



ISSN 0102 - 0110

Agosto, 2002

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

## **Documentos 77**

### **Relatório Anual de Biossegurança da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 2001**

Manoel Teixeira Souza Júnior  
Elba Correa Teixeira de Carvalho  
Patrícia Melo dos Santos

Brasília, DF  
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF  
CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372  
PABX: (61) 448-4600  
Fax: (61) 340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias  
Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual  
Membros: Antônio Costa Allem  
          Marcos Rodrigues de Faria  
          Marta Aguiar Sabo Mendes  
          Sueli Correa Marques de Mello  
          Vera Tavares Campos Carneiro  
Suplentes: Edson Junqueira Leite  
          José Roberto de Alencar Moreira  
Supervisor Editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual  
Revisor de texto: Felisberto de Almeida  
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi  
                                  Priscila Rocha Silveira  
Tratamento de Ilustrações: Alysson Messias da Silva  
Edição Eletrônica: Alysson Messias da Silva  
Capa: Alysson Messias da Silva

**1ª edição**

1ª impressão (2002): tiragem 150

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

---

Souza Júnior, Manoel Teixeira.

Relatório anual de biossegurança da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 2001 / Manuel Teixeira Souza Junior, Elba Correa Teixeira de Carvalho, Patrícia Melo dos Santos. Brasília : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.

86 p. (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 0102-0110, n. 77).

1. Biossegurança. I. Carvalho, Elba Correa Teixeira de. II. Santos, Patrícia Melo dos. III. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. IV. Título. V. Série.

CDD 660.6 - 21.Ed.

© Embrapa 2002

## **Autores**

**Manoel Teixeira Souza Júnior**

Eng. Agr., PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. E-mail: msouza@cenargen.embrapa.br

**Elba Correa Teixeira de Carvalho**

Estudante Graduação, Biologia, UniCEUB.

**Patrícia Melo dos Santos**

Estudante de Graduação, Relações Internacionais, UCB.

# Sumário

<b>Formulário de Relatório Anual das Instituições Possuidoras de CQB</b> .....	7
<b>Anexo 1</b> .....	10
Comitê Interno de Biossegurança - CIBio .....	10
<b>Anexo 2</b> .....	11
Projetos concluídos em 2001 .....	11
Projetos em andamento em 2001 (sem conclusão) .....	12
Projetos prorrogados até 2002 .....	13
Projetos novos - A iniciar em 2002 .....	13
Informações dos projetos concluídos no ano de 2001 da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia .....	14
Informações sobre os projetos em andamento em 2001 .....	40
Informações sobre os projetos prorrogados até 2002 .....	52
Informações sobre os projetos a serem iniciados em 2002 .....	57
<b>Anexo 3</b> .....	82
Relação de prédios com respectivos laboratórios e casas de vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que manipulam ou recebem OGMs .....	82
<b>Anexo 4</b> .....	84
Comitê Interno de Biossegurança da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia CIBio/ CENARGEN .....	84
<b>Anexo 5</b> .....	85
Relação de Material Transgênico Importado .....	85

# **Relatório Anual de Biossegurança da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 2001**

---

*Manoel Teixeira Souza Júnior*

*Elba Correa Teixeira de Carvalho*

*Patrícia Melo dos Santos*

## **Formulário de Relatório Anual das Instituições Possuidoras de CQB**

**1. Instituição: Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa em Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen)**

**2. CQB N.º: 004/96**

**3. Processo N.º 01200.004008/96-77**

**4. Composição da CIBio**

**Ver anexo 1**

Obs.: Caso tenha ocorrido alteração(ões) na composição da CIBio, favor informar. (Enviar *Curriculum Vitae* dos novos membros)

**5. Resumo dos projetos de pesquisa em andamento ou a serem iniciados, constando os objetivos, a relação dos organismos manipulados geneticamente, informações referentes aos genes manipulados, unidades (laboratórios, casas de vegetação) utilizadas, especificando os níveis de contenção.**

**Ver anexo 2**

**6. Lista de casas de vegetação e instalações para plantas e animais transgênicos.**

**Ver anexo 3**

7. Relatório sobre quaisquer acidentes relacionados diretamente a trabalhos com OGMs.

**Não houve acidentes.**

8. Relato de treinamento em biossegurança de OGMs.

Não houve treinamento.

9. Relato das medidas de biossegurança que vêm sendo adotadas.

Publicação de relatório anual (1999 e 2000) na série documentos da Embrapa.

Criação e manutenção de homepage da CIBio no Intranet do Cenargen.

Avaliação preliminar das novas propostas de projeto de pesquisa e

desenvolvimento a serem iniciadas em 2002 no Cenargen.

10. Citar as liberações ambientais na(s) Unidade(s) com os respectivos número dos Processos no MCT.

10.1. Realizadas: **Nenhuma.**

10.2. Em andamento: **Uma (mamão - 01200003364/99-99)**

10.3. Suspensos (mesmo que temporariamente, explicitar o motivo da suspensão): **Nenhuma.**

11. Relação dos relatórios de conclusão dos experimentos.

Vide anexo 2.

12. Número de reuniões realizadas pela CIBio.

Foram realizadas duas reuniões entre ordinárias para tratar de assuntos relacionados à biossegurança na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

**13. Avaliação da CIBio quanto ao apoio da Instituição para o funcionamento de suas atividades.**

A instituição apoiou o funcionamento da CIBio. Houve reformulação parcial da composição da comissão e a publicação do relatório anual de 1999 e 2000.

**14. Especificar o material importado e respectivas quantidades para a realização dos projetos.**

Ver anexo 5

**15. Houve monitoramento / fiscalização por parte do Órgão Competente?**

Caso afirmativo, indicar a data, equipe fiscalizadora e N.º do Termo de Fiscalização e, se houver, o N.º do Auto de Infração.

Sim, agentes fiscais da Delegacia Federal de Agricultura e do Abastecimento no Distrito Federal visitaram o campo com mamoeiro transgênico no dia 26 de abril de 2001. Os agentes Francisco Deusimar Barbosa e Paulo Tomoo Morimoto, após a visita, preencheram o termo de fiscalização 01/01 - SSV/DFA/DF. Uma visita ao campo de feijoeiro transgênico foi realizada por representantes da CTNBio (Dra. Wania Moda e Sr. Juliano), porém, até o momento, não recebemos nenhum termo de fiscalização (ou documento deste tipo) formalizando a visita.

**16. Qualquer outra ocorrência que a CIBio julgar necessário relatar à CTNBio.**

Não há.

## Anexo 1

### Comitê Interno de Biossegurança - CIBio

Os membros abaixo tiveram seus nomes aprovados pela CTNBio, que emitiu parecer favorável ao novo comitê na 44ª Reunião Ordinária, segundo Carta nº 0400-2/00 de 15.12.2000 encaminhada à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Porém, em 2001, dois membros (Ana Cristina Miranda Brasileiro e Maria Marina M.R.R.V.U.D. & Silva) solicitaram afastamento do comitê por estarem se afastando das suas atividades na Embrapa em decorrência de licença maternidade e aposentadoria, respectivamente. Para ocupar os lugares vagos, o pesquisador Francisco J. L. Aragão (membro suplente) foi efetivado como titular, e a pesquisadora Vera Carneiro assumiu a vaga de suplente.

A pesquisadora Margot Nunes Dode foi efetivada como membro titular.

Membro Titular	Área de Atuação
Manoel Teixeira Souza Júnior (Presidente/ Secretário Executivo)	Fitopatologia e Biologia Molecular de Plantas
Francisco José Lima Aragão	Biologia Molecular/ Celular
Bruno Machado T. Walter	Botânica
Edison Ryoiti Sujii	Ecologia
Abi Soares dos A. Marques	Introdução e Quarentena
Margot Nunes Dode	Melhoramento Genético - Animal
Francisco Ricardo Ferreira	Melhoramento Genético - Vegetal
Vicente Carneiro de Castro	Leigo
Membro Suplente	Área de Atuação
Vera Tavares Carneiro	Biologia Molecular/ Celular
Taciana Barbosa Cavalcanti	Botânica
Carmem Silva S. Pires	Ecologia
Vilmar Gonzaga	Introdução e Quarentena
Andréa Alves do Egito	Biologia Molecular - Animal
Rui Americo	Melhoramento Genético - Vegetal
Membros Natos	Área de Atuação
Luis Antonio Barreto de Castro	Chefe-Geral
Clara Oliveira Goedert	Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
José Manoel Cabral de Sousa Dias	Chefe-Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio



## Anexo 2

### Projetos concluídos em 2001

01.1998.841.02 – **Caracterização citogenética e molecular de acessos silvestres e cultivados do gênero *Capsicum*.**

*Responsável pelo projeto:* GLÁUCIA BUSO

03.1998.032.01 – **Estratégia para obtenção de um inibidor de a-amilase ativo para *Acanthoscelides obtectus*.**

*Responsável pelo projeto:* MARIA FÁTIMA GROSSI DE SÁ

03.1998.032.02 – **Identificação de inibidores de proteínase e/ ou proteínas tóxicas que apresentem alta eficiência em inibir pragas de interesse agrônomo.**

*Responsável pelo projeto:* MARIA FÁTIMA GROSSI DE SÁ

03.1999.035.01 – **Identificação de fatores ativos no controle de fitonematóides sedentários.**

*Responsável pelo projeto:* MARIA FÁTIMA GROSSI DE SÁ

03.1999.035.02 – **Uso da reação de hipersensibilidade no controle de fitonematóides sedentários.**

*Responsável pelo projeto:* PATRÍCIA MESSEMBERG GUIMARÃES

03.1999.042.01 – **Desenvolvimento de sistema para a obtenção de plantas transgênicas de soja.**

*Responsável pelo projeto:* ELÍBIO LEOPOLDO RECH FILHO

03.1999.042.02 – **Desenvolvimento de sistema para a obtenção de plantas transgênicas de feijão.**

*Responsável pelo projeto:* FRANCISCO JOSÉ LIMA ARAGÃO

03.1999.042.03 – **Desenvolvimento de sistema para a obtenção de plantas transgênicas de algodão.**

*Responsável pelo projeto:* ELÍBIO LEOPOLDO RECH FILHO

03.1999.042.04 – **Desenvolvimento de sistema para a obtenção de plantas transgênicas de eucalipto.**

*Responsável pelo projeto:* ANA CRISTINA MIRANDA BRASILEIRO

03.1999.042.05 – **Desenvolvimento de técnicas de transformação genética por eletroporação em protoplastos e por biobalística em células de bananeira.**

*Responsável pelo projeto:* KASUMITSU MATSUMOTO

03.1999.043.01 – **Obtenção de plantas transgênicas de batata contendo genes de proteínas antimicrobianas.**

*Responsável pelo projeto:* ELIONOR RITA PEREIRA DE ALMEIDA

03.1999.043.02 – **Bioensaios para avaliação de proteínas antimicrobianas no controle de fungos fitopatogênicos, *in vitro* e *in vivo*.**

*Responsável pelo projeto:* CARLOS CASTRO

### **Projetos em andamento em 2001 (sem conclusão)**

03.2000.049.01 – **Desenvolvimento de marcadores moleculares de alto desempenho para estudos de populações naturais de espécies arbóreas.**

*Responsável pelo projeto:* ANA YAMAGUSHI CIAMPI

03.2000.050.01 – **Estudo dos elementos regulatórios da expressão gênica em órgãos de reserva.**

*Responsável pelo projeto:* LUCÍLIA HELENA MARCELLINO

03.2000.050.02 – **Caracterização físico-química e biológica de reserva de milho e seus respectivos genes.**

*Responsável pelo projeto:* EUGEN GANDER

03.2000.141.02 – **Desenvolvimento de sistema para a obtenção de plantas transgênicas de feijão resistentes ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro.**

*Responsável pelo projeto:* FRANCISCO JOSÉ LIMA ARAGÃO

17.1999.199.02 – **Controle da mancha anelar mediante o uso de variedade(s) transgênica(s) de mamoeiro (*Carica papaya* L.) com amplo espectro de resistência.**

*Responsável pelo projeto:* MANOEL TEIXEIRA SOUZA JÚNIOR

19.1999.078.03 – **Introdução e expressão de genes transgenes em cafeeiro (*Coffea spp.*) através do processo biobalístico e do sistema *Agrobacterium*.**

*Responsável pelo projeto:* ANA CRISTINA MIRANDA BRASILEIRO

## Projetos prorrogados até 2002

03.1999.037.02 – **Caracterização de seqüências de cDNA relacionadas com a apomixia de plantas de *Brachiaria*.**

*Responsável pelo projeto:* VERA TAVARES DE CAMPOS CARNEIRO

17.1999.190.02 – **Desenvolvimento de mamoeiros transgênicos resistentes a fungos.**

*Responsável pelo projeto:* MANOEL TEIXEIRA SOUZA JÚNIOR

## Projetos novos - A iniciar em 2002

03.2002.052.02 - **Abordagem transcriptoma: Análise do padrão da expressão gênica em *Theobroma cacao* susceptível e resistente aos fungos *Crinipellis perniciosa*.**

*Responsável pelo projeto:* Eugen Silvano Gander

03.2002.052.03 - **Estabelecimento de uma metodologia de transformação genética de cacau.**

*Responsável pelo projeto:* Francisco J.L. Aragão

03.2002.053.01 - **Estratégia molecular de controle a pragas de grãos armazenados de feijão.**

*Responsável pelo projeto:* Maria Fátima Grossi de Sá

03.2002.053.02 - **Estratégia molecular de controle a pragas de algodão *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*.**

*Responsável pelo projeto:* Maria Fátima Grossi de Sá

03.2002.053.03 - **Estratégia molecular para resistência a pragas de grãos de cereais.**

*Responsável pelo projeto:* Luciane Vieira de Mello Rigden

03.2002.053.04 - **Os inibidores de enzimas digestivas e seu uso no controle da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*).**

*Responsável pelo projeto:* Maria Fátima Grossi de Sá

03.2002.054.01 - **Identificação de fatores e análise da expressão de genes envolvidos na fitopatogenicidade de nematóides visando o desenvolvimento de estratégias de controle.**

*Responsável pelo projeto:* Maria Fátima Grossi de Sá

03.2002.054.02 - **Busca de genes de resistência a nematóides fitossedentários *Meloidgyne sp.* em germoplasma silvestre de *Arachis*.**

*Responsável pelo projeto:* Patrícia Messenberg Guimarães

03.2002.054.03 - **Mapeamento genético de locos associado à resistência a *Meloidgyne* em espécies silvestres de *Arachis*.**

*Responsável pelo projeto:* Soraya Leal Bertoli

03.2002.054.04 - **Análise e expressão diferencial de genes em *Arachis sp.* associados à resistência a *Meloidgyne sp.*, *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*.**

*Responsável pelo projeto:* Patrícia Messenberg Guimarães

03.2002.059.02 - **Micromanipulação de embriões.**

*Responsável pelo projeto:* Rodolfo Rumpf

03.2002.059.03 - **Transfecção de fibroblastos e análise da expressão gênica.**

*Responsável pelo projeto:* Elíbio Rech

## **Informações dos projetos concluídos no ano de 2001 da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

1. Título do projeto 01.1998.841.02

***Caracterização citogenética e molecular de acessos silvestres e cultivados do gênero *Capsicum*.***

*Responsável pelo projeto:* GLÁUCIA BUSO

2. Objetivos

· Caracterização molecular de espécies silvestres de *Capsicum* coletadas na Mata Atlântica e Amazônia em comparação a acessos da América do Sul e América Central. *Fingerprinting* de DNA de diferentes acessos será analisado: a, em centenas de locos distribuídos por todo o genoma através da técnica de AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism"); b, em regiões de baixa taxa de

mutação e recombinação dos genomas cloroplástico (cpDNA) e mitocondrial (mtDNA) através das técnicas de CAPs (Cleavage Amplified Polymorphisms) e seqüenciamento de DNA. Dessa forma uma amostragem de regiões de alta, média e baixa taxa de evolução do genoma, em um grande número de locos, permitirá inferências significativas sobre aspectos evolutivos do gênero *Capsicum*.

· Caracterização molecular de variedades cultivadas de pimenta e pimentões conservadas no Coleção de Germoplasma de *Capsicum*. *Fingerprinting* de DNA de diferentes acessos será analisado em centenas de locos distribuídos ao acaso por todo o genoma através da técnica de RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA").

· Desenvolvimento e caracterização de locos de marcadores microssatélite para *Capsicum annuum*. Uma biblioteca de clones de seqüências satélites será construída e um conjunto de locos microssatélites será desenvolvido para aplicações futuras em estudos de diversidade genética e mapeamento genético de *Capsicum*.

3. Lista de OGMs produzidos/ manipulados no projeto:

900 fragmentos foram clonados em *E. coli*.

4. Lista de genes/fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene):

Os fragmentos continham seqüências repetitivas ou microssatélites.

5. Organismos transformados/genes utilizados:

*E. coli* (XL1-Blue).

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança:

Laboratório de Genética de Plantas, Nível I.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

Os clones foram armazenados até o seqüenciamento em geladeira própria.

Atualmente, não temos mais nenhum armazenado.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio):  
Nenhum.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil:  
Nenhum.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.  
Não se aplica.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda a equipe do projeto:  
Glaucia Salles Cortopassi Buso – Pesquisadora  
Zilneide Pedrosa Amaral – Técnica

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.  
Nenhum.

---

1. Título do projeto 03.1998.032.01

***Estratégia para obtenção de um inibidor de a-amilase ativo para *Acanthoscelides obtectus*.***

Responsável pelo projeto: Maria Fátima Grossi de Sá

2. Objetivos

Estudar a interação molecular entre a-amilases e inibidores de á-amilases de plantas visando a obtenção de inibidores de á-amilases ativos contra a amilase do bruquídeo *Acanthoscelides obtectus*.

3. Lista de OGMs produzidos/ manipulados no projeto

Não se aplica.

4. Lista de Genes/fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene).

**Tabela 1.** Elementos utilizados na construção de vetores para determinação da atividade dos mutantes do inibidor AI-2

Item	Descrição breve (referência bibliográfica)
pATM1, pATM2, pATM3, pATM4, pATM5, pATM1	Mutantes do inibidor AI-2 obtidos, por mutação sítio-dirigida, após estudos da interação molecular entre á-amilases e seus inibidores específicos ( Da Silva et al., 1999).
Promotor PHA	Promotor da proteína fito-hemaglutinina isolado do feijão <i>Phaseolus vulgaris</i> (ref).
Terminador 3'PHA	Terminador da proteína fito-hemaglutinina isolado do feijão <i>Phaseolus vulgaris</i> (ref).
<i>Npt II</i> gene	Gene neomycin phosphotransferase (Topfer et al., 1980) originado de <i>Escherichia coli</i> - Kan res.
pANos	Sinal de poliadenilação do gene nopaline sintase
Promotor 35S	Promotor originado do vírus do mosaico da couve-flor (cauliflower mosaic virus-CaMV) ( Odell et al., 1985; ietrzak et al., 1986)
Gene Gus	Gene que codifica a b-glucoronidase ( Jefferson et al., 1987. Embo J, 6: 3901-3907)
Promotor Nos	Promotor do gene nopaline sintase (An, 1986; Bevan et al., 1983) originado de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
<i>Npt II</i> gene	Gene neomycin phosphotransferase (Topfer et al., 1980) originado de <i>Escherichia coli</i> .

5. Organismos transformados/ genes utilizados:

Plantas de tabaco serão transformadas nos próximos meses para testar a atividade dos mutantes.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança:  
Área de Biologia Molecular, Nível I.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

03 Bibliotecas de cDNA armazenadas em freezer.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio):

Não se aplica.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil.

Nenhum.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

Não se aplica.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda equipe do projeto.

Maria Fátima Grossi de Sá - Pesquisadora III - Cenargen

Marise Coutinho Ventura - Pesquisadora II - Cenargen

Norma Santos Paes – Técnica Especializada - Cenargen

Maria Cristina Mattar da Silva – Pesquisadora II - Cenargen- Aluna de Doutorado, UnB

Luciane Vieira Mello Ridgen - Pesquisadora III - Cenargen

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Nenhum.

---

1. Título do projeto 03.1998.032.02:

***Identificação de inibidores de proteínases e/ou proteínas tóxicas que apresentem alta eficiência em inibir pragas de interesse econômico.***

Responsável pelo projeto: Maria Fátima Grossi de Sá

2. Objetivos:

· Identificar e/ou selecionar inibidores de proteínases com capacidade de inibir as proteínases de pragas de importância econômica, tais como o bruquídeo *Acanthoscelides obtectus*, bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* e *Rhizopherta dominica*.

· Identificar proteínas tóxicas com atividade sobre as pragas acima citadas.

3. Lista de OGMs produzidos/ manipulados no projeto:

E. coli e Planta de feijão.

4. Lista de Genes/fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene).



**Tabela 2:** Elementos utilizados na construção de vetores para utilização na transformação de plantas de feijão

Item	pPucBarArc5III
<i>Arc5III</i> gene	Gene da proteína Arcelina 5C, isolado do acesso do feijão <i>Phaseolus vulgaris</i> G07771 ( Gerhardt et al., 1999)
Promotor PHA	Promotor da proteína fito-hemaglutinina isolado do feijão <i>Phaseolus vulgaris</i>
Terminador 3'PHA	Terminador da proteína fito-hemaglutinina isolado do feijão <i>Phaseolus vulgaris</i> .
Promotor 35S	Promotor do gene nopaline synthase (An, 1986; Bevan et al., 1983) originado de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
Terminador35S	Terminador originado do vírus do mosaico da couve-flor (caulimoflower mosaic virus – CaMV) (Odell et al., 1985; Pietrzak et al., 1986)
<i>Bar</i>	Gene de resistência bialaphos que codifica para a phosphinothricin acetyltransferase (PAT) ( Akama et al., 1995, Plant Cell Reports 14:450-454)

---

Item	pPucBarArc5IV
<i>Arc5IV</i> gene	Gene de Arcelina, isolado do acesso do feijão <i>Phaseolus vulgaris</i> G07771 ( Gerhardt et al., 2000)
Promotor PHA	Promotor da proteína fito-hemaglutinina isolado do feijão <i>Phaseolus vulgaris</i> .
Terminador 3'PHA	Terminador da proteína fito-hemaglutinina isolado do feijão <i>P. vulgaris</i> .
Promotor 35S	Promotor do gene nopaline sintase (An, 1986; Bevan et al., 1983) originado de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
Terminador35S	Terminador originado do vírus do mosaico da couve-flor (caulimoflower mosaic virus – CaMV) (Odell et al., 1985; Pietrzak et al., 1986)
<i>Bar</i>	Gene de resistência bialaphos que codifica para a phosphinothricin acetyltransferase (PAT) ( Akama et al., 1995, Plant Cell Reports 14:450-454)

Item	pPucBarAI2
<i>aAI2</i> gene	Gene que codifica para o inibidor de $\alpha$ -amilaseAI-2, isolado do acesso do feijão <i>Phaseolus vulgaris</i> G12954 com atividade para <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Grossi de Sá et al., 1997).
Promotor PHA	Promotor da proteína fito-hemaglutinina isolado do feijão <i>P. vulgaris</i> .
Terminador 3'PHA	Terminador da proteína fito-hemaglutinina isolado do feijão <i>Phaseolus vulgaris</i> .
Promotor 35S	Promotor do gene nopaline synthase (An, 1986; Bevan et al., 1983) originado de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
Terminador 35S	Terminador originado do vírus do mosaico da couve-flor (caulimoflower mosaic virus – CaMV) (Odell et al., 1985; Pietrzak et al., 1986).
<i>Bar</i>	Gene de resistência bialaphos que codifica para a fosfinothricin acetyltransferase (PAT) ( Akama et al., 1995, Plant Cell Reports 14:450-454).
Item	pPucBarchag
<i>Chagasina</i> gene	Gene da proteína chagasina, um inibidor de cisteína proteinase isolado de <i>Trypanosoma cruzi</i> com atividade para os bruquídeos <i>Zabrotes subfasciatus</i> , <i>Acanthoscelides obtectus</i> e <i>Callosobruchus maculatus</i> (Monteiro et al., 2000, In preparação)
Promotor PHA	Promotor da proteína fito-hemaglutinina isolado do feijão <i>Phaseolus vulgaris</i> .
Terminador 3'PHA	Terminador da proteína fito-hemaglutinina isolado do feijão <i>Phaseolus vulgaris</i> .
Promotor 35S	Promotor do gene nopaline sintase (An, 1986; Bevan et al., 1983) originado de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
Terminador35S	Terminador originado do vírus do mosaico da couve-flor (caulimoflower mosaic virus – CaMV) (Odell et al., 1985; Pietrzak et al., 1986)
<i>Bar</i>	Gene de resistência bialaphos que codifica para a fosfinothricin acetyltransferase (PAT) (Akama et al., 1995, Plant Cell Reports 14:450-454)

**Tabela 3.** Elementos utilizados na construção de vetores para utilização na transformação de plantas de algodão.

Item	pBluAHAS-SKTI
Gene SKTI	Gene do inibidor Kunitz de serina-proteínase, isolado de soja com atividade sobre o bicudo-do-algodoeiro (Franco et al., 2000)
Promotor 35S	Promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Odell et al., 1985, Pietrzak et al., 1986) –
promotor	dobrado
<i>pAOct</i>	Sinal de poliadenilação do gene da octopina sintase
<i>Prom Ahas</i>	Promotor do gene <i>Ahas</i>
<i>Ahas</i>	Gene <i>Ahas</i>
<i>Ahas ter</i>	Terminador do gene <i>Ahas</i>
Amp	Marcador de seleção bacteriana-ampicilina res.

Obs.: Vetor base pAC 321 (obtido pela clonagem do cassete de expressão do AHAS no sítio de *Xba* I do pBluescript). Clonagem obtida pela clonagem do cassete de expressão do SKTI no sítio de *Not* I no pAC321.

Item	pUCEA1
Promotor 35S	Promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Odell et al., 1985; Pietrzak et al., 1986).
<i>Hyg</i>	Gene da higromicina-fosfo-transferase, que confere resistência ao antibiótico higromicina (Becker D. 1990. NAR 18:203).
pA35S	Sinal de poliadenilação do gene 35S.
uceA1	Promotor, 5' UTR e 12 primeiros aminoácidos da extremidade N-terminal do gene de proteína de conjugação a ubiquitina de algodão (sense).
<i>Gus</i>	Gene da b-glucoronidase ( <i>uidA</i> ) (Jefferson RA. 1987. EMBO J. 6: 3901-3907).
<i>pAnos</i>	Terminador do gene nopalina sintase.
<i>nptII</i>	Gene de neomicina-fosfo-transferase, que confere resistência ao antibiótico Kanamicina.

Obs.: Inseto (promotor uceA1) clonado nos sítios de *Nco* I e *Spe* I do pCAMBIA1391 a fim de entrar em fase com o gene *Gus*.

Item	pUCEA6
Promotor 35S	Promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Odell et al., 1985; Pietrzak et al., 1986).
<i>Hyg</i>	Gene da higromicina-fosfo-transferase, que confere resistência ao antibiótico higromicina (Becker D. 1990. NAR 18:203).
pA35S	Sinal de poliadenilação do gene 35S.
uceA1	Promotor, 5' UTR e 12 primeiros aminoácidos da extremidade N-terminal do gene de proteína de conjugação a ubiquitina de algodão (anti-sense).
<i>Gus</i>	Gene da b-glucoronidase ( <i>uidA</i> ) (Jefferson RA. 1987. EMBO J. 6: 3901-3907).
<i>pAnos</i>	Terminador do gene nopalina sintase.
<i>nptII</i>	Gene de neomicina-fosfo-transferase, que confere resistência ao antibiótico Kanamicina.

Obs.: Construção idêntica ao pUCEA1, mas com o promotor na orientação anti-sense.

**Tabela 4.** Elementos utilizados na construção de vetores para utilização na transformação de plantas de trigo

Item	pPucBarchag
<i>Chagasina</i> gene	Gene da proteína chagasina, um inibidor de cisteína proteínase isolado de <i>Trypanosoma cruzi</i> (Monteiro et al., 2000, In preparação)
Promotor PHA	Promotor da proteína fito-hemaglutinina isolado do feijão <i>Phaseolus vulgaris</i> .
Terminador 3'PHA	Terminador da proteína fito-hemaglutinina isolado do feijão <i>Phaseolus vulgaris</i> .
Promotor 35S	Promotor do gene nopaline synthase (An, 1986; Bevan et al., 1983) originado de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
Terminador35S	Terminador originado do vírus do mosaico da couve-flor (caulimoflower mosaic virus – CaMV) (Odell et al., 1985; Pietrzak et al., 1986)
<i>Bar</i>	Gene de resistência bialaphos que codifica para a phosphinothricin acetyltransferase (PAT) (Akama et al., 1995; Plant Cell Reports 14:450-454)

5. Organismos transformados / genes utilizados:

- Plantas de feijão foram transformadas com os genes acima citados ( Arc5III, Arc5IV, aAI2 e chagasina), e nos próximos meses estas serão analisadas e testadas quanto à atividade para os bruquídeos-pragas.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança.  
Área de Biologia Molecular, Nível I.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

03 Bibliotecas de cDNA armazenadas em freezer.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).

Não se aplica.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil. Listar instituições/ organismos/ tipos de marcas. Indicar o meio de transporte e o número de CQB da instituição que recebeu o material.

Nenhum.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

Não se aplica.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda a equipe do projeto.

Maria Fátima Grossi de Sá - Pesquisadora III - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Marise Coutinho Ventura - Pesquisadora II - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Norma Santos Paes – Técnica Especializada - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Luciane Vieira Mello Ridgen - Pesquisadora III – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Ana Carolina dos Santos Monteiro – estudante de doutorado – UFRJ

Osmundo de Oliveira Brilhante - aluno de doutorado –UnB

Francislete Mello - aluna de doutorado - UnB

Octavio Franco – Aluno de doutorado - UnB

Simoni Dias – Aluna de doutorado - UnB

João Nogueira Aguiar - Recém-Doutor - CNPq

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Nenhum.

1. Título do projeto 03.1998.035.01:

**Identificação de fatores protéicos ativos no controle de fitonematóides sedentários.**

Responsável pelo projeto: Maria Fátima Grossi de Sá

2. Objetivos

Identificar e/ ou selecionar fatores protéicos (inibidores de proteínases e protéicas tóxicas) com capacidade sobre os fitonematóides sedentários *Meloidogne* spp. e *Heterodera* spp.

3. Lista de OGMs produzidos/ manipulados no projeto.

*E. coli*.

4. Lista de Genes/ fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene):

**Tabela 5.** Elementos utilizados na construção de vetores para utilização na transformação de plantas de soja

Item	p100Hg
Promotor 35S	Promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Odell et al., 1985; Pietrzak et al., 1986).
<i>Hgprcys</i>	Porção gênica que codifica a pró-região da proteínase cisteínica isolada de <i>Heterodera glycines</i> .
pANos	Sinal de poliadenilação do gene nopaline synthase
Pnos	Promotor do gene da nopaline synthase (An, 1986; Bevan et al., 1983) originado de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
<i>NptII</i> gene	Gene neomycin phosphotransferase (Topfer et al., 1980) originado de <i>Escherichia coli</i> - Kan res

Continua

Continuação da Tabela 5.

pAg 7	Sinal de poliadenilação do gene 7
pANos	Sinal de poliadenilação do gene da nopaline sintase

Obs.: p100Hg: Vetor base pGPTV-Kan (Becker D, Kemper E, Sehall J and Mastersan R, 1992. New Plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. Plant Mol Biol. 20: 1195-1197).

Item	p54Hg
Promotor 4xB5 + A	Promotor do gene 35S- domínio B5 repetido em "Tandem" 4 vezes (Bertioli et al., 1999. Mol Plant Microbe Int. 12(3): 189-196)
<i>Hgprcys</i>	Porção gênica que codifica a pró-região da proteínase cisteínica isolada de <i>Heterodera glycines</i> .
PANos	Sinal de poliadenilação do gene da nopaline synthase
Pnos	Promotor do gene da nopaline synthase (An, 1986; Bevan et al., 1983) originado de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
<i>NptII</i> gene	Gene neomycin phosphotransferase (Topfer et al., 1980) originado de <i>Escherichia coli</i> - Kan res
PAg 7	Sinal de poliadenilação do gene 7

Obs: Vetor com construção idêntica ao p100Hg no qual o promotor 35S esta substituído pelo promotor 4xB5 + 4 que corresponde ao domínio B5 do promotor 35S repetido 4 vezes em *Tandem*.

Item	pUCES-Gus
Promotor UCES	Promotor do gene de conjugação a ubiquitina de soja da família <i>Leubc4</i> (Batista et al., em preparação)
<i>Gene Gus</i>	Gene que codifica a b-glucoronidade (Jefferson et al., 1987. EMBO J, 6: 3901-3907)
pA35S	Sinal de poliadenilação do gene 35S
Promotor 35S	Promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Odell et al., 1985; Pietrzak et al., 1986).
<i>Gene Hyg</i>	Gene da higromicina-fosfo-transferase (Becker, 1990. Nucleic Acids Res 18: 203)
pAnos	Sinal de poliadenilação do gene da nopalina synthase
<i>Gene NptII</i>	Gene neomycin phosphotransferase (Topfer et al., 1980) originado de <i>Escherichia coli</i> - Kan res

Obs.: Vetor base = pCAMBIA 1391Z.

Item	pUCES8.3
Promotor 35S	Promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Odell et al., 1985; Pietrzak et al., 1986).
<i>Hyg</i>	Gene da higromicina-fosfo-transferase, que confere resistência ao antibiótico higromicina (Becker D. 1990. NAR 18:203).
pA35S	Sinal de poliadenilação do gene 35S.
UCES8.3	Promotor, 5' UTR e 12 primeiros aminoácidos da extremidade N-terminal do gene de proteína de conjugação a ubiquitina de soja (sense).
<i>Gus</i>	Gene da b-glucoronidase ( <i>uidA</i> ) (Jefferson RA. 1987. EMBO J. 6: 3901-3907).
<i>pAnos</i>	Terminador do gene nopalina sintase.
<i>nptII</i>	Gene de neomicina-fosfo-transferase, que confere resistência ao antibiótico Kanamicina.

Obs.: Inseto (promotor uceS8.3) clonado no sítio de *EcoR* I do pCAMBIA1391Xc a fim de entrar em fase com o gene *Gus*.

Item	pUCES8.8
Promotor 35S	Promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Odell et al., 1985; Pietrzak et al., 1986).
<i>Hyg</i>	Gene da higromicina-fosfo-transferase, que confere resistência ao antibiótico higromicina (Becker D. 1990. NAR 18:203).
pA35S	Sinal de poliadenilação do gene 35S.
UCES8.3	Promotor, 5' UTR e 12 primeiros aminoácidos da extremidade N-terminal do gene de proteína de conjugação a ubiquitina de soja (anti-sense).
<i>Gus</i>	Gene da b-glucoronidase ( <i>uidA</i> ) (Jefferson RA. 1987. EMBO J. 6: 3901-3907).
<i>pAnos</i>	Terminador do gene nopalina sintase.
<i>nptII</i>	Gene de neomicina-fosfo-transferase, que confere resistência ao antibiótico Kanamicina.

Obs.: Construção idêntica ao pUCES8.3, mas com o promotor na orientação anti-sense.



5. Organismos transformados/genes utilizados.

Vide acima.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança.

Área de Biologia Molecular, Nível I.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

03 Bibliotecas de cDNA armazenadas em freezer.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).

Não se aplica.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil. Listar instituições/  
organismos/ tipos de marcas. Indicar o meio de transporte e o número de CQB  
da instituição que recebeu o material.

Nenhum.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de  
sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

Não se aplica.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição  
de toda a equipe do projeto.

Maria Fátima Grossi de Sá - Pesquisadora III – Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia

Patrícia Messemberg- Pesquisadora III - Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia

Marise Coutinho Ventura - Pesquisadora II - Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia

Norma Santos Paes – Técnica Especializada - Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia

Osmundo de Oliveira Brilhante- aluno de doutorado – UnB

Francine Barbosa da Silva- aluna de doutorado - UnB

João Nogueira Aguiar- Recém Doutor - CNPq

Paulo Mendes- aluno de graduação -UnB

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Nenhum.

---

1. Título do projeto 03.1999.035.02:

***Uso da reação de hipersensibilidade no controle de fitonematóides sedentários***

Responsável pelo projeto: Patricia Messemberg

2. Objetivos

Prospecção de genes de resistência a *Meloidogyne* sp. em germoplasma, silvestre e de fatores com efeito nematocida (inibidores de proteases ou amilases) a serem incorporados em culturas de importância econômica.

3. Lista de OGMs produzidos/manipulados no projeto.

Escherichia coli strain XL-Blue

Plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*)

4. Lista de genes/fragmentos introduzidos. (especificar as características conferidas pelo gene).

DNA genômico de *Arachis* sp.

Gene da tar1 – lectina

Gene cpti - inibidor de tripsina de caupi

Gene uidA (Gus)- b-glucuronidase

5. Organismos transformados/genes utilizados.

Plantas de fumo / gen da tar1, cpti e Gus

Escherichia coli / DNA genômico de *Arachis* sp.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança.

Casa de vegetação N ° 30 – devidamente equipada e autorizada para crescimento e multiplicação de plantas transgênicas. Laboratório de Proteção de plantas, prédio da Biotecnologia, autorizado para manipulação de OGMs do tipo 1.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

Cerca de 1.000 clones de *E. coli* contendo DNA genômico de *Arachis* sp.,

mantidos em freezer (-80). Cerca de 100 plantas de fumo em casa de vegetação (Nº 30).

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).  
Não há.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil. Listar instituições/organismos/tipos de marcas. Indicar o meio de transporte e o número de CQB da instituição que recebeu o material.

Não há.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/patente/projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

Não há.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda a equipe do projeto Pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia:

Patrícia Messenberg Guimarães - Pesquisadora III- Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Soraya Leal Bertioli - Pesquisador III

David Bertioli, Professor UCB

Divino Pires, Estudante UnB

Marília Bruso Leon, Estudante UnB

Ana Amélia Peixoto, Estudante UnB

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Não há.

---

1. Título do projeto 03.1999.042.01:

***Desenvolvimento de sistema para a obtenção de plantas transgênicas de soja.***

Responsável pelo projeto: Elbio Leopoldo Rech Filho

2. Objetivos

Desenvolvimento de plantas transgênicas de soja.

3. Lista de OGMs produzidos/manipulados no projeto.

Soja.

4. Lista de genes/ fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene).

*ahas* = herbicida

*hgh* = hormônio do crescimento humano

*ish* = insulina humana

*gus* = marcador

5. Organismos transformados/genes utilizados.

*Escherichia coli* = ampicilina, kanamicina

Soja = *hgh*, *ish*, *ahas*, *gus*.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança.

Área de Biologia Celular Nível I.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado:

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

Sementes e DNA.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).

Não se aplica.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil. Listar instituições/ organismos/ tipos de marcas. Indicar o meio de transporte e o número de CQB da instituição que recebeu o material.

Não se aplica.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

Não se aplica.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda a equipe do projeto

Elíbio L. Rech, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Francisco J.L. Aragão, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Adilson Leite, PhD, UNICAMP, CBMEG

Cristiano Lacorte, Pesquisador, MSc, Embrapa Recursos Genéticos e

Biotecnologia

Sergio Abud, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Giovanni Vianna, estudante UnB  
Alexandre Pova, estudante UnB  
Nicolau Brito da Cunha, estudante UnB  
Thais Almeida, estudante UnB  
Margareth das Mercês Albino, estudante UCB  
Luiz Lemos, técnico da UCB  
Warley Almeida, técnico

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Não houve problemas.

---

1. Título do projeto 03.1999.042.02:

***Desenvolvimento de sistema para a obtenção de plantas transgênicas de feijão.***

Responsável pelo projeto: Francisco José Lima Aragão

2. Objetivos

Obtenção de plantas de feijão com resistência ao herbicida glifosinato de amônia.

3. Lista de OGMs produzidos/ manipulados no projeto.

E. coli e feijão.

4. Lista de genes/ fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene).

Gene bar, que confere resistência ao glifosinato de amônia (GA).

5. Organismos transformados/genes utilizados.

Feijão / gene bar.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança.

Área de Biologia Celular, Nível I.

Casa de vegetação 31, Casa de vegetação 25-D.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

Armazenados em câmara fria (sementes), cerca de 15 clones.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio). Nenhum no ano de 2001.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil. Listar instituições/ organismos/ tipos de marcas. Indicar o meio de transporte e o número de CQB da instituição que recebeu o material.

Não ocorreu.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

Não se aplica.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda equipe do projeto:

Francisco Aragão, PhD, Pesquisador III - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Giovanni R. Vianna - Estudante da UnB

Bárbara Dias, Estudante da UCB

Elíbio Rech, PhD, Pesquisador - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Margareth das Mercês Albino - Estudante da UCB

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Não ocorreram acidentes.

---

1. Título do projeto 03.1999.042.03:

***Desenvolvimento de sistema para obtenção de plantas transgênicas de algodão.***

Responsável pelo projeto: Elíbio Leopoldo Rech

2. Objetivos

Desenvolvimento de plantas transgênicas de algodão

3. Lista de OGMs produzidos/manipulados no projeto:

*E. coli.*

4. Lista de genes/ fragmentos introduzidos. (especificar as características conferidas pelo gene).

- a. ahas = Tolerância a Herbicida
- b. nptII = Resistência a canamicina
- c. gus = Reporter

5. Organismos transformados/ genes utilizados.

Algodão = GUS/ahas

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança.  
Área de Biologia Celular, Nível I.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.  
Aproximadamente quantos clones estão armazenados?  
Sementes DNA.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).

Não Houve.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil. Listar instituições/ organismos/ tipos de marcas. Indicar o meio de transporte e o número de CQB da instituição que recebeu o material.

Não Houve.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda equipe do projeto.

Elibio Leopoldo Rech Filho, Pesquisador III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Francisco J. L. Aragão, Pesquisador III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sergio Abud, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Giovanni Vianna, Estudante UnB

Margareth Albino, Estudante UCB

Luiz Lemos, técnico

Warley Almeida, técnico

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Não houve problemas.

---

1. Título do projeto 03.1999.042.04:

***Desenvolvimento de sistema para a obtenção de plantas transgênicas de eucalipto.***

Responsável pelo projeto: Ana Cristina Miranda Brasileiro

2. Objetivos

Desenvolver um sistema de transformação genética para genótipos-elite de eucalipto (*Eucalyptus grandis* e *E. grandis* x *E. urophylla*) através do processo biobalístico e do sistema *Agrobacterium*.

3. Lista de OGMs produzidos/ manipulados no projeto.

Linhagem XL1 de *Escherichia coli* contendo o vetor pAG1.

Linhagem EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor binário pCAMBIA2301.

Linhagem EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor binário pCAMBIAAHAS.

Linhagem LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor binário pCAMBIA1391Z.

4. Lista de genes/ fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene).

Gene nptII: codifica para a enzima Neomicina Fosfostransferase II que confere resistência aos antibióticos aminoglicosilados.

Gene hpt: codifica para a enzima Higromicina Fosfostransferase que confere resistência ao antibiótico higromicina.

Gene gus: gene repórter que codifica para a enzima  $\beta$ -Glucuronidase.

Gene ahas: codifica para a enzima Acetolactate Sintase que confere resistência aos herbicidas Sulfonilureas e Imidazolinonas.

5. Organismos transformados/ genes utilizados.

Eucalipto (*Eucalyptus grandis*) e seu híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*

Álamo (*Populus tremula* x *P. alba*).



6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança.  
Área de Biologia Celular, Nível I.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.  
Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

As 2 linhagens de *Escherichia coli* e as 3 linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* são armazenadas em STAB, mantidos a 4°C.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).  
Não se aplica.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil. Listar instituições/  
organismos/ tipos de marcas. Indicar o meio de transporte e o número de CQB  
da instituição que recebeu o material.

Não se aplica.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de  
sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

Este projeto é realizado em colaboração com Embrapa Florestas (PR).

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição  
de toda a equipe do projeto:

Ana Cristina Miranda Brasileiro, Pesquisadora III, Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia.

Cristiano Lacorte, Pesquisador II, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Cláudia Rodriguez Studart Guimarães, mestranda (UnB), Embrapa Recursos  
Genéticos e Biotecnologia.

Laudete Maria Sartoretto, estudante de doutorado (UnB), Embrapa Recursos  
Genéticos e Biotecnologia.

Fabrcio Morais Rosa, Bolsista ITI da Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia (20 horas semanais).

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e  
as medidas adotadas para remediação do problema.

Não se aplica.

1. Título do projeto 03.1999.042.05:

***Desenvolvimento de técnicas de transformação genética por eletroporação em protoplastos e por biolística em células de bananeira.***

Responsável pelo projeto: Kasumitsu Matsumoto

2. Objetivos

Desenvolvimento das técnicas de transformação genética por eletroporação em protoplastos e bombardeamento de partículas (biobalísticas) em células embriogênicas de bananeiras, a fim da obtenção de bananeiras transformantes que expressam genes de proteínas antifúngicas.

3. Lista de OGMs produzidos/ manipulados no projeto.

Banana.

4. Lista de genes/fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene).

- *GUS*
- *AHAS*
- *NPT II*
- *MAGAININ 2*

5. Organismos transformados/ genes utilizados.

Células e plântulas de banana.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança.

- Área de Biologia Celular, Nível I.
- Casa de vegetação 31.
- Casa de vegetação 25-D.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

Armazenados em sala de cultura (*in vitro*), 71 clones.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).

Nenhum.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil. Listar instituições/

organismos/ tipos de marcas. Indicar o meio de transporte e o número de CQB

da instituição que recebeu o material.  
Nenhum.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.  
Não se aplica.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda a equipe do projeto:  
Kazumitsu Matsumoto, Pesquisador III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Manoel T. Souza Júnior, Pesquisador III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Francisco Aragao, Pesquisador III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Elibio Leopoldo Rech, Pesquisador III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Lucymeire S. Morais, Técnica, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/UCB  
Giovanni R. Vianna (Estudante, PG- UnB)  
Paulo César Alves (Estudante, UniCEUB)

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.  
Não houve.

---

1. Título do projeto 03.1999.043.01:

***Obtenção de plantas transgênicas de batata contendo genes de proteínas antimicrobianas.***

Responsável pelo projeto: Elionor Rita Pereira de Almeida

2. Objetivos

Obtenção de plantas de batata contendo combinação de genes que codificam para proteínas de ação antifúngica.

3. Lista de OGMs produzidos/manipulados no projeto.

E. coli e batata contendo construções com os genes abaixo mencionados.

4. Lista de Genes/fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene).

higromicina, 35S, kanamicina, AP-24, glucanase, RIP e quitinase

5. Organismos transformados/genes utilizados.

Batata, *E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens*.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança.

Laboratório de Biologia Molecular Vegetal.

Área de Biologia Celular, Nível I.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

Armazenados em câmara fria (tubérculos), cerca de 28 clones.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).

Nenhum.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil.

Nenhum.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

Sim. Há um contrato particular entre a EMBRAPA e representantes de laboratórios em países da Comunidade Européia de não usar comercialmente os produtos contendo os genes RIP e quitinase (portanto, uso permitido apenas para fins de pesquisa). Quanto aos direitos de uso dos genes de osmotina e glucanase está sendo negociado entre a EMBRAPA e o CIGB (Centro de Investigação em Biotecnologia) de Cuba.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda a equipe do subprojeto:

Carlos Castro, Pesquisador III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Elionor Rita Pereira de Almeida, Pesquisador III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Biotecnologia

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Não ocorreram acidentes.

---

1. Título do projeto 03.1999.043.02:

***Bioensaios para avaliação de proteínas antimicrobianas no controle de fungos fitopatogênicos, in vitro e in vivo.***

Responsável pelo projeto: Carlos Castro

2. Objetivos

- a. Clonar genes de proteínas antifúngicas (incluindo RIP, quitinase, osmotina e glucanase) em vetores de expressão (*E. coli* ou levedura) para testar a capacidade de inibição de crescimento de fungos *in vitro*.
- b. avaliar, sob condições controladas, a reação de plantas transgênicas contendo esses genes em combinação (RIP + quitinase e osmotina + glucanase) quanto à suscetibilidade aos fungos *Phytophthora infestans* e *Rhizoctonia solani*.

3. Lista de OGMs produzidos/manipulados no projeto.

*E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, batata (cv. Bintje) e fumo (cv. Xanthi) contendo construções com os genes abaixo mencionados.

4. Lista de genes/fragmentos introduzidos. (especificar as características conferidas pelo gene).

higromicina, 35S, kanamicina, AP-24, glucanase, RIP e quitinase.

5. Organismos transformados/genes utilizados.

batata, fumo, *E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens*.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança.

Área de Biologia Molecular, Nível I.

Casa de vegetação 25-B.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

Culturas bacterianas armazenadas em glicerol a -70 C (freezer no PBI-Cenargen)

Armazenados em câmara fria (tubérculos), cerca de 28 clones.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).

Nenhum.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil.

Nenhum.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/patente/projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

Sim. Há um contrato particular entre a EMBRAPA e representantes de

laboratórios em países da Comunidade Européia de não usar comercialmente os produtos contendo os genes RIP e quitinase. A utilização dessas construções é permitida apenas para fins de pesquisa. Quanto aos direitos de uso dos genes de osmotina e glucanase está sendo negociado entre a EMBRAPA e o CIGB (Centro de Investigação em Biotecnologia) de Cuba.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda equipe do projeto.

Carlos Castro

Elionor Rita Pereira de Almeida

Antonio Furtado Neto, Técnico Nivel Superior

Catarina Villas de Souza, Estudante

Marcelo Andrade Reis, Estudante

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Não ocorreram acidentes.

---

## Informações sobre os projetos em andamento em 2001

1. Título do projeto 03.2000.049.01:

***Desenvolvimento de marcadores moleculares de alto desempenho para estudos de populações naturais de espécies arbóreas.***

Responsável pelo projeto: Ana Yamaguishi Ciampi

2. Objetivos

a. Desenvolvimento de marcadores moleculares co-dominantes e multialélicos baseados em microssatélites para seis espécies arbóreas tropicais de grande relevância econômica e em risco de extinção.

b. Desenvolvimento e disponibilização para a comunidade científica de uma bateria de pelo menos 5 locos microssatélites com heterozigosidade média > 0.7 para estudos de genética de populações para cada uma das seis espécies tropicais.

3. Lista de OGMs produzidos/manipulados no projeto.

Clones de *E. coli*.

4. Lista de Genes/fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene).

Região de repetitivas AG/TC de arbóreas nativas.

5. Organismos transformados/genes utilizados.

Clones positivos para miniprep de plasmídeos pGEM T.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança.

Laboratório de Genética de Plantas, Nível I.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

Conservação em placas, na geladeira por período curto.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).

Não se aplica.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil.

Não enviado.

Listar instituições/organismos/tipos de marcas. Indicar o meio de transporte e o número de CQB da instituição que recebeu o material.

Não se aplica.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

Não se aplica.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda a equipe do projeto.

Ana Yamaguishi Ciampi, Pesquisadora III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Glaucia Salles Cortopassi Buso, Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Zilneide P. S. Amaral, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Christina Vinson – Bolsista Mestranda UFPA

Andrielle Camara Amaral - estagiária Iniciação Científica

Valci P. da Silva – estagiário nível médio

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Não se aplica.

1. Título do projeto 03.2000.050.01:

***Estudo dos elementos regulatórios da expressão gênica em órgãos de reserva.***

Responsável pelo projeto: Lucília Helena Marcelino

2. Objetivos

Identificar e caracterizar genes de proteínas de reserva e seus potenciais elementos reguladores

3. Lista de OGMs produzidos/manipulados no projeto.

Bactérias para fins de clonagem e análise sequencial: *E. coli*.

4. Lista de genes/fragmentos introduzidos. (especificar as características conferidas pelo gene)

a. opaque-2 de milho, coix e milheto.

b. gene ptl4 de mandioca (um gene codificante para uma proteína da raiz de mandioca).

5. Organismos transformados/genes utilizados: vide acima.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança:

Área de Biologia Molecular, Nível I.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

250 clones de DNA plasmidial conservados a -20 centígrados.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).

Nenhum.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil.

Nenhum.

Listar instituições/organismos/tipos de marcas

Indicar o meio de transporte e o número de CQB da instituição que recebeu o material

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/patente/projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

Não são.



11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda a equipe do projeto.

Lucilia Marcellino, Pesquisador III

Eugen Gander, Pesquisador III

Claudia Regina Batista de Souza, estudante

Elionor R. P.de Almeida, Pesquisador III

Antonio Furtado Neto, Técnico Superior

Renan da Silva Gonçalves, estagiário

Eliza Maria Pavin, estagiária

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Não houve.

---

1. Título do projeto 03.2000.050.02:

***Caracterização físico-química e biológica de reserva de milho e seus respectivos genes.***

Responsável pelo projeto: Eugen Gander

2. Objetivos

Identificar e caracterizar genes de proteínas de reserva e seus potenciais elementos reguladores

3. Lista de OGMs produzidos/manipulados no projeto

Bactérias para fins de clonagem e análise sequencial: *E. coli*

4. Lista de genes/fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene).

a. opaque-2 de milho, coix e milho.

b. gene ptl4 de mandioca (um gene codificante para uma proteína da raiz de mandioca)

5. Organismos transformados/genes utilizados: vide acima.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança:

Área de Biologia Molecular, Nível I.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

250 clones de DNA plasmidial conservado a -20 centígrados.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio):

Nenhum.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil: Nenhum. Listar instituições/organismos/tipos de marcas.

Indicar o meio de transporte e o número de CQB da instituição que recebeu o material.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/patente/projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

Não são.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda a equipe do projeto:

Eugen Gander, Pesquisador III

Lucília Marcellino, Pesquisador III

Claudia Regina Batista de Souza, Estudante

Elionor R.P.de Almeida, Pesquisadora III

Antonio Furtado Neto, Técnico Nivel Superior

Renan da Silva Gonçalves, Estagiário

Eliza Maria Pavin, Estagiária

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Não houve.

1. Título do projeto 03.2000.141.02:

***Desenvolvimento de sistema para a obtenção de plantas transgênicas de feijão resistentes ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro***

Responsável pelo projeto: Francisco Aragão

2. Objetivos

Obtenção de plantas com os genes AC123 do MD do feijoeiro.

3. Lista de OGMs produzidos/ manipulados no projeto.  
E. coli e feijoeiro contendo seqüências do VMD.
  
4. Lista de Genes/ fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene).  
Ac1, AC2, AC3 do BGMV, bar.
  
5. Organismos transformados/genes utilizados.  
E. coli; feijão / AC1, AC2, AC3.
  
6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança.  
Área de Biologia Celular, Nivel I.  
Casa de vegetação 31  
Casa de vegetação 25-D
  
7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.  
Aproximadamente quantos clones estão armazenados?  
Armazenados em câmara fria (sementes), cerca de 35 clones.
  
8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).  
Nenhum.
  
9. Material enviado para outras instituições no Brasi. Listar instituições/ organismos/ tipos de marcas. Indicar o meio de transporte e o número de CQB da instituição que recebeu o material em 4 linhagens transgênicas de feijão que contem o gene bar e AC123 do VMDF. Enviadas para a Embrapa Arroz e Feijão. Envio comunicados à CIBio.
  
10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.  
Não se aplica.
  
11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda a equipe do projeto:  
Francisco Aragão, Pesquisador III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Giovanni R. Vianna, Estudante da UnB  
Bárbara Dias, Estudante da UCB  
Margareth das Mercês Albino, Estudante UCB  
Lilian de Mesquita Silva, Estudante da UCB

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Não ocorreram acidentes.

---

1. Título do projeto 17.1999.199.02:

***Controle da mancha anelar mediante o uso de variedade(s) transgênica(s) de mamoeiro (*Carica papaya* L.) com amplo espectro de resistência.***

Responsável pelo projeto: Manoel Teixeira Souza Júnior

2. Objetivos.

- Caracterizar a variabilidade genética do vírus da mancha anelar (PRSV, *Papaya ringspot potyvirus*).
- Desenvolver uma variedade de mamoeiro do grupo solo com amplo espectro de resistência aos isolados brasileiros de PRSV.

Lista de OGMs produzidos/manipulados no projeto.

- Mamoeiros (*Carica papaya* L.): Plantas Ro (TL2B, TL6A, TL6B, TL7F, TL7G, TL8C, TL13F, TL17E, TL21D, TL22A, TL24B, UM1A, UM1G, UM4A, UM6F, UM6H, UM7A, UM7C, UM7D, UM8A, UM11D, UM15B, UM17H, UM17I, UM18E, TM1A, TM8A, TM8B, TS1J, TS1O, TS5F, TS6I, TS7F, e TS8B.) e Plantas R1 [(UM7CxUM1G) e UM6HxTL2A]).
- *E. coli* (XL1-Blue) contendo vetor pGEM com gene da capa proteica de 12 isolados brasileiros de *Papaya ringspot virus* (PRSV).

4. Lista de genes/ fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene).

**Tabela 6.** Elementos do plasmídeo utilizado no desenvolvimento das linhas de mamoeiros transgênicos.

Item	Descrição breve (referência bibliográfica)
PRSV cp gene	Gene da capa protéica do isolado Brasil.Bahia do vírus da mancha anelar do mamoeiro / Papaya ringspot virus (PRSV) (Souza Jr., 1999).
Promotor 35S	Promotor originado do vírus do mosaico da couve-flor (caulimoflower mosaic virus – CaMV) (Odell et al., 1985; Pietrzak et al., 1986).
Terminador 35S	Terminador originado do vírus do mosaico da couve-flor (caulimoflower mosaic virus – CaMV) (Odell et al., 1985; Pietrzak et al., 1986).
Promotor nos	Promotor do gene nopaline synthase (An, 1986; Bevan et al., 1983) originado de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
<i>Npt II</i> gene	Gene neomycin phosphotransferase (Topfer et al., 1980) originado de <i>Escherichia coli</i> .
<i>Gent</i> gene	Gene de resistência ao antibiótico Gentamicina (Allmansberger et al., 1985), originado de <i>E. coli</i> .
<i>Tet</i> gene	Gene de resistência ao antibiótico Tetraciclina (An, 1986), originado de <i>E. coli</i> .

Obs.:Gene da capa protéica do isolado Brasil.Bahia do vírus da mancha anelar do mamoeiro/ Papaya ringspot virus. Este gene foi introduzido ou na forma não traduzível (untranslatable) ou na forma traduzível (translatable), completo com 921 pares de bases ou sem os primeiros 60 pb do terminal 5' (~860 pb). A expressão deste gene no genoma do mamoeiro, tanto na forma traduzível ou não, é condição necessária, mas não única, para a obtenção de resistência ao citado vírus.

#### 5. Organismos transformados/ genes utilizados.

No ano de 2001 não foi realizado nenhum trabalho de transformação neste projeto.

#### 6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança Área de Biologia Celular, Casa-de-Vegetação 31 e Campo (Nível de segurança I).

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

· Clones de *E. coli* (XL1blue) com plasmídeo pGEM-cpPRSV (em freezer -80C) - Aproximadamente 25 clones.

· Plantas (no campo) - Cinquenta e cinco plantas (52 Ro e três R1). Todas essas plantas foram eliminadas (por incineração) no segundo semestre de 2001.

· Sementes (em laboratório) - Aproximadamente 30 populações R1 e R2 distintas, armazenados em freezer e câmara fria.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).

Um (Processo número 01200.003364/99-99 – Estudo, em condições de campo, de mamoeiros transgênicos resistentes ao PRSV).

9. Material enviado para outras instituições no Brasil. Listar instituições/ organismos/ tipos de marcas. Indicar o meio de transporte e o número de CQB da instituição que recebeu o material.

Treze populações R1 e R2 foram enviadas para a Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF (Processo de CQB nº 01200002041/98-33) na forma de sementes. Estas sementes foram levadas pelo pesquisador Manoel Souza por transporte aéreo em abril de 2001 para o CNPMF. Abaixo está a lista de material enviado para o CNPMF.

**Tabela 7.** Lista de eventos elite enviadas para a Embrapa Mandioca e Fruticultura – abril 2001.

Nome da população	Geração / # de sementes	Descrição
Embrapa PTP01	R1 / 386	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM1a (Plantas 31 e 52)
Embrapa PTP02	R1 / 261	População originária de cruzamento controlado entre linha Ro UM7d (Planta 55) e linha Ro UM1a (Planta 31)
Embrapa PTP03	R1 / 420	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM1g (Plantas 39 e 60)
Embrapa PTP04	R1 / 350	População originária de cruzamento controlado entre linha Ro UM7d (Planta 55) e linha Ro UM11d (Planta 58)
Embrapa PTP05	R1 / 515	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM11d (Plantas 51 e 58)
Embrapa PTP06	R1 / 302	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM15b (Plantas 34 e 59)
Embrapa PTP07	R1 / 350	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM18e (Plantas 10 e 66)
Embrapa PTP08	R1 / 472	População originária de autofecundação controlada da linha Ro TS1j (Plantas 56 e 64)
Embrapa PTP09	R1 / 504	População originária de autofecundação controlada da linha Ro TS7f (Plantas 42 e 54)
Embrapa PTP10	R1 / 518	População originária de autofecundação controlada da linha Ro TS8b (Plantas 18 e 38)
Embrapa PTP17	R1 / 300	População originária de autofecundação controlada da linha Ro TL6b(Planta36)

Continua...

Continuação da Lista.

Embrapa PTP18	R2 / 200	População obtida por autofecundação controlada de planta R1 (Planta 68) resultante de cruzamento entre plantas Ro UM7c e Um1g
Embrapa PTP28	R1 / 400	População originária de autofecundação controlada da linha Ro UM6b (Planta 26)

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

As informações apresentadas acima não são objeto de sigilo/patente/projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda equipe do projeto.

Manoel Teixeira Souza Júnior, Pesquisador III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Roberto Caracas - Mestrando, UFRPe

Lilian Silveira Travassos - Graduanda de Biologia, UniCEUB

Rivane Neumann - Graduanda de Biologia, UCB

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Não ocorreram acidentes.

1. Título do projeto 19.1999.078.03:

***Introdução e expressão de genes transgenes em cafeeiro (Coffea spp.) através do processo biobalístico e do sistema Agrobacterium***

Responsável pelo projeto: Ana Cristina Miranda Brasileiro

2. Objetivos

Desenvolver um sistema de transformação genética para cultivares-elite de cafeeiro (*Coffea arabica*) através do processo biobalístico e do sistema Agrobacterium.



3. Lista de OGMs produzidos/ manipulados no projeto.

Linhagem XL1 de *Escherichia coli* contendo o vetor pBARGUS.

4. Lista de genes/ fragmentos introduzidos, (especificar as características conferidas pelo gene).

Gene nptII: codifica para a enzima Neomicina Fosfostransferase II que confere resistência aos antibióticos aminoglicosilados.

Gene gus: gene repórter que codifica para a enzima  $\beta$ -Glucuronidase.

Gene ai-1: codifica para um Inibidor de  $\alpha$ -Amilase, isolado de feijoeiro, específico contra a broca-do-café.

Gene bar: codifica para a enzima Fosfinotricina Acetil Transferase que confere resistência aos herbicidas que possuem a fosfinotricina como princípio ativo.

5. Organismos transformados/genes utilizados:

Cafeeiro (*Coffea arabica*) cv. Catuaí Vermelho e cv. IAPAR 59.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança.

Laboratórios com nível de segurança I.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

As 4 linhagens de *Escherichia coli* são armazenadas em STAB, mantidos a 4°C.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).

Não se aplica.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil.

Não se aplica.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

Este projeto é realizado em colaboração com as seguintes instituições: IAPAR (PR), EPAMIG (MG), IAC (SP) e Embrapa Cerrados (DF).

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda a equipe do projeto.

Ana Cristina Miranda Brasileiro, Pesquisadora III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

Érika V. S. Albuquerque de Barros, Técnica Especializada II, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

Welcimar Gonçalves da Cunha, Bolsista ITI do programa Café.

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Não se aplica.

---

## Informações sobre os projetos prorrogados até 2002

1. Título do projeto 03.1999.037.02:

***Caracterização de cDNA relacionada com a apomixia de plantas de *Brachiaria*.***

Responsável pelo projeto: Vera Tavares Campos Carneiro

2. Objetivos: Descrever o perfil de expressão gênica da formação do gametófito feminino. Caracterizar as seqüências de cDNA associadas a este caráter.

3. Lista de OGMs produzidos/manipulados no projeto.

Bactérias *Escherichia coli* transformadas serão mantidas na forma de "stab" com as seguintes construções:

pAct1-D - gene repórter gus sob o comando do promotor do gene actina-1 de arroz.

pAHC-27 - gene repórter gus sob o comando do promotor do gene ubiquitina com intron de *Zea mays*.

pAG1 - gene gus sob o controle do promotor de actina 2 de *Arabidopsis thaliana*.

pBI 426 - gene gus e nptII sob controle de duas seqüências do promotor CaMV 35S.

pLAU6 - gene gus sob o controle do promotor de CVMVp

PTRA151 - gene higromicina fosfotransferase (hpt) sob o comando do promotor 35S.

pU3G - gene gus sob o controle do promotor de ubiquitina Ubq 3 com intron de *Arabidopsis thaliana*.

p35M - contém o gene MPI regulado pelo promotor constitutivo 35S fragmentos cDNA diferenciais clonados no vetor pGEM-T.

4. Lista de genes/fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene).

Gene uidA (gus): gene repórter que, na presença de substrato cromogênico, confere coloração azul ao tecido. O ensaio é destrutivo.

Gene hpt: higromicina fosfotransferase, confere resistência ao antibiótico higromicina.

Gene pmi : fosfomanose isomerase, gene que converte manose-6-fosfato em frutose-6-fosfato. As células transformadas são capazes de utilizar manose como fonte de carbono.

5. Organismos transformados/genes utilizados.

*Brachiaria ruziziensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha* transformadas com o gene que confere resistência à higromicina.

*Brachiaria brizantha* transformada com os genes uiA e pmi.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de biossegurança:

Área de Biologia Celular, Nível I.

Casa de vegetação AIQ 3F.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado.

Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

Casa de vegetação da Quarentena (AIQG – no. 3F). Aproximadamente 60 plantas são mantidas em sacos de terra.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio):

Não há.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil.

Listar instituições/organismos/tipos de marcas

Indicar o meio de transporte e o número de CQB da instituição que recebeu o material.

Não há.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/patente/projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

A seguinte patente foi desenvolvida em processo de colaboração entre o CIAT (Colômbia) e Embrapa:

Lentini, Z., Carneiro, V. T. C., Manzano, S. J. L., and Galindo, L. (1999).

Processo de Regeneração de Plantas e Transformação Genética de espécies de Brachiaria. Vol. PI 9903700-9. CIAT-Colômbia, Embrapa-Brasil, Brasil.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda a equipe do projeto:

Ana Cláudia Guerra de Araújo, Pesquisadora III, Embrapa

Diva Maria de Alencar Dusi, Pesquisadora III, Embrapa

Gláucia Barboza Cabral, Pesquisadora II, Embrapa

Vera Tavares de C. Carneiro, Pesquisadora III, Embrapa

Júlio Carlyle Macedo Rodrigues, Técnico especializado, Embrapa

Ana Luiza Machado Lacerda, Estagiária, UnB /Embrapa

Keila Maria Martins de Brito, Estagiária, 2 grau / Embrapa

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Não houve.

---

1. Título do projeto 17.1999.190.02:

***Desenvolvimento de mamoeiros transgênicos resistentes a fungos.***

Responsável pelo projeto: Manoel Teixeira Souza Júnior

2. Objetivos

Controle, mediante emprego da engenharia genética, das principais doenças de origem fúngica que atacam o mamoeiro (*Carica papaya* L.).

3. Lista de OGMs produzidos/manipulados no projeto.

· *E. coli* (DH5 $\alpha$  e XL1-Blue) contendo vetor pBluescript II SK (+), com e sem os cassetes de expressão de genes em plantas SAN 167 e SAN168 [que contém o promotor do gene *Ubg3*, o gene *Magainin 2* ou seu análogo sintético *MSI99*

(respectivamente), e o terminador do gene *Nos*), e com e sem o cassete de expressão de genes em plantas AHAS (promotor, região codante e terminador do gene *Ahas*).

- *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) contendo os plasmídeos pSAN 163, 164, 167, 168, 236, 237, e 238.

- Quarenta eventos distintos de transformação de *Nicotiana tabacum* L. (cv. Xanthi e Samsun), obtidas por co-bombardeamento (Biobalística) utilizando o plasmídeo pSAN236 em combinação com os plasmídeos pBSAN167, pBSAN168, pSAN163 e pSAN164.

- Noventa e um "putative transgenic embryo clusters" (PTEC) de mamoeiro (*Carica papaya* L. cv. Sunrise) foram obtidos por co-bombardeamento (Biobalística) utilizando o plasmídeo pSAN236 em combinação com os plasmídeos pBSAN167 e pBSAN168. Plantas transgênicas foram regeneradas de cinquenta e dois PTECs distintos. Essas plantas encontram-se em processo de aclimação e transferência para casa de vegetação.

4. Lista de genes/fragmentos introduzidos (especificar as características conferidas pelo gene).

Os genes Magainin 2 e MSI99 expressam peptídeos com atividade antimicrobiana de amplo espectro, o gene *Ahas* confere tolerância ao herbicida imazapyr e o gene *npt II* confere resistência ao antibiótico canamicina.

5. Organismos transformados/ genes utilizados:

- *Nicotiana tabacum* L. (cv. Xanthi e Samsun)/ co-bombardeamento (Biobalística) utilizando o plasmídeo pSAN236 em combinação com os plasmídeos pB.SAN167, pB.SAN168, pSAN163 e pSAN164.

- *Carica papaya* L. (cv. Sunrise) / bombardeamento utilizando os plasmídeos pB.SAN167-Ahas e pB.SAN168-Ahas, separadamente, ou co-bombardeamento utilizando o plasmídeo pSAN236 em combinação com os plasmídeos pB.SAN167 e pB.SAN168.

6. Indicar as instalações utilizadas pelo projeto e o nível de Biossegurança. Área de Biologia Celular, Nível I.

7. Indicar a forma de conservação do material geneticamente modificado. Aproximadamente quantos clones estão armazenados?

OGM - Bactérias:

- Armazenamento temporário: Geladeira (4 C), em meio de cultura (LB ou LB + Ágar).

- Armazenamento longo: Freezer (-80 C), em meio de cultura LB e glicerol 50%.
- Aproximadamente 20 clones.

OGM - Plantas:

- As plantas transgênicas de fumo foram mantida em casa de vegetação e ao final do ano eliminadas.
- Os mamoeiros transgênicos (52 clones) encontram-se no laboratório (*in vitro*) e na casa de vegetação.

8. Número de experimentos de campo (correlacionar com permissão da CTNBio).  
Nenhum.

9. Material enviado para outras instituições no Brasil. Listar instituições/ organismos/ tipos de marcas. Indicar o meio de transporte e o número de CQB da instituição que recebeu o material.

Não houve envio de material neste projeto para nenhuma outra instituição no Brasil.

10. Descrever de forma clara se as informações apresentadas são objeto de sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

As informações apresentadas acima não são objeto de sigilo/ patente/ projeto de cooperação e outros casos pertinentes.

11. Listar o nome, situação (pesquisadores, técnicos, estudantes) e instituição de toda equipe do projeto:

Manoel Teixeira Souza Júnior, Pesquisador III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Marly Catarina Coelho, Pesquisador II, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Adelar de Almeida Pinto, Mestrando, UFSC

Paulo César Alves - Graduando de Biologia, UniCEUB

Lílian do Carmo - Graduanda de Biologia, UniCEUB

12. Relatar a ocorrência de acidente ou liberação acidental envolvendo OGMs e as medidas adotadas para remediação do problema.

Não ocorreram acidentes.

## Informações sobre os projetos a serem iniciados em 2002

Título do projeto : 03.2002.052.02

***Abordagem Transcriptoma: Análise do padrão da expressão gênica em Theobroma cacao suscetível e resistente aos fungos Crinipellis perniciososa***

Responsável pelo projeto: Eugen Silvano Gander

### **Resumo**

É indiscutível o impacto que a vassoura-de-bruxa causou em níveis socio-econômicos e ambientais nas regiões produtoras de cacau e dependentes dela. Basta lembrar que mais de 200.000 pessoas estão desempregadas no sul da Bahia, apesar de as ações contra a vassoura-de-bruxa terem sido iniciadas desde 1978 pela CEPLAC que contou com a ativa colaboração e participação de várias instituições públicas e privadas, implantando uma campanha de controle da vassoura-de-bruxa - CAVAB.

Porém estas medidas não impediram a entrada do *C. perniciososa* no estado da Bahia e demais regiões produtoras (Bastos, 1991). Durante o desenvolvimento da doença, o Brasil que ocupava a segunda posição como exportador de cacau, disputa agora o quarto lugar junto com a Nigéria, com sérios prejuízos econômicos para o país. Além disso, o impacto da vassoura-de-bruxa no ambiente natural de Mata Atlântica, promovido pela prática extrativista e mudanças agrícolas com plantio de pastos, é assustador e em determinadas áreas irreversível em tempos históricos.

Hoje em dia, a Biotecnologia, junto com o melhoramento clássico, oferece métodos alternativos e eficientes aos programas de melhoramento e aproveitamento de recursos naturais. Dentro desses aspectos destacam-se os mecanismos de controle de pragas de importância econômicas. O subprojeto apresentado aqui visa a aplicação de técnicas de Genoma Funcional e, em particular, da abordagem através de *Transcriptoma* para a identificação de genes cujas expressão poderia ser envolvida com a resistência e/ou susceptibilidade contra *C. perniciososa*.

### **Vínculo**

O projeto visa o aumento do conhecimento básico sobre as relações entre patógenos e hospedeiros está vinculada, através da elaboração de tese de doutorado, com a comunidade acadêmica e com a comunidade dos produtores

através de uma colaboração com a firma "M + M Almirante de cacau" in Ilhéus; BA.

### **Objetivo**

Comparar o padrão da expressão gênica em meristemas de *T. caçãõ* e *T. grandiflorum* resistentes e suscetíveis ao fungo patógeno. Como ambas as espécies são hospedeiras de *C. pernicioso*, achou-se possível identificar, desta maneira, genes envolvidos com a resistência contra o patógeno.

### **Meta fim**

Identificar genes que são envolvidas com resistência e susceptibilidade de *Theobroma ssp.* vis-à-vis *C. pernicioso*.

### **Recursos humanos**

Eugen Silvano Gander, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Lucilia Helena Marcellino, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Alessandra Rezende Ramos, Cand. PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Claudia Regina Batista de Souza, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Antonio Furtado Neto, MSc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Sergio Lopez Loyola, Estagiário.

---

Título do projeto: 03.2002.052.03

### **Estabelecimento de uma metodologia de transformação genética de cacau (*Theobroma cacao L.*)**

Responsável pelo projeto: Francisco J. L. Aragão

### **Resumo**

A produção de cacau entrou em colapso na década de 90 devido, principalmente, ao ataque dos cacauais pela vassoura-de-bruxa, cujo agente etiológico é o fungo *Crinipellis pernicioso*. Tomando como base protocolos desenvolvidos para feijão, soja, algodão e banana, propõe-se o estabelecimento de uma metodologia para transformação genética de cacau, via bombardeamento de partículas. O gene a ser introduzido no genoma do cacau será na forma de fragmentos (promotor, seqüências codificantes e seqüência de reconhecimento 3' de poliadenilação).



O gene marcador GUS (*uidA*) (Jefferson et al., 1987) será utilizado para estudo de transformação transiente bem como estável. Não serão utilizados genes para resistência a antibióticos, os quais serão removidos juntamente com o "backbone" do vetor, que será digerido com enzimas apropriadas. Os fragmentos contendo o cassete de expressão a ser utilizado nos experimentos de transformação serão separados em gel de agarose e eletroeluídos de acordo com Sambrook et al. 1989.

O gene *CP4 EPSPS*, que confere resistência a glifosato (Oxtoby & Hughes, 1990), sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, e o gene *ahas* (acetolactase sintase) para resistência a imidazolinonas (imazapir) (Sathasivan et al., 1990), sob controle do próprio gene (*ahas*) de *Arabidopsis thaliana*, serão utilizados para seleção de tecidos e calos transgênicos. Ápices embrionários e calos embriogênicos serão utilizados como explantes para bombardeamento. Para análise por meio de PCR de plantas transformadas, o DNA será isolado de discos foliares de acordo com o protocolo desenvolvido no Laboratório de Transformação Genética da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A análise de Southern blot será conduzido nas plantas transformadas de cacau candidatas a se tornarem "evento elite", seguindo procedimentos padrões.

Basicamente, o DNA genômico será isolado de acordo com Dellaporta et al., (1983). "Southern blotting" e hibridizações serão conduzidos como descrito previamente (Sambrook et al., 1989). O DNA genômico (15 mg), digerido com as enzimas apropriadas, será separado em gel de agarose a 1%, transferido para membrana de náilon (Hybond) e hibridizado com "probes" específicos, marcados com  $a^{32}P$  dCTP (3000 Ci/mol) usando um primer randômico de DNA marcado (Pharmacia Biotech), de acordo com os fabricantes. Análises de todas plantas de cacau putativamente transformadas serão conduzidas como descrito por Aragão et al., (1992).

### **Objetivos**

1. Desenvolvimento de um eficiente sistema de transformação genética em alta frequência, usando processos biolísticos.
2. Obtenção de plantas de cacau contendo um gene marcador.
3. Análises moleculares e bioquímicas de plantas transgênicas de cacau.

**Metas fim**

Obter plantas de cacau transformadas geneticamente de dois genótipos

Título do projeto: 03.2002.053.01

**Estratégia molecular de controle á pragas de grãos armazenados de feijão**

Responsável pelo projeto: Maria Fátima Grossi de Sá.

**Resumo**

Na produção agrícola mundial, a proteção da colheita contra danos causados pelo ataques de insetos é de vital importância. As sementes são alvo de ataque de diversos organismos ( microrganismos, insetos, aves roedores e mamíferos) que as utilizam como fonte de alimento, danificando-as, de modo a comprometer o seu consumo.

Estima-se que a perda da produção mundial, relacionada a pestes e doenças, atinja 37%, sendo que, pelo menos 13% dessa perda é causado pelo ataque de insetos (Gatehouse and gatehose, 1998). No caso particular do armazenamento de grãos de feijão, o ataque de insetos induz à queda na produção total de até 30% (Stone and Sartorato, 1994). Estes danos são devidos principalmente, a fatores como precariedade de condições de armazenamento e a pouca disponibilidade de inseticidas para o controle das pragas, entre outros.

Os danos causados pelos carunchos do feijão são consideráveis, depreciando-os qualitativa e quantitativamente. Os prejuízos são avaliados pela redução no peso, na qualidade do produto, na queda do poder germinativo das sementes, além da depreciação comercial devido à presença de insetos mortos, ovos, excrementos (Stone and Satorato, 1994). As maiores perdas ocorrem entre os agricultores mais pobres, que não podem recorrer ao uso de agrotóxicos para proteger os grãos armazenados e que, além disso, não possuem instalações adequadas para o armazenamento de grãos, deixando-os susceptíveis ao ataque de bruquídeos que se multiplicam livremente durante período de estocagem.

Para proteger a produção, programas integrados de controle de pestes são utilizados, os quais combinam o uso de inseticidas com diversificação das culturas e inspeção sanitária e, sobretudo, exploração de variedades de plantas que sejam inerentemente resistente. Essa resistência inerente reflete-se nos mecanismos naturais de defesa desenvolvidos pelas plantas ao longo da

evolução (Schuler et al., 1998). Os agricultores têm buscado o uso de variedades resistentes para evitar o ataque de pragas e elevar a produtividade de suas culturas.

Tal procedimento envolve métodos de melhoramento genético clássico para a incorporação de fatores intrínsecos à resistência. No entanto, nos últimos anos, estratégias biotecnológicas utilizando conhecimentos da biologia molecular acoplada às técnicas de engenharia genética, têm proporcionado a transferência de informações genéticas entre as espécies, em um tempo reduzido e, dessa forma, possibilitando a obtenção de plantas resistentes a insetos-pragas.

Em particular, nos últimos anos, o nosso grupo no Cenargen vem trabalhando em um projeto direcionado para a identificação de fatores protéicos ativos contra os principais brúquideos de grãos armazenados do feijão comum, *P. vulgaris* visando o seu controle.

Entre as pragas do feijoeiro, *A. obtectus* e *Z. subfasciatus* destacam-se como duas principais espécies de carunchos que atacam o feijão durante o armazenamento.

Algumas proteínas expressadas por diferentes espécies de plantas, principalmente entre leguminosas e cereais, têm sido identificadas como fatores de defesa naturais de plantas contra o ataque de insetos-pragas. Estão incluídas entre esses fatores de defesa, as lectinas, arcelinas e os inibidores de enzimas hidrolíticas. Particular atenção tem sido dada para as proteínas inibidoras de enzimas hidrolíticas digestivas de insetos que ocorrem naturalmente em muitas plantas, estando presentes principalmente em sementes (Ryan 1990).

As principais classes são os inibidores de  $\alpha$ -amilases e os inibidores de proteínases. Os inibidores de  $\alpha$ -amilases são encontrados principalmente em sementes (Feng et al., 1996; Grossi de Sá et al., 1997), enquanto que os inibidores de proteínases estão presentes, não apenas nas sementes, mas também nos frutos, folhas e tubérculos (Xavier-Filho, 1992; Bode & Huber, 2000).

Entre os inibidores de  $\alpha$ -amilases mais estudados estão os inibidores de trigo (*Triticum aestivum*), denominados 0.19, 0.53 e 0.28 (Feng et al., 1996; Franco et al., 2000) e os inibidores de  $\alpha$ -amilases de sementes de feijão comum

(*P. vulgaris*) denominados, aAI-1 e áAI-2 (Young et al., 1999; Grossi de Sá et al., 1997).

Utilizando como estratégia de controle os inibidores de  $\alpha$ -amilases e proteínases e as proteínas da família das lectinas, tem-se identificado e clonado genes que codificam para proteínas que apresentam atividade tóxica e inibitória *in vitro* e *in vivo* contra os bruquídeos *Z. subfasciatus* e *A. obtectus* (Grossi de Sá et al., 1997; Gerhardt et al., 2000; Paes et al., 2000; Franco et al., 2000; lulek et al., 2000). Vetores foram construídos com genes isolados e serão utilizados na transformação de plantas de feijão.

Devido aos problemas atuais de quebra de resistência e com o objetivo de obter fatores protéicos mais específicos contra pragas alvo, nos propôs-se a utilização de diferentes estratégias moleculares, baseadas em bibliotecas combinatórias de inibidores mutantes (*DNA shuffling*, *Phage display*), para a seleção de mutantes específicos para as pragas de interesse. Estudos de modelagem molecular associados à cristalização de moléculas estão sendo conduzidos visando a determinação de resíduos de aminoácidos envolvidos na interação enzima/inibidores e o desenho de moléculas alvo contra as pragas de interesse. Outra estratégia bastante promissora é o uso da pró-região das proteínases como reguladoras das proteínases hidrolíticas digestivas de insetos.

### **Objetivos**

- A construção de uma biblioteca combinatória de mutantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases do tipo *Phage display* através da técnica de *DNA shuffling*.
- A determinação da especificidade de mutantes de inibidores de proteínases, já selecionados, para as proteínases do bruquídeo *A. obtectus* através de estudos de interação proteína/proteína utilizando o sistema Biocore e de ensaios *in vivo* com os insetos.
- O uso da pró-região de proteínases dos bruquídeos genes já isolados no controle dos bruquídeos *Z. subfasciatus* e *A. obtectus*.
- A transformação de plantas de feijão com genes potencialmente ativos para as pragas de feijão, *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus*.

### **Metas**

- Construir uma biblioteca combinatória de mutantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases do tipo *Phage display* através da técnica de *DNA shuffling*. A biblioteca construída poderá ser utilizada na seleção de inibidores de amilases

- mutantes para qualquer praga , principalmente as de grãos armazenados.
- Selecionar pelo menos um inibidor mutante para cada uma das principais pragas de grãos armazenados de feijão.
  - Construir vetores de expressão contendo os genes para as proteínas mutantes selecionadas sob controle de vetores apropriados para a transformação de plantas.
  - Identificar a especificidade de interação entre as proteínas de *A. obtectus* e os mutantes selecionados.
  - Utilizar a pró-região das proteínases de *Z. subfasciatus* e *A. obtectus* como fatores de inibição de suas próprias proteínases.
  - Obter plantas de feijão transformadas com diferentes genes (*áAI-2 Arc-5III Chagasina, wheat 0.19 e wheat 0.53*). Análise dos transformantes e bioensaios com as pragas *Z. subfasciatus*, *A. obtectus* e *Callosobruchus maculatus*.

### **Recursos físicos e humanos**

Os laboratórios da área de bioquímica e biologia molécula possuem uma ampla estrutura. O laboratório conta, atualmente, com pesquisadores, consultores, alunos de pós- graduação (doutorado e doutorando), alunos de iniciação científica e estagiários.

### **Equipe**

M.Fátima Grossi de Sá	phD/biol. Molecular
Maise V. Coutinho	Mestre-bio. Moleclar
Norma Santos Paes	T. especialista
Luciane Mello Rigden	phD/Bioquímica
M. Cristina Mattar	Mestre
João A. N. Batista	phD
Daniel Rigden	phD/ bioquímica
Octavio Franco	Doutorando
Francislete Melo	Dutorando
Railene	Doutoranda
Ana Carolina Monteiro	Doutoranda
Paulo Mendes	Iniciação científica

---

Titulo do projeto: 03.2002.053.02

***Estratégia molecular de controle a pragas de algodão *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*.***

*Responsável pelo projeto:* Maria Fátima Grossi de Sá

### **Resumo**

Dados do "IPM Working for Development" mostram que quase 25% dos pesticidas utilizados pela humanidade são gastos na cotonicultura, movimentando um mercado de US\$ 7,5 bilhões/ano. Nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul são efetuadas, em média, 18 aplicações de produtos durante uma cultura. Na região Centro-Oeste, onde as lavouras são mais recentes, estão sendo utilizados onze aplicações só para controlar o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* e a lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*. O controle de pragas como o bicudo-do-algodoeiro e a lagarta do cartucho do milho, é dificultado devido ao seu hábito endofítico, ou seja, no caso específico do bicudo, a fêmea oviposita dentro do botão floral e as larvas, após eclodirem, aí permanecem até a emergência do adulto.

Dessa forma, a eficiência dos agrotóxicos é baixa, pois as larvas não entram em contato com esses. A identificação de fatores com atividades sobre essas pragas tais como toxinas de *Bacillus thuringiensis*, inibidores de enzimas hidrolíticas intestinais e outras proteínas potencialmente tóxicas contra insetos-pragas são estratégias que vêm sendo cada vez mais utilizadas no desenvolvimento de variedades de plantas resistentes.

### **Objetivos**

Este projeto tem como objetivo principal o controle das pragas do algodoeiro de hábito alimentar endofítico. Através do uso de estratégias moleculares baseadas, principalmente, em bibliotecas combinatórias de inibidores de proteínases e de toxinas Bt, pretende-se isolar genes com atividade e especificidade para as pragas *A. grandis* e *S. frugiperda*. As etapas do subprojeto envolvem:

- Construção de uma biblioteca combinatória de toxinas Bt para uso na seleção de toxinas mutantes para o bicudo-do-algodoeiro, lagarta do cartucho do milho e qualquer outra praga de interesse.
- Obtenção de inibidores mutantes de proteínases específicos para os insetos-pragas, *A. grandis*, *S. frugiperda*, através do uso de bibliotecas de

inibidores de proteínases do tipo *Phage display*. A seleção de mutantes será feita em colaboração com o grupo do Dr. Maarten Jongsma, da Universidade de Wageningen na Holanda.

- O uso da pró-região das proteínases de insetos, isoladas previamente, como fatores inibidores da própria proteínase madura.
- Isolamento de genes codificadores de toxinas Bt a partir de cepas ativas contra o bicudo-do-algodoeiro e lagarta do cartucho do milho.
- Obtenção de promotores capazes de direcionar a expressão de transgenes para o botão floral do algodão.
- Transformação de plantas de algodão com genes que codificam para proteínas com atividades sobre as pragas endofíticas do algodoeiro, o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis*, e a lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*.

### **Metas**

- Construir uma biblioteca combinatória de toxinas Bt do tipo *phage display*.
- Selecionar mutantes de toxinas Bt na biblioteca combinatória de toxinas Bt mutantes para o bicudo-do-algodoeiro e lagarta do cartucho do milho.
- Isolar os genes codificadores para as toxinas ativas de cepas de *B. thuringiensis* que são eficazes contra a lagarta do cartucho do milho e bicudo-do-algodoeiro.
- Selecionar mutantes para os inibidores de proteínases com alta eficiência em inibir as proteínases do bicudo-do-algodoeiro e da lagarta do cartucho do milho através do uso de bibliotecas combinatórias de inibidores de proteínases mutantes do tipo *Phage display*.
- Estudar a potencialidade de outras proteínas tóxicas contra o bicudo-do-algodoeiro e a lagarta do cartucho do milho. Incorporação dos genes para estas proteínas em plantas transgênicas em associação com genes que codificam para as tóxicas Bt e/ou inibidores de proteínases.
- Construir vetores com os inibidores de proteínases SKTI e BCTI, já identificados como ativos para o bicudo-do-algodoeiro (Franco et al., 2000), para utilização na transformação de plantas de algodão.
- Clonar os genes que codificam para os fatores de resistência identificados (Bt, mutantes de inibidores de proteínases, lectinas.)
- Expressar os genes isolados e caracterizados em sistema heterólogo (*Escherichia coli*, células de inseto, plantas) e testar contra as diferentes pragas alvo.

- Isolar promotores capazes de direcionar a expressão de transgenes para o botão floral.
- Obter plantas de algodão transformadas.

### **Recursos humanos**

Maria Fátima Grossi de Sá	phD/Biologa Mol.
Elionor R P. de Almeida	phD/ Biologa Mol.
Marise V. Coutino	Mestre - Biologa Mol.
Norma Santos Paes	T. especializada
Rose G. Monnerat	phD/ Entomologia
Luciane Mello Rigden	phD/Bioquimica
Patrícia G. Messenberg	phD/ Biologa Mol.
Soraya Leal Berthioli	phD/ Biologa Mol.
Francisco Aragão	phD/Biologo Mol.
Elibio Rech	phD/ Biologo Mol.
David Berthioli	phD/ Biologo Mol.
Roseane Gomes	Mestre
Daniel Rigden	phD/Bioquimica
João A. N. Batista	phD/ Biólogo Mol.
Osmundo Brilhante	Doutorando
Octavi Franco	Doutorando
Ana C Monteiro	Doutoranda

Título do projeto: 03.2002.053.03

***Estratégia molecular para resistência a pragas de grãos de cereais.***

*Responsável pelo projeto:* Luciane Vieira de Mello Rigden

### **Resumo**

A demanda deste subprojeto são os agricultores de cereais em geral, que sofrem prejuízos na lavoura ou no armazenamento de grãos. O resultado esperado é o entendimento da base estrutural das proteínas de defesa em plantas.

Neste projeto em especial, os bruquídeos de cereais serão focados, visto que eles causam grandes danos à agricultura mundial, atacando cereais em geral.

No entanto, embora os estudos sejam realizados em específicos insetos, é de esperar que o mecanismo de interação enzima-inibidor entre essas proteínas de outros insetos/plantas apresente grande semelhança. Dessa forma, os resultados poderão servir como base em novos estudos, procurando-se resolver outros problemas da agricultura nacional e internacional. Assim, de uma forma mais



ampla, o impacto se deverá a um avanço nos estudos de obtenção de plantas transgênicas resistentes a pragas, tendo como consequência uma queda na perda da produção de grãos.

### **Objetivos e metas**

O objetivo geral deste projeto baseia-se na obtenção de um melhor entendimento das bases estruturais da interação das amilases e proteases com seus respectivos inibidores. Envolve uma série de etapas, desde a clonagem de genes, expressão e purificação de suas proteínas, aos estudos computacionais e de cristalografia. No entanto essas duas últimas etapas serão realizadas em colaboração com o Laboratório de Bioinformática deste centro, fazendo parte de um outro projeto. As metas principais englobam a clonagem dos genes de  $\alpha$ -amilases e proteínases cisteínicas de *R. dominica*, seguida por estudos de modelagem, a fim de se entender o porquê de inibidores já bem conhecidos não serem eficientes para esta praga. Ao mesmo tempo, novos inibidores, que estão sendo determinados em nosso laboratório, serão testados e seus potenciais avaliados. A expressão e purificação dessas proteínas serão realizadas, a fim de se obter material em grande quantidade para estudos de cristalografia.

### **Recursos físicos e humanos**

Os laboratórios de bioquímica e biologia molecular possuem uma ampla estrutura, onde estudos de clonagem de genes, expressão e purificação de proteínas podem ser realizados. O laboratório conta, atualmente, com pesquisadores e alunos de doutorado e iniciação científica. Existe uma grande interação deste laboratório com o de bioinformática do centro, facilitando muito a troca de experiência entre os pesquisadores, que trabalharão juntos, uma vez que as análises computacionais serão realizadas sob coordenação dos pesquisadores de bioinformática.

---

Titulo do projeto: 03.202.053.04

***Os inibidores de enzimas digestivas e seu uso no controle da broca-do-café (Hypothenemus hampei).***

Responsável pelo projeto: Maria Fátima Grossi de Sá

### **Resumo**

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, é considerada uma das principais pragas do cafeeiro (*Coffea* spp.) no Brasil, alcançando dimensões epidêmicas que afetam a quantidade e a qualidade dos grãos. Considerável atenção tem sido

dada aos problemas causados pela broca-do-café e pesquisas vêm sendo conduzidas baseadas nos mecanismos envolvidos na resistência de plantas ao ataque do inseto-praga, em particular, no uso de compostos antimetabólicos, tais como os inibidores de enzimas hidrolíticas digestivas, amilases e proteínases, os quais possuem um enorme potencial para serem incluídos dentro do programa de melhoramento genético através da biotecnologia.

Este projeto tem como objetivo utilizar os inibidores de  $\alpha$ -amilases como estratégia para o controle da broca-do-café. Espera-se identificar e clonar genes codificadores de inibidores de  $\alpha$ -amilases, presentes em acessos selvagens de *P. coccineus*, com alta eficiência em inibir as amilases hidrolíticas digestivas da broca-do-café. Paralelamente, plantas de café serão transformadas com o inibidor,  $\alpha$ A-1, já demonstrado ser ativo contra as amilases de *H. hampei*.

Espera-se obter, pelo menos, dois inibidores altamente ativos e específicos e construções de vetores serão feitas com esses genes para introdução em plantas de café.

### **Objetivos**

O projeto tem como objetivo a obtenção de inibidores de  $\alpha$ -amilases altamente ativos e específicos contra as amilases digestivas da broca-do-café.

### **Metas**

Análise bioquímica das proteínas presentes nas sementes dos acessos de *P. coccineus* resistentes à broca-do-café.

Clonar os genes codificadores para os inibidores de  $\alpha$ -amilases, presentes em acessos selvagens de *P. coccineus*.

Construir vetores com um ou mais genes que codificam para os inibidores de  $\alpha$ -amilases.

Transformar plantas de café com o inibidor  $\alpha$ A-1.

### **Recursos Humanos**

Maria Fátima Grossi de Sa, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Ana Cristina Brasileira, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Marise Ventura Coutinho, Mestre, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Norma Santos Paes, T.especializada, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Érica V. A. Barros, T. especializada

João Aguiar, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Luciane Melo Rigden, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Railene, doutoranda  
Osmundo Brilhante, doutorando  
Arnubio Valência, PhD, Colômbia  
Marteen Chrispeels, PhD, Univ. Califórnia

---

Título do projeto: 03.2002.054.01

***Identificação de fatores e análise da expressão de genes envolvidos na fitopatogenicidade de nematóides *Meloidogyne* spp visando o desenvolvimento de estratégias de controle.***

Responsável pelo projeto: Maria Fátima Grossi de Sá

### **Resumo**

Fitonematóides são pragas de grande importância econômica, causando, numa escala global, enormes prejuízos às diversas culturas agrícolas, estimados em até 100 bilhões de dólares/ano. Os maiores danos são causados por formas sedentárias endoparasíticas pertencentes aos gêneros *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Globodera*, que causam lesões nos cilindros vasculares.

As secreções dos nematóides podem ter um importante papel na indução e/ou manutenção das estruturas de alimentação. Em adição, as secreções do estilete provavelmente têm função na penetração e migração das formas juvenis J2, infectivas no tecido da planta, e na modificação e manutenção das células das plantas que atuam como células alimentadoras, bem como na digestão do conteúdo da célula hospedeira para facilitar a aquisição de nutrientes pelos nematóides. Os métodos atuais de controle de nematóides baseiam-se principalmente no uso de cultivares resistentes, na rotação de culturas, ou no uso de nematicidas. Todavia, poucas são as cultivares resistentes e muitos dos genes de resistência apresentam alta especificidade para tipos particulares de nematóides, inviabilizando o seu uso mais amplo.

Diferentes estratégias vêm sendo utilizadas visando o controle de fitonematóides sedentários, tais como o uso de genes de resistência, o uso de proteínas com atividade antinematóides (lectinas, inibidores de enzimas digestivas, collagenases, toxinas) em plantas transgênicas. Uma outra importante estratégia consiste em expressar anticorpos específicos em raízes de plantas capazes de bloquear as etapas iniciais de infecção (penetração), bem como o desenvolvimento dos nematóides nas raízes. Para o sucesso desta estratégia é necessária a obtenção de anticorpo(s) específico(s) que reconheçam proteína(s)

da secreção do nematóide, que estejam particularmente envolvidas com a penetração e/ou estabelecimento do nematóide na raiz da planta.

Através do uso das técnicas moleculares, tais como o uso de microarranjos de DNA e de bibliotecas combinatória de inibidores de proteínases mutantes e de anticorpos do tipo *Phage display*, este subprojeto tem como objetivo principal a identificação de genes envolvidos com a fitopatogenicidade do nematóide *Meloidogyne* spp., visando identificar alvos para o desenvolvimento de fatores inibitórios e/ou bloqueadores do mecanismos de infecção.

### **Objetivos gerais**

Identificação de genes envolvidos com a fitopatogenicidade do nematóide *Meloidogyne* spp, visando identificar alvos para o desenvolvimento de fatores inibitórios e/ou bloqueadores do mecanismos de infecção.

Identificação de fatores proteicos ativos contra *Meloidogyne* spp. através da seleção de inibidores de proteínases específicos para as proteínases de *Meloidogyne incógnita* e *M. javanica* ( previamente caracterizadas).

Transformação de plantas modelo com o gene da glucoronidase sob controle do promotor de conjugação da ubiquitina, isolado previamente.

### **Objetivos específicos**

Desenvolvimento de microarranjos de cDNAs randômicos a partir de biblioteca subtrativa de expressão de nematóides no estágio infectivo juvenil 2 (J2) não induzido (antes de sua penetração na planta hospedeira) versus estágio J2 induzido (após penetração na planta hospedeira). Os microarranjos gerados serão utilizados na seleção de seqüências expressas unicamente pelo nematóide induzido, as quais serão posteriormente caracterizadas a partir de contraste com banco de dados (genebank). Esta mesma biblioteca será utilizada na varredura de anticorpos produzidos a partir de linfócitos de camundongos estimulados com proteínas da secreção de *Meloidogyne* spp.

Desenvolvimento de microarranjos de cDNAs a partir de biblioteca subtrativa de nematóides no estágio J2 não induzido versus estágio adulto (fêmea piriforme) visando a identificação de seqüências expressas unicamente na fase adulta e sedentária do organismo. A identificação e isolamento de genes codificadores para proteínas envolvidas na fase adulta possibilitarão a seleção de fatores inibitórios e/ou bloqueadores do processo parasitário.

Desenvolvimento de biblioteca de anticorpos do tipo *Phage display* a partir de proteínas da secreção do *Meloidogyne* spp. visando a identificação de anticorpos importantes no bloqueio da penetração do nematóide.

Expressão dos genes que codificam para as proteínases de *M.incognita* clonados e seleção de inibidores de proteínases específicos para as proteínases de *M. Incognita*, utilizando biblioteca combinatoria de inibidores mutantes do tipo *phage display*.

Transformação de plantas de Arabidopsis e/ou tabaco com o gene da glucoronidase sob controle do promotor de conjugação da ubiquitina visando confirmar sua capacidade de expressão em células de alimentação.

### **Metas**

- Confeção de uma biblioteca subtrativa de cDNA do estágio J2 induzido versus J2 não induzido.
- Confeção de uma biblioteca subtrativa de cDNA de nematóide fêmea versus estágio J2 não induzida.
- Confeção de microarranjos contendo fragmentos randômicos de cDNAs de J2 induzidos.
- Seleção de clones diferenciais através da hibridização dos microchips com as sondas (cDNA total de J2 induzido e J2 não induzido) marcadas diferencialmente.
- Confeção de microarranjos contendo fragmentos de cDNAs randômicos de nematóides fêmeas.
- Seleção de clones diferenciais através da hibridização dos microchips com as sondas (cDNA Total de J2 não induzido e fêmeas) marcadas diferencialmente.
- Seqüenciamento e análises dos cDNAs selecionados nos microarranjos e análise computacional utilizando banco de dados.
- Isolamento dos genes identificados.
- Confeção de bibliotecas de anticorpos do tipo *Phage display*.
- Isolamento de anticorpos específicos contra proteínas da secreção.
- Estudos imunocitológicos em raízes infectadas com nematóides com os anticorpos selecionados Isolamento dos genes que codificam para os anticorpos selecionados.
- Expressão dos genes que codificam para a aspartil e serino-proteínases, clonados a partir de fêmeas de *Meloidogne incognita*, em sistema heterólogo.

- Expressão do gene que codifica para a cisteína-proteínase, clonado a partir de fêmeas de *M. javanica*, em sistema heterólogo de expressão.
- Seleção de inibidores para as proteínases purificadas de *M. javanica* e *M. incognita* e para as proteínases de *M. incognita* (Aspatil e serino-proteínases) e *M. javanica* (cisteína-proteínase) expressas, utilizando bibliotecas de mutantes de inibidores clonados em fagos filamentosos através do uso da técnica *Phage display*. Parte dessa etapa será desenvolvida com o Dr. Maarten Jongsma, na Holanda..
- Expressão dos inibidores mutantes identificados e isolados.
- Transformação de plantas modelo (*Arabidopsis thaliana* e tabaco) com gene repórter sob controle dos promotores isolados (promotores da proteína de conjugação a ubiquitina de soja e algodão), para comprovação de sua capacidade de expressão no sítio de alimentação de nematóides e/ou raízes.

### **Parcerias, acordos e convênios**

As equipes do projeto e subprojetos já têm colaborações estabelecidas neste projeto e em outros projetos. Grupos da Universidade Brasília, da Unicamp, da Esalq-USP, bem como da Universidade do Canadá, Otawa, Universidade Wageningen, Holanda, e Universidade de Rothamsted, Inglaterra, estão envolvidos neste projeto.

### **Recursos Humanos**

M. Fatima Gossi de Sá, PhD/Biol. Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Responsavel-30%

Elionor R.P. de Almeida, PhD/Biol. Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Membro- 20%

Marise V.Coutinho, Mestre-Biol. Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Membro-20%

Norma Santos Paes, T.Especializada PhD/Biol. Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Membro-20%

Patricia M. Guimaraes, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Membro-15%

Regina Carneiro, PhD/ Nematologista, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Membro-5%

Lucianae Mello Rigden, PhD/ Bioquímica, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Membro-15%

---

Título do projeto: 03.2002.054.02

***“Busca de genes de resistência a nematóides fitosedentários (*Meloidogyne* sp.) em germoplasma silvestre de *Arachis*”***

Responsável pelo projeto: Patrícia Messenberg Guimarães

### **Resumo**

O Brasil contém alguns dos centros de biodiversidade mais ricos do mundo, contendo os centros de origem de um número de plantas de grande importância econômica (mandioca, amendoim, caju, abacaxi, cacau), assim como de parentes silvestres de muitas outras plantas (diversos representantes de Solanáceas). Existem, no Brasil, bancos de germoplasma com inúmeros acessos de variedades cultivadas mais primitivas. Embora estes recursos genéticos sejam valiosos, existem muitas dificuldades práticas na sua utilização. Até agora, um dos usos mais importantes de germoplasma silvestre foi a integração de genes de resistência em variedades cultivadas por melhoramento tradicional (Knott and Dvorak 1976). A utilização de variedades resistentes é uma maneira eficiente, de baixo custo e de baixo dano ambiental de controlar pragas se comparada ao uso de pesticidas químicos. Embora o melhoramento tradicional tenha obtido inúmeros sucessos na obtenção de variedades resistentes, a incompatibilidade sexual entre espécies torna este trabalho vagaroso e, as vezes, impossível.

Nematóides fitosedentários do gênero *Meloidogyne* spp. são responsáveis por perdas enormes em várias culturas em todo o mundo. Resistência a *M. arenaria* através da produção de “resposta de hipersensibilidade” foi identificada em uma espécie de amendoim não cultivada (*Arachis cardenasii*) e uma completa redução da população destes fitopatógenos foi observada.

Recentemente, um grande número de genes de resistência (R genes) têm sido clonados (Bent et al., 1994; Jones et al., 1994; Lawrence et al., 1994; Martin et al., 1993; Mindrinos et al., 1994; Whitham et al., 1994; Milligan et al., 1998). Os principais genes de resistência clonados até agora podem ser agrupados em diferentes classes, baseados em suas similaridades com o sítio de ligação de nucleotídeo no N-terminal (NBS) e com a repetição de leucinas no C-terminal (LRR). Vários estudos utilizaram estas regiões para desenhar primers oligonucleotídios para amplificar as regiões NBS de genes de resistência análogos por PCR (RGAs; Kanazin et al., 1996; Aarts et al. 1998;

Yu et al., 1996; Shen et al., 1998). Alguns destes RGAs contêm LRRs e são geneticamente ligados a genes de resistência conhecidos, portanto, é muito provável que sejam também R-genes com especificidade ainda não determinada.

O presente projeto visa a clonagem de genes de resistência a nematóides fitossedentários e/ou a outros patógenos, através da utilização de primers desenhados a partir de regiões conservadas (NBS e LRR) de genes de resistência já descritos. Para tanto, a espécie *Meloidogyne arenaria* será utilizada como modelo. É importante ressaltar que os genes identificados através desta estratégia poderão ser transferidos para outras culturas através da técnica de transformação de plantas, assim como esta estratégia poderá ser utilizada para identificar genes de resistência a outros patógenos em outras plantas, desde que eles apresentem homologia de sequência de nucleotídeos com os primers desenhados.

### ***Vínculo com o projeto***

Os subprojetos complementam-se de maneira que os marcadores identificados através de microssatélites e os RGAs serão todos utilizados para a saturação de um mapa genético de *Arachis*. Além disso, a introgressão de genes de resistência oriundos de duas estratégias diferentes possibilitará o acúmulo (piramidização) de genes de resistência em uma cultivar, dificultando a quebra de resistência pelo patógeno. Durante e após o projeto, o germoplasma, as plantas híbridas, os marcadores gerados para o mapeamento, assim como o banco de dados de RGAs serão compartilhados por toda a equipe.

### ***Objetivos do subprojeto***

O principal objetivo deste subprojeto é o de isolar regiões do genoma de diferentes espécies silvestres de *Arachis* que estejam associadas a resistência a *Meloidogyne* spp. Para tanto, primers construídos a partir de regiões conservadas de genes de resistência já descritos serão construídos e utilizados para “pescar” regiões potencialmente relacionadas à resistência desta planta ao nematóide. As regiões isoladas através de amplificação via PCR serão caracterizadas através de seqüenciamento e comparadas com informações já disponíveis em bancos de dados.



### **Objetivos específicos**

- Isolamento e seqüenciamento de RGAs e posterior desenvolvimento de marcadores baseados nestas seqüências.
- Construção de populações segregantes para resistência a nematóides, a partir do cruzamento entre as espécies diplóides *A. stenosperma* x *A. duranensis*. Uma planta  $F_1$  será autofecundada para obtenção de cerca de 100 plantas  $F_2$ , que serão utilizadas para mapeamento.
- Construção de primers para a utilização destes RGAs como marcadores moleculares a serem utilizados no desenvolvimento de um mapa de ligação para espécies diplóides de *Arachis*, possuidoras de genoma AA, utilizando RGAs e microssatélites no subprojeto 3.
- Identificação de marcadores moleculares associados a locos que conferem resistência a *M. arenaria* em espécies silvestres de *Arachis* possuidoras de genoma AA.

### **Parcerias, acordos e convênios**

As equipes executoras já têm colaborações oficializadas em outros projetos envolvendo estrutura genética de *Arachis*, busca de sintenia entre o genoma de *Arachis* e a leguminosa modelo *Lotus japonicus* e busca de resistência contra doenças. As instituições envolvidas incluem: Sainsbury's Laboratory (Inglaterra), Universidade de Aarhus (Dinamarca), IBONE (Argentina), Universidade do Texas (EUA) e Universidade Católica de Brasília (DF).

### **Recursos humanos**

Patrícia M. Guimarães	PhD / Biol. Molecular	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia	Responsável-40%
Soraya C. M. Leal-Bertioli	PhD / Biol. Molecular	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia	Membro-20%
Regina G. Carneiro	PhD / Parasitologia	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia	Membro-20%
José Montenegro Valls	PhD/ Citologia	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia	Membro-20%

Título do subprojeto 03.2002.054.03

***Mapeamento genético de locos associado à resistência a *Melogyne* em espécies silvestres de *Arachis*.***

Responsável pelo projeto: Soraya Leal Bertioli

***Resumo do subprojeto***

Para conhecer e utilizar fontes de resistência e explorar eficientemente genes de resistência em germoplasma silvestre, é necessário desenvolver ferramentas, como um mapa genético, que permite seleção assistida, acelerando o melhoramento tradicional, além de permitir o isolamento de novos genes de resistência. Marcadores microssatélites são ideais para o desenvolvimento de mapas genéticos pela sua facilidade de obtenção e pelo alto conteúdo informativo. Marcadores SSR caracterizam-se por serem codominantes, facilmente detectáveis por PCR, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma, multialélicos e dependentes de pequena quantidade de DNA dos indivíduos analisados para fins de análise.

O presente subprojeto tem como objetivos principais o desenvolvimento de marcadores microssatélites e seu mapeamento em genoma de *Arachis*.

***Vínculo com o projeto***

Os marcadores identificados através de microssatélites e os RGAs serão todos utilizados para a saturação de um mapa genético de *Arachis*. Além disso, a introgressão de genes de resistência oriundos de duas estratégias diferentes possibilitará o acúmulo (piramidização) de genes de resistência em uma cultivar, dificultando a quebra de resistência pelo patógeno. Durante e após o projeto, o germoplasma, as plantas híbridas, os marcadores gerados para o mapeamento, assim como o banco de dados de RGAs serão compartilhados por toda a equipe.

***Objetivos do subprojeto***

- Desenvolvimento e caracterização de locos de marcadores microssatélites para *Arachis* spp. Bibliotecas de clones de seqüências microssatélites serão construídas e um conjunto de locos microssatélites será desenvolvido para mapeamento genético e para aplicações futuras em estudos de diversidade genética de *Arachis*.
- Construção de sistemas multiplex de marcadores SSR, que permitam a análise concomitante de vários marcadores em apenas uma reação de amplificação e uma corrida de gel.

- Desenvolvimento de um mapa de ligação para espécies diplóides de *Arachis*, possuidoras de genoma AA, microssatélites e os utilizando RGAs, isolados no subprojeto 2.
- Identificação de marcadores moleculares associados a locos que conferem resistência a *M. arenaria* em espécies silvestres de *Arachis* possuidoras de genoma AA.

---

Título do subprojeto: 03.2002.054.04

***Análise da expressão diferencial de genes em Arachis sp. associados à resistência a Meloidogyne sp.***

Responsável pelo projeto: Patrícia Messenberg Guimarães

### ***Resumo do subprojeto***

Os nematóides das galhas, *Meloidogyne* spp, são responsáveis por 25% das perdas agrícolas no Brasil. Os nematicidas não são efetivos e apresentam alto custo financeiro e ambiental. A utilização de variedades resistentes é a maneira mais eficiente, de baixo custo e de baixo dano ambiental, para controlar pragas se comparada ao uso de pesticidas químicos. Parentes silvestres do amendoim, *Arachis* spp. apresentam resistência às principais espécies de *Meloidogyne*. O Cenargen mantém um banco de germoplasma com inúmeros acessos de variedades cultivadas e silvestres de *Arachis* sp.

Para a maioria das culturas, a caracterização de genes de resistência tem se concentrado em genes que já foram introgrididos em plantas cultivadas, mas poucos genes oriundos de germoplasma silvestre foram caracterizados. A busca de genes de resistência encontra uma poderosa ferramenta na tecnologia de microarranjos de DNA, que possibilita a varredura massal do genoma por dados biológicos. Neste subprojeto, é proposto o isolamento de seqüências relacionadas à resposta à infecção por *M. arenaria* através da análise de sua expressão diferencial. Espera-se, com este conhecimento genético, isolar genes de resistência que podem ser futuramente transferidos para *A. hypogaea* por melhoramento tradicional e para outras culturas de importância comercial através de transformação genética.

### ***Vínculo com o projeto***

Existe ampla complementaridade entre os subprojetos aqui propostos, já que respostas de resistência a nematóides serão estudadas de duas formas

diferentes: através da análise da expressão gênica diferencial e do estudo de genes contrastantes. Ambos os métodos têm suas vantagens. O estudo dos genes contrastantes é capaz de identificar genes que são responsáveis por resistência, mas que não mudam a expressão durante a resposta de resistência, ou seja, são expressos constitutivamente (Rossi et al., 1998). O método da análise da expressão utilizando microarranjos deve ser mais eficiente para identificar genes cuja expressão é modificada durante desafio com o patógeno, mas cuja genética é muito complexa (os que têm sua expressão afetada por genes supressores), mas cujo nível de expressão determina resistência ou susceptibilidade (Ellingboe, 2000). Além disso, a introgressão de genes de resistência oriundos de duas estratégias diferentes possibilitará o acúmulo (piramidização) de genes de resistência em uma cultivar, dificultando a quebra de resistência pelo patógeno.

### **Objetivos do subprojeto**

- Análise genômica funcional de genes expressos diferencialmente em resposta à infecção por *M. arenaria* (espécie utilizada como modelo) em *Arachis* spp.

### **Objetivos específicos**

- Análise de expressão gênica de linhagens segregantes e contrastantes quanto à resistência a *M. arenaria* através de microarranjos de cDNA
- Isolamento e montagem de um banco de genes envolvidos com resistência a *M. arenaria* para utilização no mapeamento de espécies silvestres de *Arachis*
- Capacitação de pessoal na utilização da técnica de microarranjos.

---

Título do projeto: 03.2002.059.02

### **Micromanipulação de embriões**

Responsável pelo projeto: Rodolfo Rumpf

### **Objetivos**

Objetivo 1: Aprimorar o protocolo de transferência nuclear a partir de células embrionárias e células somáticas baseado na seleção e ativação ovocitária, seleção da célula doadora do núcleo, sistema de enucleação e reconstrução, reclonagem e todos os benefícios gerados no contexto do objetivo 1 do subprojeto 1.

Objetivo 2: Desenvolver um protocolo de injeção intra-citoplasmática de espermatozói­de capaz de produzir embriões. Serão utilizados espermatozói­des intactos, mortos e liofilizados, bem como células primordiais.

Objetivo 3: Iniciar estudos de análise da relação materno-fetal em gestações produzidas a partir de embriões produzidos por micromanipulação.

Objetivo 4: Iniciar o estabelecimento de biblioteca de cDNA inicialmente em ovócitos imaturos e secundários, e embriões de 8 e 16 células (ativação genômica).

Objetivo 5: Estabelecer no laboratório a rotina de microinjeção em pró-núcleo visando a produção de animais transgênicos.

### ***Metas***

Objetivo 1: Obter 30% de blastocisto e 30% de gestação após 60 dias da in­ovulação a partir de embriões reconstruídos.

Objetivo 2: Obter embriões a partir da técnica de injeção intracitoplasmática.

Objetivo 3: Definição de metodologia apropriada para atender o objetivo.

Objetivo 4: Definição de metodologia apropriada para atender o objetivo.

Objetivo 5: Treinamento de recursos humanos e estabelecimento da rotina.

### ***Equipe***

Rodolfo Rumpf Responsável

Margot Alves Nunes Dode Colaborador

Elíbio Rech Colaborador

Regivaldo V. Sousa Colaborador

José Urias Câmara Colaborador

Normandes do Nascimento Colaborador

Lílian Tamy Iguma Estudante de Doutorado

Carlos Frederico Martins Estudante de Doutorado

Leonardo Silveira Estudante de Mestrado

Haroldo Campos Estudante de Mestrado

Título do projeto: 03.2002.059.03

***Transfecção de fibroblastos e análise da expressão gênica***

*Responsável pelo projeto:* Elíbio Rech

### ***Objetivos***

O objetivo geral do projeto consiste no desenvolvimento de uma plataforma tecnológica para a produção de biomoléculas utilizando animais transgênicos como biofábricas. Caprinos e bovinos deverão ser utilizados para a efetiva produção no leite, em larga escala e custo reduzido, de proteínas recombinantes biologicamente ativas e economicamente importantes. O anticorpo scFv anti-Tn será expressado no leite. O desenvolvimento desta plataforma tecnológica deverá ter impacto direto na produção de fármacos e demais benefícios derivados, associados à extensão desta tecnologia.

Os objetivos específicos para a produção de biomoléculas recombinante no leite de animais transgênicos deverão envolver:

1. O desenvolvimento de construções gênicas, incluindo sequências regulatórias que direcionam a expressão das proteínas recombinantes para o leite, como o promotor da beta-lactoglobulina e beta-caseína e seqüências que codificam para a produção do anticorpo scFV anti-Tn.
2. A manipulação de seqüências envolvidas na regulação da expressão gênica.
3. O desenvolvimento de um eficiente sistema de expressão do gene de interesse em fibroblastos fetais e de animais adultos, e o estabelecimento de linhagens transgênicas.
4. O desenvolvimento de sistemas de expressão *in vivo*, utilizando a biobalística, para prever a potencial eficiência de um vetor de expressão.
5. As análises moleculares e citológicas de estabilidade cromossômica e localização das inserções dos transgenes no genoma.

### ***Metas***

1. Construção contendo o promotor da beta-lactoglobulina ou beta-caseína controlando o gene do anticorpo scFv e terminador e demais seqüências regulatórias necessárias.

2. Construção contendo o promotor do RSV controlando o gene marcador de seleção NEO, terminador RSV e do promotor CMV controlando os genes marcadores GFP ou beta-gal.
3. Isolamento e estabelecimento de 20 linhagens de células doadoras (fibroblastos).
4. Geração de 20 linhagens de fibroblastos transfectados de bovinos e caprinos contendo as construções 1 e 2 respectivamente, ou co-transformação;
5. Vinte e cinco experimentos de expressão transiente *in vivo*, para avaliar vetores de expressão na glândula mamária.
6. Quinze análises moleculares e bioquímicas, análises citogenéticas, hibridação *in situ* e resgate de plasmídeos.
7. Cinquenta análises moleculares e bioquímicas, análises citogenéticas, hibridação *in situ* e genotipagem.

### **Equipe**

- |                              |  |
|------------------------------|--|
| - Elibio Leopoldo Rech Filho | Pesquisador Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia |
| - Francisco José Lima Aragão | Pesquisador Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia |
| - Adilson Leite              | Pesquisador UNICAMP-CBMEG                              |
| - Eduardo Lemos              | Pesquisador Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia |
| - Giovanni Vianna            | Estudante Doutorado                                    |
| - Leticia Jungmann           | Estudante Doutorado                                    |
| - Daniela Matias             | Estudante Mestrado                                     |
| - Sharon Lisauskas           | Estudante Mestrado                                     |

### ANEXO 3

#### Relação de prédios com respectivos laboratórios e casas de vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que manipulam ou recebem OGMs.

Instalações	Sigla	Responsável	Nível de Segurança
<b>Prédio da Coleta e Caracterização de Germoplasma</b>	PCC	Taciana Cavalcanti	NB1
Laboratório de Genética Vegetal	LGV	Gláucia Buso	NB1
<b>Prédio da Quarentena de Germoplasma</b>	PQG	Renata Tenente	NB1
Laboratório de Quarentena Vegetal	LQV	Marta Aguiar S. Mendes	NB1
Casa de vegetação 03	CV 03		
<b>Prédio da Biotecnologia</b>	PBI	Eliana Santana	NB1
Laboratório de Bioquímica e Biofísica	LBB	Thales Lima Rocha	NB1
Laboratório de Transferência de Genes	LTG	Francisco Aragão	NB1
Laboratório de Imunologia	LIM	Isabel K. Santos	NB1
Laboratório de Microscopia Eletrônica	LME	Rosana Falcão	NB1
Laboratório de Análise de Proteínas	LAP	Carlos Bloch	NB1
Laboratório de Ácidos Nucléicos	LAN	Eliana Aparecida Gomes	NB1
Laboratório de Regulação e Expressão Gênica	LRG	Eugen Gander	NB1
Laboratório de Interações Moleculares de Planta-Praga	LPP	Fátima Grossi/ Soraya Leal Bertoli	NB1
Casa de vegetação 30	CV30	Francisco Aragão	NB1
Casa de vegetação 31	CV31	Patrícia Messemerberg	NB1

Continua...



Continuação do Anexo 3.

<b>Fazenda Experimental Sucupira</b> Laboratório Reprodução Animal	FAEX	J. Expedito	NB1
	LRA I	Regivaldo Vieira de Souza	NB1
<b>Prédio do Controle Biológico I</b> Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Microorganismos e Invertebrados	PCB-II LGM	Carmem Pires João Batista Tavares	NB1 NB1
Laboratório de Controle Microbiano de Pragas	LCP	Heloísa da Silva Frazão	NB1

Obs.: Todas as instalações acima descritas já se encontram relacionadas no COB n.º 004/96 da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**ANEXO 4****Comitê Interno de Biossegurança da Embrapa Recursos  
Genéticos e Biotecnologia CIBio/ CENARGEN****Ficha de identificação de experimento em casa de  
vegetação com  
organismos geneticamente modificados**

*Casa de vegetação N<sup>o</sup> \_\_\_\_\_*

Espécie vegetal:

Gene(s) utilizado(s):

Título e número de projeto ou subprojeto:

Responsável pelo projeto ou subprojeto:

Responsável pelo experimento:

Telefone para contato:

Resumo do experimento:

## ANEXO 5

### Relação de material transgênico importado

#### Material transgênico quarentenado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em 2001.

Produto	Procedência	Destino	Recebimento de Material	Liberação de Material
ALGODÃO	DELTA AND PINE	MONSANTO-SP	01.12.20	02.01.24
ALGODÃO		MONSANTO-SP	01.12.20	02.01.24
ALGODÃO	NOVARTIS-EUA	NOVARTIS-MG	01.02.19	01.04.20
MAMÃO	CORNELL UNIVERSITY -EUA	CENARGEN-DF	01.02.07	-
MILHO	PIONEER-EUA	PIONEER-GO	01.04.27	-
MILHO	PIONEER-GO		01.06.11	-
MILHO	PIONEER-EUA	PIONEER-GO	01.02.08	01.04.04
MILHO	SYNGENTA-EUA	NOVARTIS-MG	01.06.11	-
MILHO	SYNGENTA SEEDS-EUA	NOVARTIS-MG	01.05.25	-
MILHO	MONSANTO-EUA	MONSANTO-MG	01.05.31	-
MILHO	NOVARTIS-EUA	NOVARTIS-MG	01.03.05	-
MILHO	PIONEER-ARGENTINA	PIONEER-GO	01.02.08	-
MILHO	PIONEER-ARGENTINA	PIONEER-GO	01.12.18	-
SOJA	MONSANTO-EUA	MONSANTO	01.07.26	-