

ISSN 0102-0110

Documentos

Número, 21

Talento Estudantil do Cenargen - 1996

Resumo dos trabalhos



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos
Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

República Federativa do Brasil

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Arlindo Porto Neto

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Elza Angela Battaggia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

**Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia -
CENARGEN**

Chefe Geral

Afonso Celso Candeira Valois

Chefe-Técnico de Recursos Genéticos

Edna Stella Brito G. Costa Manso

Chefe-Técnico de Biotecnologia

Dameres de Castro Monte

Chefe-Administrativo

Osmar Rodrigues de Faria

Documentos, nº 21

ISSN 0102-0110

Talento Estudantil do Cenargen - 1996

Resumo dos trabalhos



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos
Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

*Brasília, DF
1996*

Embrapa-Cenargen - Documentos, 21

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia

SAIN Parque Rural - Final Av. W/5 Norte - Brasília, DF

CEP: 70770-900 Caixa Postal: 02372

PABX: (061) 340-3600 Tel: (061) 340-3500

Fax: (061) 340-3624 Telex: (061) 1622

Comitê de Publicações

Presidente: Edna S. B. G. Costa Manso

Secretário Executivo: Miguel Borges

Membros: Ana Cristina M. Brasileiro

 Antônio Costa Allem

 Damares de Castro Monte

 Eugen S. Gander

 Maria Regina J. Soares

 Rui A. Mendes

Editoração eletrônica: Francisco Marcelino Valeriano Amorim

 Fábio Rocha Araujo

Normalização bibliográfica: Maria Regina Jorge Soares

Editoria: Antônio Costa Allem

 Maria Consolacion F. Vallafane Udry

 Marcos Rodrigues de Faria

 Marisa de Goes

 Miguel Borges

Tiragem: 500 exemplares

Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF). **Talento estudantil do CENARGEN - 1996:** resumos dos trabalhos. Brasília, 1996. 60p. (Embrapa-CENARGEN. Documentos, 21).

1. Controle Biológico. 2. Recurso Genético. 3. Biotecnologia. I. Título. II. Série.

CDD 575.1

APRESENTAÇÃO

O Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen-objetiva não só conter a progressiva perda dos recursos genéticos do País e aumentar a disponibilidade dos mesmos para os programas de melhoramento genético, como também, promover o desenvolvimento de conhecimentos técnicos científicos básicos em recursos genéticos, biotecnologia e controle biológico. Cumprindo sua missão institucional, na qualidade de um dos Centros Temáticos da Embrapa, responde a demanda da sociedade por treinamento técnico-científico.

Nesse contexto uma das principais atividades para o cumprimento da missão do Centro tem sido o atendimento de bolsistas, estagiários, alunos de pós-graduação e pesquisadores visitantes que se deslocam para a Unidade com o objetivo de completarem currículos escolares, receberem orientação e preparar teses, dissertações e monografias, além de realizarem pesquisas, atividades estas incluídas nos objetivos e metas do Cenargen.

Uma das formas de acompanhamento, avaliação e controle desse esforço institucional é a uniformização dos conhecimentos adquiridos, além de mostrarem a qualidade técnica dos trabalhos de pesquisa realizados.

Nesse sentido, o Cenargen organizou pela primeira vez em março de 1996, um seminário técnico-científico denominado "Talento Estudantil do Cenargen" visando divulgar e promover o intercâmbio interno e externo dos trabalhos dos treinandos através da apresentação em seminários abertos dos projetos desenvolvidos individualmente ou em equipe.

É com imensa satisfação que o Cenargen coloca esta publicação à disposição da sociedade contendo os resumos dos trabalhos apresentados no referido seminário, na certeza de estar incentivando e promovendo a trajetória de jovem cientista rumo à construção de uma sociedade sustentável.

Afonso Celso Candeira Valois
Chefe Geral
Embrapa - Cenargen

S U M Á R I O

PALESTRA

- A evolução dos mapas genéticos***
Rubens Onofre Nodari 11

RESUMOS DOS TRABALHOS

- Influência da temperatura de cultivo no crescimento e toxicidade do isolado S93 de Bacillus thuringiensis subesp. kurstaki***
Jeanine S. Giusti, Denise C. Costa e José M. C. S. Dias 13

- Padrões isoenzimáticos de isolados de Alternaria cassiae que apresentaram potencial bio-herbicida para o manejo de populações do fedegoso (Senna obtusifolia)***
Gutemberg Delfino de Sousa, Glaucia de Figueiredo e Eliana M.G. Fontes 14

- Efeito da previsibilidade alimentar no vigor da prole de Podisus nigrispinus (Heteroptera: Pentatomidae)***
Vinicius F. Carvalho, Og de Souza, Eliana M.G. Fontes, José Zanuncio e Andréa dos P. Serafini 16

- Avaliação preliminar da atividade letal de bacilos contra o nematóide do alho Ditylenchus dipsaci (Kühn, 1857) Filipjev, 1936***
André G. S. Rocha, José M. C. S. Dias e Renata C. V. Tenente 18

Avaliação da estabilidade de Bacillus thuringiensis subesp. kurstaki isolado S93 armazenado a -18° C
Jeanine S. Giusti e José M.C.S. Dias 19

Avaliação da potência de 15 estirpes de Bacillus sphaericus contra larvas dos mosquitos Aedes fluviatilis e Culex quinquefasciatus
Cláudia M. de Carvalho, Ana M. Sanchez e José M. C. S. Dias 20

Análise de agregação e similaridade de 94 isolados brasileiros de Bacillus sphaericus por meio de antibiogramas
Cláudia M. de Carvalho e José M.C.S. Dias 21

Isolamento e identificação preliminar de contaminante bacteriano em dieta artificial de bicudo-do-algodoeiro (Anthonomus grandis)
José R. M. V. Abreu Neto, Cláudia M. de Carvalho e José M. C. S. Dias 22

Isolamento e caracterização de bacilos da Região Norte do Brasil e avaliação da patogenicidade contra dípteros e lepidópteros
Silvânia F. Silva, Raquel C.P.S. Caetano, Adriana N. Tostes, Jacqueline M. Farias e José M. C. S. Dias 23

- Seleção de isolados de Bacillus thuringiensis com atividade larvicida contra Anticarsia gemmatilis e Spodoptera frugiperda***
Adriana N. Tostes, Joseilde O. Silva-Werneck, Cláudia B. Siqueira e José M.C.S. Dias 25
- Infecção de Schistocerca pallens (Orthoptera:acrididae) pelo protozoário Nosema locustae (Microspora:nosematidae)***
João B. T. da Silva e Absolon L. da Silva Júnior 26
- Regeneração de calos de Eucalyptus grandis x E. urophylla***
Silvia B.R.C. Carvalheira, Luis Pedro Barrueto Cid e Ana Cristina M. Brasileiro 27
- Análise de distância genética entre clones de Eucalyptus: aplicações no melhoramento, mapeamento genético e plantio operacional***
Cynthia Costa e Silva¹, Fernando Bertolucci², Dario Grattapaglia³ 28
- Mapeamento genético de isoenzimas e microsátélites e saturação dos grupos de ligação 6 e 9 de Brassica napus com marcadores RAPD***
Karla A. A. Paula, Alexandra M. Casa e Márcio Elias Ferreira 30

- Regeneração a partir de folhas do *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla***
Adriane C.M.G. Machado, Luis Pedro Barrueto Cid e Ana Cristina M. Brasileiro 32
- Adaptação de um protocolo para transformação genética de batata (*Solanum tuberosum* L.), cultivar *Bintje* visando introdução de resistência a PVY**
Aletéia V. Pascoal, Maria Imaculada C. S. Gama, Fernando Bravo-Almonacid, Alejandro Mentaberry, Eduardo Romano, Diva Dusi, Paulo Mello e Damares Monte-Neshich 33
- Ensaio preliminares de transformação genética de *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla***
Mariana V. Esmeraldo, Sérgio Araújo Figueiredo, Luciana de O. R. Machado, Luis Pedro Barrueto Cid e Ana Cristina M. Brasileiro 35
- Padrões de estabilidade de expressão de QTLs para crescimento em altura em *Eucalyptus grandis***
Eduardo N. Campinhos, Fernando L. Bertolucci, Acelino C. Alfenas e Dario Grattapaglia 36
- Marcadores RAPD mapeados são transferíveis entre árvores de *Eucalyptus urophylla* de uma mesma população**
Rosana P. V. Brondani e Dario Grattapaglia 38

- Mapeamento comparativo em Eucalyptus revela significativa conservação da ordem e ligação de locos RADP entre árvores e maior recombinação meiótica em parentais femininos***
Rosana P. V. Brondani e Dario Grattapaglia 40
- Análise da diversidade genética do arroz silvestre americano (Oryza spp.) através de marcadores moleculares***
Glaucia S. C. Buso, Marcos R. Bertozo, Paulo H. Rangel e Marcio Elias Ferreira 42
- Diagnóstico molecular para uso e preservação de germoplasma equino***
Valéria B. Martins, Marcio Elias Ferreira, Dario Grattapaglia e Assis Roberto de Bem 44
- Caracterização dos componentes biológicos da produção de sementes de Arachis pintoi Krap. & Greg. e A. repens Handro (Leguminosae)***
Andréa del Pilar de S. Peñaloza e José F. M. Valls 46
- Resgate de germoplasma e levantamento florístico na área de inundação e área de influência do aproveitamento hidrelétrico Corumbá I, Goiás***
Cristina M. de A. Gualda, Micheline C. Silva e Taciana B. Cavalcanti 48

<i>Revisão taxonômica das espécies brasileiras de Paspalum L., grupo Linearia (Gramineae; Paniceae)</i> <i>Regina Célia de Oliveira e José F.M. Valls</i>	50
<i>Flora do Distrito Federal: levantamento florístico do Parque Boca da Mata</i> <i>João M. de Rezende e Taciana B. Cavalcanti</i>	51
<i>Estudo da variabilidade genética em Arachis pintoï Krap. & Greg. através de cruzamentos intra e interespecíficos</i> <i>Marilda A. P. Oliveira e José F.M. Valls</i>	53
<i>Caracterização protéica e isoenzimática de populações de Arachis pintoï Krap. & Greg. e A. repens Handro</i> <i>Marcos R. Bertozo e José F.M. Valls</i>	55
<i>Produção de embriões e gestações a partir de ovócitos recuperados por ultra-sonografia em fêmeas bovinas superovuladas</i> <i>Maurício A. S. Peixer, Rodolfo Rumpf e Assis Roberto de Bem</i>	56
<i>Índice de autores</i>	58

A evolução dos mapas genéticos

Rubens Onofre Nodari

O desenvolvimento de mapas genéticos tem sido um dos objetivos dos geneticistas, desde a redescoberta das leis de Mendel, porque se constitui numa ferramenta de fundamental importância nos estudos de herança. A construção de mapas genéticos se tornou possível após a descoberta, no início deste século, da ligação entre genes e de que estes se localizam nos cromossomos. Um mapa genético é uma maneira de ver a segregação de genes e ao mesmo tempo um instrumento que mostra a relação física entre genes. Entretanto, os mapas não proporcionam informação a nível molecular dos genes. Os mapas genéticos são utilizados tanto em estudos básicos de genética quanto na manipulação de organismos vivos. Os mapas destacam-se por auxiliar na fundamentação de estudos comparativos e de evolução e no entendimento dos processos biológicos e da organização dos cromossomos. Se portadores de uma elevada quantidade de informações, os mapas genéticos proporcionam simplificação na manipulação genética. Entre as aplicações práticas estão as oportunidades para a clonagem de genes e a escolha de genótipos parentais para o melhoramento e seleção indireta de plantas. Com o advento das isoenzimas em 1957 e posteriormente dos marcadores moleculares (a partir dos anos 80), um número relativamente grande de marcadores genéticos se tornou disponível para a construção de mapas genéticos de alta resolução, alguns com

Eng. Agr., Ph. D, Universidade Federal de Santa Catarina

marcadores a cada centiMorgan (cM). Existem basicamente dois tipos de mapas: mapa genético de ligação e mapa físico. Enquanto para a obtenção do primeiro se baseia na quantidade de recombinação (distância relativa) entre marcadores, no mapa físico se utiliza a distância real (número de bases) entre marcadores genéticos. Pode-se então dizer que um mapa genético constitui-se no ordenamento e no estabelecimento da distância entre marcadores genéticos (qualquer marca no DNA). A unidade de distância entre marcadores num mapa de ligação é a medida da frequência de recombinação entre os marcadores analisados. Cada cM, unidade de mapeamento, corresponde a 1% de recombinação. Marcadores considerados ligados aparecem a uma distância menor que 50 cM. Um mapa físico de um cromossomo é semelhante ao mapa de uma rodovia. Consiste na localização de pontos conhecidos que são os marcadores e a distância em número de pares de bases entre eles. A construção de um mapa genético compreende quatro etapas: identificação de marcadores genéticos, desenvolvimento de uma população segregante, análise da herança dos marcadores genéticos na população segregante e estabelecimento da ordem dos marcadores genéticos e da distância entre eles. O mapeamento genético de plantas beneficiou-se com o desenvolvimento das técnicas moleculares desenvolvidas recentemente. As principais restrições são relativas à dificuldades de obtenção de populações experimentais segregantes, como em espécies frutíferas e arbóreas. Mapas genéticos para várias espécies de plantas tem sido desenvolvidos nos últimos anos.

Influência da temperatura de cultivo no crescimento e toxicidade do isolado S93 de Bacillus thuringiensis subesp. kurstaki

Jeanine S. Giusti¹, Denise C. Costa² e José M. C. S. Dias³

Em um "screening" envolvendo 218 isolados bacilares, foi obtido um B. thuringiensis subesp. kurstaki com elevada potência larvicida contra Spodoptera frugiperda, principal praga do milho no Brasil. Após diversas avaliações de sua toxicidade em comparação com estirpes comerciais, decidiu-se desenvolver um bioinseticida, com o novo isolado S93. Foram feitos estudos da influência da temperatura na produção de biomassa e de princípio ativo (pró-toxinas). O microrganismo foi cultivado em incubador rotativo a 200rpm por até 48h, nas temperaturas de 25, 27, 29, 31, 33, 35 e 37° C. As amostras foram submetidas a análises de pH, massa seca, absorvância, concentração de células e esporos e de proteínas. Bioensaios contra S. frugiperda também foram realizados com as amostras de 36 e 48h. Os resultados obtidos, para as condições de cultivo, mostram que a temperatura ótima de crescimento para o isolado S93 situa-se entre 29 e 31° C, sendo a 29° C a mais elevada velocidade específica de crescimento (0,41h⁻¹). Para os bioensaios realizados contra S. frugiperda, foi verificado que a 25 e 27° C a maior mortalidade deu-se com o cultivo de 48h, enquanto que nas demais temperaturas ensaiadas o cultivo de 36h foi mais eficaz contra S. frugiperda.

¹ Bolsista, CNPq., estudante de graduação de Biologia. ² Estagiária, Embrapa/CENARGEN. ³ Eng. Químico, Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

Padrões isoenzimáticos de isolados de Alternaria cassiae que apresentaram potencial bio-herbicida para o manejo de populações do fedegoso (Senna obtusifolia)

Gutemberg Delfino de Sousa¹, Gláucia de Figueiredo² e Eliana M. G. Fontes³

O fedegoso (*S. obtusifolia*) é uma Fabaceae que no Brasil se tornou importante espécie invasora nos cultivos de leguminosas em virtude do uso de herbicidas seletivos. Os levantamentos da micoflora patogênica associada ao fedegoso, apontaram o fungo *A. cassiae* como promissor no desenvolvimento de bio-herbicida destinado ao manejo desta invasora para ser aplicado de forma inundativa nas lavouras afetadas. Vários isolados deste fungo foram inoculados em plântulas de fedegoso de origens geográficas diversas, resultando em graus diferentes de severidade. A existência de variabilidade patogênica na população do fungo pode sugerir o potencial para a seleção de genótipos mais virulentos candidatos ao programa de manejo. A técnica de eletroforese de isoenzimas tem sido preconizada como ferramenta útil na análise de interações patógeno/hospedeiro. Cinco isolados monoconidiais do patógeno foram analisados sob 17 sistemas enzimáticos em gel de poliacrilamida. Dentre estes sistemas, EST, MR, ACP, ALP, 6PGDH, PPO e PO forneceram resultados interpretáveis quanto aos padrões isoenzimáticos. Submeteu-se também à análise, as proteínas solúveis do hospedeiro, o-

¹ Bolsista ITI - RHAЕ, estudante de graduação de Biologia, Embrapa/CENARGEN.

² Eng. Agr., MSc, UNESP/JABOTICABAL. ³ Bióloga, Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

riundos do Mato Grosso, Minas Gerais e Distrito Federal, para SDH, EST, 6PGDH e ACP. A variabilidade fenotípica entre os isolados foi observada para EST, ALP e PPO, sendo maior para EST (4 fenótipos). Foi verificada similaridade para três isolados para ALP, 6PGDH, ACP e PPO. Os sistemas empregados para fedegoso foram monomórficos. A possibilidade de variação fisiológica na população do patógeno deve ser investigada, utilizando-se um maior número de isolados de regiões distintas e com a utilização de técnicas que abarquem o genoma completo deste agente fúngico.

Efeito da previsibilidade alimentar no vigor da prole de Podisus nigrispinus (Heteroptera: Pentatomidae)

Vinicius F. Carvalho¹, Og de Souza², Eliana M. G. Fontes³, José Zanuncio⁴ e Andréa dos P. Serafin⁵

Os organismos variam seus esforços reprodutivos respondendo a estímulos ambientais e fisiológicos, por balanços entre sobrevivência e fecundidade. Isto já foi verificado em Pentatomidae predadores submetidos a diferentes regimes alimentares. Não são conhecidos porém, os efeitos deste balanço na prole daqueles insetos. Neste trabalho, foi testado o efeito de diferentes previsibilidades alimentares no vigor da prole de Podisus nigrispinus. Casais deste predador foram isolados em placas de Petri e alimentados com larvas de Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae). Receberam em média, uma larva por dia e foram acompanhados por vinte dias. Foi medida a previsibilidade alimentar pela variância do número de dias que os insetos receberam alimento. Foi avaliado o período de pré-postura, de incubação de ovos e o número de ovos por fêmea. Os dados foram submetidos à ANOVA. As ninfas eclodidas foram isoladas e mantidas sem alimento até a morte, registrando-se o tempo de sobrevivência destas. Em total previsibilidade alimentar, os predadores ovipositaram mais cedo e produziram um número maior de ovos do que aqueles cuja alimentação foi menos previsível. Menores previsibilidades resultaram num menor período de incubação dos ovos e maior sobrevivência de ninfas. Os

¹ Eng. Agr., MSc, bolsista da CAPES. ² Eng^o. Agr^o, Ph.D, UFV/DBA.

³ Bióloga, Ph.D, Embrapa/CENARGEN. ⁴ Eng. Florestal, Ph.D, UFV/DBA.

⁵ Estagiária, estudante de graduação de Biologia, Embrapa/CENARGEN.

resultados mostram que existe um balanço entre quantidade e qualidade da prole do predador, é sugerida a avaliação deste efeito na eficiência de predação do mesmo.

Avaliação preliminar da atividade letal de bacilos contra o nematóide do alho *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936

André G. S. Rocha¹, José M. C. S. Dias² e Renata C. V. Tenente³

*O nematóide do alho é considerado uma das pragas mais importantes dessa cultura. A ineficiência do controle químico tem incentivado utilização de bactérias para biocontrole do mesmo. Foi realizada uma avaliação preliminar da patogenicidade de bacilos contra este fitonematóide utilizando as subespécies kurstaki (S93) e israelensis (S222) de *Bacillus thuringiensis* (Bt) e a estirpe 2362 de *B. sphaericus* (Bs). Os nematóides foram inoculados em plantas de alho e extraídos após 50 dias, colocando 50 J4 em tubos com 0,5ml de água estéril e 0,5ml de cada suspensão bacteriana previamente cultivada em caldo nutritivo e completamente esporulada. Os tubos foram colocados em incubador rotativo (27°C, 200 rpm) por 48 horas, garantindo oxigenação aos nematóides. Numa primeira análise foi avaliado o efeito dos tratamentos na degeneração cuticular dos juvenis e Bs 2362 causou degeneração em 75% dos mesmos, contra 1,5 a 32,8% dos isolados de Bt. As testemunhas não foram afetadas. Na segunda análise, efetuada 24 horas após, foi avaliada a mortalidade total dos nematóides, sendo encontrados 75,8% para Bs 2362 e 39,6% (S93) e 55,2% (S222) para os isolados de Bt. A mortalidade total das testemunhas foi, no máximo, de 1,6%. Concluiu-se, que Bs foi mais letal não se sabendo ainda como atua o mesmo. Os resultados sugerem diferentes modos de ação para os bacilos utilizados.*

¹ Eng. Agr., bolsista ITI RHA/CNPq. ² Eng. Químico, Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

³ Eng^a. Agr^a, Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

Avaliação da estabilidade de Bacillus thuringiensis subesp. kurstaki Isolado S93 armazenado a -18° C

Jeanine S. Giusti¹ e José M. C. S. Dias²

Testes realizados em laboratório mostraram que um isolado brasileiro de B. thuringiensis subesp. kurstaki, denominado S93, apresenta elevada potência larvicida contra a lagarta do cartucho do milho (Spodoptera frugiperda). Visando a produção de um bioinseticida à base de S93, foi estudada a estabilidade do microrganismo, conservado em tubos inclinados contendo meio ágar nutritivo, à temperatura de -18°C. A avaliação da estabilidade bacteriana foi feita conservando os tubos por até 90 dias no congelador e retirando de 10 em 10 ± 2 dias um tubo que era cultivado e submetido a análises de crescimento e de toxicidade contra o inseto mencionado. Os cultivos foram feitos em incubador rotativo por 12 e 36h a 30°C/200rpm e submetidos a análises de pH, massa seca, concentração de células e de esporos. O cultivo de 36h também foi utilizado em bioensaios contra S. frugiperda, com o objetivo de verificar a toxicidade do B. thuringiensis ao longo do período de congelamento. Os resultados obtidos demonstraram que o crescimento do isolado S93 não foi afetado pelo tempo de congelamento, bem como a sua atividade larvicida, que permaneceu constante. O método de congelamento para este isolado se mostrou eficaz no intervalo de tempo considerado.

¹ Bolsista de aperfeiçoamento, CNPq., estudante de graduação de Biologia.

² Eng. Químico, Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

Avaliação da potência de 15 estirpes de Bacillus sphaericus contra larvas dos mosquitos Aedes fluviatilis e Culex quinquefasciatus

Cláudia M. de Carvalho¹, Ana M. Sanchez² e José M. C. S. Dias³

A patogenicidade de 15 isolados de B. sphaericus foi avaliada contra larvas de 3º estágio (L3) de A. fluviatilis e de 2º estágio (L2) de C. quinquefasciatus. As estirpes utilizadas neste trabalho pertencem ao Banco de Germoplasma Microbiano do CENARGEN e foram isoladas a partir de amostras de solos de todas regiões brasileiras. Foi utilizada a estirpe 2362, recomendada pela Organização Mundial de Saúde e fornecida pelo Instituto Pasteur, como padrão. Os bioensaios foram realizados com liofilizados bacterianos, compostos principalmente por misturas de esporos e cristais. Os valores de CL50 (média de duas repetições) calculados contra larvas de A. fluviatilis situaram-se entre 0,056 e 2,833 ppm e para C. quinquefasciatus entre 3,76 e 137,65 ppb. As estirpes mais tóxicas para A. fluviatilis foram S56 (procedente de Guarda de Cubatão - SP) S201 (Anhumas - MT), S442 (Monte Azul - MG) e S444 (Monte Azul - MG) e para C. quinquefasciatus foram S201 e S231 (Sorriso - MS).

¹ Bolsista ITI RHA/CNPq, estudante de graduação de Biologia.

² Bióloga, estagiária, Embrapa/CENARGEN.

³ Eng. Químico, Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

Análise de agregação e similaridade de 94 isolados brasileiros de *Bacillus sphaericus* por meio de antibiogramas

Cláudia M. de Carvalho¹ e José. M. C. S. Dias²

Bacillus sphaericus é uma espécie bacteriana em que alguns isolados formam cristais protéicos letais contra mosquitos. Para caracterização de isolados dessa espécie, foram realizados antibiogramas de 94 isolados provenientes de amostras de solo de todas as regiões do Brasil. Dezenove são tóxicos e 75 não o são contra *Culex quinquefasciatus*. Os resultados (resistência) a cada um dos 24 antibióticos foram utilizados para a análise de dados de sensibilidade agregação ("cluster") e similaridade entre os isolados. Foram utilizados, também, os resultados dos antibiogramas de 4 estirpes padrão (IAB-49, 1593, 2297 e 2362). Todos os isolados mostraram-se sensíveis a amicacina, ampicilina, cefalotina, penicilina e vancomicina. Trinta e sete isolados brasileiros (14 tóxicos e 23 não-tóxicos) mostraram-se totalmente similares entre si e distintos dos padrões. O padrão 2362 mostrou-se similar a um grupo de 7 isolados brasileiros: os padrões IAB-49 e 2297 mostraram-se similares entre si e a outros 2 isolados brasileiros e o 1593 foi similar a cinco isolados brasileiros.

¹ Bolsista RHAE/CNPq, estudante de graduação de Biologia.

² Eng. Químico, Ph.D., Embrapa/CENARGEN.

Isolamento e identificação preliminar de contaminante bacteriano em dieta artificial de bicudo-do-algodoeiro (Anthonomus grandis)

José R. M. V. Abreu Neto¹ , Cláudia M. de Carvalho¹ e José M. C. S. Dias²

Em uma dieta artificial adquirida especificamente para criação do bicudo do algodoeiro (A. grandis) foi observada a presença de uma bactéria que impedia o desenvolvimento larval bem como a alimentação dos adultos do inseto. Tal contaminante apresentava como características principais: forma gelatinosa, coloração amarelada, formação de grumos em meio líquido e odor forte e desagradável. A bactéria foi isolada em meio contendo penicilina e para efetuar a sua identificação foi seguida a metodologia do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Pelas características iniciais, o contaminante poderia pertencer ao Grupo IV, que contem 80 gêneros bacterianos. A morfologia da bactéria avaliada por microscopia ótica e eletrônica era a de cocobacilos, sem parede celular, sem esporos, acristalífera e com poucos flagelos. O teste de Gram resultou negativo e em um antibiograma feito com 24 antibióticos, o isolado foi sensível a oito. Diversos outros testes e ensaios foram realizados e permitiram definir que o contaminante é do gênero Phyllobacterium ou Pseudomonas. Este isolado parece não ser letal contra fases imaturas do bicudo-do-algodoeiro bem como os adultos, já que não se evidenciou morte por contaminação bacteriana de qualquer uma das fases até o presente momento.

¹ Bióloga, bolsista ITI RHAE/CNPq. ² Eng. Químico, Ph.D, Embrapa /CENARGEN.

Isolamento e caracterização de bacilos da Região Norte do Brasil e avaliação da patogenicidade contra dípteros e lepidópteros

Silvânia F. Silva¹, Rachel C. P. S. Caetano², Adriana N. Tostes², Jacqueline M. Farias² e José M. C. S. Dias³

Dentre os grupos de organismos estudados no controle biológico de insetos-praga da agricultura e vetores de doenças tropicais, os bacilos entomopatogênicos apresentam uma grande importância. Assim, procura-se isolar e identificar novas estirpes de Bacillus sphaericus e B. thuringiensis. Nesse trabalho foram processadas 35 amostras de solos da Região Norte do Brasil, sendo 2 do Acre, 4 do Amapá, 8 do Amazonas, 8 do Pará, 5 de Rondônia, 3 de Roraima e 5 de Tocantins. O método utilizado foi o recomendado pela Organização Mundial da Saúde, modificado. Foram obtidos 95 isolados bacilares sendo 69 B. cereus, 12 B. sphaericus e 14 B. thuringiensis. Os 95 isolados das três espécies citadas foram armazenados no Banco de Germoplasma Microbiano do CENARGEN. Os mesmos foram bioensaiados contra larvas de 3º estágio do mosquito urbano (Culex quinquefasciatus), tendo-se encontrado somente um B. sphaericus patogênico (código S1116) proveniente do Amapá. Os isolados de B. thuringiensis também foram bioensaiados contra larvas de 2º/3º estágio da lagarta da soja (Anticarsia gemmatalis) encontrando-se 03 isolados patogênicos (código S1105 de

¹ Bióloga, bolsista ITI RHAEC/CNPq. ² Estudante de graduação de Biologia.

³ Eng. Químico, Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

Rondônia, S1111 do Pará e S1123 do Acre). O número de 2,7 isolados bacilares com potencial entomopatogênico por amostra da região Norte mostrou-se inferior ao encontrado em outros trabalhos realizados com a mesma metodologia. Para a região Centro-Oeste esse número foi de 4,13 e para a região Sul, de 3,05 isolados por amostra.

Seleção de isolados de Bacillus thuringiensis com atividade larvicida contra Anticarsia gemmatalis e Spodoptera frugiperda

Adriana N. Tostes¹, Joseilde O. Silva-Werneck², Cláudia B. Siqueira² e José M. C. S. Dias³

A lagarta da soja (Anticarsia gemmatalis) e a lagarta do cartucho-do-milho (S. frugiperda) são no Brasil as principais pragas de suas respectivas culturas. A primeira é bastante suscetível a B. thuringiensis, sendo usada em alguns casos, como inseto-alvo na seleção de isolados desse patógeno, enquanto a segunda é muito pouco sensível ao mesmo. Com o objetivo de identificar isolados de B. thuringiensis que possam ser usados para o controle biológico de lepidópteros, foram feitos bioensaios com 60 isolados dessa bactéria obtidos de solos e águas das diversas regiões do Brasil, contra larvas de A. gemmatalis. Os isolados que causaram mortalidade igual ou superior a 70% na primeira seleção, foram avaliados contra S. frugiperda. Dos 60 isolados testados, 43 causaram até 30% de mortalidade (15 não tiveram atividade larvicida), 8 mataram entre 40 e 60% das larvas testadas e 9 causaram mortalidade igual ou superior a 70%. A avaliação destes últimos 9 isolados contra S. frugiperda mostrou que 5 causaram mortalidade inferior a 70%, 3 entre 70 e 90% e apenas um (código S699, proveniente de Iranduba (AM)) causou mortalidade total.

¹ Estudante de graduação de Biologia, bolsista ITI RHAE/CNPq. ² Eng^a. Agr^a., Embrapa/CENARGEN. ³ Eng. Químico, Ph.D., Embrapa/CENARGEN.

INFECÇÃO DE *Schistocerca pallens* (ORTHOPTERA: ACRIDIDAE) PELO PROTOZOÁRIO *Nosema locustae* (MICROSPORA: NOSEMATIDAE)

*João B. T. da Silva*¹ e *Absolon L. da Silva Júnior*²

*Os protozoários são conhecidos como importantes agentes na regulação natural da população de insetos. A maioria das formas patogênicas a insetos ocorrem nos filos Apicomplexa e Microspora. Os protozoários do filo Microspora são parasitas esporogênicos intracelulares que causam enfermidades em vertebrados e invertebrados. Esse grupo tem demonstrado ser o mais importante entre os entomopatogênicos, apresentando grande persistência no hospedeiro. Algumas espécies de microsporídeos foram detectadas em acridídeos, sendo as mais patogênicas as pertencentes ao gênero *Nosema*. Esporos de *N. locustae* foram utilizados para infectar ninfas de 2-3º instar de *S. pallens*, mantidas em gaiolas. Após jejum de 24 h, os insetos foram alimentados, por 48 h, com dieta à base de fécula de aveia e capim *Andropogon*, pulverizada com suspensão de 10⁶ esporos por ml de água destilada. Os gafanhotos infectados foram dissecados e fragmentos do trato intestinal e tecido adiposo foram observados em microscópio ótico, para se verificar a presença de esporos típicos de *N. locustae*. As observações realizadas diariamente até o 30º dia mostraram infecção de 25% e mortalidade de 10%, em comparação com o grupo controle. Mesmo com baixo índice de mortalidade, os resultados são promissores pois *N. locustae* não é nativo dessa espécie de gafanhoto. Paralelamente, foram realizadas dissecações em *S. pallens* coletados no campo, mas não foi possível a detecção de microsporídeos nativos.*

¹ Biólogo, Ph.D, Embrapa/CENARGEN. ² Bolsista do CNPq.

Regeneração de calos de Eucalyptus grandis x E. urophylla

Silvia B. R. C. Carvalheira¹, Luis Pedro Barrueto Cid² e Ana Cristina M. Brasileiro³

Eucalyptus grandis x E. urophylla é um híbrido de importância agroindustrial, pois tem-se mostrado promissor na produção de polpa de celulose. Entretanto, na atualidade, não são disponíveis protocolos de regeneração "in vitro", condição imprescindível para trabalhos de transformação. Após a assepsia em NaClO e teste de viabilidade, as sementes do híbrido foram colocadas em meio nutritivo SP-0 para germinar. Aos 14 dias, cotilédones, hipocótilos e nós foram retirados e inoculados em SP-0+TDZ por 30 dias no escuro a 24±2°C. A regeneração foi observada após 30 dias em meio SP-0 suplementado com Zeatina/ANA e BA/ANA. O alongamento dos brotos foi obtido após 30 dias em SP-0 acrescido de BA/ANA/GA₃. O enraizamento das plantas foi alcançado colocando as mesmas em meio SP-4+AIB por 5 dias, após os quais, as plantas foram transferidas para SP-4 com carvão ativado. As condições de luz e temperatura para a germinação, regeneração, alongamento e enraizamento foram de 16h/luz e 24±2°C. Nas sementes, foram observadas altas porcentagens de germinação e viabilidade. Independente do tipo de explante, a taxa de calos formados foi próxima a 100%. A regeneração foi constatada nos 3 tipos de explantes testados, sendo que, o nó foi superior aos outros. Alongados e enraizados os brotos, o aspecto de plântula foi normal. Portanto, um protocolo inédito de regeneração deste híbrido foi definido.

¹ Eng^a. Agr^a., bolsista, Embrapa/CENARGEN. ² Biólogo, Ph.D, Embrapa/CENARGEN. ³ Eng.Florestal, Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

Análise de distância genética entre clones de Eucalyptus: aplicações no melhoramento, mapeamento genético e plantio operacional

Cynthia Costa e Silva¹, Fernando L. Bertolucci², Dario Grattapaglia³

Plantios clonais de Eucalyptus envolvem geralmente um número pequeno de genótipos superiores no estabelecimento de milhares de hectares de floresta. A questão do Ganho de produtividade x Risco de catástrofe é importante ao se plantar clones. Para garantir uma segurança razoável e realizar ganho adequado, a informação sobre o relacionamento genético entre os clones plantados pode auxiliar significativamente no planejamento de plantios clonais. A premissa deste estudo, é que genótipos relacionados ao nível de DNA compartilham uma origem e ancestralia comum, foram sujeitos a pressões evolutivas semelhantes e por isso compartilham alelos de susceptibilidade/tolerância a locos que controlam a resposta ao ataque de pragas e patógenos. Geralmente clones operacionais derivam de indivíduos selecionadas a altíssima intensidade a partir de plantios de semente das mais diversas origens sem informação sobre pedigree. Marcadores moleculares representam uma ferramenta poderosa para gerar dados de relacionamento genético em situações onde não há outra forma de acessar esta informação. Os objetivos deste estudo foram: (1) Guiar a estruturação de um plantio clonal em um formato

¹ Bolsista de aperfeiçoamento, Laboratório de Genética de Plantas, Embrapa-CENARGEN.

² Msc. Gerente de Melhoramento genético ARACRUZ Celulose S. A.

³ Eng. Florestal, Ph. D. Laboratório de genética de Plantas, Embrapa -CENARGEN.

de "Mosaico genético de clones" com o objetivo de maximizar a divergência entre genótipos contíguos para minimizar assim a progressão de potenciais ataques de pragas ou patógenos. Além disso esta medida pode vir a minimizar a necessidade de replantio ou reforma de áreas atacadas; (2) Indicar cruzamentos mais divergentes para um dialelo dos clones elite visando maximizar a segregação transgressiva e/ou heterose nas progênes obtidas e otimizar a construção de mapas genéticos pelo incremento de polimorfismo de DNA; (3) Comparar o nível de variabilidade genética existente entre clones elite com aquele existente entre e dentro famílias de polinização aberta de uma espécie pura. Foram analisados 15 genótipos elite utilizados seja em plantios operacionais bem como em um programa de recombinação genética de novos clones. A similaridade genética entre este grupo de clones foi comparada com a similaridade encontrada entre 24 indivíduos dentro de famílias e entre 24 famílias de polinização aberta. Similaridades genéticas médias foram 0.340 (\pm 0.135), 0.400 (\pm 0.08) and 0.550 (\pm 0.100) respectivamente entre clones, entre famílias de polinização aberta e entre indivíduos dentro de famílias. Testes t entre os diferentes grupos foram todos significativos ($P < 0.001$) confirmando as estimativas de ampla variabilidade para características fenotípicas no grupo de clones. Foram identificados os 20 cruzamentos mais divergentes, e informações de divergência entre clones foi utilizada nos cruzamentos realizados em 1996. O plantio clonal operacional baseado em informação de DNA, inédito no mundo, será implementado a partir de 1997.

Mapeamento genético de isoenzimas e microsátélites e saturação dos grupos de ligação 6 e 9 de Brassica napus com marcadores RAPD

Karla A. A. Paula¹, Alexandra M. Casa² e Márcio Elias Ferreira³

Para saturar os grupos de ligação 6 e 9 de B. napus foi utilizada a técnica de BSA (Bulked Segregant Analysis), que seleciona marcadores para regiões específicas do genoma. Para composição dos "bulks" são misturados DNAs de 15 linhagens resistentes e 15 susceptíveis a Leptosphaeria maculans e 15 resistentes e 15 susceptíveis a Albugo candida. A resistência aos dois patógenos é controlada por regiões dos grupos de ligação 6 e 9, respectivamente. Foram testados 295 "primers" RAPD, dos quais 13 foram selecionados para análise de segregação, gerando 40 marcadores. Foram estudados, com a mesma população, 23 sistemas isoenzimáticos e 23 pares de "primers" microsátelite (SSR), sendo selecionados para mapeamento em B. napus, três sistemas isoenzimáticos e três pares de "primers" SSR, sendo um com dois locos. Testes de ligação e mapeamento genético dos 49 locos (RAPD, SSR, isoenzimas) foram realizados com 141 locos do mapa genético de B. napus. Oito locos RAPD foram mapeados no grupo de ligação 6. Um destes locos (UBC 155) encontra-se a apenas 7 cM de Lem1, um loco que controla resistência a L. maculans. Quatro marcadores RAPD, sendo dois co-do-

¹ Bióloga da Polícia Civil do DF. ² Bióloga bolsista DTI-CNPq. ³ Eng. Agr., Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

minantes, foram mapeados no grupo de ligação 9 onde se encontra um loco que controla resistência a A. candida (Aca1). Vinte e três locos RAPD foram mapeados em outros grupos de ligação e seis apresentaram segregação independente de todos os 190 marcadores testados. Dois locos isoenzimáticos e três locos SSR foram também mapeados. A extensão do mapa genético de B. napus foi incrementada em aproximadamente 25% neste estudo.

Regeneração a partir de folhas do *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla*

*Adriane C. M. G. Machado*¹, *Luiz Pedro Barreto Cid*² e *Ana Cristina M. Brasileiro*³

*Na cultura de tecido, ainda não são disponíveis protocolos de regeneração a partir de folha deste híbrido. Considerando o alto potencial deste tipo de explante para a clonagem, o presente trabalho relata resultados preliminares de regeneração a partir de folha deste híbrido. Com este propósito sementes de *E. grandis* X *E. urophylla*, foram inoculadas em meio SP-0 suplementado com 100 µg.ml⁻¹ de cefotaxima, após assepsia com hipoclorito de sódio 9%, e cultivada sob condições de 24 ± 2°C de temperatura e fotoperíodo de 16 h (condição padrão). A medida que as plântulas foram completando 20, 30, 40 e 50 dias, as folhas foram isoladas e inoculadas em meio SP-0 suplementado com TDZ (SP-1), permanecendo neste meio durante 30 dias, a 24 ± 2°C no escuro. Passados 30 dias, os explantes foram transferidos para o meio SP-0 suplementado com ANA/BA (SP-2) por 30 dias, sob condições padrão de luz e temperatura. Após 30 dias em SP-1, foi observada formação de calos na região abaxial e região peciolar das folhas. A regeneração ocorreu após 30 dias em meio SP-2, verificando-se que as porcentagens da mesma aos 20, 30, 40 e 50 dias, foram respectivamente 15, 40, 32 e 5%. Portanto, um protocolo inédito de regeneração a partir de folha, está sendo estruturado, o qual, oferece boas perspectivas para a transformação genética deste material.*

¹ Bióloga, bolsista do CNPq. ² Biólogo, Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

³ Eng. Florestal, Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

Adaptação de um protocolo para transformação genética de batata (Solanum tuberosum L.), cultivar Bintje visando introdução de resistência a PVY

Aletéia V. Pascoal¹, Maria Imaculada C. S. Gama², Fernando Bravo-Almonacid³, Alejandro Mentaberry³, Eduardo Romano⁴, Diva Dusí⁵, Paulo Mello⁶ e Damares Monte-Neshich⁷

A batata (Solanum tuberosum L.) é uma das hortaliças de maior importância para o país, sendo porém, susceptível a uma série de enfermidades, entre as quais destacam-se as viroses. O vírus de batata (PVY) pode causar até 30% de perdas na produção brasileira de batata. A melhor alternativa na prevenção de viroses é a utilização de variedades resistentes, que podem ser obtidas através da transferência de genes de resistência via engenharia genética, com alteração mínima da base genética das cultivares apreciadas pelos produtores. Uma estratégia seria a utilização de genes codificadores para a proteína do capsídeo do vírus. Tal processo já se mostrou eficaz e alguns autores demonstraram sua viabilidade para a obtenção de resistência a viroses. Para a utilização destas técnicas, no entanto, é necessário o estabelecimento de protocolos para a transformação genética de cultivares de batata de importância nacional (Bintje, Baronesa e Achat, por exemplo). Foi estabelecido, em nosso

¹ Bióloga, estagiária Embrapa/CENARGEN. ² Bióloga, Ph.D, Embrapa/CENARGEN. ³ International Center for Genetic Engineering and Biotechnology - INGEBI. ⁴ Eng. Agr., Embrapa/CENARGEN.

⁵ Eng^a. Agr^a., MSc, Embrapa/CENARGEN. ⁶ Eng. Agr., MSc, Embrapa/CNPH.

⁷ Eng^a. Agr^a., Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

laboratório, um procedimento para a regeneração e transformação de batata via Agrobacterium tumefaciens utilizando modificações de meios descritos anteriormente. Visando obter plantas de batata, cv. Bintje, com resistência ao vírus Y, foi feita a transformação genética com um plasmídeo binário de A. tumefaciens contendo o gene da proteína do capsídeo do PVY sob o controle do promotor 35CaMV e o gene nptII, que codifica para a neomicina fosfotransferase e que confere resistência ao antibiótico kanamicina em plantas. Foram obtidos cerca de 250 clones resistentes ao agente de seleção (kanamicina), que foram enviados sob a forma de tubérculos e microtubérculos ao Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq), onde estão sendo multiplicados e as plantas analisadas quanto a susceptibilidade ao PVY. Dando continuidade ao trabalho anteriormente desenvolvido, foi iniciada a caracterização molecular de parte das plantas potencialmente transformadas através de Southern blot, Northern blot e Western blot. Dentre os clones obtidos, 112 já foram analisados através de PCR, sendo que 70% mostraram-se PCR positivos.

Ensaio preliminares de transformação genética de *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla*

Mariana V. Esmeraldo¹, Sergio Araújo Figueiredo¹, Luciana de O. R. Machado¹, Luís Pedro Barreto Cid² e Ana Cristina M. Brasileiro³

*No Brasil o plantio de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) abrange uma área de cerca de 4 milhões de hectares, sendo a principal essência florestal plantada no país devido ao seu grande potencial de uso, principalmente na produção de papel e celulose. O melhoramento genético clássico possibilitou a obtenção de árvores-elite com características florestais de interesse, porém com limitações, considerando a elevada variabilidade genética dos cruzamentos e o tempo para obtenção destas árvores melhoradas. Visando contornar estas limitações, a transformação genética via *Agrobacterium* spp. possibilita a incorporação rápida de genes de interesse, auxiliando significativamente nos programas de melhoramento tradicional. Assim, o objetivo deste trabalho foi a determinação de alguns parâmetros de co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*, regeneração e seleção de explantes transformados. Para tanto, foram testados tempo de co-cultura em meio líquido, concentração e estágio de aplicação de acetoseringona e diferentes reguladores de crescimento durante a co-cultura em meio líquido e durante a co-cultura em meio sólido. Para a regeneração dos explantes, foram testadas diferentes combinações de tempo e de concentrações de BAP e 2,4-D e para seleção dos explantes transformados foram realizados testes de susceptibilidade à kanamicina nas mesmas condições de regeneração.*

¹ Bolsista CNPq, estudante de graduação de Biologia. ² Biólogo, Ph.D, Embrapa/CENARGEN. ³ Eng. Florestal, Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

Padrões de estabilidade de expressão de QTLs para crescimento em altura em Eucalyptus grandis

Eduardo N. Campinhos¹, Fernando L. Bertolucci², Acelino C. Alfenas¹ e Dario Grattapaglia³

A metodologia utilizada nesta pesquisa para procura de QTL tem sido a de uso de pedigrees de árvores provenientes do melhoramento convencional. As características de um QTL deveriam variar dependendo onde estes são detectados, ou em famílias de irmãos completos ou de meios-irmãos. Nossa hipótese é a de que em árvores geneticamente heterogêneas, a expressão de um alelo em um QTL a partir de uma árvore individual será variável em relação ao "background" genético existente. Além disto espera-se que QTLs com maiores efeitos sejam mais estáveis do que aqueles com menores efeitos. Começamos direcionando a questão da estabilidade da expressão alélica de um QTL através de "backgrounds" genéticos variáveis pela análise de diferentes famílias de meios-irmãos composta por uma mãe comum E. grandis, e o pólen variável de E. urophylla. Procuramos QTLs mapeados para o parental comum em uma família de meios-irmãos para crescimento até a idade de 6,5 anos. Analisamos 100 progênies individuais por família para um total de 13 marcadores RAPD que agruparam 4 alelos de QTL não-ligados para o volume de crescimento. Os resultados para as primeiras 3 famílias mostraram que para crescimento em altura até a idade de 6 meses, somente um

¹ Estudante de Mestrado, Bolsista do CNPq - BIOAGRO - Universidade Federal de Viçosa. ² MSc. Gerente de Melhoramento Genético ARACRUZ Celulose S.A..

³ Eng. Florestal, Ph.D., Embrapa/CENARGEN.

dos 4 alelos de QTL é expresso em todas as famílias. Um alelo de QTL pode ser detectado somente em uma família e os últimos dois alelos não puderam ser detectados em qualquer família. Estes resultados preliminares indicam que as interações QTL x "background" são importantes mesmo para alelos de QTL originalmente detectados em um "background" de meios-irmãos mais representativo. Contudo é importante notar que além do efeito "background, o efeito de confundimento da idade pode também contar para a instabilidade do QTL observada.

Marcadores RAPD mapeados são transferíveis entre árvores de *Eucalyptus urophylla* de uma mesma população

Rosana P. V. Brondani¹ e Dario Grattapaglia²

*Tem sido sugerido que marcadores RAPD teriam pouca ou nenhuma capacidade de serem transferidos entre mapas de ligação de árvores individuais construídos pela estratégia de "pseudo-testcross", assim, o progresso em relação ao alinhamento e integração de mapas requereriam necessariamente outras classes de marcadores moleculares tais como RFLPs ou SSRs. Em um trabalho anterior foi visto que o grau de conservação de marcadores RAPD entre árvores de origem distinta foi baixa, o que seria de se esperar como resultado do isolamento reprodutivo. No presente estudo foi lançada a hipótese de que existe um alto grau de conservação de marcadores RAPD entre árvores de uma mesma população. Esta hipótese foi testada utilizando árvores que fazem parte de uma mesma população de melhoramento de *E. urophylla*. Foram testados 60 marcadores RAPD distribuídos de maneira a cobrir todo genoma, previamente mapeados em uma árvore de *E. urophylla*. Foram analisados 10 indivíduos irmãos completos F_1 de cada uma das 10 famílias de *E. urophylla* mais os dois parentais. A frequência média de marcadores RAPD comuns entre as 10 árvores foi de 78%. Destes, 80% encontravam-se em estado de heterozigose, ou seja, segregaram na configuração de 1:1 nos indivíduos da progênie de acordo*

¹ Estudante de mestrado, bolsista CNPq. ² Eng. Florestal, Ph.D., Embrapa/CENARGEN.

com a configuração do "pseudo-testcross". Foi estimado que em média, 64% dos marcadores RAPD seriam prontamente transferíveis e conseqüentemente informativos entre os mapas dos diferentes indivíduos. Estes dados corroboram com a hipótese de trabalho lançada e indicam que: (1) árvores de uma mesma população compartilham de um significativo grau de homologia entre seus genomas para locos de marcadores RAPD e; (2) será possível alinhar mapas de ligação de árvores individuais usando marcadores RAPD que são comuns entre elas.

Mapeamento comparativo em Eucalyptus revela significativa conservação da ordem e ligação de locos RAPD entre árvores, e maior recombinação meiótica em parentais femininos

Rosana P. V. Brondani¹ e Dario Grattapaglia²

O mapeamento comparativo conta com locos homólogos em uma configuração informativa entre mapas de ligação. Mapas de ligação gerados para dois parentais a partir de um cruzamento particular de irmãos completos pela estratégia do "pseudo-testcross", por definição não possuem marcadores em comum e conseqüentemente não podem ser comparados. Entretanto, mapas individuais gerados a partir da genotipagem de diferentes famílias de irmãos completos permitem extensivos estudos comparativos explorando os marcadores em comum. Em um estudo paralelo foi verificada uma alta conservação dos marcadores RAPD entre mapas de diferentes árvores. A hipótese de trabalho proposta foi que locos de marcadores RAPD mapeados em diferentes árvores conservam a mesma ordem dos marcadores ao longo dos grupos de ligação. Além disso, marcadores comuns permitiriam testar diferenças relacionadas com o sexo pela frequência de recombinação em Eucalyptus. O estudo de mapeamento comparativo foi realizado utilizando dois mapas de ligação desenvolvidos a partir de duas famílias distintas de irmãos completos de Eucalyptus formada cada uma por 92 indivíduos. As taxas de recombinação foram medidas para o parental masculino e parental feminino separadamente, e foi assumido que

¹ Estudante de mestrado, bolsista CNPq. ² Eng. Florestal, Ph.D., Embrapa/CENARGEN.

as diferenças nas taxas de recombinação entre os indivíduos é devida ao sexo e não ao "background" genético. Dos 29 marcadores mapeados, 20 mapearam nos grupos de ligação corretos e conservaram a mesma ordem de ligação observada nos dois mapas. Entretanto foi observado que os valores da frequência de recombinação foram sempre significativamente maiores ($P < 0,01$) em 8 dos 14 pares de marcadores testados para o mapa feminino em relação ao masculino. Estes resultados indicam que: (1) a conservação da ordem e ligação dos marcadores RAPD é grande entre indivíduos de uma mesma população; (2) assim como em outras angiospermas e diferentemente do que ocorre em Pinus, em Eucalyptus as maiores taxas de recombinação meiótica ocorrem no gameta feminino.

Análise da diversidade genética do arroz silvestre americano (*Oryza spp.*) através de marcadores moleculares

Gláucia S. C. Buso¹, Marcos R. Bertozzo², Paulo H. Rangel³ e Márcio Elias Ferreira⁴

*O nível e estruturação da diversidade genética de três populações de arroz silvestre americano recentemente coletadas foram investigados. Duas populações foram coletadas na bacia do rio Amazonas (ARB1 e ARB2) e uma na bacia do rio Paraguai (PRB1). As populações foram caracterizadas como *Oryza glumaepatula* segundo classificação morfológica. Cinco sistemas isoenzimáticos (IDH, EST, SDH, MDH e PGM) e marcadores RAPD obtidos com a utilização de 20 primers randômicos foram usados na avaliação de quarenta e oito indivíduos escolhidos ao acaso de cada população. Cinco locos isoenzimáticos e 229 bandas RAPD foram usados na análise. Os locos isoenzimáticos foram utilizados para identificar o genótipo dos indivíduos, estimar a frequência alélica e valores de heterozigosidade. Os resultados indicam que a variabilidade intrapopulacional é menor do que a variabilidade interpopulacional. As populações ARB1 e ARB2 mostraram maior similaridade entre elas do que com a população PRB1. Os valores de heterozigosidade e número médio de alelos por loco das populações ARB1 e ARB2 foram 0.0/1.25 e 0.01/2.0, respectivamente, enquanto os mesmos valores para a popula-*

¹ Eng. Agr., MSc, Embrapa-CENARGEN. ² Bolsista, CNPq. ³ Eng. Agr., Ph.D, Embrapa/CNPAF. ⁴ Eng. Agr., Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

ção PRB1 foram 0.358/2.75. Os valores de diversidade genética variaram bastante ($ARB1=0.143$ a 1.00; $ARB2=0.588$ a 1.00 e $PRB1=0.429$ a 1.00). A análise de coordenadas principais sugere que a população PRB1 deva ser uma espécie diferente. Através de análise citológica confirmou-se ser outra espécie, com número de cromossomos equivalente ao de espécies tetraplóides. Marcadores específicos para espécies diplóides e tetraplóides foram identificados e serão usados na caracterização de acessos da coleção de *Oryza selvagem*.

Diagnóstico molecular para uso e preservação de germoplasma equino

*Valéria B. Martins¹, Márcio Elias Ferreira², Dario Grattapaglia³
e Assis Roberto de Bem⁴*

O presente trabalho foi desenvolvido com animais da espécie equina (Equus caballus). Os experimentos foram desenhados com o fim de atingir três objetivos: 1) desenvolver sistema de diagnóstico racial em eqüinos baseado em marcadores RAPD; 2) estimar a diversidade genética entre indivíduos da raça equina Lavradeira para fins de uso e preservação; 3) detectar marcadores específicos para sexo em eqüinos. Foram utilizadas as técnicas de RAPD e isoenzimas. Os sistemas enzimáticos utilizados e as freqüências encontradas para o alelo mais freqüente numa amostra de 55 cavalos da raça Lavradeira foram ACP - 1.00, PGM - 0.98, PGD - 0.92, PHI - 0.80, e MDH - 0.93. Com a técnica RAPD foi feito um screening de 269 primers entre os quais 185 mostraram boa amplificação gerando 943 fragmentos dos quais 92 polimórficos. Foram selecionados 10 primers para o trabalho. Estes primers geraram 64 fragmentos dos quais 22 mostraram-se polimórficos entre as raças eqüinas analisadas. Nove destes fragmentos apareceram com freqüências significativamente diferentes entre a amostra de 55 cavalos da raça Lavradeira, 11 cavalos da raça Crioula e 8 da raça Campolina, sendo que três deles foram amplificados apenas na raça Lavradeira. Também foi

¹ Méd. Vet., Bolsista do CNPq. ² Eng. Agr., Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

³ Eng. Florestal, Ph.D, Embrapa/CENARGEN. ⁴ Méd. Vet., Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

identificado um fragmento que é amplificado apenas em eqüinos do sexo masculino e que portanto é um marcador sexo específico na espécie E. caballus. Estes métodos foram desenvolvidos para serem utilizados pelo Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) na avaliação, caracterização genética e conservação de germoplasma eqüino, na diferenciação racial de amostras e na identificação do sexo de amostras e embriões. Através desta metodologia é possível identificar dentro de uma população aqueles animais que possuem maior variabilidade e que deverão ser prioritariamente preservados e utilizados em cruzamentos.

Caracterização dos componentes biológicos da produção de sementes de *Arachis pintoi* Krap. & Greg. e *A. repens* Handro (Leguminosae)

*Andréa del Pilar de Souza Peñaloza*¹ e *José F. M. Valls*²

*Diante da variabilidade mostrada por *A. pintoi* e *A. repens* quanto à produção de sementes, foram analisados aspectos citogenéticos e reprodutivos, como germinabilidade do pólen, morfologia dos estigmas e comportamento de florescimento a campo, de 16 acessos de *A. pintoi* e dois de *A. repens*. Além disto, foi definida a melhor técnica para estudo mitótico dessas espécies. O melhor horário de coleta para estudo citogenético situou-se entre 9 e 9:15 h e o pré-tratamento em para-dicloro-benzeno deve ser de 2 horas. Os acessos são diplóides ($2n = 20$), exceto *A. pintoi* BRA-031895, que mostra $2n = 30$ e meiose irregular. A germinabilidade do pólen in vitro superou 60%. Já no acesso triplóide, foi inferior a 15%. Há grande variação na morfologia do ápice dos estigmas. Nos acessos prolíferos, o ápice apresenta pêlos curtos e em pequena quantidade. Nos que produzem pouca ou nenhuma semente, o ápice mostra pêlos longos e em maior quantidade. Foram observados distintos padrões de florescimento a campo, entre outubro de 1994 e abril de 1995. Em *A. pintoi* BRA-030368, BRA-030996 e BRA-031143 o florescimento foi homogêneo, pouco sensível às variações de umidade e temperatura. Os demais acessos apresentaram picos de florescimento, em resposta ao aumento da umidade relativa*

¹ Eng^o Agr^o, Bolsista da CAPES, PG UnB - Embrapa/CENARGEN. ² Eng. Agr., Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

*associada à diminuição da temperatura média do ar. Exce-
tuando-se a infertilidade do acesso triplóide, óbvia conse-
quência de gametas desbalanceados, a interação dos fatores
acima, e não qualquer dos fatores isoladamente, parece con-
dicionar a produção de sementes. A redução potencial por
barreiras no ápice estigmático pode ser compensada por flo-
rescimento mais intenso ou mais longo.*

Resgate de germoplasma e levantamento florístico na área de inundação e área de influência do aproveitamento hidrelétrico Corumbá I, Goiás

Cristina M. de A. Gualda¹, Micheline C. Silva¹ e Taciana B. Cavalcanti²

Visando unir esforços para a realização de coleta de germoplasma e ações de conservação em áreas sob impacto ambiental, a EMBRAPA/CENARGEN firmou um convênio com FURNAS Centrais Elétricas S/A, para ações em áreas destinadas ao Aproveitamento Hidrelétrico (AHE), no Centro Oeste do país. Trata-se de uma ação piloto em termos de trabalhos ambientais em usinas hidrelétricas, visto que prevê o resgate de espécies importantes com antecedência que permita a coleta a cada ano, acompanhando as fenofases reprodutivas das populações-alvo. A cobertura vegetal natural predominante nas áreas de influência direta e indireta do AHE Corumbá I é o Cerrado. Entre as fisionomias que permanecem mais preservadas estão as matas-de-galeria, que são também a vegetação que mais sofrerá com o enchimento do reservatório, visto que ocorrem às margens do rio Corumbá. Encontra-se praticamente concluído o levantamento florístico da área. Este levantamento teve o objetivo de subsidiar a coleta de germoplasma no sentido de determinar espécies prioritárias para o resgate. O germoplasma coletado segue para câmara fria provisória no CENARGEN e um dos seus destinos é o viveiro de FURNAS, implantado próximo ao canteiro de obras,

¹ Eng^o. Florestal, estagiária, Embrapa/CENARGEN. ² Bióloga, Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

onde estão sendo produzidas mudas que serão destinadas à recuperação de áreas degradadas na região. Outra parte deste germoplasma tem sido enviada para estudos básicos de classificação, poder germinativo e outras características do germoplasma-semente, para posterior encaminhamento para as câmaras de conservação permanente no CENARGEN. Mudas e sementes de espécies ornamentais e medicinais são enviadas ao Banco Ativo de Germoplasma do Jardim Botânico de Brasília. As atividades realizadas envolvem a identificação botânica do material coletado para compor a listagem para a região, participação nas coletas para familiarização com a metodologia utilizada para coleta de germoplasma de espécies nativas e técnicas de rotina de herbário. (Convênio EMBRAPA/FURNAS N°. 10.325).

**Revisão taxonômica das espécies brasileiras de *Paspalum* L.,
grupo *linearia* (Gramineae; Paniceae)**

Regina Célia de Oliveira¹ e José F. M. Valls²

O presente estudo visa a fornecer um tratamento sistemático do gênero Paspalum, grupo Linearia, complementado com aspectos citológicos. Os materiais que serviram como base para este estudo foram aqueles depositados em herbários do Brasil e exterior, materiais vivos observados e coletados em campo e pelo acompanhamento das espécies sob cultivo. Foram encontradas novas ocorrências de espécies do grupo para os estados da Bahia, Maranhão e Mato Grosso. Foram feitas contagens cromossômicas em espécies do grupo, detectando-se aneuploidia em P. ellipticum, fenômeno raro no gênero, a qual é discutida. Contrariamente ao indicado por diversos autores, que assumem a ocorrência de hilos punctiformes nas cariopses de Paspalum spp., neste trabalho foram encontradas hilos elípticos a sub-lineares, indicando a necessidade de melhor conhecimento e padronização deste caráter e a possibilidade de seu uso como distintivo dos grupos de Paspalum. Foram propostas quatro sinonimizáveis: P. approximatum Doell var. coarctatum e P. parinervium Mez a P. approximatum Doell, P. doellii Chase ex Filgueiras a P. dedeccae Quarín e P. ciliocinctum Mez a P. ellipticum Doell, além de interpretada a ampla variação morfológica das espécies tratadas. O trabalho inclui chave analítica para diferenciação das espécies, mapas de distribuição, comentários sobre aspectos ecológicos, citológicos e nomenclaturais e descrições acompanhadas de ilustrações. É questionada e discutida a validade do grupo informal Linearia de Paspalum, pela continuidade morfológica com Notata.

¹ Bióloga, Bolsista da CAPES, PG UNICAMP - Embrapa/CENARGEN. ² Eng. Agr., Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

Flora do Distrito Federal: levantamento florístico do Parque Boca da Mata

João M. de Rezende¹ e Taciana B. Cavalcanti²

Os estudos no Parque Boca da Mata foram iniciados segundo o contexto do projeto Flora do Distrito Federal, fazendo parte de suas ações o levantamento florístico. Este levantamento visa obter o completo conhecimento da flora, vegetação atual e sua distribuição no Distrito Federal, atualmente bastante modificada e ainda ameaçada pela expansão de Brasília e cidades satélites. O projeto Flora do DF realizará levantamentos em Parques, Estações Ecológicas, Reservas e Áreas de Proteção Ambiental do Distrito Federal, áreas que ainda detêm a vegetação nativa local, prevendo também, além da complementação de informações sobre a flora, sugestões para preservação e manejo destas unidades. O Parque Boca da Mata possui aproximadamente 260 hectares, e é cortado pelo córrego Taguatinga. Em termos vegetacionais, é composto basicamente por três tipos de fisionomias de Cerrado. O campo de murundus, corresponde a cerca de 50% da área total do Parque. Trata-se de um ambiente úmido, de solo cinzento e argiloso, formado principalmente por espécies de gramíneas e várias espécies herbáceas diferenciadas, representando até o momento 45 famílias e 127 espécies. O campo sujo de cerrado, apesar de também se caracterizar pela predominância de espécies de gramíneas, é mais seco e pode ser formado também por espécies subarbustivas e arbóreas, eventual-

¹ Estagiário da área de Exploração Botânica e Coleta de Germoplasma Embrapa/CENARGEN. ² Bióloga, Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

mente. Foram registrados até o presente 48 famílias e 147 espécies nesta fisionomia. A mata-de-galeria é a fisionomia menos predominante no Parque e a mais afetada pela ação antrópica. É formada por espécies arbóreas nativas representadas em 25 famílias e cerca de 40 espécies no Parque. O levantamento florístico do Parque Boca da Mata teve início em junho de 1995 através de coletas semanais, e conta atualmente com 518 amostras coletados. Está prevista para este Parque a elaboração da listagem da flora presente e relatório de impacto ambiental com sugestões de recuperação, preservação e manejo.

Estudo da variabilidade genética em Arachis pintoi Krap. & Greg. através de cruzamentos intra e interespecíficos

Marilda A. P. Oliveira¹ e José F. M. Valls²

Um fator limitante ao aumento da produção animal no Brasil é a alimentação do gado. O melhoramento animal possibilitou grandes avanços, quanto às características dos rebanhos nacionais. Novos progressos deverão ser obtidos com o desenvolvimento de cultivares forrageiras. Pertencendo à Secção Caulorrhizae, A. pintoi e A. repens têm se destacado por reunir características de grande potencial forrageiro. Quanto aos caracteres morfológicos, A. pintoi e A. repens possuem uma gradação para formato e tamanho de folíolos, que variam entre os exemplares típicos, dificultando a separação entre as duas espécies. Também encontramos variação para o carácter presença e ausência de cerdas, assim como variação na cor de flor. A variabilidade existente dentro de uma mesma secção poderá ser melhor compreendida, através de estudos mais acurados de caracterização morfológica e molecular. Os materiais genéticos utilizados para obtenção de híbridos foram GK 12787, V 13167, V 13338, V 13468 para acessos de A. pintoi e Nc 1579 para A. repens. O delineamento experimental utilizado foi o dialelo parcial, com 6 parentais, os quais participaram dos cruzamentos intra e interespecíficos. Os cruzamentos foram iniciados em janeiro de 1995. As emascações foram efetuadas entre 16:30 e 18:00h, e as poli-

¹ Bióloga, Bolsista da CAPES, PG UNESP/Botucatu - Embrapa/CENARGEN.

² Eng. Agr., Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

nizações eram realizadas no dia seguinte, entre 7:30 e 9:00h. A caracterização morfológica foi feita, utilizando-se descritores de fácil visualização. Técnicas de cultura de tecidos foram empregadas para resgatar o eixo embrionário de sementes mal formadas, e de sementes nas quais observou-se dormência. Foram obtidas 51 sementes possivelmente híbridas, provenientes de 509 cruzamentos. Estão plantados 25 híbridos em casa de vegetação, os quais foram caracterizados morfológicamente. Dos híbridos resgatados in vitro, um já está ambientado em casa de vegetação.

Caracterização protéica e isoenzimática de populações de *Arachis pintoi* Krap. & Greg. E *Arachis repens* Handro

Marcos R. Bertozo¹ e José F. M. Valls²

O gênero *Arachis* originário da América do Sul, compreende 69 espécies descritas, distribuídas em 9 secções. Desde 1980, espécies silvestres de *Arachis* estão sendo coletadas pelo CENARGEN, e atualmente 150 acessos de *A. pintoi* e *A. repens* estão disponíveis como germoplasma. Na última década, *A. pintoi* tem despertado grande interesse para uso forrageiro e diversas cultivares desenvolvidas a partir de um único acesso são comercializadas mundialmente. Estudos para se conhecer e caracterizar a variabilidade genética dessa espécie precisam ser ampliados. O presente trabalho tem por objetivo a caracterização genético-bioquímica e molecular de acessos de *A. pintoi* e *A. repens* coletados nos vales dos rios Jequitinhonha, São Francisco e Paraná, usando técnicas para proteínas de reserva, isoenzimas e RAPDs. Um total de 11 acessos de *A. pintoi* e 13 de *A. repens* foram analisados por proteínas de reserva da semente e isoenzimas em folhas jovens. A análise das proteínas de reserva revelou 6 zonas de atividade no gel e o polimorfismo foi detectado em apenas uma região do mesmo. De um total de 37 isoenzimas testadas, 12 foram selecionadas e apenas 4 (EST, IDH, TPI e LAP) foram polimórficas, entre os acessos estudados. Foi detectada variação dentro e entre acessos, para as isoenzimas EST, IDH e LAP. Na próxima etapa deste trabalho, serão realizados estudos usando marcadores RAPDs.

¹ Biólogo, Bolsista CNPq, PG UNESP/Botucatu - Embrapa/CENARGEN. ² Eng. Agr., Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

Produção de embriões e gestações a partir de ovócitos recuperados por ultra-sonografia em fêmeas bovinas superovuladas

Maurício A. S. Peixer¹, Rodolfo Rumpf² e Assis Roberto de Bem²

A punção folicular (PF) em animais vivos, associada às técnicas de fecundação in vitro (FIV), abre novas possibilidades para um maior aproveitamento de vacas de reconhecido valor genético. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção qualitativa e quantitativa de embriões de diferentes categorias de animais superovulados, bem como avaliar o melhor momento para se realizar a PF. Utilizou-se quatro grupos de animais: grupo-I constituiu-se de cinco vacas mestiça nelore não lactantes; grupo-II constituiu-se de cinco novilhas mestiça nelore, ambos os grupos foram puncionadas 96 h após o início da superovulação; grupo-III formado pelas mesmas vacas do grupo-I e grupo-IV formado pelas mesmas novilhas do grupo-II, no entanto puncionadas 72 h após o início do tratamento de superovulação (SOV). Sete dias após a colocação de implante (Syncromate-B) iniciou a SOV. Para os grupos I e II utilizou-se 400 UI de FSH-p (PLUSET - SERONO) em oito doses decrescentes. e 360 UI do mesmo hormônio para os grupos III e IV, em seis doses decrescentes. A retirada do implante em todos os animais foi realizada após a PF. A punção foi realizada com uma sonda transdutora convexa-setorial de 5 mHz em um aparelho de ultra-sonografia ALOKA modelo SSD 500. A

¹ Méd. Vet., Embrapa/CENARGEN. ² Méd. Vet., Ph.D, Embrapa/CENARGEN.

agulha utilizada para PF é do tipo 18 g e possui 58 cm de comprimento. Todos os folículos visíveis foram puncionados. O meio de coleta e lavagem dos ovócitos foi o PBS + 100 UI de heparina sódica + 10% SFB e antibióticos. Os resultados médios de recuperação ovocitária e produção de embriões em vacas e novilhas puncionadas em diferentes momentos da superovulação foram respectivamente por grupos:

- a) Variação do nº médio de PF I - 16,6 (9-21); II - 29,4 (20-48); III - 15,8 (7-24); IV - 24,6 (14-44);
- b) Variação nº médio de ovócitos em recuperação I - 7,6 (3-10); II - 7,8 (6-13); III - 7,0 (9-11); IV - 10,2 (7-13);
- c) Percentual de recuperação I - 45,78; II - 26,53; III - 44,30; IV - 41,46;
- d) Percentual de ovócitos utilizáveis I - 89,46; II - 89,73; III - 85,70; IV - 92,14;
- e) Variação percentual produção Blast. em D7 I - 00; II - 00; III - 23,33 (75-00); IV - 00.

Os ovócitos dos grupos I e II apresentaram em sua maioria, células da CR (Corona Radiata) levemente expandidas e com pontos picnóticos, o que sugere que estes ovócitos se encontravam em um estágio mais avançado da ovogênese. Avaliando o grupo-III fica evidenciado o comportamento individual entre doadoras para a produção de blastocistos. Seis embriões foram transferidos a fresco e resultaram em três gestações, sendo estes os primeiros produtos obtidos por PF/FIV em Laboratório no CENARGEN.

ÍNDICE DE AUTORES

Abreu Neto, J. R. M. V., 22
Alfenas, A. C., 36
Barrueto Cid, L. P., 27, 32, 35
Bem, A. R. de, 44, 56
Bertolucci, F. L., 28, 36
Bertoza, M. R., 42, 55
Brasileiro, A. C. M., 27, 32, 35
Bravo-Almonoacid, F., 33
Brondani, R. P. V., 38, 40
Buso, G. S. C., 42
Caetano, R. C. P. S., 23
Campinhos, E. N., 36
Carvalheira, S. B. R. C., 27
Carvalho, C. M. de, 20, 21, 22
Carvalho, V. F., 16
Casa, A. M., 30
Cavalcanti, T. B., 48, 51
Costa, D. C., 13
Costa e Silva, C., 28
Dias, J. M. C. S., 13, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25
Dusi, D., 33
Esmeraldo, M. V., 35
Farias, J. M., 23
Ferreira, M. E., 30, 42, 44
Figueiredo, G. de, 14
Figueiredo, S. A., 35
Fontes, E. M. G., 14, 16
Gama, M. I. C. S., 33

Gualda, C. M. de A., 48
Machado, A. C. M. G., 32
Machado, L. de O. R., 35
Martins, V. B., 44
Mello, P., 33
Mentaberry, A., 33
Monte-Neshich, D., 33
Nodari, R. O., 11
Oliveira, M. A. P., 53
Oliveira, R. C. de, 50
Pascoal, A. V., 33
Paula, K. A. A., 30
Peixer, M. A. S., 56
Peñaloza, A. del P. de S., 46
Rangel, P. H., 42
Rezende, J. M. de, 51
Rocha, A. G. S., 18
Romano, E., 33
Rumpf, R., 56
Sanchez, A. M., 20
Serafini, A. dos P., 16
Silva, J. B. T. da, 26
Silva, M. C., 48
Silva Júnior, A. L. da, 26
Silva, S. F., 23
Silva-Werneck, J. O., 25
Siqueira, C. B., 25
Sousa, G. D. de, 14

Souza, Og de, 16
Tenente, R. C. V., 18
Tostes, A. N., 23, 25
Valls, J. F. M., 46, 50, 53, 55
Zanuncio, J., 16

