outro método alternativo seria a digestão enzimática do ovário e subsequente retirada de milhares de ovócitos. Tais ovócitos são imaturos,

Pela superovulação, uma mãe com acentuado desempenho em uma característica, pode produzir, uma progênie grande, num único tempo de gestação, usando fêmeas comuns como receptora desses óvulos, assim a progênie dessas vacas superiores, durante a sua vida reprodutiva seria extremamente incrementada.

LERNER et alii⁶⁵ descrevem os efeitos da idade do doador e outros fatores na superovulação.

As doadoras analisadas foram 339 vacas holandesas, com idade variando de 1,8 anos à 17,8 anos. 987 embriões também foram analisados.

Observaram que o número de embriões, a taxa de fertilização, a qualidade dos embriões e o número de embriões passíveis de transferência, diminuiu com o aumento da idade da doadora.

Entre as doadoras mais velhas, o aumento da dose do hormônio folículo estimulante (FSH) associou-se ao aumento no número de embriões. Entretanto entre as doadoras mais jovens o aumento da dose de FSH tem efeito negativo.

Os autores concluem que o aumento da idade da doadora tem influência negativa no sucesso da superovulação e na produção de embriões transferíveis e que a resposta ao FSH foi afetada pela idade da doadora.

2.1.6. Sincronização do estrógeno

Essa técnica vem sendo usada mais intensamente, já há alguns anos por produtores de suínos.

Segundo RUTLEDGE & SEIDEL⁹⁸, a lactação inibe o estrógeno e a maioria das fêmeas, em suínos, exibem o cio cinco a sete dias após a desmama. Assim, as porcas podem ser sincronizadas no que diz respeito ao comportamento do estrógeno. Como a variação no tempo de gestação é pequeno, isso proporciona um instrumento excelente para a programação de partos.

A metodologia para sincronizar o cio em gado de corte, vem sendo intensamente estudada com sucesso, o que permitirá uma maior difusão do uso da inseminação artificial. Em gado de leite a sincronização do estrógeno evita o problema da detecção do cio.

Segundo os autores, as pesquisas neste campo tem levado a outros métodos como o uso de prostaglandina F_{2α} como hormônio luteolítico.

A sincronização do estrógeno, em ovelhas, é amplamente praticada na Europa, usando a progesterona e tem sido uma ferramenta valiosa particularmente em sistemas de manejo intensivo.

2.1.7. Micromanipulação

O avanço nos estudos da organização, regulação, transcrição e tradução genética em eucariotos, vem proporcio-

nando progresso no melhoramento animal, principalmente permitindo o entendimento da base genética de certos fenômenos, como a heterose.

Um dos mais excitantes progressos tem ocorrido na metodologia de transferência de genes selecionados, entre espécies e até gêneros diferentes. A tecnologia do DNA recombinante permite identificar, isolar, purificar e multiplicar genes específicos.

A injeção de DNA em pronúcleos tem sido feita com relativo sucesso.

Segundo BRADFORD¹², a lista dos genes potencialmente transferíveis, em animais domésticos, ainda é pequeno. O mesmo autor descreveu os efeitos de um gene, em camundongo, que resultou no aumento da taxa de crescimento. O efeito desse alelo em animais domésticos poderia ser interessante.

O gene Booroola, importante por variar frequência de gêmeos em ovelhas, representa um potencial para transferência inter e intraespecífica.

Em cultura de tecido animal, fragmentos de DNA podem ser estavelmente introduzidos, por microinjeção, usando micropipeta com um diâmetro extremamente reduzido (0,1 a 0,5 microns). Esta técnica requer micromanipulador, afim de se posicionar corretamente a célula para a injeção.

Segundo WATSON et alii¹²⁵, uma vez dominada a técnica é possível injetar 500 à 1000 células por hora, obtendo em 50% das células injetadas o gene estavelmente integrado e se expressando.

A vantagem desse procedimento é que, em princípio, qualquer fragmento de DNA pode ser introduzido em qualquer célula, a desvantagem é o equipamento e a prática necessária.

Para a introdução em camundongos, o DNA do doador é fragmentado com enzimas de restrição, até obter fragmentos de tamanhos estáveis. O fragmento é ligado a um vetor, geralmente o pBR322 e posteriormente é transferido. Pode-se construir um banco desses fragmentos, usando fago ou cosmídios.

Para o resgate do gene transferido o primeiro passo é encontrar as enzimas de restrição que não clivem o gene transferido. Uma vez identificadas, o DNA é cortado e ligado ao pBR322, possuindo uma marca para resistência à droga.

Esse DNA pode ser introduzido nas células de camundongos e o DNA dos transformantes é usado para uma segunda transformação. A população total de DNA é usada para transformar *E. coli*. somente os transformantes contendo a marca de resistência à droga são selecionados, pois são os que contém o gene eucariótico.

WATSON et alii¹²⁵ lembram que a capacidade para introduzir qualquer pedaço de DNA nas células de mamíferos permite a identificação de seqüências de DNA responsáveis pelo controle da expressão de certos genes eucarióticos.

Geralmente, quando um gene clonado é introduzido em células eucarióticas, ele continua a responder ao sinal que normalmente controla a expressão do gene "in vivo". Como em procariotos, o controle da transcrição de genes

eucarióticos age através de elementos como os promotores, que normalmente estão bem próximos de seus respectivos genes, e produzem elementos que se ligam a elementos controladores que ativam e desativam os genes.

Alguns genes eucarióticos, por exemplo, são controlados por hormônios tipo esteróides. A transcrição do genoma do vírus de tumor de mama (MMTV), em camundongos é controlado por glicocorticóide. Quando o vírus é introduzido em células de camundongos que contém o receptor para este hormônio, continua a responder e a transcrição do gene transferido aumenta cinco a dez vezes, por adição de hormônios.

2.1.8. Transplante e conservação de embriões

A ênfase maior da técnica de transferência de embrião tem sido dada em gado de leite, onde essa tecnologia permite aumentar a taxa de reprodução das fêmeas.

A transferência de embrião também é praticada em ovelhas, cabras, suínos e eqüinos, mas em proporções menores. Em suínos, a transferência de embrião, tem sido usada principalmente para introduzir variabilidade, uma vez que esses rebanhos são muito fechados.

É necessário salientar que a transferência de embrião associada à inseminação artificial, são técnicas auxiliares ao melhoramento genético, isto é, elas por si só, não promovem o ganho genético, devem estar sempre associadas a um programa de seleção adequado.

A taxa de reprodução relativamente baixa, em bovinos, determina um progresso genético necessariamente lento, mais lento do que o progresso que se pode obter com espécies mais prolíficas, como suínos. O transplante de embrião contribui para aumentar as taxas do potencial reprodutivo das fêmeas.

McDANIEL & DENTINE⁷² citam três fatores que levam ao aumento do ganho genético, através do transplante de embrião:

1. Produção de touros melhores para uso na inseminação artificial.
2. Produção de fêmeas de substituição.
3. Teste de progênie de mães, uma vez que tradicionalmente se faz teste de progênie de machos, que poderá então ser usada para produzir fêmeas de substituição e touros jovens.

Os mesmos autores apontam os usos principais desta técnica:

1. Determinação da melhor raça ou combinações de raças, para um ambiente específico.
2. Produção de machos de projeção.
3. Introdução de características citoplasmáticas desejáveis.

A razão do primeiro item é que raças resultantes da introdução de novas raças geralmente leva à heterose. O uso de embriões exóticos ou de raças melhoradas desenvolvidas, no útero de várias fêmeas pode propiciar uma rápida avaliação do total da raça produzida.

O terceiro item foi listado porque, existem algumas evidências que DNA citoplasmático afeta a eficiência, em animais. O transplante de embrião é um dos únicos caminhos para multiplicar tal material.

Teoricamente o transplante de embrião pode difundir mais rapidamente genótipos produtores de fenótipos raros, como alta proporção de proteína/gordura, pode aumentar a intensidade de seleção de fêmeas e pode melhorar a precisão da seleção através do teste de progênie das fêmeas.

A vantagem de maior impacto desta técnica é uma distribuição mais intensiva do número de filhos de vacas elites. Ao invés de um ou dois filhos (machos) de uma vaca elite, pode obter-se 10 à 20 filhos e assim uma progênie maior desses filhos ser testada, no mesmo espaço de tempo. Portanto, de certa forma, o intervalo de geração é reduzido, pois permite que as fêmeas produzam vários filhos ao mesmo tempo.

Segundo RUTLEDGE & SEIDEL⁹⁸, a cultura "in vitro" permite estocar os embriões por alguns dias apenas, por mais tempo é necessário temperaturas muito baixas, chegando a -270°C .

A criopreservação de esperma e embriões terá no futuro um inestimável valor, por preservar material genético de animais que poderão se extinguir.

2.1.9. Sexagem

A modificação da frequência de formação dos sexos, na espécie humana e animais domésticos tem um profundo impacto social e econômico.

A técnica da sexagem não tem evoluído muito devido a dificuldade em se identificar diferenças que possam servir para a inativação preferencial de espermatozoides.

Como ressalta PINKEL et alii⁸⁹, ainda que vários métodos físicos, fisiológicos e bioquímicos tenham sido propostos, nenhum demonstrou ainda total eficácia. A única diferença conhecida para separar os espermatozoides é a constituição cromossômica.

Tipicamente os cromossomos X e Y diferem em conteúdo de DNA, resultando numa diferença de 3 a 4% entre espermatozoides carregando o cromossomo X ou Y, no homem e animais domésticos.

PINKEL et alii⁸⁹ desenvolveram um trabalho usando a técnica de citometria de fluxo, que é precisa o suficiente para determinar essa diferença, desde que adaptada adequadamente.

Entretanto essa técnica, para identificar a diferença de 3 a 4% de DNA, requer a descondensação dos cromossomos, usando enzimas proteolíticas. Essa preparação, portanto, inviabiliza os espermatozoides.

RUTLEDGE & SEIDEL⁹⁸ descrevem outra metodologia onde o espermatozoide carregando o Y pode ser reconhecido por fluorescência. Esse método também mata os espermatozoides.

Um outro método envolve a biópsia dos embriões. Pode-se posteriormente fazer cariótipo ou identificar embriões machos com o uso do antígeno H-Y (WHITE et alii¹²⁸). A precisão do método de biópsia depende da qualidade das matáfases conseguidas, mas o procedimento é de alto custo e consome tempo.

KEITH & LEWIN⁶⁰ acham que a técnica mais promissora é a produção de anticorpo monoclonal, para o antígeno H-Y. Eles poderiam ser usados para selecionar embriões de um sexo. No entanto para que essa metodolo-

gia seja disponível para rotina é necessário determinar a sua viabilidade e precisão sob condições de campo.

2.1.10. Conclusão

A lista das características que podem ser usadas na engenharia genética de plantas, inclui caracteres como resistência a doenças e herbicidas, aumento da capacidade fotossintética, capacidade para fixar o nitrogênio, tolerância a secas, aumento da qualidade nutricional das proteínas, etc. Mas para tanto é necessário se conhecer mais sobre a bioquímica e fisiologia dos genes, pois isso é fator limitante na integração e expressão de DNA exógenos.

A cultura de tecido, a clonagem de genes e o uso do plasmídeo Ti, já podem ser usados comercialmente.

É importante salientar que para o melhorista de plantas, as técnicas para a inserção de DNA tem méritos especiais. Se for possível "criar" muitas plantas, transformadas, com um amplo espectro de variação por inserção de DNA, variedades melhores poderão ser conseguidas, em menos tempo.

A cultura de tecido e célula tem contribuído, à passos largos, para o conhecimento em muitas áreas básicas como diferenciação, divisão celular, nutrição celular, metabolismo e preservação celular. Vem possibilitando também a regeneração e propagação de plantas de importância econômica.

A cultura de embrião, ovário, óvulos e a polinização "in vitro" tem sido usada para sobrepor as barreiras da esterilidade e incompatibilidade. Contudo, a tecnologia de produção de haplóides e produção de híbridos somáticos, através da fusão de protoplastos, não tem alcançado comparável desenvolvimento.

Por outro lado, até o momento, na pecuária, a biotecnologia, como técnicas de melhoramento genético é muito mais restrita do que na agricultura.

É necessário observar que várias tecnologias devem ser usadas ao mesmo tempo, como instrumento na intensificação do melhoramento animal.

O melhor exemplo desse sinergismo vem do impacto que causou a inseminação artificial. Rapidamente a indústria absorveu a tecnologia do sêmen congelado, entretanto do ponto de vista genético os resultados iniciais da inseminação artificial foram desapontadores, porque os touros disponíveis vinham de um único ou alguns poucos rebanhos.

Os geneticistas desenvolveram maneiras de se avaliar melhor os touros, através de métodos estatísticos-genéticos, de maneira que hoje a inseminação artificial ajuda a avaliar tanto machos como fêmeas.

Outro sinergismo característico é o que ocorre na transferência de embriões. Essa tecnologia tem vários passos distintos: primeiro as fêmeas e touros superiores são identificado, depois a doadora e receptoras são preparadas para a transferência. Esse passo envolve a superovulação da doadora e a sincronização do estrógeno das receptoras. Posteriormente a doadora é inseminada artificialmente e, finalmente os embriões são coletados e transferidos. Outras tecnologias devem ainda serem incorporadas, como a sexagem.

Já a introdução de DNA exógeno em animais vem sendo

feita, mas com limitado sucesso. Se na agricultura o entendimento da regulação gênica é necessário, para o sucesso desta técnica, muito mais em animais, onde o balanço gênico é extremamente delicado.

Além disto, a presença de seqüências de DNA procarióticas (necessárias para a clonagem) no DNA introduzido reduz, em animais, a expressão de genes ligados.

Outro problema sério, na pecuária, é o efeito negativo de alguns genes introduzidos, sobre a fertilidade. O entendimento desse fenômeno é essencial para se implantar a introdução de genes.

Deste modo deve-se ressaltar que essas tecnologias são ferramentas poderosas para o melhoramento animal, mas sozinhas não promovem absolutamente o ganho genético, devendo necessariamente estarem associadas a um bom programa de seleção.

2.2. Produtos na agricultura

2.2.1. Controle biológico de insetos

O uso indiscriminado de pesticidas por anos consecutivos vem acarretando problemas cada vez mais sérios para a agricultura mundial.

CAMERON¹⁶ salienta o fato de que o uso abusivo de produtos químicos afeta negativamente não apenas a população humana, mas também organismos que naturalmente auxiliam na redução de pragas que prejudicam lavouras de importantes culturas. Assim, um produto químico utilizado de maneira não racional contra determinada praga, pode eliminar também inimigos naturais dessa praga (insetos úteis) que agora livre dos mesmos, vão poder multiplicar-se mais rapidamente.

Outros problemas do uso de pesticidas vem com a resistência dos insetos, que vai sendo progressivamente selecionada, bem como os efeitos residuais e a poluição ambiental.

O produto químico também pode favorecer populações de insetos considerados pragas secundárias, que poderá causar problemas pela redução ou eliminação de seus inimigos naturais.

O controle biológico tem suas raízes nos estudos de patologia de insetos e hoje o controle microbiano é a principal meta da patologia de insetos e representa um ramo, talvez o mais prolífico, do controle biológico de insetos. Esse controle representa a utilização racional dos patógenos visando a manutenção da população de pragas a níveis não econômicos.

Apesar do avanço do controle biológico verificado nos últimos anos é importante mencionar que os microrganismos entomopatogênicos não devem ser considerados como os únicos agentes de controle de insetos. Ele deverá fazer parte de um conjunto de medidas que, atuando em harmonia com o ambiente, sejam eficazes na redução da população dos insetos pragas a níveis não econômicos.

2.2.1.1. Vírus

Segundo TINSLEY & KELLY¹¹⁵, os vírus patogênicos a insetos podem ser classificados em:

- Família Baculoviridae. Gênero Baculovirus e Oryctes. Entre os Baculovirus temos os da poliedrose nucleares e das granuloses. Todos possuem DNA fita dupla, como ma-

terial genético. Os baculovirus possuem corpo de inclusão, o Oryctes não possui.

- Família Poxviridae. Gênero Entomopoxvirus. Possui DNA fita dupla como material genético e o corpo de inclusão.

- Família Reoviridae. Gênero Poliedrose citoplasmática. Possui RNA fita dupla como material genético e corpo de inclusão.

- Família Iridoviridae. Gênero Iridovirus. Possui DNA fita dupla como material genético e não possui corpo de inclusão.

- Família Parvoviridae. Gênero Densovirus. Possui DNA fita simples como material genético e não possui corpo de inclusão.

- Família Picornaviridae. Gênero Enterovirus. Possui RNA fita simples como material genético e não possui corpo de inclusão.

- Família Nodaviridae. Gênero Nodavirus. Possui RNA fita simples como material genético e não possui corpo de inclusão.

- Família Rhabdoviridae. Gênero Sigmavirus. Possui fita simples como material genético e não possui corpo de inclusão.

Os vírus tem grande potencial para serem utilizados como inseticidas biológicos desde que o fato deles não se multiplicarem em meio de cultura seja superado pela cultura de células "in vitro".

Os baculovirus tem sido os mais usados em controle biológico por serem altamente específicos para invertebrados além de apresentarem boa estabilidade e eficiência quando aplicados no campo visando o controle de pragas, mas os vírus da poliedrose citoplasmática (CPV) também vêm sendo usados ALVES². Segundo esse mesmo autor, os vírus da poliedrose nuclear (NPV) podem ocorrer em ortópteros, neurópteros, tricópteros, coleópteros, himenópteros e lepidópteros. Os vírus da granulose (GV) são específicos de lepidópteros e os CPV ocorrem normalmente em lepidópteros, podendo também atacar dípteros, himenópteros e coleópteros. Podem ser usados em culturas de importância agrícola e em florestas.

As formulações à base de vírus mais conhecidas no mercado americano são Elcar e Biotrol - VHZ, formulado com o *Baculovirus heliothis* para controle de diversas espécies de *Heliothis*. Na Rússia o *Baculovirus* de *Limantria dispar* foi registrado para controle dessa praga em florestas.

Segundo STOCKDALE & PRISTON¹¹³, o crescimento de vírus em cultura de tecidos pode chegar a ser otimizado para ser produzido aproveitando os métodos disponíveis na indústria de fermentação, além de se conseguir com a cultura "in vitro", o vírus purificado, livre de bactérias, restos da larva e mesmo outros vírus, que existem na produção "in vivo". Entretanto o alto custo desta técnica tem sido fator limitante para o seu uso em escala comercial, que não existe até o momento.

Linhagens permanentes de células, derivadas de tecidos do inseto *Antheraea eucalypti*, deram origem às primeiras culturas (GRACE³⁹). Daí para frente um número grande de linhagens de células de artrópodos vem sendo estabelecidas.

Algumas dessas linhagens permitem o crescimento de um ou mais vírus.

As linhagens de células de lepidópteros têm sido as mais pesquisadas por permitir o crescimento de NPV, CPV e GV e inclui culturas de tecidos de *Trichoplusia ni*, *Autographa californica*, *Spodoptera frugiperda*, etc.

Segundo SHERMAN¹⁰⁷, o material usado para cultura geralmente são ovos ou larvas dos estágios iniciais que são esterilizadas superficialmente com hipoclorito ou álcool, depois maceradas e seus tecidos são então dissolvidos com enzimas, como tripsina. Esse produto é plaqueado em pequena quantidade de meio contendo soro bovino fetal e antibiótico. Faz-se posteriormente sub-culturas até estabelecer uma linhagem celular. Pode-se diluir para selecionar clones específicos que mostrem maior eficiência para a produção do vírus.

Essa eficiência, apesar de não bem entendida ainda, existe, obrigando o desenvolvimento de várias linhagens de células de órgãos diferentes, da mesma espécie de inseto, pois nem todas permitem a replicação do NPV.

Por outro lado, algumas mas nem todas as linhagens de células, permitem o crescimento somente do NPV da espécie de inseto do qual ele é derivada. Os GV e o vírus *Oryctes* representam os extremos. Os GVs aparentemente, são altamente específicos e nenhuma das linhagens celulares disponíveis replicam este vírus. Já o *Oryctes* replicou em linhagem de células de três diferentes ordens: Coleóptera, Lepidóptera e Díptera (KELLY⁶¹).

Como já salientado, a cultura de tecido não tem sido usada para a produção comercial. Essa produção tem sido realizada exclusivamente sobre os insetos hospedeiros ou ocasionalmente sobre hospedeiros alternativos.

Segundo ALVES³, a utilização de insetos provenientes do campo só deverá ser feita desde que seja possível a avaliação da sanidade dos mesmos e apresente vantagens econômicas na sua utilização. O ideal é a produção de insetos criados massalmente em laboratórios. Isso vem sendo feito com os NPVs de *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea*, *Anticarsia gemmatilis* e GVS de *Diatraea saccharalis* e *Laspeyresia pomonella*.

Depois de inoculado o vírus é incubado, as larvas recém-mortas devem ser coletadas e guardadas em recipientes plásticos em freezer à -20°C. Vácuo parcial e liofilização também podem ser usados para o armazenamento.

Os insetos assim obtidos poderão ser macerados, misturados a água e espalhados com tanques grandes de pulverização, por trator ou avião; mas também podem sofrer tratamento de purificação, secagem e formulação.

A purificação é feita através de lavagens e centrifugações sucessivas. O precipitado contendo os poliedros deve ser seco a frio. A formulação é feita geralmente como pó molhável. Argila atapulgita e farelo de cereais poderão ser usados.

No Brasil, o CNPS/EMBRAPA, Londrina - PR, vem desenvolvendo conjuntamente com a EMATER-PR, o uso de NPV de *Anticarsia gemmatilis*, para controle na soja desde a safra de 80/81.

A produção do vírus é feita, hoje, já pelos próprios agricultores, que armazenam em freezer as lagartas mortas

e as usam no próximo ano, macerando-as e pulverizando com o equipamento existente na propriedade. As avaliações do uso em larga escala vem mostrando que o vírus é tão eficiente quanto o tratamento químico para a proteção da soja contra lagarta de *A. gemmatilis* e vem se expandindo para outros Estados do Sul e Centro-Sul do país (MOSCARDI⁷⁸).

Através da engenharia genética, o potencial para o uso de baculovírus como agente de controle biológico pode ser expandido. Por exemplo, a produção de um baculovírus recombinante que contenha genes para outras toxinas, como a γ -endotoxina do *Bacillus thuringiensis*. Isso melhoraria o efeito inseticida deste vírus.

A cultura de tecido, se não vem sendo ainda utilizada para a produção em grande escala dos vírus, vem facilitando enormemente o estudo genético deles, pois "in vitro", é mais fácil isolar, purificar e clonar os vírus. Os clones mutantes e geneticamente homogêneos podem ser produzidos.

MILLER et alii⁷⁵ citam algumas maneiras que a engenharia genética pode contribuir para a maior eficiência do baculovírus como inseticida:

- aumentando a virulência.
- aumentando a tolerância do baculovírus às condições físicas e químicas, de maneira a persistir mais tempo no campo.
- aumentando o espectro de hospedeiros.

2.2.1.2. Bactérias

Embora sejam conhecidas muitas espécies de bactérias associadas a insetos, são poucas as que possuem características que permitam seu uso no controle de insetos pragas. As espécies de maior importância pertencem às famílias Enterobacteriaceae e Bacillaceae.

HABIB & ANDRADE⁴² agrupam essas bactérias em três categorias: obrigatórias, facultativas e potenciais, mas os autores entendem que do ponto de vista da patologia de insetos o melhor é agrupar as bactérias entomotogênicas em dois grupos: a. esporulantes - as do gênero *Bacillus* e b. não esporulantes, como *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa*.

As não esporulantes são inadequadas para o uso no controle biológico de insetos, devido a sua alta sensibilidade às radiações e condições climáticas, além de grande parte ser patogênica aos vertebrados.

O *Bacillus cereus*, segundo FAUST & BULLA Jr.³¹, foi isolado de numerosos insetos mortos da ordem Coleoptero, Hymenoptero e Lepidoptero. São considerados não cristalíferos. Sua virulência é devida a ação da lecitinase (fosfolipase C), que atua num pH entre 6,6 a 7,4.

Segundo FAUT & BULLA³¹, o *Bacillus popilliae* é responsável pela doença leitosa nas larvas de besouros da família Scarabacidae. Praticamente não cresce em meios artificiais. Possui cristal protéico, mas sua toxicidade ainda não foi totalmente determinada, sabe-se que o cristal solubilizado e injetado nas larvas produz duas vezes mais letalidade do que a injeção de cristais intactos.

A resistência dos seus esporos ao calor, à dissecação é à radiação e sua permanência por muito tempo nas lar-

vas mortas e no solo fazem desta bactéria excelente agente contra as larvas dos escaravelhos.

O *Bacillus sphaericus*, segundo SINGER¹⁰⁹, é cosmopolita encontrada em solo e em sistemas aquáticos. É virulenta a larvas de *Culex*, *Aedes* e *Anopheles*. É esporulante, de fácil produção em larga escala por fermentação submersa e segura aos vertebrados.

Bioensaios feitos com o sobrenadante e o concentrado de culturas centrifugadas, mostraram que a atividade bactericida está associada às células e não ao sobrenadante, mostrando que a virulência envolve toxinas associadas às células, já que, tanto vivas como mortas são patogênicas.

O *Bacillus thuringiensis* foi descrito em 1915, por BERLINER, na Alemanha, isolado de larvas de *Anagasta kuhniella*. Hoje ela é descrita como patogênica a inúmeras espécies de Lepidoptero, algumas espécies de Orthoptero, Diptero, Hymenoptero e Coleoptero.

Hannay, em 1953 HANNAY & FITZ-JAMES⁴⁴, foi o primeiro a detectar a presença de cristais de "diamante" em culturas esporuladas de *B. thuringiensis*, relacionando-os com a patogenicidade desta bactéria. Usando espectro de absorção de UV, ele demonstrou que o cristal tem características de proteína, contendo 17% em nitrogênio e por cromatografia, encontraram pelo menos 17 aminoácidos diferentes na sua composição.

Esse cristal protéico contém a δ -endotoxina, que é a toxina mais importante produzida pelo *B. thuringiensis*, que está presente em todas as variedades do bacilo e é altamente tóxica a larvas de várias ordens de insetos. Esse cristal representa o componente principal dos produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* (DULMAGE²⁹). O cristal protéico em si, não tem ação tóxica, sendo considerada como pró-toxina.

O *B. thuringiensis* além desta toxina, possui outras como descreve FAUST & BULLA Jr.³¹:

- α - exotoxina: é uma lecitinase C (fosfolipase). É produzida nas células vegetativas.
- β - exotoxina: possui estrutura bioquímica semelhante a dos nucleotídeos. É excretada durante o crescimento vegetativo. Parece que ela inibe a síntese de RNA, especificamente a RNA polimerase dependente de DNA. Tem efeito teratogênico e mutagênico nos vertebrados.
- γ -exotoxina: enzima não identificada, responsável pelo clareamento do ágar gema de ovo.

Existem três grupos de microrganismos com base em sua ecologia. O primeiro grupo uma vez introduzido numa população, será reciclado naturalmente gerando um grau de controle permanente naquela população com *B. popilliae*.

O segundo grupo logo desaparece do ambiente onde foi aplicado e deverá ser aplicado repetidamente, pois precisa de condições especiais para sobreviver *B. thuringiensis*.

O terceiro grupo pode se comportar de ambas as formas, dependendo das combinações de linhagem do patógeno com espécie de praga e também do ambiente - *B. sphaericus*.

Segundo MORAES & CAPALBO⁷⁷, as vantagens do uso de bacilos são:

- Produzem esporos resistentes aos fatores adversos do ambiente.

- Podem ser mantidos na forma de pó ou emulsão.

Podem ser utilizados nos equipamentos projetados para a aplicação de inseticidas químicos.

- São inócua ao ser humano, outros mamíferos e a flora e fauna benéficas.

- As desvantagens são:

- As bactérias agem por via oral, não tendo nenhuma ação por contato, como os fungos.

- Sua ação se restringe a um estágio do desenvolvimento do inseto.

- A umidade produz a germinação dos esporos.

Para produção comercial há necessidade da seleção de uma linhagem bem adaptada ao processo fermentativo, através de bioensaios com o produto obtido.

O processo fermentativo para a produção pode ser contínuo ou descontínuo.

- Contínuo: o ideal é a produção em bateladas. Conhecidas as condições ótimas para tal, pode-se produzir num processo contínuo. O uso desse processo para microrganismos esporuláveis é raro. Nesse processo também é difícil manter as condições assépticas e também é difícil a retirada dos metabólitos.

- Descontínuo: o meio para fermentação deve conter água, carbono, nitrogênio e traços minerais. O manganês, por exemplo é requerido para a esporulação. Os carboidratos mais utilizados têm sido triptona, peptona, farinha de soja, torta de algodão, melão de cana e água de maceiração de milho (MORAES⁷⁶).

Parte significativa do produto final consiste de componentes do meio não usado, metabólitos e células mortas. A recuperação é por filtração do mosto fermentado ou sua centrifugação, o precipitado (esporo e cristal) é suspenso em lactose e precipitado com acetona, posteriormente lavado com acetona e água, procedendo-se a secagem.

Segundo ILZUKA et alii⁵², o *B. thuringiensis* tem uma variedade muito grande de plasmídios (tanto em número quanto em tamanho), o que tem dificultado muito o estudo dos genes que codificam o cristal protéico, bem como os que regulam sua produção. Isto, dificulta a generalização de técnicas para o melhoramento da propriedade tóxica, destes microrganismos e da produção comercial.

Talvez por estas razões, observamos a dificuldades em se estabelecer um sistema de engenharia genética, DNA recombinante, transformação, conjugação, transdução e clonagem.

Considerando o uso da técnica do DNA recombinante em *B. thuringiensis* vários autores propõem o seguinte:

- a. Combinação de caracteres patogênicos de outros microrganismos para aumentar o espectro de ação sobre os insetos;

- b. Desenvolvimento de linhagens mais potentes quanto à ação tóxica;

- c. Remover características indesejáveis do bacilo;

- d. Aumentar a tolerância fisiológica e propriedades epidemiológicas de tais bactérias;

- e. Melhorar a capacidade de fermentação para a produção comercial.

2.2.1.3. Fungos

Segundo AZEVEDO & MESSIAS⁷, os fungos que atacam insetos pertencem a muitos gêneros e espécies salientando-se os gêneros *Entomophthora*, *Beauveria*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Asckersonia* e *Metarhizium*, como alguns dos mais estudados. O número de espécies de insetos atacados por fungos é também bastante grande, como borboletas e mariposas, especialmente nas lagartas, em abelhas, besouros, moscas e mosquitos.

Segundo os mesmos autores a infecção se inicia quando o esporo do fungo entra em contato com a cutícula do inseto, onde germina e emite o apressório que força a cutícula e nela penetra. Produzem-se hifas no interior do hospedeiro que, vencendo as barreiras naturais do mesmo tomam conta do corpo inteiro, levando a morte.

Nesse processo os fungos produzem várias enzimas e toxinas, como a beauvericina produzida por *B. bassiana* e destruxinas encontrados no *M. anisopliae*.

O *M. anisopliae* ocorre naturalmente em mais de 300 espécies de insetos de diferentes ordens. Entre as pragas mais importantes, que esse fungo controla, estão a cigarrinha-da-cana-de-açúcar, a cigarrinha-das-pastagens e a broca-de-cana.

Os confídios são produzidos em meio de cultura, depois misturados a água e aplicado por pulverização. Os fungos podem permanecer na área tratada sobre a matéria orgânica do solo ou sobre os cadáveres de cigarrinhas e de outros insetos.

Segundo ALVES⁴, o gênero *Beauveria* ocorre em mais de 200 espécies de insetos das diferentes ordens. O fungo penetra, freqüentemente via tegumento, devido a uma ação mecânica e efeitos enzimáticos. Com 72 horas o inseto apresenta-se totalmente colonizado.

A *B. bassiana* ficou conhecida internacionalmente pelo produto soviético Boverin, que é empregado em combinação com produtos químicos com a finalidade de se obter um efeito sinérgico e uma redução das doses dos produtos químicos.

A *Nomuria rileyi* é um fungo entomopatogênico que ocorre naturalmente sobre pragas de algumas culturas econômicas. Penetra também via tegumento. Secretam protease, quinase e lipase.

O ciclo completo do fungo sobre lagartas é geralmente de 8 a 12 dias. A germinação ocorre em 12 horas e a invasão da hemolinfa em 24 horas. A colonização do hospedeiro dura cerca de 3 a 5 dias e a morte pode ocorrer entre 6 a 7 dias (IGNOFFO⁵).

Esse patógeno ocorre em mais de 32 espécie de insetos das ordens Coleoptera, Lepidoptera e Orthoptera, sendo que cerca de 90% dos hospedeiros são lepidopteros. No Brasil, tem importância particular por sua grande eficiência no controle natural de *Anticarsia gemmatalis*.

Hirsutella thompsonii é específico para ácaros e de fácil produção em larga escala (McCOY et alii⁷¹). O fungo penetra o hospedeiro, geralmente através do tegumento. A colonização ocorre em 3 a 4 dias. A Abbott laboratórios produz o Mycar, à base deste patógeno.

A *Aechersonia aleyrodís* ataca cochonilhas e mosca-branca.

A penetração do hospedeiro pelo patógeno *Entomophthora* ocorre principalmente via tegumento, mas pode ocorrer também pelas aberturas naturais ou por qualquer solução de continuidade de tegumento do inseto (ALVES⁴).

Ocorre em insetos da ordem Homoptera, Diptera, Orthoptera e Lepidoptera. Apesar de ser possível sua produção em meios de cultura trata-se de patógeno que apresenta sérias dificuldades para a produção e aplicação.

Apesar de existirem grandes dificuldades práticas para a produção de fungos entomopatogênicos através de meios líquidos e semi-sólidos em fermentação contínua, esse métodos poderá ser empregado para a produção de grandes quantidades desses patógenos. As principais dificuldades do processo estão na obtenção de meio de cultura adequados, condições de desenvolvimento, esporulação e preservação das contaminações secundárias (ALVES⁵).

A produção tem sido feita em meios sólidos, em sacos plásticos, garrafas de soro ou bandeja, tendo como substrato, o arroz. Depois de 12 a 15 dias da inoculação, o conteúdo é retirado do recipiente usado para crescimento e encaminhados a peneiras vibratórias para a retirada dos esporos. Posteriormente vão para o controle de qualidade e formulação.

Alguns fungos de difícil crescimento em meio de cultura como *Entomophthora* e *Nomuraea*, podem ser produzidos a partir da inoculação nos insetos hospedeiros.

Para a produção em grande escala é importante o estabelecimento das melhores linhagens. Para isto, o papel do geneticista é muito importante, estudando a variabilidade das linhagens e estabilizando-as geneticamente. Outra importante função é a realização do melhoramento genético através da mutação e recombinação. A obtenção de protoplastos, como em *M. anisopliae*, abre enormes perspectivas para facilitar os cruzamentos evitando-se os inconvenientes da incompatibilidade genética entre linhagens (AZEVEDO & MESSIAS⁷⁹).

2.2.2. Controle biológico de doenças

Controle biológico é a redução na quantidade de inóculo ou no potencial para produzir doenças do patógeno realizado por ou através de um ou mais organismos que não seja o homem (COOK & BAKER²²).

O potencial para desenvolver doenças inclui crescimento, infectividade, agressividade, virulência e outras qualidades do patógeno, ou processo que determina a infecção, o desenvolvimento de doenças e reprodução.

O controle biológico de doenças pode ser acoplado a práticas culturais, ambientes favoráveis aos antagonistas, resistência da planta hospedeira, introdução massal de antagonísticos, de linhagens não patogênicas.

Os patogenos incluem fungos, bactérias, nematóides, algas e vírus. A relação entre patógeno e hospedeiro pode ser como epífita (na superfície da planta) ou endófita (no interior dos tecidos da planta), ou ambos. Certas linhagens de *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas syringae* estão presentes em cristais de gelo (-2 a -5^o) nas plantas. Se esses cristais se forma em folhas de tomate, milho ou outra planta sensível ao frio, os tecidos são danificados e essas bactérias podem agora colonizar as células mortas.

Essas bactérias exemplificam bem o caso de patógenos que iniciam sua infecção como epífitas (LINDOW et alii⁶⁷).

Por outro lado os antagonistas são agentes biológicos com potencialidade para interferir nos processos vitais dos patógenos de plantas. Inclui fungos, bactérias, protozoários e vírus.

2.2.2.1. Fungos fitopatogênicos

Quando patógenos não são inibidos naturalmente por antagonistas e na ausência de variedades geneticamente resistentes, recorre-se ao biocontrole pela adição de antagonistas efetivos. Muitos podem ser identificados no laboratório, mas a maioria deles tem pouco efeito antagônico, principalmente no controle de doenças de raiz, onde é necessário adição no solo natural. Mas parasitas não especializados como *Phytium*, *R. solani*, que atacam uma gama de hospedeiros, podem ser controlados biologicamente, uma vez que o período de proteção deve ser relativamente curto e portanto a população do antagonista deve ser grande somente por algumas semanas (MELO⁷⁴).

A introdução de antagonistas no solo é um método alternativo de controlar muitos fungos de raiz. *Coniothyrium minitans*, *Sporidesmium sclerotivorum* e *Trichoderma* parecem ser os fungos mais comuns para controlar este grupo de patógenos.

T. harzianum tem diminuído efetivamente a incidência de doenças causadas por *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* em testes de campo (WELLS et alii¹²⁷), *Phytium oligandrum*, um vigoroso microparasita necrotrófico, foi mostrado ser ativo contra várias outras espécies patogênicas de *Phytium*. Esses antagonistas são considerados promissores porque são bem adaptados a sobreviver na rizosfera.

De um modo geral, os fenômenos antagônicos podem ser observados em qualquer tipo de solo e envolvem as seguintes relações: parasitismo (*Trichoderma*, *Rhizopus*), predação (nematóide por *Arthrobotrys*), lise (actinomicetos), antibiose (*Streptomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma*) e competição (por nutrientes) (MELLO⁷⁴).

2.2.2.2. Bactérias fitopatogênicas

O biocontrole de doenças é muito pouco utilizado em larga escala, em comparação ao biocontrole de pragas, mas na Austrália, por exemplo, os agricultores usam controle biológico para suprimir a galha bacteriana causada por *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*. Para o vírus do mosaico do tabaco, *Fomes annosus*, a tristeza dos citros, também já é usado ao nível de campo.

O controle biológico da galha resultou da descoberta de uma linhagem não patogênica (K-84) da mesma bactéria. Esta linhagem não induz tumor e possui um pequeno plasmídeo que codifica para produção de uma substância antibiótica que inibe as patogênicas. O antibiótico é chamado "agrocin 84", produzido comercialmente. A K-84 carrega também um outro plasmídeo grande com os genes para nopalina: (NEW & KERR⁸⁰).

Nas linhagens sensíveis ao "agrocin 84", os genes que controlam a sensibilidade estão no plasmídeo Ti (responsável pela indução de tumor), isto quer dizer que há uma li-

gação genética muito íntima entre patogenicidade e sensibilidade ao "agrocin 84", talvez por isso o controle é tão eficiente.

Aliás, a antibiose é o fenômeno antagônico mais viável, até o momento, para a produção em escala comercial, quer seja através da produção de antibióticos (bacteriocinas) ou metabólitos tóxicos.

A K-84 é comercializada sob a forma de pó molhável e tem dado ótimos resultados principalmente em rosáceas e crisântemo, com pouco sucesso em videira (KERR & TATE⁶²).

Outros êxitos vêm sendo obtidos com estirpes de *Bacillus subtilis*, no controle do fungo *Sclerotinia fructicola*, agente da podridão parda do pêssego e nectarina, também é eficiente no controle do fungo *Phomopsis sp*, em soja, com tratamento da semente antes do plantio (CUBETA et alii²⁴). O controle do agente da ferrugem do feijoeiro, também tem sido eficiente com pulverizações de *B. subtilis*.

BACKER et alii⁹ verificaram que além do *B. subtilis*, o *B. cereus* var. *mycoides*, o *B. thuringiensis* e *Erwinia ananas* var. *uredovora* são eficientes neste controle, em certas condições.

Estirpes de *Erwinia hercicola* e *P. syringae*, que catalisam núcleos de cristais de gelo a temperaturas em torno de 0°C, causando injúrias as plantas sensíveis ao frio, que são denominados INA⁺, podem ser controladas pela introdução de bactérias epífitas antagônicas, inativas para nucleação de gelo (INA⁻), como são algumas mutantes de *E. hercicola* (LINDOW et alii⁶⁷).

2.2.2.3. Nematóides

Os nematóides fitoparasitas são responsáveis por grandes perdas na produção agrícola. Vários são os organismos que atacam os nematóides, entre eles: vírus, riquetsias, bactérias, fungos, nematóides, ácaros, insetos, etc. Entretanto até o momento, a bactéria *Pasteuria penetrans* e algumas espécies de fungos são os organismos mais adequados, no controle dos nematóides parasitas de plantas (NOVARETTI⁸²).

Vírus infectando nematóides não tem sido muito encontrados, provavelmente por fatores técnicos, uma vez que são cosmopolitas (LORDELLO⁶⁸).

A *Pasteuria penetrans* produz endosporo típico de *Bacillus*, de tamanho bastante reduzido (5 µm). É um dos mais promissores agentes de controle de fitonematóides, por apresentar a resistência dada pelo esporo, eficiente mecanismo de fixação e penetração, além de bloquear a produção de ovos de seus hospedeiros (STIRLING¹¹²).

Os esporos de *P. penetrans* não germinam em meios de cultura comuns e não são cultivados "in vitro" com sucesso. SAYRE¹⁰⁰ estudou o ciclo de vida da bactéria, sincronizando com o ciclo de vida do nematóide *Meloidogyne javanica* e descreveu os seguintes estágios: fixação do esporo na larva, penetração, crescimento vegetativo, fragmentação, esporogênese e fase no solo. A fêmea adulta é transformada em um "saco" contendo cerca de 2 milhões de esporos e não se reproduz.

Apesar dos conhecimentos adquiridos, até o presente so-

bre *Pasteuria penetrans*, pouco ainda se conseguiu quanto à produção e utilização desse organismo em escala comercial. Existem as dificuldades do cultivo "in vitro", à manutenção e o manuseio do inóculo e a especificidade dos hospedeiros.

Após alguns insucessos do uso de fungos para controle biológico de nematóides, o interesse reviveu depois que demonstraram que algumas espécies de fungos endoparasitas impediam o aumento da população do nematóide *Heterodera avenae* e mesmo reduziam a população de nematóides, causadores de galhas. Na França, dois fungos predadores de nematóides, *Arthrobotrys robusta* e *A. irregularis* são vendidos comercialmente (NOVARETTI⁸²).

Os fungos predadores elaboram um sistema de hifas provido de órgãos destinados a capturar nematóides. O corpo do nematóide capturado é em seguida invadido pelo fungo.

Os nematóides ingerem os conídios dos endoparasitas que germinam. Já os fungos predadores capturam os nematóides através de órgãos adesivos ou de anéis, capazes ou não de realizar constrição. Há outros fungos que capturam suas vítimas por meio de substâncias adesivas secretadas pela própria hifa.

Apesar de sua larga distribuição, os fungos nematófagos ocorrem em pequena quantidade no solo.

2.2.2.4. Vírus

Para fitoviroses, o controle biológico é interpretado como sendo aquele obtido por meio de agentes biológicos capazes de interferir nos processos de infecção ou replicação viral e de disseminação do vírus na cultura. No primeiro caso o controle biológico pode ser alcançado pela premunização das plantas com estirpes fracas do vírus e de efeito protetor ou por meio da supressão do vírus já presente na planta, através do estabelecimento de estirpes fracas do mesmo vírus ou de um vírus diferente. O controle da disseminação pode ser obtido por meio de inimigos naturais dos vetores e técnicas de macho esterilidade.

A natureza do mecanismo envolvida na proteção tem sido motivo de estudos e sugestões de diversos investigadores (SHERWOOD & FULTON¹⁰⁸).

A proteção cruzada ou premunização apesar de não reduzir a produção e proteger as plantas contra o estabelecimento dos isolados severos e de ser conhecida desde 1937, não tem dado resultados práticos talvez pelas sérias desvantagens desse método, conforme aponta REZENDE et alii⁹⁶.

— A presença do isolado fraco em todas as plantas pode originar o fenômeno do sinergismo, no caso da infecção da planta por outro vírus.

— Há certa dificuldade para que os lavradores aceitem material infectado para a propagação.

— A existência de vírus fraco em todas as plantas pode aumentar a possibilidade de surgirem mutantes severos e com maior poder de competição.

— A presença de um vírus fraco numa cultura pode servir de fonte para outra cultura onde esse vírus pode originar moléstia de importância.

Segundo MULLER & COSTA⁷⁹, o uso da premunização

com estirpes fracas, para o controle da tristeza em plantas de laranja-pera é praticamente o único caso, no mundo, onde essa técnica atingiu escala comercial de desenvolvimento.

2.2.2.5. Uso de micorrizas

O estudo de fungos micorrízicos tem mostrado que eles podem reduzir significativamente o efeito de fitopatógenos. Vários mecanismos quer seja de natureza bioquímica, morfológica ou nutricional tem sido propostos para explicar a redução no efeito dos fitopatógenos do solo nas plantas.

Tem sido sugerido a formação de barreira física nas raízes, síntese de enzimas e antibióticos, produção de metabólitos, alteração na qualidade e quantidade de nutrientes na rizosfera, alteração da morfologia e anatomia das raízes do hospedeiro, estímulo de uma população rizosférica antagonista, produção de aminoácidos e açúcares redutores, lignificação das raízes, etc., para explicar a ação desses microrganismos. O mecanismo de ação talvez deva ser atribuído a um complexo de fatores que atuam conjuntamente (DEHNE²⁶).

O maior volume de trabalho envolvendo interação entre fungos micorrízicos são feitos com fungos que infectam o sistema radicular, *Fusarium* sp, *Verticillium* sp, *Phytophthora* sp. Na maioria dos casos há sempre redução no efeito da doença.

Os fungos micorrízicos têm sido implicados também em interações com doenças causadas por nematóides, principalmente dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* (OLIVEIRA & ZAMBOLIM⁸⁴).

Embora a maior parte dos resultados obtidos nos estudos envolvendo interações entre fitopatógenos e fungos micorrízicos sejam promissores, poucos trabalhos demonstram consistentemente a influência desses simbiontes na redução dos danos causados pelos patógenos em condições de campo. Outro fato que influencia esses fungos no solo, é o uso indiscriminado de pesticidas que reduz a sua população.

2.2.3. O uso de técnicas do DNA recombinante e cultura de tecidos no controle biológico de doenças e insetos.

Pouco se tem conseguido no sentido de clonar genes de toxinas de microrganismos, ou o que se conseguiu é a nível de patente de indústria e portanto não revelado.

A modificação genética das plantas para o caráter resistência a doenças requer, tanto pelos métodos convencionais como pela engenharia genética, que indivíduos resistentes sejam identificados, em uma população de plantas susceptíveis.

Isto normalmente é feito por inoculação das plantas com o patógeno, método que possui sérias falhas. Alguns autores tem proposto o uso das toxinas produzidas pelo patógeno e não o uso do patógeno para identificar mais seguramente as plantas resistentes ("in vivo") ou protoplastos resistentes ("in vitro") (BRETTEL & INGRAM¹³).

Segundo YODER¹³², as toxinas podem ser entendidas como fatores de patogenicidade ou fatores de virulência.

O fator de patogenicidade é quando a toxina é necessária para causar qualquer sintoma da doença. O fator de virulência não é necessário para iniciar a doença mas, se presente, altera o grau da doença que se desenvolve. Tem ainda uma possibilidade que seria a substância não estar envolvida na doença, mas ser coincidente com ela ou resultado dela.

O mesmo autor propõe uma maneira de se distinguir essas três possibilidades. Se os mutantes não produtores da toxina, não causarem doença, é fator de patogenicidade. Se eles causarem doença, mas de uma maneira alterada é fator de virulência e se eles causarem o mesmo nível de doença que as linhagens patogênicas é uma substância sem influência na patogenicidade.

Se a toxina é um fator de patogenicidade, plantas altamente resistentes a ela será completamente resistente à doença. Se a toxina é um fator de virulência, as plantas resistentes a ela, podem ser parcialmente resistentes a doença.

A toxina HV, produzida pelo fungo *Cochliobolus victoriae*, é um fator de patogenicidade porque isolados que não produzem a toxina, não produzem doença. Esse fungo ataca certas variedades de aveia. Os estudos mostraram que todas as plantas resistentes à toxina HV, são resistentes ao patógeno, enquanto que plantas parcialmente resistentes à toxina tem resposta intermediária ao patógeno.

UCHYTL & DURBIN¹¹⁷ dão dois exemplos de fatores de virulência. Um caso envolve a toxina T produzida pelo fungo *C. heterostrophus*, que afeta milho e o outro é a tabatoxina, produzida por várias bactérias incluindo *P. syringae* var. *tabaci*, patogênica a tabaco. A tabatoxina é inativa, produtos de sua hidrólise é que são tóxicos. Nenhuma é necessária para causar doença, são responsáveis por parte dos sintomas das respectivas doenças.

Calos derivados de milho susceptível foram selecionados para resistência a toxina T. As plantas regeneradas dos calos resistentes, foram susceptíveis ao patógeno mas o dano causado foi muito menor do que em plantas originalmente susceptíveis. Esses resultados podem, por si só, produzir um controle efetivo da doença, em condições de campo (GENGENBACK et alii³⁸).

O gene do cristal protéico do *B. thuringiensis* tem sido clonado (ver item 2.2.1.2). Os genes da faseolotoxina, tabatoxina parecem não estar localizado em plasmídios. Já o gene para produção de seringomicina parece ser plasmidial.

Esses genes cromossômicos podem ser isolados através de complementação, em mutantes não produtores da toxina, usando um banco genômico, preparado da linhagem produtora da toxina, e depois selecionando os transformantes produtores dela (GROSS & VIDAVER⁴¹).

2.2.4. Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é um dos nutrientes fundamentais para as plantas, participando da composição das moléculas de proteínas e clorofila, além de desempenhar uma função chave no processo de divisão celular. Assim, uma adequada nutrição em nitrogênio é fundamental para o crescimento vigoroso das plantas.

Os processos industriais de síntese de amônia, a base

da indústria de fertilizantes, requerem uma enorme quantidade de energia, o que encarece o seu uso na agricultura. Por outro lado, a situação tecnológica da indústria de inoculantes é precária. Uma conjugação de esforços entre a pesquisa agrônômica, expressa pela seleção de estirpes de fixadores biológicos, com a pesquisa tecnológica para a produção de inoculantes econômicos e de alta potencialidade é necessária.

Vários gêneros de microrganismos apresentam a reação de fixação de nitrogênio, como *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Rhodospirillum*, *Azospirillum*, *Rhizobium* e a cianobactéria *Anabaena azolae*, em associação com leguminosas, gramíneas e leguminosas florestais (LEMOS⁶⁶).

A transferência da capacidade de fixar nitrogênio (genes nif) nas plantas ainda é uma meta a ser atingida.

A transferência dos genes responsáveis pela fixação de nitrogênio, para bactérias não fixadoras, como de *Klebsiella pneumoniae* para *Escherichia coli* (CANNON et alii¹⁷), já tem sido feita.

A possibilidade de transferir o operon nif de microrganismos para cereais, ou outra planta que não fixa nitrogênio, vem sendo cogitada (HARDY & HAVELKA⁴⁵). Esses autores, argumentam que o plasmídio contendo o operon nif pode ser introduzido em protoplastos de plantas, seguido da regeneração da planta que carregam os genes nif, bem como gerações subsequentes através de suas sementes.

O uso do plasmídio Ti (*A. tumefaciens*) para transferir genes nif de *Rhizobium* e posterior infecção em dicotiledoneas não leguminosas tem sido tentado (STOTNICKI & ROLFE¹⁰⁴).

Em tabaco conseguiu-se algumas possibilidades para regenerar protoplasto injectado por *A. tumefaciens* carregado o gene nif (SACRISTÁN & MELKERS⁹⁹).

A absorção de *Rhizobium* por protoplastos de folha de *Pisum sativum* foi descrita por DAVEY & COCKING²⁵, mas a sobrevivência da bactéria fixadora, após a absorção, não foi conseguida.

GILES, em 1978, conseguiu a atividade de redução de acetileno (prova da existência da enzima nitrogenase), em protoplastos de *Zea mays*, infectada com *A. vinelandii*.

As leguminosas arbóreas são as mais exploradas, principalmente espécies das subfamílias Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilinoideae e, mesmo assim pequeno número de espécie tem sido examinadas com relação a nodulação, em comparação a quantidade de espécies que compõe a família Leguminosae. Nessas árvores, é bem conhecido que podem nodular e fixar nitrogênio tão eficientemente como as leguminosas herbáceas, uma vez que o seu crescimento se estende por vários anos e para cobrir as necessidades de nitrogênio, há nestas espécies também uma taxa muito superior de fixação de nitrogênio (DOBEREINER²⁷).

2.2.5 Proteínas armazenadas nas sementes

Existem alguns aspectos que estão retardando o uso da engenharia genética em vários campos do melhoramento de plantas, como por exemplo, a caracterização bioquímica dos genes.

Muito se conseguiu saber sobre os processos bioquí-

micos e fisiológicos envolvidos nas características, processos que quando desconhecidos inviabilizam ou dificultam a identificação dos genes responsáveis por elas. Uma exceção, são os genes que codificam as proteínas armazenadas nas sementes. Genes de diferentes tipos de proteínas têm sido isolados e caracterizados.

OSBORN⁸⁵ foi o primeiro a caracterizar quimicamente as proteínas da semente. Usou o sistema de classificação baseado na solubilidade das proteínas em diferentes solventes. Chamou proteínas solúveis em água, "albuminas", proteínas solúveis em 5% de sal, "globulinas"; e proteínas solúveis em solução de álcool (etanol à 70%) de "prolaminas". As outras foram extraídas com a solução de ácido ou alcali e foram chamadas "glutelinas".

HURMKMAN et alii⁵⁰ trabalhando com as proteínas da semente de milho, que consiste num grupo de prolaminas, chamadas zeínas, deram evidência de que ela é formada por agregação de proteínas dentro do retículo endoplasmático rugoso e isolaram estruturas com a mesma característica física de ovócitos de *Xenopus laevis* previamente injetadas com RNAm de zeína.

PEDERSEN et alii⁸⁷ construíram clones de cDNA do RNAm de zeínas e determinaram a seqüência do DNA das várias zeínas. Conseguiram então, determinar a complexa seqüência primária de aminoácidos dos polipeptídios e compará-las estruturalmente. Citam, como alternativa para estimar o número de genes da zeína, o uso de clones de cDNA como marcador da hibridização do DNA do milho.

Os mesmos autores analisaram o clone de cDNA correspondente a uma zeína de 19000 Mr (peso molecular aparente, derivado da eletroforese em gel). Baseada na análise por reconstrução, observaram quatro bandas pequenas e claras características de genes simples. Usaram a Eco RI, que não corta no gene da zeína: essas quatro bandas parecem participar de uma pequena família de genes de aproximadamente dez membros.

As outras proteínas também foram analisadas deste mesmo modo e estimaram o total de quarenta a cinquenta genes.

FISHER & GOLDBERG³³ citam que quando as proteínas do grão de soja são separadas por centrifugação em gradientes, aparecem três grações com coeficientes de sedimentação de 2S, 7S e 11S. Eles clonaram os genes de 7S e 11S, isolaram e caracterizaram parcialmente.

Em contraste com os genes da zeína, que não contém introns, vários membros da 11S contém. É um grande intron ou, um ou mais introns pequenos nos genes de 11S.

Ainda que uma caracterização estrutural completa desses genes, é necessária para a determinação das seqüências de seus DNAs, esse estudo ilustra que a estrutura dos genes das globulinas é mais complexa do que dos genes da zeína e mais simples do que os genes das proteínas armazenadas de ovos de animais.

2.2.6. Tolerância a salinidade e a seca em plantas superiores

A alta produtividade de uma planta em um ambiente determinado é entre outros fatores, a somatória de alguns

aspectos do seu metabolismo. O grau de tolerância a salinidade e a seca pode ser um desses aspectos. A tolerância aos dois fatores estão interligados por ambos dependerem do balanço osmótico.

Uma série de aspectos anatômicos/ morfológicos e fisiológicos/bioquímicos estão envolvidos nesta tolerância.

Previamente dois requerimentos básicos são necessários ao nível celular (JONES & GORHAM⁵⁵): a. manutenção da composição iônica citoplasmática, compatível com a atividade metabólica, especialmente nas células de crescimento das regiões apicais. O citoplasma contém altos níveis de K, Na e Cl. As células também deve ter níveis adequados de carbono, nitrogênio e fosfato; b. manutenção de turgescência, nas células maduras e imaturas. Parece provável que ao nível celular tanto o transporte iônico como a capacidade para acumular citosoluto orgânico compatível são importantes na tolerância.

A prolina, que se acumula em plantas durante o stresse osmótico, parece funcionar como composto osmoprotetor. A indução de mutantes para superprodução de prolina, conferindo tolerância osmótica, tem sido feita (STROM et alii¹⁴).

A clonagem do gene para tolerância osmótica, em microrganismos, já foi obtida.

Sementes, pólen e outros tecidos sujeitos a desidratação, freqüentemente produzem grandes quantidades desses compostos. Os níveis destas substâncias aumentam ou diminuem em sincronia com o stresse. Estas substâncias sintetizadas pelas plantas protegem também a bactérias em stresse osmótico.

A identificação das moléculas orgânicas que conferem tolerância osmótica em bactéria e o estudo de mutantes osmóticos tolerantes tem levado ao desenvolvimento de métodos de seleção para isolar os genes *osm*.

O primeiro gene osmótico tolerante a ser clonado foi o gene mutante para a super produção de prolina, a partir de *Salmonella*, no pBR322 e introduzido em *E. coli* pro⁻. As células cresceram em meio sem prolina.

O maior requisito para o melhorista obter plantas resistentes ao stresse osmótico é o desenvolvimento de métodos rápidos de seleção de um número grande de amostras de plantas, para a presença ou falta de compostos osmoprotetores. Um caminho para isto seria o desenvolvimento de linhagens testadoras de bactérias adequadas para bioensaio rápido de amostras de tecidos de plantas.

2.2.7. Produção de compostos secundários em cultura de tecido

Culturas de tecidos são potencialmente valiosas para o estudo da biossíntese de metabólitos secundários e podem eventualmente, fornecer um meio de produção comercial de importantes produtos de plantas. Tais produtos secundários são metabólitos que parecem não ser essenciais a todas as células da planta.

Inúmeras classes de compostos são produzidas, desde ácidos cinâmicos, cumarinas, ligninas, flavonóides, antraquinonas, naftoquinonas, isoprenóides, ácidos graxos não comuns, até produtos derivados de aminoácidos. A constatação de que certas culturas produzem substâncias até en-

tão desconhecidas, como paniculídeos e rutacultina, foi inesperada e mostrou que culturas poderiam ser importantes fontes de novos compostos (BUTCHER¹⁵).

O avanço na produção de produtos úteis, a partir da cultura de tecidos, à área de saúde, tem sido grande. Por exemplo, culturas de células em suspensão de *Ruta graveolens* produz simultaneamente óleos voláteis, furanocumarinas e alcalóides, enquanto *Phytolacca americana* está sendo testada para o uso comercial, como um inibidor de viroses de plantas. Têm sido patenteadas culturas de tecidos que produzem metabólitos como alergens, diosgenina, L-dopa, ginsenosídeos e glicirrizina (STABA¹¹).

Os estudos têm sido direcionados em cultura de tecido visando a produção de cataranto e camptoteca, alcalóides anti-tumorogênicos, aminoácidos, proteínas, antibióticos, ácidos graxos, papaína e outras enzimas, precursores de esteróides, produtos de biotransformação de esteróides, agentes corantes, condimentos e perfumes, adoçantes, inseticidas, vitaminas, compostos semelhantes à insulina entre outros.

2.3. Produtos na pecuária

2.3.1. Clonagem e introdução de DNA em ovos de mamíferos

A introdução de genes em animais tem progredido vagarosamente, em relação à introdução em microrganismos e plantas. O domínio da regulação gênica é essencial para o sucesso de transferência.

Segundo RADKE & LAGARIAS⁹², já tem sido estabelecidas linhagens de células de fibroblastos de camundongos que, constitutivamente, sintetizam e secretam o hormônio de crescimento bovino (bGH).

A transferência de DNA para ovos fertilizados de mamíferos por microinjeção vem sendo desenvolvida. Uma das dificuldades é que a microinjeção resulta em múltiplas cópias desse DNA, que se integram ao acaso.

Os autores acima citados ressaltam que existem diferenças na manipulação de ovos de mamíferos de espécies diferentes, que afetam o sucesso da obtenção de embriões viáveis para reimplantação. Embriões de suínos, por exemplo, se dividem em cultura, até o estágio de quatro células, já, embriões de carneiros e bovinos podem dividir-se até blastocisto.

WATSON et alii¹²⁵ citam que uma das primeiras introduções de genes, feita com sucesso, foi usando o gene APRT (adenina fosforibosil transferase) de hamster.

A introdução de genes para a produção de hormônios será relatada em um item a parte.

Segundo YOUNG et alii¹³³, um dos principais objetivos na zootecnia é aumentar a deposição de miofibrila nos músculos de animais de corte. A identificação e regulação da atividade molecular, nos cromossomos, que permite a RNA polimerase iniciar a transcrição de seqüências específicas, como os genes da proteína miofibrilar é desconhecida. Essa identificação teria uma grande influência na produção da carne.

AFFARA et alii¹ mostraram que durante o desenvolvimento do músculo, mioblastos mononucleados fundem-se para formar microtúbulos multinucleados. Este processo

é acompanhado de acúmulo de RNAm de proteína miofibrilar no citoplasma.

A maior proteína dada por esse RNAm produz um aparato contrátil que é composto por miosina de cadeia pesada (MHC), miosina de cadeia leve (MLC), actina, subunidades de tropomiosina, subunidades de troponina e outras proteínas envolvidas direta ou indiretamente no processo de contração.

Diferentes isoenzimas de miosinas são encontradas em diferentes tipos de músculos ou no mesmo tipo de músculo em diferentes estágios de desenvolvimento do animal (GAUTHIER et alii³⁷; RUSHBROOK & STRACHER⁹⁷).

No músculo cardíaco de diferentes espécies, três isoenzimas de miosina tem sido identificadas e são compostas de duas MHC diferentes. Elas diferem no mapa peptídico, na atividade enzimática, nas propriedades imunológicas e na seqüência de cDNA (KAVINSKY et alii⁵⁸; CHIZZONITE et alii²⁰).

Vários trabalhos têm mostrado que são múltiplos genes que codificam a miosina de cadeia pesada em vários organismos, como o homem, rato, coelho, galinha e bovinos (NGUYEN et alii⁸¹; KAVINSKY et alii⁵⁹), mas em *Drosophila* essa cadeia é codificada por um único gene. Assim, em alguns organismos, mas não em todos, essa proteína é codificada por grandes famílias multigênicas.

O RNAm da miosina de cadeia pesada foi separada do RNA total e posteriormente usado como molde para a síntese do DNA complementar (MEDFORD et alii⁷³). O cDNA foi obtido e depois clonado para isolar as seqüências específicas de MHC.

Outro método usado é a construção do banco genômico e subsequente seleção para seqüência de MHC. O DNA genômico é freqüentemente clonado em um bacteriófago (λ) para produção do banco (MAHDAVI et alii⁶⁹).

SINHA et alii¹¹⁰ fizeram os mapas de restrição desses DNA, revelando sítios homólogos e alguns heterólogos, indicando que são dois RNAm diferentes produzidos pelos genes da α e β miosina de cadeia pesada.

2.3.2. Hormônios

Na década de 70, o DNA de SV40 foi microinjetado em vários embriões de camundongos, no estágio de blastócitos e depois reimplantados no útero das fêmeas. Cerca de 40% dos camundongos tinham DNA do SV40 nas suas células.

Experimentos desse tipo, tem sido feito com vários genes clonados, incluindo interferon humano, genes da insulina, da β -globulina de coelho, da timidina quinase etc.

Segundo WATSON et alii¹²⁶, merece ênfase os experimentos onde o gene contendo a seqüência promotora da metalotionina de camundongo foi fusionado com seqüências codificando o gene do hormônio de crescimento (GH) em ratos. Posteriormente ele foi clonado no pBR322, originando o plasmídeo pMGH que foi introduzido, por microinjeção em ovos de camundongo.

Alguns animais revelaram a presença de múltiplas cópias do MGH. Um nível alto do RNAm do hormônio de crescimento foi encontrado nesses animais.

Vários outros trabalhos tem mostrado que o gene para hormônio de crescimento de rato e homem, pode

ser introduzido em camundongo, tornando-se estavelmente integrados no genoma, mas nem sempre se expressando eficientemente. Esses fatores levaram (WATSON et alii¹²⁶) a concluir que:

- genes podem ser introduzidos por microinjeção em células somáticas e germinativas.

- o sítio onde o DNA exógeno se integra, no cromossomo, influencia na sua atividade durante o desenvolvimento.

- Certos DNA exógenos podem ficar sobre o controle gênico das células hospedeiras.

PALMITER et alii⁸⁶, entretanto, observam que o gene que possui o promotor/regulador da metalotionina de camundongo, quando fusionado com o gene estrutural do hormônio de crescimento de rato, bovino ou humano, após sua microinjeção em camundongo ocorre formação de seu RNAm em alguns órgãos, particularmente, no fígado e intestino.

O gene geralmente torna-se, estavelmente, integrado também nas células germinativas e é herdado pela progênie.

Segundo HAMMER et alii⁴³, a aplicação das técnicas de transferência de genes em espécies domésticas, apresenta o problema da visualização do núcleo do ovo. O microscópio de interferência e contraste tem possibilitado a microinjeção em ovos de coelho, ovelha, porco e bovino.

Esses autores microinjetaram algumas centenas de cópias de fragmentos de 2,6 Kb de DNA produzidos por digestão com Bst EII e EcoRI, isolados do plasmídeo pMGH, em núcleos de ovos de coelha, ovelha e porco. A injeção de DNA reduziu em 50% a sobrevivência desses embriões. Observaram que em coelhos, esse gene se expressa em alguns tecidos, particularmente em órgãos secretores como o fígado e o intestino.

2.3.3. Produção de gêmeos

Segundo RUTLEDGE & SEIDEL⁹⁸, os clones (gêmeos univitelinos) ocorrem naturalmente em bovino, homem e outros mamíferos. Esses gêmeos univitelinos tem sido úteis em pesquisa.

Um método eficiente para a produção de gêmeos foi descrito por WILLADSEN¹²⁹, que tem produzido clones, com sucesso, passando, 1/2 ou 1/4 de embrião condicionado em blocos de ágar, para ovidutos de ovelhas, deixando por 1 a 5 dias. Os blocos com embriões foram, então, retirados e os embriões separados do ágar e subseqüentemente re-transferidos para fêmeas receptoras.

Gêmeos, trigêmeos e quadrigêmeos idênticos têm sido obtidos em cavalos, bovinos e ovinos por esse processo.

Recentemente WILLIAMS et alii¹³⁰ desenvolveram uma metodologia rápida, de baixo custo e eficiente para produzir gêmeos idênticos em bovinos, a partir da divisão em dois do embrião e depois transferido não cirurgicamente.

Essa técnica pode ser aplicada para purificar rebanhos em escala comercial de maneira que centenas ou milhares de gêmeos idênticos resultem a cada ano.

RUTLEDGE & SEIDEL⁹⁸ ressaltam a importância do seccionamento do embrião, onde metade ou 1/4 é transferido e as outras partes congeladas, de modo que, depois de avaliado, se desejado, cópias geneticamente idênticas do

animal podem ser produzidas. Com o acoplamento sexual, as vantagens desta técnica, são aumentadas.

2.3.4. Anticorpo monoclonal e suas aplicações

A formação dos anticorpos é o mecanismo de defesa do organismo contra as doenças infecciosas.

Em 1798, Jenner demonstrou a produção de imunidade à varíola pela injeção de material preparado de lesões de varíola de gado. Esse método foi denominado vacinação. Passado um século, Pasteur, efetivamente, desenvolveu o estudo das vacinas.

Na década de 70, a fusão de células malignas de camundongos, com linfócitos normais, do mesmo, formaram os primeiros hibridomas. Observou-se que vários hibridomas secretavam anticorpos que reconheciam especificamente um antígeno determinado, quando introduzidos em eritrócitos de ovinos (KOHLER & MILSTEIN⁶³).

A tecnologia dos anticorpos monoclonais permitiu a produção de quantidades ilimitadas de anticorpo, com determinada afinidade, especificidade e isotipo. Portanto os anticorpos monoclonais são cópias idênticas de imunoglobulinas derivadas de uma mesma célula.

Os anticorpos monoclonais, segundo KEITH & LEWIN⁶⁰, são geralmente produzidos em cultura de tecido. Em alguns casos pode ser feito sem soro bovino fetal, o que simplifica a purificação da imunoglobulina. A produção em cultura de tecido produz, geralmente, pequena quantidade de anticorpo específico, cerca de 1 a 50 µg/ml.

O uso do soro de sangue para cultura, dá uma maior concentração de anticorpos, chegando a 5 a 10 mg/ml.

Um fator limitante na produção comercial de anticorpo monoclonal, é a falta de sistemas que permitam a produção eficiente, em grandes quantidades.

Os animais domésticos podem ser importantes como incubadoras biológicas para a produção em larga escala, desses anticorpos.

A primeira área a se beneficiar da tecnologia do híbrido foi a medicina humana, mas pesquisas com patógenos de animais tem promovido avanços na medicina veterinária, ainda que o diagnóstico de doenças infecciosas não seja um campo dominado na ciência animal clássica.

Testes relativamente simples podem ajudar a determinar o estado da doença em animais. A detecção de infecções subclínicas, tem importância especial, pois podem influir na produtividade.

A brucelose, pela sua importância econômica, tem sido objetivo de intensivos estudos, neste campo, e conseguiu-se a produção de anticorpo monoclonal da *Brucella abortus*. Anticorpos monoclonais a parasitas, incluindo tripanossomas, *Plasmodium berghei*, tem sido produzidos. Esses reagentes têm aplicação no diagnóstico e na terapêutica.

Segundo SHERMAN et alii¹⁰⁶, anticorpo monoclonal vem sendo usado para reduzir a incidência de diarreia bovina, de difícil tratamento e fatal, causada por uma *E. coli* enterotóxica. Foi produzido, em camundongo, o anticorpo monoclonal contra proteína do pilus da *E. coli* K-99.

Bezerros tratados com o anticorpo monoclonal, quando

infectados com a K-99 diminuíram somente metade do peso perdido pelos animais controle (sem anticorpo monoclonal). Os sintomas da diarreia foram significativamente reduzidos, e somente 29% dos bezerros tratados morreram em oposição a 82% de morte dos controles.

Isto significa que a administração do anticorpo monoclonal foi específica para a proteína do pilus da *E. coli* e foi efetiva na proteção dos bezerros contra a doença. Este foi um dos primeiros anticorpos monoclonais produzido para uso em bovinos.

Segundo KEITH & LEWIN⁶⁰, os leucócitos são um grupo heterogêneo de tipos de células diferenciadas. A imunologia tem tentado caracterizar sorologicamente os leucócitos. O uso de anticorpo monoclonal para distinguir células morfológicamente idênticas (como os linfócitos), em grupos funcionais é uma das mais importantes aplicações da tecnologia do hibridoma.

Anticorpo monoclonal para uma variedade de hormônios reprodutivos está sendo desenvolvido. O uso dessa tecnologia poderá diminuir a variação que ocorre na medida hormonal devido à diferenças entre as partidas do antisoro convencional usado.

Através dessa técnica é possível quantificar uma variedade de moléculas como o hormônio β - luteinizante humano, a gonadotropina coriônica e prolactina, a pré-albumina, e o hormônio tireoideano. Em bovinos e eqüinos, anticorpo monoclonal já sem sendo usado para medir o hormônio luteinizante.

Os antígenos codificados pelo maior complexo de histocompatibilidade (MHC) é outra aplicação da produção do anticorpo monoclonal.

Segundo WARNER¹²², os genes do maior complexo de histocompatibilidade (MHC) são muito importantes para a engenharia genética em espécies domésticas, devido a atuação em alguns fenômenos biológicos como, resistência a doenças e reprodução.

Um dos genes deste complexo, o gene Ped, em camundongos, influencia o desenvolvimento e a sobrevivência do embrião, mas a pesquisa de genes como o Ped, em espécies domésticas tem sido dificultada por dispor-se de poucos dados sobre a estrutura molecular do MHC.

O MHC codifica as maiores proteínas de superfície nas células e tecidos do indivíduo. O envolvimento do MHC na imunologia inclui rejeição de tecidos transplantados, estimulação da produção de anticorpos, linfólise, resposta imune e restrição da resposta imune. Os maiores fenômenos não imunes, nos quais MHC está envolvido são caracteres associados à reprodução.

O MHC tem função na preferência de cruzamentos, no número de óvulos produzidos, na taxa de clivagem embrionária, no sucesso da implantação, no tamanho dos fetos e no tamanho da ninhada.

Neste trabalho, Warner teve como objetivo o estudo do MHC de duas espécies domésticas, porco e galinha, usando a análise do polimorfismo de fragmentos de restrição, a fim de identificar, seqüências e clonar os genes do MHC, no intuito de encontrar alelos mais vantajosos para sua introdução em germoplasmas. No MHC existe três classes de

moléculas: I, II e III. A I e II são glicoproteínas de superfície a III é componente do complexo do soro.

Para a determinação do número de genes da classe I, em cada uma das espécies, os genes foram isolados, depois digeridos com enzima de restrição. Procedeu-se então a eletroforese, transferiu para nitrocelulose e foi depois hibridizado com cDNA padrão (de camundongo).

As enzimas de restrição usadas foram Sst I, Hind III e Bam HI. Os resultados sugerem que 10 a 20 genes são responsáveis pela classe I, em porco e 3 a 10 genes, em galinha.

3. CONCLUSÕES

Acredita-se que a maior contribuição da biotecnologia seja permitir a modificação de genomas de plantas e animais, de maneira mais incisiva e rápida, do que através do melhoramento convencional.

A ênfase desta contribuição recai sobre os seguintes pontos:

- a. Produção de novos tipos, até agora inacessíveis.
- b. Investigar o controle genético, com o objetivo de regenerar o material cultivado "in vitro".
- c. Desenvolver técnicas para a produção de plantas haplóides.
- d. Obter plantas, livres de doença, via cultura de tecido.
- e. Pesquisar a fertilização "in vitro" tanto para plantas como animais.
- f. Introduzir DNA de uma planta para outra, sexualmente incompatível, via fusão de protoplasto.
- g. Introduzir DNA exógeno em ovos de mamíferos, no sentido de agilizar e intensificar o melhoramento genético através de seleção.
- h. Introduzir genes para a resistência a doenças ou patógenos ou agente tóxico ou genes para fixação biológica do nitrogênio, em plantas.
- i. Propagar vegetativamente as plantas.
- j. Transplantar DNA de mitocôndria e cloroplasto.

A biotecnologia é uma área de "ponta", no limiar dos processos de transformação tecnológica, em que os detentores do conhecimento científico, não o repassarão aos outros países. Mas a defasagem tecnológica, apesar de já evidente em determinados tipos de indústrias de bens e serviços, ainda comporta a competição, pelas diferenças de disponibilidade de insumos básicos, minerais, água e energia e pela ampla gama de produtos cujo potencial de geração, por biotecnologia, cria espaços para países subdesenvolvidos.

O país de origem dos conhecimentos técnico-científicos que sustentam o processo biotecnológico, não constitui necessariamente, o local da fase final de desenvolvimento. Assim, há oportunidades, com vantagens, para países do terceiro mundo, detentores de substratos bioprocessáveis, para os quais os processos deverão ser "aclimatados" ou que representam o principal mercado para certos produtos ou serviços de origem biotecnológica.

Há, portanto, espaço para países cujos governos decidam participar do processo, desde que a biotecnologia seja encarada como área a merecer tratamento especial: que

disponha de programas de coordenação, que evite a pulverização dos investimentos, que estimule a cooperação, a complementariedade e a partilha dos resultados, que não relegue a segundo plano a pesquisa básica, que fortaleça a integração entre a oferta e a demanda da tecnologia e que examine as principais conseqüências do "fosso tecnológico" existente entre os países desenvolvidos e subdesenvolvidos, em níveis de difícil superação.

O Brasil dispõe de inúmeras vantagens, para a implantação de programa especial em biotecnologia

Do ponto de vista da demanda, há problemas de saúde, agrícolas e energéticos, que requerem atenção governamental e atividades industriais, cujos resultados serão de gran-

de impacto sócio-econômico para o País.

A proposta de ação do governo brasileiro em biotecnologia, foi oficialmente configurada em 1981, através do PRO-NAB – Programa Nacional de Biotecnologia, elaborado através da ação conjunta CNPq-FINEP e referendado pela Secretaria do Planejamento da Presidência da República.

Os investimentos previstos, se ocorrerem e forem devidamente aplicados, irão permitir o alcance de metas básicas, para a geração de biotecnologias importantes para a realidade política e sócio-econômica nacionais. Permitirão também a entrada do Brasil no cenário de competitividade internacional, minimizando a importação de tecnologia, como é desejável.

ABSTRACT

This review reports the use of biotechnology in agriculture and animal husbandry. The main techniques and the most important products both in experimental stage or in commercial use are reported. The work intends to give a global vision to the theme, chronologically and spacially, showing the main lines of research and what has been obtained in this area. The techniques and products that are related to genetics and breeding are emphasized.

KEY-WORDS: *Biotechnology; Genetic Engineering; Recombinant DNA; Tissue Culture; Embryo transfer; Antibody monocloning; Nitrogen fixation; Biological control.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

001. AFFARA, N.A.; RIBERT, B. JACQUET, M.; BUCKINGHAM M.E.; GROS, F. Changes in gene expression during myogenic differentiation. I. Regulation of messenger RNA sequence expressed during myotube formation. *Journal Molecular Biology*: 140-441, 1980.
002. ALVES, S.B. Vírus entomopatogênicos. In: Alves, S. B. Coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, 1986. p. 171.
003. ALVES, S.B., Produção de vírus, protozoários e nematóides entomopatogênicos. In: Alves, S.B. Coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole. 1986. p.324.
004. ALVES, S.B., Fungos Entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. Coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, 1986. p.73.
005. ALVES, S.B., Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. Coord. *Controle Microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, 1986. p. 311.
006. AMANN, R.P. & SCHANBACKER, B.D. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci.*, 57(2): 380, 1983.
007. AZEVEDO, J.L. & MESSIAS, C.L. Aspectos genéticos do controle biológico de insetos por fungos. In: AZEVEDO, J.L. Coord. *Genética de Microrganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética*. s.l. FEALQ, 1985, p.111.
008. BAJAJ, Y.P.S., Protoplast isolation, culture and somatic hybridization. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. ed. *Plant cell, tissue and organ culture*. Berlin, Springer-Verlag, 1977. 803 p.
009. BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. *Plant Disease*, 69: 770, 1985.
010. BELLIARD, G.; VEDEL, F.; PELLETIER, G. Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Nature*, 281: 401, 1979.
011. BOMHOFF, G.; KLAPWIJK, P.M.; KESTER, H.C.M.; SCHILPEROORT, R.A.; HERNALSTEENS J.P.; SCHELL, Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.*, 145: 177, 1976.
012. BRADFORD, G.E., Evidence for a major gene for rapid growth in mice. *J. Anim. Sci.*, 55(1): 140, 1982.
013. BRETTELL, R.I.S. & INGRAM D.S. Tissue culture in the production of novel disease; resistant crop plants *Biol. Rev.*, 54: 329, 1979.
014. BRILL, W.J., Microbiologia agrícola. *Investigation y ciência*. Edição em espanhol de Scientific American 62: 119.
015. BUTCHER, D.N. Secondary products in tissue cultures. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.B.S. ed. *Plant. Cell, Tissue and organ culture*. Berlin, 1977. 803 p.
016. CAMERON, J.W.M., Factors affecting the use of microbial pathogens in insect control. *Annual Review of Entomology*, 8: 265, 1963.
017. CANNON, F.C.; DIXON, R.A.; POSTGATE J.R. Chromosomal integration of *Klebsiella* nitrogen fixation genes in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbial*, 80: 227, 1974.
018. CARLSON, P.S. SMITH, H.H.; DEARING, R.D. Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 2292, 1972.
019. CHILTON, MD.; DRUMMOND, H.J.; MERLO, D.J.; SCIAKY,

- A.L.; MONTOYA, A.L.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11: 263, 1977.
020. CHIZZONITE, R.A.; EVERETT, A.W.; CLARK, W.A.; JACOVIC, S.; RABINOWITZ, M.; ZAK, R. Isolation and characterization of two molecular variants of myosin heavy chain from rabbit ventricle. *Journal Biol. Chem.*, 257: 2056, 1982.
021. CHOUREY, P. & NELSON, O. Apud: DORING, H.P.M. GRISER; WECK, W. WERR, COURAGE-TEBBE M. TILLMANN E. STARLINGER, P. 1983. Comparison of genomic clones derived from the *Sh* gene in *Zea mays* L. and of two mutants of this gene which are caused by the insertion of the controlling element *Ds*: In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P.; HOLLAENDER, A. Ed. *Genetic engineering of plants*. N.Y. Plenum, 1983. p. 203-210.
022. COOK, R.J. & BAKER, K.F. The nature and practice of Biological control of plant pathogens. The Amer. Phytopathol. Society. 539 p.
023. COX, E.A.; STOTZKY G.; GOOS, R.D. "In vitro" culture of *Musa balhasiana* Calla embryos. *Nature*, 185: 403, 1960.
024. CUBETA, M.A.; HARTMAN, G.L. SINCLAIR, J.B. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybean seeds. *Plant Disease*, 69: 506, 1985.
025. DAVEY, M.R. & COCKING, C. Uptake of bacteria by isolated higher plant protoplast. *Nature*, 239: 455, 1972.
026. DEHNE, H.W. Interaction between vesicular arbuscular micorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 1115, 1982.
027. DOBEREINER, J. Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas florestais. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 19: 83, 1984.
028. DRUMMOND, M.H.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W.; CHILTON, M.D. Foreign DNA bacterial plasmid origin is transcribed in crown gall tumor. *Nature*, 269: 535, 1977.
029. DULMAGE, H.T. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest. control. In: BURGESS, H.D. ed. *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*. N.Y.; Academic, 1981. p. 193.
030. ENGLER, G.; DEPICKER, A.; MAENHAUT, R.; VILLARROEZ-MANDIOLA, R.; VAN MONTAGU, M. SCHELL, J. Physical mapping of DNA base sequence homologies between an octopine and a nopaline Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* J. *Mol. Biol.*, 152: 183, 1981.
031. FAUST, R.M. & BULLA, JR., L.A. Bacteria and their toxins as insecticides. In: KURSTAK, E. ed. *Microbial and viral pesticides*. N.Y., Dekker, 1982, p. 75.
032. FERENCZY, L. & A. MARAZ. Transfer of mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 268: 524, 1977.
033. FISCHER, R.L. & GOLDBERG, R.B. Structure and flanking regions of soybean seed protein genes. *Cell*, 29: 651, 1982.
034. FRALEY, R.S.L., DELLAPORTO, C.; PAPAHAJIOPOULOS, D. Liposome-mediated delivery of tobacco mosaic virus RNA into tobacco protoplasts: a sensitive assay for monitoring liposome-protoplast interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 1859, 1982.
035. GARCIA, J. & BRITO, J. Utilização de microrganismos no tratamento de minérios de urânio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENERGIA. 3. 5(5): 2049.
036. GARDNER, R.C. Plant viral vectors: CaMV as an experimental tool. In: KOSUGE, T. MEREDITH, C.P. HOLLAENDER, A. ed. *Genetic engineering of plants and agricultural perspective*. Plenum N.Y., 1983.
037. GAUTHIER, G.F., LOWEY, S.; BENFIELD, P.A.; HOBBS, A.W. Distribution and properties of myosin isozymes in developing avian and mammalian skeletal muscle fibers. *Journal Cell. Biol.*, 92: 471, 1982.
038. GENGENBACK, B.G.; GREEN; DONOVAM, C.M. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5113, 1977.
039. GRACE, T.D.C. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown "in vitro". *Nature*, 195: 788, 1962.
040. GREVE, J.; LEEMANS, J.; HERNALSTEENS, J.P.; THIA-TOONG, L.; BEUCKELLER, M.; WILLMITZER, L.; OTTEN, L.; VAN MONTAGU M.; SCHELL, J. Regeneration of normal and fertile plants express octopine synthase, from tobacco crown galls after deletion of tumor-controlling functions. *Nature*, 300: 752, 1982.
041. GROSS, D.C. & VIDAVER A.K. Transformation of *Pseudomonas syringae* with nonconjugative R plasmids. *Can. J. Microbiol.* 27: 759, 1981.
042. HABIB, M.E.M & ANDRADE C.F.S. Bactéria entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. Coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, 1986. p.127
043. HAMMER, R.W.E.; PURSEL, V.G.; REXROAD, C.E.; WALL, R.J.; BOLT, D.J.; PALMITER, R.J.; BRINSTER, R.L. Genetic engineering of mammalian embryos. *Journal of Animal Science*, 63(1): 269, 1986.
044. HANNAY, C.L. & FITZ-JAMES, P.C. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Canadian Journal of Microbiology*, 1: 694, 1955.
045. HARDY, R.W.F. & HAVELKA, M.D. Nitrogen fixation research: a key to world food. *Science*, 188: 633, 1975.
046. HARRISON, B.D.; FINCH, J.I.; GIBBS, A.J.; HOLLINGS, M.; SHEPERD, P.J.; VALENTA V.; WETTER, C. Sixteen groups of plant viruses. *Virology*, 45: 356, 1971.
047. HESS, D. Cell modification by DNA uptake. In: REINERT, J & BAJAJ, Y.P.S. ed. *Plant cell, tissue and organ culture* Springer-Verlag, Berlin, 803, p.
048. HOPPE, P.C. & ILLMENSEE, K. Microsurgically produced homozygous-diploid uniparental mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74: 5657, 1977.
049. IIOWELL, S.H.; WALKER, L.L.; DUDLEY, R.K. Cloned cauliflower mosaic virus DNA infects turnips (*Brassica rapa*). *Science*, 208: 1265, 1980.
050. HURKMAN, W.J.; SMITH, L.D.; RICHTER, J.; LARKINS, B.A. Subcellular compartmentalization of maize storage proteins in *Xenopus* oocytes injected with zein messenger RNAs. *J. Cell. Biol.*, 89: 292, 1981.
051. IGNOFFO, C.,M. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. In: BURGESS, H.D. *Microbial control of pest and plant diseases*. Londres, Academic, 1981. p. 413
052. IZUKA, T.; FAUST, R.M.; TRAVERS, R.S. Isolation and

- partiol characterization of extrachromosomal DNA from serotypes of *Bacillus thuringiensis* pathogenic to Lepidopteran and Diptera – Larvae by agarose gel e electrophoresis. *The Journal of Sericul. Sci. of Japan.*, 50(2): 120, 1981.
053. JENSEN, C.J. Monoploid production by chromosome elimination. In: REINERT, J. e BAJAJ, Y.P.S. Ed. *Plant cell: tissue and organ culture*. Berlin, Springer-Verlag, 1977. 803. p.
054. JOHRI, B.M.; SRIVASTAVA, P.S.; RASTE, A.P. Endosperm culture. *Int. Rev. Cyt. Sup. 11B*: 157, 1980.
055. JONES, R.G.W. & GORHAM, J. Aspects of salt and drought tolerance in higher plants. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P.; HOLLAENDER, A. *Genetics engineering of plants: an agricultural perspective*, s.l., ed., 1983. p. 355.
056. KADO, C.I.; & KLEINHOF, A. Genetic modification of plant cells through uptake of foreign DNA. *Int. Rev. Cytol. Sup.*, 11B: 47, 1980.
057. KANTA, K.; RANGASWAURY, N.S.; MAHESHUWARI, P. Test tube fertilization in a flowering plant. *Nature*, 194: 1214, 1962.
058. KAVINSKY, C.J.; UMEDA, P.K.; LEVIN, J.E.; SINHA, A.M.; NIERO, J.M.; JACKOVIC, S.; RABINOWITZ, M. Analysis of cloned mRNA sequences encoding subfragment 2 and part of subfragment 1 alpha and beta-myosin heavy chains of rabbit heart. *Journal Biol. Chem.* 259: 2775, 1984.
059. KAVINSKY, J.; UMEDA, P.K.; SINHA, A.M.; ELZING, A.M.; TONG, S.W.; ZAK, R.; JACKOVIC, S.; RABINOWITZ, M. Cloned mRNA sequences for two types of embryonic myosin heavy chains from chick skeletal muscle. *Journal Biol. Chem.*, 258: 5196, 1983.
060. KEITH, W.K. & LEWIN, H.A. Monoclonal antibodies: pragmatic application of immunology and cell biology *journal of Animal Science*, 63(1): 298, 1986.
061. KELLY, D.C. *Oryctes* virus replication: electron microscope observations on infected a moth and mosquito cells. *Virology*, 69: 596, 1976.
062. KERR, A. & TATE, M.E. Agrocins and the biological control of crown gall. *Microbiol. Sci.*, 1:1, 1984.
063. KOHLER, G. & MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495, 1975.
064. LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60: 197, 1981.
065. LERNER, S.P.; TAYNE, W.V.; BAKER, R.D.; HENSCHEN, T.; MEREDITH, S.; INSKEEP, E.K.; DAILEY, R.A.; LEWIS, P.E.; BUTCHER, R.L.; AGE, dose of FSH and other factors affecting superovulation in holstein cows. *Journal of Animal Science* 63(1): 176-183, 1986.
066. LEMOS, M.V.F. Aspectos genéticos da fixação de nitrogênio. In: AZEVEDO, J.L. Coord. *Genética de Microorganismos em biotecnologia e engenharia genética*. s.l., FEALQ, 1925, p. 105.
067. LINDOW, S.E.; ARNY, D.C.; UPPER, C.D. *Erwinia herbicola*: a bacterial ice nucleus active in increasing frost injury to corn. *Phytopathology*, 68: 523, 1978.
068. LORDELLO, I.G.E. Nematóide de Plantas Cultivadas. 6. ed. São Paulo, Nobel, 1981, 314 p.
069. MAHDAVI, V.; CHAMBERS, A.P.; NADAL-GINARDI, B. Cardiac alpha and beta – myosin heavy chain genes are organized in tandem. *Proc. Natl. Acad. Science*, 81: 2626, 1984.
070. MARX, J.L. Somatic cell hybrids: impact on mammalian genetics. *Science*, 179: 785, 1973.
071. MCCOY, C.W.; HILL, A.J.; KANAVAL, R.F. A liquid medium for the large-scale production of *Hirsutiella thompsonii* in submerged culture. *Journal of Invertebrate Pathology*, 19: 370, 1972.
072. McDANIEL, B.T. & DENTINE, M.R. Genetic Gains in milk yield possible through artificial insemination and embryo transfer. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO ANIMAL, 1., São Paulo, 1983. *Anais.* São Paulo, s.ed., 1983. p. 145.
073. MEDFORD, R.M.; WYDRO, R.M.; NGUYEN, H.T.; NADAL-GINARD, R.D. Cytoplasmic processing of myosin heavy chain messenger RNA: Evidence provided by using a recombinant DNA plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 5749, 1980.
074. MELO, I.S. Controle biológico de doenças de raiz. In: REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., Piracicaba - SP, 1986. *Anais.* Piracicaba, ESALQ, 1986.
075. MILLER, L.K.; LINGG, A.J.; BULLA Jr. L.A. Bacterial viral and fungal insecticides. *Science*, 219: 715, 1983.
076. MORAES, I.O. Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa. Campinas, F.E.A./UNICAMP, 1973. 60p. (Tese de mestrado).
077. MORAES, I.O. & CAPALBO, D.M.F. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. Coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, 1986. p. 297.
078. MOSCARDI, F. Utilização de vírus para o controle da lagarta-da-soja. In: ALVES, S.B. Coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, 1986. p. 188-202.
079. MULLER, G.W. & COSTA A.S. Uso da premunização com estirpes fracas do vírus da tristeza reergue a produção comercial de laranja pera no estado de São Paulo. *Fitopatol. - Brasil*, 6: 301, 1981.
080. NEW, P.B. & KERR, A. Biological control fo crown gall: field observations and green house experiments. *J. Appl. Bacteriol.*, 35: 279, 1972.
081. NGUYEN, H.T.; GUBITS, R.M.; WYDRO, R.M.; NADAL-GINARDI, B. Sarcomeric myosin heavy chain is coded by a highly conserved multigenes family. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 5230, 1982.
082. NOVARETTI, W.R.T. Controle biológico de nematóides fitopatogênicos. In: REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., Piracicaba - SP., 1986. *Anais.* Piracicaba, ESALQ, 1986.
083. OCHOA-ALEJO, N. Linhagens celulares de plantas superiores. In: CROCOMO, O.J. et alii, ed. *Seminário de Biotecnologia Agrícola*. Piracicaba, SP. Brasil. 264 p.
084. OLIVEIRA, A.A.R. & ZAMBOLIM, L. Interação entre o fungo endomicorrízico *glomus etunicatum* e o nematóide das galhas, *Meloidogyne javanica* sob diferentes níveis de fósforo em feijão. *Fitopatol. Brasil*, 9(2): 429, 1984.
085. OSBORN, T.B. Apud: LARKINGS, B.A. Genetic engineering of seed storage proteins. In: KOSUGE,

- T.; MEREDITH, C.P.; HOLLAENDER, A. ed. *Genetic Engineering of plants: an agricultural perspective*. N.Y. Plenum, 1983. p. 93.
086. PALMITER, R.D.; NORSTEDT, G.; GELINAS, R.E.; HAMMER, R.E.; BRINSTER, R.L. Metallothionein - human growth hormone fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, 222: 809, 1983.
087. PEDERSEN, K.; DEVEREUX, J.; WILSON, D.R.; SHELDON, E.; LARKINS, B.A. Cloning and sequence analysis reveals structural variation among related zein genes in maize. *Cell*, 29: 1015, 1982.
088. PICKETT, B.W. & BERNDTSON, W.E. Preservation of bovine spermatozoa by freezing, in straws: a review. *J. Dairy Sci.*, 57: 1287, 1974.
089. PINKEL, D.; GLEDHILL, B.L.; LAKE, S.; STEPHENSON, D.; VAN DILLA, M.A. Sex preselection in mammals? Separation of sperm bearing y and "O" chromosomes in the vole *Microtus oregoni*. *Science*, 218: 904, 1982.
090. POWER, J.B. & COCKING, E.C. Selection systems for somatic hybrids. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. ed. *Plant cell, tissue and organ culture*. Berlin. Springer Verlag. 803 p.
091. PRING, D.R. & LEVINGS III C.S. Heterogeneity of maize cytoplasmic genomes among male-sterile cytoplasms. *Genetics*, 89: 121, 1978.
092. RADKE, K. & LAGARIAS, D. Altering the genetic make up of animals. *Biotechnology*, 4(1): 14, 1986.
093. RAGHAVAN, V. Applied aspects of embryo culture. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., ed. *Plant cell tissue and organ culture*. Berlin, Springer-Verlag, 1977. 803 p.
094. RAGHAVAN, V. Embryo culture. *Int. Rev. Cytol. Sup.*, 11B: 209, 1980.
095. REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Anther culture: haploid production and its significance. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., ed. *Plant cell, tissue and organ culture*. Berlin, Springer-Verlag, 1977. 803 p.
096. REZENDE, J.A.M.; COSTA, A.S.; MULLER, G.W. Controle biológico de viroses de plantas. In: REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., Piracicaba - SP., 1986. *Anais...* Piracicaba, ESALQ, p. 39.
097. RUSHBROOK, J.I. & STRACHER, A. Comparison of adult, embryonic, and dystrophic myosin heavy chains from chicken muscle by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and peptide mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 4331, 1979.
098. RUTLEDGE, J.J. & SEIDEL, G.E. Genetic engineering and animal production. *Journal of Animal Science.*, 57(2): 265, 1983.
099. SACRISTÁN, M.D. & MELCHERS, G. Regeneration of plants from "Habited" and "Agrobacterium - transformed" single-cell clones of tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 152: 111, 1977.
100. SAYRE, R.M. Biocontrol: *Bacillus penetrans* and related parasites of nematodes. *Journal of Nematology*, 12(4): 260, 1980.
101. SCHENCK, N.C. Can mycorrhiza control root disease? *Plant Dis.*, 65: 230, 1981.
102. SCHEIDER, O. & VASIL, I.K. Protoplast fusion and somatic hybridization. *Int. Rev. Cyt. Sup.*, 11B: 21, 1980.
103. SCHWARTZ, H.J.; GALLETA, G.J.; ZIMMERMAN, R.H. Field performance and phenotypic stability of tissue culture-propagated strawberries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 106: 667, 1981.
104. SCOTNICKI, M.L. & ROLFE, B.G. Transfer of nitrogen fixation genes from a bacterium with the characteristics of both *Rhizobium* and *Agrobacterium*. *J. Bacteriol.*, 133: 518, 1978.
105. SCOWCROFT, W.R. *Genetic variability in tissue culture: impact on germoplasm conservation and utilization*. s.l., AGPG: IBPGR/84/152. 41 p.
106. SHERMAN, D.M.; ACRES, S.D.; SADOWSKI, P.L.; SPRINGER, J.A.; BRAY, B.; RAYBOULD, T.J.G.; MUSCOPLAT, C.C. Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered *Escherichia coli* K99. *Specific monoclonal antibody*. *Infect. Immun.*, 42: 653, 1983.
107. SHERMAN, K.E. Considerations in the large-scale and commercial production. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K.E., ed. *Viral insecticides for biological control*. N.Y., Academic, 1985. p. 757-774.
108. SHERWOOD, J.L. & FULTON, R.W. Competition for infection sites and multiplication of the competing strain in plant viral interference. *Phytopathology*, 73: 1363, 1983.
109. SINGER, S. Potential of *Bacillus sphaericus* and related spore-forming bacteria for pest control. In: BURGESS, H.D. *Microbial control of pests and plant diseases*. Academic, N.Y., 1981. p. 283.
110. SINHA, A.M.; UMEDA, P.K.; KAVINSKY, C.J.; RAJAMANICKAM, C.; HSU, H.J.; JACKOVIC, S.; RABINOWITZ, M. Molecular cloning of mRNA sequences for cardiac alpha and beta form myosin heavy chains: Expression in ventricles of normal, hypothyroid, and thyrotoxin rabbits. *Prod. Natl. Acad. Sci.*, 79: 5847, 1982.
111. STABA, G.J. Tissue culture and pharmacy. In: REINERT, J., & BAJAJ, Y.P.S., ed. *Plant cell, tissue and organ culture*. Berlin, Springer-Verlag, 1977. 803 p.
112. STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penentrans*. *Phytopathology*, 74: 55, 1984.
113. STOCKDALE, H. & PRINSTON, R.A.J. Production of insect viroses in cell culture. In: BURGESS, H.D., ed. *Microbial Control of Pests and Plant diseases*. N.Y. Academic, 1981. p. 313-328.
114. STROM, A.R.; LERUDULIER, D.; JACOWEC, M.W.; BUNNELL, R.C.; VALENTINE, C.C. Osmoregulatory (Osm) genes and osmoprotective compounds. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P.; HOLLAENDER, A. *Genetics engineering of plantas: and agricultural perspective*, 1983. p. 39.
115. TINSLEY, W. & KELLY, D.C. Taxonomy and nomenclature of insect pathogenic viruses. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K.E. ed. *Viral insecticides for biological control*. N.Y. Academic, 1985. p. 3-26.
116. TRUDINGER, P.A. Microbes, metals and minerals. *Mineral Science Engineering*, 3(4): 113-125, 1971.
117. UCHYTIL, T.F. & DURBIN, R.D. Hydrolysis of tabtoxins by plant and bacterial enzymes. *Experientia*, 36: 301, 1980.
118. VAISBICH, S.V. et alii. Lixiviação bacteriana de rejeito de

- minério de cobre de Camaquã pela ação de bactéria isolada no rejeito. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 10(4): 289-302, 1979.
119. VASIL, I.K. Androgenetic haploids. *Int. Rev. Cytol. Sup.*, 11A: 195, 1980.
120. VASIL, I.K. & VASIL, V. Clonal propagation. *Int. Rev. Cytol. Sup.*, 11A: 145, 1980.
121. VIEGAS, J.A. & BARROS, P.M. *Biotecnologia e Desenvolvimento Nacional*. São Paulo, Depto. de Ciência e Tecnologia, 1985. 328 p.
122. WARNER, C.M. Genetic manipulation of the major histocompatibility complex. *Journal of Animal Science*, 63(1): 279-287, 1986.
123. WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. *Oxford Rev. Biol.*, 1: 283, 1986.
124. WATSON, J.D.; TOOZE, J.; KURTZ, D.T. Recombinant DNA. *Scientific American Books*. N.Y., 1983. p. 164-173.
125. WATSON, J.D.; TOOZE, J.; KURTZ, D.T. Recombinant DNA. *Scientific American Books*. N.Y., 1983. p. 176-188.
126. WATSON, J.D.; TOOZE, J.; KURTZ, D.T. Recombinant DNA. *Scientific American Books*. N.Y., 1983. p. 200-210.
127. WELLS, H.D.; BELL, D.K.; JAWORSKI, C.A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 62: 442, 1972.
128. WHITE, K.L.; LINDNER, G.M.; ANDERSON, G.B.; BONDURANT, R.H. Survival after transfer of "sexed" mouse embryos exposed to H-Y antisera. *Theoriogenology*, 18: 655, 1982.
129. WILLADSEN, S.M. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 277: 298, 1979.
130. WILLIAMS, T.J.; ELDSEM, R.P.; SEIDEL, G.E. Identical twin bovine pregnancies derived from bisected embryos. *Theoriogenology*, 17: 114, 1982.
131. WILSCHUT, N.; DUZQUNES, R.; FRALEY, R.T.; PAPAHAJOUPOULOS, D. Apud: FRALEY, R.T. & HORSCH, R.B. "In vitro" plant transformation systems using liposomes and bacterial co-cultivation. In: KOSUGE, R.; MEREDITH, C.P. & HOLLAENDER, A. ed. *Genetic Engineering of plants*. N.Y., Plenum, 1983. p. 177-194.
132. YODER, D.C. Toxins in pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 18: 103, 1980.
133. YOUNG, R.B.; MORIARITY, D.M.; MCGEE, C.E. Structural analysis of myosin genes using recombinant DNA techniques. *Journal of Animal Science.*, 63(1): 259-268, 1986.
134. ZENKTELER, M. Intraovarian and in vitro pollination *Int. Rev. Cytol. Sup.*, 11B: 137, 1980.

AGRADECIMENTOS:

Ao professor Marco Antonio da Rocha do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Patologia Animal e Zootecnia - CCA/FUEL, pelas valiosas críticas e sugestões emitidas. À Diretoria de Pesquisa, pelas facilidades na publicação, em virtude das características inerentes ao trabalho.