

**PROGRAMA ESPECIAL DE TREINAMENTO**

**EM**

**BIOTECNOLOGIA**

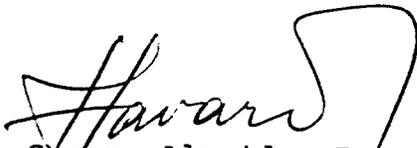
**ESALQ - USP**

**CAPES**

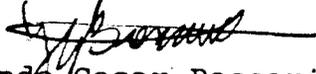
**RELATÓRIO SEMESTRAL Nº1**

1989

Piracicaba, 31 de agosto de 1989.



Flavio Cesar Almeida Tavares



Fernando Cesar Boscariol



Goran Kuhar Jesovsek



José Henrique Conti



Roberto Pedroso de Oliveira

RELATÓRIO SEMESTRAL DE ATIVIDADES  
PROGRAMA ESPECIAL DE TREINAMENTO  
PET - BIOTECNOLOGIA

I. Identificação do Programa

Universidade: Universidade de São Paulo/Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz".

Implantação do PET: Fevereiro de 1989.

Departamento: Departamento de Genética.

Tutor: Flávio Cesar Almeida Tavares.

Prof. Associado.

Relatório Nº 1: Período Fevereiro/Agosto de 1989.

II. Informações sobre os Bolsistas

1. Relação Nominal

Fernando Cesar Boscariol	9º Semestre Agronomia
Goran Kuhar Jezovsek	7º Semestre Agronomia
José Henrique Conti	9º Semestre Agronomia
Roberto Pedroso de Oliveira	7º Semestre Agronomia

2. Desempenho Acadêmico na Graduação

2.1.	NOME	SEMESTRE	MÉDIAS
	F.C.Boscariol	9º	6,9
	G.K.Jezovsek	7º	6,7
	J.H.Conti	9º	7,4
	R.P.Oliveira	7º	8,7

Observação: Em anexo notas das disciplinas cursadas após  
ingresso no Grupo PET.

## 2.2. Justificativas para o declínio no rendimento

Não houve declínio no rendimento do grupo ou bolsista em particular.

## 2.3. Apreciação do Professor-Tutor sobre o desempenho do Grupo no Semestre

O grupo teve evolução excelente no semestre. Como esperado foi possível obter um rendimento elevado nas atividades programadas para o semestre. Além destas atividades, merece destaque o fato de que a Biotecnologia é um ramo do conhecimento multidisciplinar e bastante amplo, o que torna mais difícil ainda a formulação de conceitos e a atuação integrada. O grupo tinha uma visão da Biotecnologia que se ampliou e que se tornou mais objetiva. Individualmente se nota este grande progresso e como grupo se destacam por sua atuação mais científica, concepção de ideias e conceitos com melhor visão crítica, estando mais capacitados ao envolvimento na pesquisa e ao desempenho de atividades mais criativas.

A participação do grupo com empenho está garantindo uma atuação diferenciada e capaz de influenciar os outros alunos, que já estão procurando se integrar ao programa, inclusive participando de atividades coletivas.

## III. Desempenho dos Bolsistas no Programa Especial de Treinamento

### 1.1. Reuniões do Grupo com o Tutor

15/02 - 1 hora - Apresentação do programa e seus objetivos - Todos os bolsistas.

28/02 - 2 horas - Discussão Biotecnologia no Brasil e ESALQ - Todos os bolsistas

- 08/03 - 2 horas - Discussão do Plano diretor de Bio  
tecnologia ESALQ. Todos os bolsistas
- 15/03 - 2 horas - Definição de objetivos indivi-  
duais. Todos os bolsistas
- 29/03 - 2 horas - Discussão dos objetivos indivi-  
duais. Todos os bolsistas
- 12/04 - 2 horas - Debate das dúvidas das leituras  
realizadas. Todos os bolsistas
- 18/04 - 2 horas - Avaliação do desenvolvimento dos  
trabalhos individuais. Todos os bolsistas
- 17/05 - 2 horas - Avaliação do andamento dos traba-  
lhos individuais e discussão sobre o PET  
na ESALQ. Todos os bolsistas
- 07/06 - 2 horas - Avaliação dos trabalhos. Todos  
os bolsistas
- 24/06 - 4 horas - Reunião conjunta com outros gru-  
pos do PET da ESALQ para apresentação dos  
trabalhos individuais e avaliação geral.
- 05/07 - 2 horas - Reunião para avaliação do semes-  
tre e definição dos objetivos para o 2º  
semestre. Todos os bolsistas
- 25/08 - 2 horas - Reunião para avaliação do grupo  
e definição de trabalho para o 2º semestre

### 1.3. Palestras de outros profissionais

- Dr. Joaquim Aparecido Machado, gerente de Pes-  
quisas da Agrocere S/A - Sobre as pesquisas  
desenvolvidas na Empresa Agrocere principal-  
mente na biotecnologia de Plantas.

- Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna - Pesquisador da Agroceres - Sobre Eletroforese Vegetal e suas aplicações em Biotecnologia Vegetal.
- Dr. Paulo Fernando Machado - Departamento de Zoologia ESALQ/USP - Sobre as pesquisas desenvolvidas naquele departamento na área de Biotecnologia Animal.

1.4. Outros Seminários, Conferências, Palestras assistidas pelos bolsistas-PET

- Seminários (F.C. Boscarol)
  - Análise Quantitativa da variabilidade genética em Leveduras
  - Genética Biotecnologia da Produção de Dextrana
  - Mecanismos de Diferenciação em Plantas Cultivadas "in vitro"

1.5. Participação em Congressos

- XV Congresso Brasileiro de Microbiologia - 16 à 20/07/89 - Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto - Todos os bolsistas.
- Congresso de Iniciação Científica da ESALQ - 3 à 5 julho 1989 - Todos os bolsistas Apresentam do trabalhos de Pesquisa: Fernando e Goram.
- I Reunião Paulista de Iniciação Científica em Ciências Agrárias da ESALQ. Todos os bolsistas
- Curso de atualização em Genética (Roberto Henrique).

1.7. Monografias (Anual)

1.7.1. Orientador: F.C.A. Tavares

Bolsista: F.C. Boscarol

Titulo: Leveduras resistentes na Biotecnologia da Fermentação Alcolica

Fase atual: Levantamento bibliografico ,  
pesquisa laboratorial para  
obtenção de leveduras resis-  
tentes a contaminação bacte-  
riana, leituras.

1.7.2. Orientador: F.C.A. Tavares

Bolsista: G.K. Jesevsek

Titulo: Transformação vegetal com Agro-  
bacterium.

Fase atual: Levantamento biblio-  
grafico, pesquisa laboratorial de  
avaliação de diferentes linhagens  
de Agrobacterium na indução de  
tumores, leituras.

1.7.3. Orientador: F.C.A. Tavares

Bolsista: J.C. Conti

Titulo: Cultura de Tecidos: proteíñas to-  
tais e diferenciação

Fase atual: Levantamento bibliografico ,  
pesquisa laboratorial com a-  
valiação das proteíñas em ca-  
los de Stylosanthes, leituras

1.7.4. Orientador: F.C.A. Tavares

Bolsista: R.P. Oliveira

Titulo: Cultura de Tecidos: Micropropagação sob diferentes formulações hormonais em Stylosanthes.

Fase atual: Levantamento bibliografico , pesquisa laboratorial em micropropagação, leituras.

## 1.8. Pesquisa

1.8.1. Titulo: (idem 1.7.1.)

Objetivo: Obtenção de híbridos de leveduras resistentes à contaminação bacteriana e agentes inibidores visando contornar geneticamente problemas de fermentação.

Parecer: A pesquisa envolve o treinamento em várias técnicas relacionadas à Biotecnologia da Fermentação com objetiva visão do processo e expectativas de contribuição real para a sua otimização. O bolsista superou o período inicial de treinamento e com desenvoltura realiza ensaios de fermentação controlados, experimentos de fusão de protoplastos , cruzamentos naturais, micromanipulação, obtenção de mutantes , análises químicas e cromatograficas e análise estatística de dados experimentais próprios. Espera-se concluir o projeto em tempo compatível com a apresentação da monografia.

1.8.2. Titulo: (idem 1.7.2.)

Objetivo: A pesquisa consta da avaliação de diferentes linhagens de Agrobacterium, com ênfase na espécie A. rhizogenes na sua capacidade de indução de tumores e forma-

ção de raízes em Nicotiana tabacum e Zea mays. Esta pesquisa tem o objetivo básico de identificar linhagens eficientes visando-se seu emprego em futuros experimentos de transformação vegetal mediada por bactérias. Trata-se de pesquisa com importância destacada como método de transferência de genes, ou seja, uma engenharia genética "in vivo".

O bolsista tem demonstrado empenho na condução dos vários experimentos de avaliação do material biológico obtido de coleções nacionais e de laboratórios do exterior. Seu treinamento nas técnicas microbiológicas e de cultura de tecidos já foi superado estando o mesmo ativamente desenvolvendo os experimentos laboratoriais. A seleção de um bom vetor de transformação é fundamental para projetos desta natureza, o que é esperado acontecer em tempo de elaborar uma monografia sobre o assunto.

#### 1.8.3. Titulo: (idem 1.7.3.)

Objetivo: Determinar por eletroforese de proteínas totais a variação ocorrida nas diferentes etapas da cultura de tecidos, desde a formação do caule até a regeneração de partes vegetais.

Parecer: Na cultura de tecidos, principalmente quando voltada a micropropagação vegetativa, a formulação do meio de cultivo é fundamental para esta finalidade. Neste meio nutrientes e hormônios tem influência na capacidade de regeneração, o que implica na expressão e diferenciação gênica. Estes processos são pouco estudados e a variação no padrão eletroforetico em diferentes estágios do desenvolvimento poderá fornecer elementos indicadores para futuros trabalhos. Inclusive pela associação com os meios de cultivo podem ser feitas inferen

cias importantes. O bolsista encontra-se em fase final de treinamento em técnicas de cultura de tecidos e eletroforese estando apto a conduzir os experimentos individualmente.

#### 1.8.4. Titulo: (idem 1.7.4.)

Objetivo: Desenvolver a formulação de meio de cultivo para a cultura de tecidos de Stylosanthes visando a micropropagação.

Parecer: Como mencionado a formulação do meio adequado à cultura de tecidos é necessária tanto visando a micropropagação como estudos fisiológicos. Para algumas espécies de Stylosanthes, planta leguminosa de interesse forrageiro, esta determinação ainda está sendo feita, de modo que esta pesquisa deverá contribuir neste particular. Adicionalmente é complementar à pesquisa anteriormente citada (1.8.3.). O desempenho do bolsista tanto acadêmico como na pesquisa é considerado excelente, esperando-se obter resultados conclusivos brevemente.

#### 1.9. Estágios

Área: Transformação de plantas com Agrobacterium

Coordenador: F.C.A. Tavares e S. Echeverrigaray

Período: Julho de 1989.

Participante: Goran K. Jesovsek

Atividades: Técnicas de preservação e multiplicação de linhagens de Agrobacterium sp. Ensaio de infectividade de linhagens de Agrobacterium rhizogenes, isolamento e re-isolamento. Regeneração de raízes e transformação.

#### 1.11. Leituras: vide anexo

**1.12. Visitas**

**Empresa:** Sementes Agrocere S/A

**Local:** Santa Cruz das Palmeiras, SP.

**Data:** 03.06.89

**Objetivo:** Visita ao laboratório de Biotecnologia e ao setor de produção de sementes de milho. Palestras sobre Biotecnologia e discussões sobre a visão empresarial da Biotecnologia no Brasil. Realizaram-se demonstrações no laboratório.

**Participantes:** Todos os bolsistas

**Centro de Pesquisa:** ITAL - Instituto Tecnológico de alimentos.

**Local:** Campinas, SP.

**Data:** 29.06.89

**Objetivos:** Visita aos laboratórios

**Participante:** F.C. Boscariol

**Empresa:** Bioplanta S/A e Vigoragro S/A

**Local:** Paulinea, SP.

**Data:** 10.05.89

**Objetivo:** Visita aos laboratórios, indústria de produção de mudas e de sementes

**Participante:** F.C. Boscariol

**Empresa:** Usina São Martinho Açúcar e Alcool

**Local:** Pradopolis, SP.

**Data:** 17.07.89

**Objetivo:** Visita às instalações industriais, laboratórios de acompanhamento e controle de processo e sistema de produção.

**Participante:** F.C. Boscariol

Centro de Pesquisa: Centro de Biotecnologia Agrícola, ESALQ/USP.

Local: Piracicaba, SP

Data: 04.08.89

Objetivo: Discutir com pesquisadores sobre as pesquisas em andamento

Participante: F.C. Boscarol

### 1.13. Estudo de Língua Estrangeira

J.C. Conti

Cultura Inglesa - First Certificate in English

R.P. Oliveira

CCAA - Curso Básico Completo

F.C. Boscarol

LESSA - Curso Básico

G.K. Jesovsek

Ingles Completo

### 1.14. Outras Atividades

#### a) Promoção de Eventos Científicos

Organização e participação da 1ª Reunião Paulista de Iniciação Científica em Ciências Agrárias e 4º Congresso de Iniciação Científica da ESALQ, realizados no período 3 à 5 de julho de 1989. A integração de bolsistas do PET- Biotecnologia foi proveitosa tanto pela experiência real de organização e participação no evento, como também da análise e classificação de trabalhos para as diferentes seções de comunicação. Dois

bolsistas apresentaram também resultados de suas atividades de pesquisa.

## 2. Apreciação sobre o aproveitamento do grupo

Torna-se evidente que o grupo desempenhou neste primeiro semestre, o mais difícil por ser período de implantação, uma série de atividades bastante diversificadas e abrangentes do programa proposto em quase sua totalidade. Apenas algumas visitas adicionais que estavam programadas deixaram de ser realizadas. O desempenho do grupo, superou as expectativas e se espera para o próximo semestre um desempenho pelo menos equivalente ao demonstrado até o momento.

Adicionalmente ao grande número de atividades cabe destacar o elevado nível de dedicação, empenho e a excelente participação em todas as atividades. O campo da Biotecnologia por ser muito vasto exige muito mais em termos de aprendizado e concentração. O grupo mostrou-se à altura, respondendo muito bem tornando as sessões de reflexão e o desempenho das demais atividades com grande entusiasmo e superando as dificuldades do tempo disponível devido às aulas com grande eficiência.

## IV. Considerações sobre o relacionamento do Grupo

Entre si: Poderia ser mais intenso se os horários disponíveis para as atividades extra-classe fossem coincidentes. Praticamente no período noturno e em fins de semana é que foi possível desenvolver atividades conjuntas. Apesar disso, o coleguismo e o espírito de colaboração esteve sempre pre-

sente contribuindo bastante para contornar as dificuldades devido a limitação de tempo.

2. Com o Tutor: Excelente, todos demonstrando interesse, vontade e dedicação, desempenhando suas atividades a contento e sob clima amigavel e sincero

3. Com outros alunos que não pertencem ao PET: Excelente, inclusive aproximando outros colegas que participaram inclusive de algumas atividades conjuntas.

4. Com o Corpo Docente da ESALQ: Excelente, pois são bons alunos, interessados e dedicados.

#### V. Resultados propiciados pelo PET

A implantação do programa na ESALQ ocorrido neste semestre, demonstrou de forma bastante positiva a validade de programas desta natureza, especialmente em áreas multidisciplinares com a Biotecnologia. Para a instituição, embora ainda cedo para oferecer uma avaliação mais profunda, verifica-se que o programa trouxe expectativas, algo novo acontecendo visando atender à Graduação em Instituições fortemente empenhada em programas de Pós-Graduação. Sente-se que mais um espaço foi aberto, inclusive que pode ter reflexos positivos para o próprio programa de Pós-Graduação da ESALQ. Os grupos PET proporcionam meios para a seleção e encaminhamento de talentos para a pós-graduação com preparo muito melhor. A vivência na pesquisa, o melhor conhecimento dos campos de especialização e as oportunidades que o programa oferece que contribuem para a ampliação da

visão crítica e científica, somente poderá resultar na melhor formação de pessoal.

Os maiores resultados são visíveis dentro do próprio grupo. Conforme mencionado, o grupo apresentou uma evolução conceitual e objetiva sobre a Biotecnologia, ampliando a sua visão crítica sobre a área e também passou a ser mais seletivo, fato que veio a ser comprovado com a sua atuação em pesquisa. A participação direta na pesquisa orientada de forma mais completa que a iniciação científica, criou um tipo de envolvimento intensivo de grupo, embora mais difícil de ser implementado devido a carga didática da graduação na ESALQ. As definições começaram a aparecer após algumas sessões de reflexão onde a ênfase à especialização superou as ansiedades profissionais futuras.

Para o Tutor a experiência foi bastante proveitosa, principalmente por trazer consigo a possibilidade de seleção de talentos e seu encaminhamento à Pós-Graduação. O envolvimento mais direto com o grupo e não com os indivíduos isoladamente, oferece também oportunidades de reorientação de conceitos e métodos de atuação na pesquisa e no desenvolvimento de outras atividades que somente desta forma se tornam mais evidentes.

## VI. Planejamento das Atividades para o Próximo Semestre

### Atividades

1. Sessões de reflexão - quinzenal
2. Curso de Inglês - todo ano
3. Curso sobre Metodologia da Pesquisa Científica e Elaboração de Projetos - outubro

4. Pesquisa Individual - todo ano
5. Eventos Científicos na ESALQ
  - Seminário sobre Problemas e Perspectivas na Agricultura (24 a 26/10/89)
  - Palestras, defesas de teses e aulas específicas de interesse - todo ano
6. Visitas Técnicas a empresas, instituições de pesquisa, instituições de fomento a pesquisa e setores de administração universitária - todo ano
7. Monografia - fevereiro de 1990
8. Seleção de novos Bolsistas - novembro de 1989
9. Férias - 15/12/89 a 15/01/90



SAG/450-89

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS DE PIRACICABA

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"



- A T E S T A D O -

ATESTO, a requerimento do interessado e de ordem do Senhor Diretor, que o Sr. **FERNANDO CESAR BOSCARIOL**, natural de Piracicaba - Estado de São Paulo, nascido a 10 de abril de 1966, filho de Luiz Darcy Boscariol e de Rachel Antonia Orlandin Boscariol, é aluno regularmente matriculado e está cursando o 10º (décimo) semestre do Curso de Graduação em ENGENHARIA AGRONÔMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, tendo obtido os seguintes resultados referentes às disciplinas cursadas no semestre anterior:

<u>disciplinas</u>	<u>sem.</u>	<u>freq.</u>	<u>nota</u>	<u>res.</u>
LER-471 Hidráulica	1º/89	94%	7.1	AP
LFT-624 Doenças das Grandes Culturas	1º/89	93%	6.8	AP
LGN-449 Genética Quantitativa	1º/89	94%	6.3	AP
LGN-477 Princípios Genéticos em Biotecnologia	1º/89	100%	7.1	AP
LGN-616 Melhoramento de Hortaliças	1º/89	100%	7.9	AP
LHO-670 Controle das Plantas Daninhas	1º/89	94%	7.0	AP
LZT-649 Bovinocultura de Leite	1º/89	94%	5.7	AP
.....				

Piracicaba, 07 de agosto de 1989.

*Luís Assaf Júnior*  
 Lúcio Assaf Júnior  
 - TÉCNICO ADMINISTRATIVO -

V I S T O:

*Eliana F. Zandoná*  
 Eliana Filomena Zandoná  
 CHEFE DA SEÇÃO DE ENG. AGRONÔMICA  
 - Substituta -



SAG/452-89

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS DE PIRACICABA

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"



- A T E S T A D O -

ATESTO, a requerimento do interessado e de ordem do Senhor Diretor, que o Sr. JOSÉ HENRIQUE CONTI, natural de Valinhos - Estado de São Paulo, nascido a 15 de junho de 1967, filho de Antonio Bueno Conti e de Odette Romano Conti, é aluno regularmente matriculado e está cursando o 10º (décimo) semestre do Curso de Graduação em ENGENHARIA AGRONÔMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo, tendo obtido os seguintes resultados referentes às disciplinas cursadas no semestre anterior:

<u>disciplinas</u>	<u>sem.</u>	<u>freq.</u>	<u>nota</u>	<u>res.</u>
LAG-637 Plantas Extrativas	1º/89	100%	7.4	AP
LES-667 Administração Rural	1º/89	83%	7.9	AP
LGN-449 Genética Quantitativa	1º/89	94%	6.9	AP
LHO-670 Controle das Plantas Daninhas	1º/89	97%	7.9	AP
LHO-628 Fruticultura II	1º/89	100%	7.5	AP
LSG-418 Gênese e Manejo de Solos Tropicais	1º/89	100%	6.7	AP
.....				

Piracicaba, 07 de agosto de 1989.

*Lucio Assaf Junior*  
 Lúcio Assaf Júnior

- TÉCNICO ADMINISTRATIVO -

V I S T O:

*Eliana F. Zandoná*  
 Eliana Filomena Zandoná  
 CHEFE DA SEÇÃO DE ENG. AGRONÔMICA  
 - Substituta -

# RELATÓRIO SEMESTRAL DO GRUPO PET BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

## 1 - INTRODUÇÃO

Na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" esta em andamento, com o apoio da CAPES, o Programa Especial de Treinamento (PET) nas áreas de Biotecnologia Agrícola, Ecologia e Gerência e Administração da Empresa Agrícola. Cada área é composta por um grupo de 4 alunos selecionados a partir de critérios estabelecidos pelo programa. Trata-se de um programa que tem como objetivo a formação de profissionais capacitados com uma visão crítica sobre as diversas áreas correlacionadas. Para tal finalidade estamos realizando atividades referentes a organização de congressos, participação em eventos científicos, cursos específicos, visitas técnicas a empresas, revisões bibliográficas, elaboração de projetos de pesquisa e sessões de reflexão para troca de idéias e principalmente, de experiências.

## 2 - ATIVIDADES REALIZADAS

O Programa Especial de Treinamento da ESALQ tem como diretriz a manutenção de um contato frequente entre as três áreas de atuação que ele engloba. Por isso são realizadas atividades individuais e também em conjunto visando estimular, desde já, a colaboração científica e o trabalho em grupo.

### 2a - Atividades conjuntas do grupo PET - ESALQ

#### - Cursos:

. Uso da Biblioteca. Ministrado pela equipe de bibliotecárias da ESALQ. Teve como objetivo fornecer subsídios para a utilização de todos os recursos que a nossa biblioteca central dispõe.

. Introdução à Informática. Ministrado no Centro de Informática na Agricultura (CIAGRI). Teve como objetivo fornecer noções básicas sobre processadores de texto, planilhas eletrônicas e programas de análise estatística via computador.

- Organização e participação:

. I Reunião Paulista de Iniciação Científica em Ciências Agrárias e IV Congresso de Iniciação Científica da ESALQ. O objetivo foi oferecer experiência prática sobre a elaboração de uma atividade desse nível e o de analisar os trabalhos de iniciação científica realizados na ESALQ e em outras instituições.

- Sessões gerais de reflexão:

. Nessas sessões participavam o orientador de cada grupo, o professor Irineu Packer (vice diretor da ESALQ e coordenador geral do nosso programa) e os integrantes de cada grupo. Tinham como objetivo a apresentação e discussão dos resultados das atividades individuais e em grupo realizadas, o planejamento de novas atividades e a avaliação do andamento do programa.

2b - Atividades conjuntas do grupo PET - Biotecnologia Agrícola

- Cursos e Congressos:

. A técnica da Eletroforese e sua Aplicação. Teve como objetivo proporcionar uma apresentação e treinamento desta técnica, um importante instrumento da biotecnologia.

. Curso de Atualização em Genética e Melhoramento, realizado na ESALQ. Visou incrementar nossos conhecimentos nestas áreas abordadas.

. XV Congresso Brasileiro de Microbiologia, realizado na USP de Ribeirão Preto. Proporcionou maiores informações sobre este ramo da ciência; tanto na área agrícola como médica.

- Visitas técnicas:

. Empresa de sementes Agroceres, em Santa Cruz das Palmeiras. Após a visita, enviamos à empresa um relatório o qual segue em anexo.

. Departamento de Zoologia da ESALQ. Nesta visita o professor Paulo Fernando Machado fez uma exposição sobre os trabalhos realizados pelo departamento na área de biotecnologia animal. Posteriormente fizemos uma discussão sobre perspectivas da utilização da biotecnologia no melhoramento animal.

- Sessões de Reflexão:

. São de frequência quinzenal e visam a discussão sobre as atividades realizadas e a elaboração de novas metas dentro de nosso programa. Nessas reuniões são também realizadas discus -

sões sobre temas polêmicos de biotecnologia, visando a formação de uma opinião crítica sobre o assunto.

- Programa de leituras:

. É estabelecido com a finalidade de proporcionar um maior embasamento teórico do grupo, criando condições para discussões de temas relacionados a biotecnologia.

2c - Atividades individuais do grupo PET - Biotecnologia Agrícola

Além das atividades em grupo, cada membro desse programa possui uma série de atividades individuais relacionadas ao desenvolvimento de trabalhos de iniciação científica na área de biotecnologia. Desta forma, cria-se condições para que cada um de nós desenvolva potencialidades em áreas específicas da biotecnologia por nós escolhidas.

Segue-se em anexo o relatório das atividades individuais de cada membro desse programa.

## RELATÓRIO SEMESTRAL PET - BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

José Henrique Conti  
Roberto Pedroso de Oliveira

### 1 - INTRODUÇÃO

Dentro do Programa Especial de Treinamento da CAPES, na área de Biotecnologia Agrícola, cada membro desse grupo escolheu uma área de maior interesse. Devido haver interesses comuns entre José Henrique Conti e Roberto Pedroso de Oliveira, nós iniciamos um trabalho conjunto. Estamos realizando um estudo sobre a expressão gênica em plantas de Stylosanthes humilis, com planos de expandir esta abordagem para hortaliças, milho e materiais de origem animal de interesse agropecuário. Com relação a cultura de Stylosanthes estamos objetivando estudar a variação da expressão gênica em função de diferentes explantes e diferentes fases de diferenciação dessa cultura 'in vitro'. Dentre essas fases de diferenciação citamos a formação de calo, a emissão de radícula e a regeneração da parte aérea das plantas.

Para a execução de tal projeto temos verificado a complexidade do assunto e também a sua especificidade. Estes aspectos, associados a falta desses tópicos no currículo agrônomo, tem levado a necessidade de estudos aprofundados visando o entendimento desses processos genéticos. Com relação a este aspecto fizemos um curso sobre "A técnica da eletroforese e sua aplicação" para adquirir fundamento prático e fizemos duas revisões bibliográficas sobre "Estrutura Gênica de Vegetais" e sobre "A Técnica da Eletroforese e sua Utilização na Determinação da Estrutura Gênica" para termos fundamento teórico. Essas revisões seguem em anexo.

### 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

Uma das nossas preocupações era a capacitação para a execução correta da técnica da eletroforese. Até o momento temos apenas realizado trabalhos sobre o estudo da expressão gênica na cultura de Stylosanthes humilis. Porém estamos estudando a viabilidade desse estudo em outras culturas.

Temos realizado a cultura de tecidos 'in vitro' de Stylosanthes humilis no laboratório central de cultura de tecidos da ESALQ e as eletroforeses no laboratório do professor Flávio C. A. Tavares.

Com relação ao procedimento adotado para a cultura de

tecidos, estamos utilizando a seguinte sequência: Primeiramente é feita a escarificação das sementes com a finalidade de diminuir o efeito da dormência das sementes. As sementes são esterelizadas através do mergulho destas, respectivamente, em álcool 70% por um minuto, hipoclorito 3% por 20 minutos e em água por várias vezes. Prepara-se o meio de cultura MS/4 e faz-se a inoculação das sementes em câmara asséptica. As sementes germinaram em frascos de 250ml contendo 20ml de meio de cultura, tendo permanecidas sob condições controladas de luz e temperatura. Após vinte dias temos feito a inoculação dos explantes. Esclarecemos que os explantes são produzidos em condições de laboratório para diminuirmos a taxa de contaminação. Os explantes utilizados foram os de folha, epicótilo, hipocótilo e cotilédone. Estes foram inoculados em oito meios de cultura MS com concentrações distintas de NAA e BAP.

Os meios de cultura utilizados foram: meio A (MS; 0,5mg/l BAP e 2,0 mg/l NAA), meio B (MS; 1,0mg/l BAP e 2,0mg/l NAA), meio C (MS; 2,0mg/l BAP e 2,0mg/l NAA), meio D (MS; 3,0mg/l BAP e 2,0mg/l NAA), meio E (MS; 0,5mg/l BAP e 3,0mg/l NAA), meio F (MS; 1,0mg/l BAP e 3,0mg/l NAA), meio G (MS; 2,0mg/l BAP e 3,0mg/l NAA) e meio H (MS; 3,0mg/l BAP e 3,0mg/l NAA).

Com relação a inoculação dos explantes utilizou-se 6 plantas para cada meio onde em cada planta eram retiradas duas amostras de cada tipo de explante. Estes foram inoculados nos respectivos meios individualmente. Esta etapa foi conduzida em tubos de cultura com 7ml do meio, sendo que o experimento totalizou a utilização de 384 tubos de cultura.

Trinta dias depois se fez a avaliação do material e o estudo de possíveis meios de regeneração dos calos, de cada meio e de cada explante, para se fazer a eletroforese. Esta fase teve como objetivo verificar se houve influência do meio de cultura e do explante na expressão gênica. A técnica da eletroforese é descrita em uma das revisões bibliográficas que seguem em anexo.

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com relação a cultura de tecidos de S. humilis os resultados indicaram que as concentrações de hormônios utilizadas foram excessivas, não proporcionando condições ideais para a produção de calos. Houve a formação de calos em maior porcentagem nos meios A, B e E, porém essa porcentagem foi baixa. Por isso pretendemos repetir o experimento com doses inferiores de NAA e BAP no meio de cultura.

Com relação ao tipo de explante a porcentagem de formação de calos foi maior quando se utilizou os cotilédones. As menores porcentagens foram encontradas no explante folha.

Devido a baixa porcentagem de calos formados decidimos repetir o experimento com doses menores de hormônios e não seguir a etapa seguinte, que seria estudar possíveis meios de regeneração.

Fizemos a eletroforese dos calos formados para estudarmos o possível efeito do meio de cultura e do explante na expressão gênica. Verificamos que algumas bandas apareceram em algumas amostras e foram ausentes em outras, evidenciando a produção de algum tipo de proteína específica. Como, ainda, estamos em estudos preliminares sobre o assunto, torna-se difícil a interpretação dessa causa. Esta pode se relacionar ao tipo de meio de cultura, ao tipo de explante ou a fase de diferenciação em que a planta se encontra (produção de radícula, parte aérea, etc.). Pode-se observar também que as concentrações de proteínas são distintas, existindo proteínas que aparecem em maior quantidade do que outras. Tentaremos, em estudos posteriores, relacionar a maior quantidade de proteínas presentes com a fase de diferenciação da planta.

#### 4 - PERSPECTIVAS

Na presente fase deste trabalho, estamos estudando / mecanismos para correlacionar a produção de certas proteínas com relação às diferentes fases de diferenciação das plantas, diferentes explantes e meios de cultura. Para tal estudo procedemos nesse primeiro semestre de trabalho a acertar a metodologia e a aprendizagem das técnicas a serem utilizadas. No próximo semestre estudaremos os efeitos de cada fator acima correlacionado na expressão gênica, proporcionando a fixação de todas as variáveis que possam interferir na interpretação dos dados.

### Opinião sobre o programa

O programa tem sido de grande valor para o aprimoramento da minha formação profissional. Os trabalhos no laboratório, as visitas, a participação na organização do congresso, as sessões de reflexão; todas essas atividades aumentaram a minha experiência assim como permitiram um maior relacionamento com professores, pós graduandos, profissionais que atuam em empresas e outros colegas.

Uma das finalidades do grupo PET é permitir um maior contato entre pesquisadores. Isto está realmente acontecendo pois o relacionamento entre os membros e com o tutor do PET Biotecnologia é muito bom, proporcionando uma intensa troca de informação e que está ajudando no entendimento e na formação de uma visão crítica sobre todas as áreas que compõem a biotecnologia.

O PET está nos ensinando a trabalhar em grupo; a buscar soluções para os problemas através do trabalho conjunto de pesquisadores de laboratórios diferentes, de departamentos diferentes e, o que é mais importante, com idéias diferentes.

### Opinião sobre o tutor

O tutor do grupo PET Biotecnologia é um grande incentivador da pesquisa com biotecnologia. O trabalho de orientação do tutor tem sido ótimo, fornecendo subsídios para a definição dos rumos dentro do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo. A atuação do tutor nas sessões de reflexão é excepcional; ele orienta as leituras a serem discutidas e durante a sessão incentiva a formação de uma opinião crítica sobre o assunto. O tutor se mostrou sempre disponível para sanar as dúvidas que surgiram em leituras, em visitas, em congressos e no andamento do projeto de pesquisa.

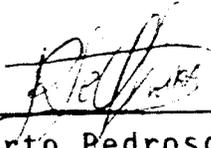
  
José Henrique Conti

### Opinião sobre o programa

Desde o princípio me interessei pelas diretrizes desse programa, o qual visa a formação de profissionais capacitados em áreas específicas da engenharia agrônoma. Na minha opinião os objetivos propostos são excelentes, pois englobam em suas prerrogativas uma gama de atividades visando em primeiro plano a melhor formação do aluno de graduação. Penso que essas atividades, que complementam o currículo mínimo do nosso curso, oferecem condições suficientes tanto para a formação de pessoal capacitado ao mercado de trabalho, como condições satisfatórias à continuidade desses estudos em cursos de pós-graduação. Nesse particular sinto-me na obrigação de defender a viabilidade desse programa e salientar a sua superioridade em relação a outros estágios que visam meramente a produção científica, deixando um pouco de lado a iniciação científica e profissional do indivíduo.

### Opinião sobre o tutor

Participei de outros programas de estágios nesta mesma escola e, por isso, tenho a autoridade de dizer que o papel do orientador em questão merece destaque. Pois, desde o princípio, se preocupou com a nossa formação pessoal e profissional, se interessando por nossas dúvidas e pela realização das atividades programadas.

  
\_\_\_\_\_  
Roberto Pedroso de Oliveira

Componentes do meio MS	
a. Macronutrientes	
	-NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
	-KNO <sub>3</sub>
	-CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
	-MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
	-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
b. Micronutrientes	
	-Solução padrão
c. Vitaminas	
	-Glicina
	-Ácido nicotínico
	-Piridoxina
	-Tiamina HCl
d. Na <sub>2</sub> EDTA+FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	
e. Ágar	

Tabela 2: Meio MS

Outra bactéria do mesmo gênero, *A.tumefaciens*, foi utilizada para transformar folhas de tabaco e callus de *Arabidopsis thaliana*, através de co-cultivo em meio MS líquido por 24 horas, seguido de plaqueamento em meio MS sólido com 500mg/l do antibiótico Cefataxima. Foram utilizadas para isso, as linhagens LBA, 294, 632 e 305, todas portando o plasmídeo pARC8, com gene marcador para resistência a Canamicina (Kan<sup>r</sup>).

Paralelamente, está sendo feito a cultura de tecidos vegetais de tabaco, para a obtenção de vegetais estéreis para os experimentos de transformação.

### 3. Perspectivas:

Os resultados dos experimentos só devem ser obtidos a partir dos próximos dois meses. As inoculações deram resultado em primeira fase, obtendo-se algumas perdas por contaminação fúngica.

Dar-se-á continuidade as inoculações, nas quais haverá a variação dos vegetais (tabela 3) e das linhagens bacterianas.

Os vegetais resultantes serão comparados em diversas fases de desenvolvimento, com os vegetais normais, através de eletroforese de proteínas totais.

Vegetal	Nome Científico
Batata	<i>Solanum tuberosum</i> L.
Batata-doce	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lan.
Berinjela	<i>Solanum melongena</i> L.
Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.
Pimentão	<i>Capsicum annum</i> L.

Tabela 3: Vegetais a serem utilizados

Componentes do meio MS	
a. Macronutrientes	
	-NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
	-KNO <sub>3</sub>
	-CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
	-MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
	-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
b. Micronutrientes	
	-Solução padrão
c. Vitaminas	
	-Glicina
	-Ácido nicotínico
	-Piridoxina
	-Tiamina HCl
	d. Na <sub>2</sub> EDTA+FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
	e. Ágar

Tabela 2: Meio MS

Outra bactéria do mesmo gênero, *A. tumefaciens*, foi utilizada para transformar folhas de tabaco e callus de *Arabidopsis thaliana*, através de co-cultivo em meio MS líquido por 24 horas, seguido de plaqueamento em meio MS sólido com 500mg/l do antibiótico Cefataxima. Foram utilizadas para isso, as linhagens LBA, 294, 632 e 305, todas portando o plasmídeo pARCB, com gene marcador para resistência a Canamicina (Kan<sup>r</sup>).

Paralelamente, está sendo feito a cultura de tecidos vegetais de tabaco, para a obtenção de vegetais estéreis para os experimentos de transformação.

### 3. Perspectivas:

Os resultados dos experimentos só devem ser obtidos a partir dos próximos dois meses. As inoculações deram resultado em primeira fase, obtendo-se algumas perdas por contaminação fúngica.

Dar-se-á continuidade as inoculações, nas quais haverá a variação dos vegetais (tabela 3) e das linhagens bacterianas.

Os vegetais resultantes serão comparados em diversas fases de desenvolvimento, com os vegetais normais, através de eletroforese de proteínas totais.

Vegetal	Nome Científico
Batata	<i>Solanum tuberosum</i> L.
Batata-doce	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lan.
Berinjela	<i>Solanum melongena</i> L.
Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.
Pimentão	<i>Capsicum annum</i> L.

Tabela 3: Vegetais a serem utilizados

#### 4. Trabalhos apresentados:

Durante a I Reunião Paulista de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, realizado em Piracicaba, no período de 3 a 5 de julho de 1989, foi apresentado o trabalho "Transformação de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium rhizogenes*", feito em conjunto com o Dr. Sérgio Echeverrigaray, de Sementes Agroceres, que, embora tenha sido escrito antes do início do programa PET, faz menção a este.

#### 5. Visitas:

Individualmente foi realizada uma visita ao Laboratório de Biotecnologia de Cereais, de Sementes Agroceres, localizado em Santa Cruz das Palmeiras, SP, no período de 10 a 14 de julho de 1989.

Segue relatório anexo.

#### 6. Opinião sobre o programa:

O programa PET, além de um projeto de iniciação científica, permite a participação e a organização de uma série de atividades complementares como visitas, seminários, cursos e congressos. Isso estimula, junto com as sessões de reflexão, o trabalho em grupo, raro neste País, sendo este o grande mérito deste programa. Outro ponto alto, é a troca de informações entre os diferentes grupos, evitando o direcionamento excessivo do bolsista. Estes fatores tornam o PET um verdadeiro treinamento profissional.

#### 7. Opinião sobre o tutor:

O Dr. Flávio C. A. Tavares exerce sua função de forma bastante satisfatória, tendo como grandes predicados a exigência de formação de um bom espírito crítico, além da integração entre os bolsistas e os alunos da pós-graduação. Possui também uma ótima liderança nas sessões de reflexão, provocando grande estímulo nos estagiários. Mostra-se, porém, apático em certos momentos, talvez devida a sua sobrecarga de atividades.

  
Goran Kuhar Jezovsek

**Relatório da Visita ao Laboratório de Biotecnologia de Cereais.  
Fazenda Agroceres - Santa Cruz das Palmeiras - SP  
10 a 14 de julho de 1989**

**Atividades desenvolvidas:**

**a. Instalação de experimento de transformação de *Nicotiana tabacum* com *Agrobacterium rhizogenes*.**

**-Objetivos:** verificar a transformação do vegetal através de comparações eletroforéticas das proteínas totais entre vegetais supostamente transformados e normais, nas várias fases de desenvolvimento e da análise comparativa de morfologia e das proteínas das progênies.

**-Instalação:** tomando cinco plantas de tabaco crescidas 'in vitro', cortou-se suas folhas em pedaços de aproximadamente 1,0x0,5 cm, contendo a nervura principal, e pelo menos uma secundária de cada lado, inoculou-se as seguintes linhagens de *A. rhizogenes*: A4, 307 e 642, através de seis cortes com lâmina infectada, sendo dois na nervura principal, e dois em uma nervura secundária de cada lado. Este material foi incubado em placas com obedecendo os seguintes tratamentos:

- I. Testemunha: duas placas (13 pedaços)
- II. A4: quatro placas (28 pedaços)
- III. 307: quatro placas (28 pedaços)
- IV. 642: quatro placas (28 pedaços)

**b. Análise de dados de leitura de fitas de densitômetro no programa GENES, para a obtenção de distâncias genéticas e agrupamentos de linhagens e híbridos geneticamente semelhantes.**

**-Metodologia:** passou-se no densitômetro géis de eletroforese de proteínas totais de coedótipos das linhagens e híbridos desejados. Calculando-se as áreas embaixo de cada curva do gráfico, tirou-se a porcentagem interna de frequência de cada proteína, para cada híbrido e linhagem. Estas porcentagens, devidamente agrupadas, foram inseridas no programa GENES, que fez os agrupamentos desejados, por vias estatísticas.

**c. Cromatografia de papel de terpenóides.**

**-Finalidade:** descobrir um método fácil de identificar a quantidade de terpenóides associados ao sabor da cenoura, para fins de melhoramento.

**-Metodologia:** tomou-se duas amostras de 5g de cada um dos cultivares estudados. Foi feita a extração com 10ml de éter de petróleo e 5ml de acetona, depois evaporados e concentrado.

lentou-se a corrida com:

- I. Benzeno e Clorofórmio (1:1)
- II. Acetona e Clorofórmio (1:1)
- III. Acetona

após a corrida, o papel foi corado com a seguinte solução:

- 0,5g de Vanilina
- 2,0ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc.
- 8,0ml etanol

e seco em estufa a 100°C.

-Resultados: a melhor extração e a melhor corrida foram obtidas com o uso de acetona em ambos os casos, porém aparentemente deve-se reduzir o tempo de corrida para que seja obtida uma melhor definição.

d. Instalação de experimento de transformação de *N. tabacum* e *A. thaliana* com *A. tumefaciens*.

-Objetivo: testar a transformação com *A. tumefaciens* contendo plasmídeo Ti marcado.

-Material: plantas de tabaco estéreis  
callus de *Arabidopsis*  
linhagens de *A. tumefaciens* :  
\*LBA/pARC8  
\*294/pARC8  
\*637/pARC8  
\*305/pARC8

-Metodologia: co-cultivar as bactérias e o material vegetal em meio MS líquido por 24 horas, passando depois o material vegetal para MS sólido com 500mg/l de cefataxima.

e. Fotografias: foram tiradas fotografias do campo para o Eng. Luis F. P. Jafelice, e de géis de eletroforese de proteínas para a Eng. Agr. Dirce M. Carraro.

#### Conclusões:

As atividades realizadas contribuíram para a assimilação de novas técnicas de genética molecular, de métodos de análises estatísticas e de métodos de laboratório, que serão muito úteis em um futuro próximo. A visita foi muito produtiva e plenamente justificável.

  
Goran Kuhar Jezovsek

ANEXO Nº " 1 "

PET BIOTECNOLOGIA:  
Atividades individuais: FERNANDO CÉSAR BOSCARIOL

I) Projeto de Pesquisa: -Obtenção de linhagens de levedura alcoólica (Saccharomyces cerevisiae) tolerantes a ácidos orgânicos.

-Introdução:

Um dos principais problemas que afetam o rendimento da fermentação alcoólica na Indústria é a contaminação do processo por bactérias produtoras de ácidos orgânicos, diminuindo assim a eficiência do processo. Com o objetivo de obter uma ou mais linhagens de levedura tolerantes a ácidos orgânicos, foi iniciado no Departamento de Genética da ESALQ-USP, um projeto utilizando linhagens que apresentaram tolerância a ácidos orgânicos e outras de alta produtividade como parentais, visando a obtenção da linhagem desejada.

-Materiais e métodos:

Os materiais utilizados foram linhagens selecionadas em um ensaio anterior para tolerância a ácidos orgânicos (5 linhagens: F4-D, F7-B, IZ-378, IZ-915, M 606) e duas linhagens resistentes a Nistatina e de alta produtividade de Etanol (M402-4-2APi e M402-3-2BPi)

A técnica utilizada foi a fusão de protoplastos, ou seja, foram obtidos esferoplastos das linhagens parentais, fundidos em meio adequado e os produtos de fusão recuperados em meio seletivo. A metodologia utilizada para a esferoplastização e fusão foi a normalmente usada no Laboratório de leveduras e se mostrou de grande eficiência.

-Resultados obtidos:

Após os primeiros ensaios de fermentação, alguns híbridos obtidos mostraram-se promissores na produção de Etanol em um meio com 5000 ppm de Ácido acético, indicando portanto que o objetivo do projeto é viável e que a técnica utilizada é adequada.

O trabalho deve ser continuado, realizando-se novos testes de rendimento fermentativo com os híbridos obtidos, assim como novos cruzamentos visando sempre associar características desejáveis em uma linhagem industrial boa produtora de Etanol.

## II) Aprendizado de novas técnicas:

-Além do projeto de Pesquisa, no Laboratório do Setor de Leveduras tive oportunidade de conhecer e utilizar outras técnicas e metodologias de grande aplicação na área biotecnológica, tais como:

- Eletroforese de proteínas vegetais e microbianas;
- Cultura de tecidos vegetais;
- Transformação de vegetais via Agrobacterium rhizogenes;
- Obtenção de Mutantes de leveduras;
- etc.

## III) Visitas técnicas:

-Além das visitas realizadas em conjunto com o grupo PET, tive a oportunidade de visitar e conhecer o que se faz na área de Biotecnologia, as seguintes instituições:

- ITAL - Instituto de tecnologia de Alimentos; em Campinas, SP.
- BIOPLANTA - Empresa de biotecnologia vegetal, em Paulínia, SP.
- VIGORAGRO - Empresa produtora de sementes de hortaliças, em Paulínia, SP.
- Usina São Martinho SA, Açúcar e Alcool - em Pradópolis, SP.

## IV) Revisões Bibliográficas:

-Com o objetivo de obter um conhecimento mais amplo sobre determinados assuntos, foram realizadas as seguintes revisões de Bibliografia :-

- Atividade enzimática e cinética de Fermentação Alcoólica.
- Obtenção de Plantas Cultivadas tolerantes a Herbicidas.
- Otimização da Fermentação Alcoólica em escala industrial.

-O PET (Programa Especial de Treinamento) ,me pareceu de grande valia no aprimoramento e conhecimento de uma determinada área de atuação do Engenheiro Agrônomo, no meu caso, a pesquisa na área de Biotecnologia, permitindo assim que além da formação acadêmica de rotina se adquira uma visão mais ampla do que se realiza e quais as perspectivas da área. Além disso, o Programa possibilitou o conhecimento e treinamento de técnicas de grande utilização e fundamentais para o desenvolvimento de projetos de pesquisas.

- Sobre o Tutor:

-O Tutor do grupo PET de Biotecnologia Agrícola, Dr. Flávio C.A. Tavares, se mostrou extremamente competente na orientação e supervisão do grupo, permitindo-nos assim um grande avanço no conhecimento desta abrangente área. Ao mesmo tempo, sempre esteve disponível e de boa vontade para o esclarecimento de dúvidas e solucionar os problemas que surgiram durante o transcorrer deste primeiro semestre.

## RELATORIO DE VISITA

Empresa AGROCERES

Santa Cruz das Palmeiras - SP

### INTRODUÇÃO

Na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" está em andamento, com o apoio da CAPES, o Programa Especial de Treinamento (PET) na área de Biotecnologia Agrícola. Trata-se de um programa que tem como objetivos a formação de profissionais capacitados com uma visão crítica sobre as diversas áreas da biotecnologia. Para tal finalidade, estamos realizando atividades relacionadas a organização de congressos, consecução de trabalhos científicos, discussões sobre problemas e conquistas da biotecnologia e visitas a empresas e instituições relacionadas a esta área. Com este intuito e visando cumprir as metas estabelecidas realizamos uma visita à Empresa de Sementes Agroceres na unidade de produção de Santa Cruz das Palmeiras no dia 3 de junho de 1989.

## A VISITA

Fomos recebidos pela diretoria da empresa onde se definiu o programa de visita. De início fomos ao laboratório central onde o Dr. Sergio Echeverrigaray ajudou-nos a realizar uma eletroforese de calos de *Stylosanthes humilis*. De início verificamos sobre a necessidade de padronizar a concentração de proteínas nas amostras. Utilizou-se o colorímetro e verificamos que a concentração era similar, não havendo a necessidade daquela operação. Em seguida centrifugamos as amostras, preparamos os géis e foi feita a corrida eletroforética.

Visitamos também a unidade beneficiadora das sementes, onde o Engenheiro Agrônomo Edson se encarregou de mostrar-nos as instalações beneficiadoras. Acompanhamos as fases de recepção das sementes, armazenamento em silos, classificação por tamanho das sementes, tratamento químico, análise laboratorial da pureza, poder germinativo e vigor das plantulas.

Após o almoço oferecido, tivemos uma reunião onde foi realizada uma explanação sobre a história da empresa e seu papel na produção de sementes no Brasil. Foi discutido também a importância da biotecnologia para o país e para a empresa, que cita o grande desenvolvimento dessas técnicas em alguns países e teme, por isso a dependência tecnológica de nosso país.

## conclusões

Esta visita contribuiu significativamente para complementar nossos conhecimentos e atingiu os objetivos prescritos pelo nosso programa.

A visita também se mostrou construtiva ao se demonstrar o funcionamento da empresa. Com relação a este aspecto nos tornou potente uma harmoniosa relação entre produtores de sementes, agrônomos de campo e pesquisadores com um objetivo conjunto de produzir um produto final de alta qualidade.

Notamos também uma pré-disposição da empresa em aumentar as suas relações com a Universidade, o que ao nosso ver é muito importante e trará benefícios para ambos os lados.

O grupo em questão agradece a visita realizada e enfatiza que o sucesso da visita deve ser atribuído a dedicação e hospitalidade com que fomos recebidos.

### VISITANTES:

- Flávio C. A. Tavares - Tutor do grupo PET
- Fernando César Boscarino
- José Henrique Conti
- Roberto Pedrosa de Oliveira
- Sionez Narado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

"ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO  
ALCOÓLICA NA SELEÇÃO DE LEVEDURAS"

Fernando César Boscariol

PIRACICABA  
Estado de São Paulo-Brasil  
junho - 1989

## Í N D I C E

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
3. CONCLUSÕES .....	6
4. LITERATURA CITADA .....	7

## 1. INTRODUÇÃO

No processo industrial da fermentação alcoólica, seria desejável associar conhecimentos básicos envolvendo atividade enzimática, ciclo celular mitótico, linhagens bem caracterizadas geneticamente e outras características da fisiologia celular à cinética do processo de fermentação. Os estudos científicos, que são bastante extensos quanto à fermentação alcoólica, geralmente consideram isoladamente os aspectos relativos à fisiologia; em muitas situações, seu melhor conhecimento dependeria da associação de resultados com variáveis ambientais, especialmente importantes pela cinética do processo. A partir do desenvolvimento de metodologias adequadas aos ensaios enzimáticos, pode-se avaliar sistematicamente algumas enzimas, as condições ambientais e microbiológicas em processos de fermentação simulados, obtendo-se informações que permitam caracterizar o estado fisiológico de linhagens de leveduras nas várias etapas do processo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Diversos métodos foram desenvolvidos pela análise eletroforética de diferentes enzimas, sendo que tais métodos encontram larga aplicação na taxonomia e caracterização de linhagens selvagens de leveduras. Entretanto, a eletroforese de enzimas parece oferecer um promissor método para a obtenção rápida de informações sobre muitas enzimas de leveduras, em um grande número de amostras. Em um estudo de 17 enzimas da via Embden-Megorhof, na glicólise, com Saccharomyces cerevisiae, houve diferenças qualitativas e quantitativas em muitas enzimas, mais notadamente em gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, álcool desidrogenase, isonitrato de hidrogenase, malate desidrogenase e fumerase, quando a levedura foi cultivada sob diferentes intensidades de aeração, em glicose e etanol (SAURA et alii, 1979).

As enzimas da glicólise são uma apreciável fração da proteína "solúvel" - cerca de 65%, sendo que este valor reflete a importância quantitativa da via fermentativa. A concentração individual das enzimas varia em uma faixa de  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  M; a maioria são oligômeros (fosfoglicerato kinase sendo exceção); a principal reação mostrando cinética cooperativa e controle alostérico envolve a fosfofrutoquinase e piruvato quinase e elas são usualmente consideradas importantes no controle da via glicolítica. Estudos da regulação das enzimas glicolíticas mostraram que seus níveis são muito baixos, após crescimento em um meio de acetato suplementado e, a adi-

ção de glicose, causou um aumento de até 100 vezes em suas diferentes taxas de sínteses durante várias horas; experimentos com diminuição da atividade das enzimas, após remoção de açúcar também foram reportados (FRAENKEL et alii, 1982).

As propriedades de enzimas isoladas têm sido estudadas extensivamente e, em alguns casos, a estrutura primária das enzimas foi determinada, assim como a estrutura tridimensional. A concentração de muitas enzimas glicolíticas aumentam quando as células são transferidas do crescimento em uma fonte não fermentável de carbono para crescimento em glucose. A cinética deste aumento na atividade específica enzimática tem sido estudada e os resultados sugerem que a expressão dos genes envolvidos na glicólise pode ser coordenada. A expressão coordenada dos genes glicolíticos é também sugerida pelo fenótipo de uma linhagem mutante de levedura, a qual deixa de sintetizar muitas, se não todas as enzimas glicolíticas.

Com o isolamento de genes que codificam gliceraldeído-3-fosfato dehydrogenase e enolase foi investigada a expressão destes genes no objetivo de determinar os mecanismos envolvidos no controle da síntese destas duas enzimas glicolíticas (HOLLAND et alii, 1982).

Em um sistema glicolítico reconstituído por enzimas purificadas, a fim de simular a conversão de glucose para Etanol mais  $CO_2$ , concluiu-se que o Arsenato na concentração de 4 mM poderia simular o equivalente de  $10 \mu \text{ mol ml}^{-2} \text{ min}^{-1}$  de atividade de ATPase, sendo tal sistema capaz de degradar 1 M glicose em 8 horas, originando 9% Etanol. Com o sucesso de

operação de tal sistema enzimático reconstituído, pode ser possível conduzir transformações complexas com sistemas multienzimáticos "in vitro" (WELCH et alii, 1985).

Em dois isolados de leveduras tolerantes a Etanol, de Saccharomyces cerevisiae Y-20 e S. cerevisiae Y-7, quando comparados em suas atividades de invertase e álcool dehydrogenase com linhagens padrão de S. uvarum e outras linhagens, demonstrando um aumento na produtividade e atividade de Álcool-dehydrogenase, variando de acordo com as condições de crescimento. Para a invertase tal aumento e variação não ocorreram. Os isolados demonstraram uma isozima Álcool-dehydrogenase semelhante quando comparados com S. uvarum (GOKHALE et alii, 1986).

Em estudos realizados durante a fermentação descontinua, onde a taxa de produção de Etanol por miligrama de proteína celular declina progressivamente com o aumento de Etanol no meio circundante, demonstrou-se que a remoção deste Etanol não restaura imediatamente a atividade fermentativa. Diversas causas potenciais para o declínio da atividade fermentativa foram investigadas, tais como viabilidade remanescente pH interno, e a atividade específica de diversas enzimas glicolíticas e alcoolgênicas (medidas "in vitro"), a qual permanece alta durante a fermentação descontínua. Nenhum dos fatores estudados parece estar relacionado com a queda na atividade fermentativa, sendo tal diminuição provavelmente devida a mudanças fisiológicas ocorrentes (DOMBEK et alii, 1987).

Em um outro estudo, realizado com S. cerevisiae, com a presença de 1 M de Etanol, começou a ocorrer a diminuição na liberação de  $CO_2$ , entretanto, a fermentação parou so

mente com 3 M Etanol, sendo que a inibição não foi competitiva. A atividade das enzimas Hexoquinase Fosfofrutoquinase Piruvatoquinase, Aldolase e Glucose-6-fosfato desidrogenase foram determinadas; sendo que em um extrato celular com 3 M de Etanol, assim como a incubação de células de levedura com 4 M de Etanol, causaram um decréscimo em Piruvatoquinase e Hexoquinase. A Fosfofrutoquinase remanescente não mudou, mesmo em altas concentrações de Etanol. O fluxo de prótons através da membrana celular foi o mais sensível parâmetro testado (PASCUAL et alii, 1988).

A taxa intracelular de Fosfofrutoquinase estudada em células de levedura S. cerevisiae demonstrou um comportamento característico, com diferentes açúcares e células de diferentes linhagens. Os resultados sugerem que a Fosfofrutoquinase não limita a taxa de produção de CO<sub>2</sub> das células sob investigação e que 80% da atividade da Fosfofrutoquinase foi utilizada pela via glicolítica. A via de reação característica pode ser um teste útil para a análise de atividade de enzimas e do potencial de linhagens de leveduras para melhoramento (LIAO et alii, 1988).

### 3. CONCLUSOES

No estudo das enzimas da via glicolítica, a maioria dos trabalhos analisa a atividade de enzimas específicas ou sistemas enzimáticos, algumas vezes chegando a resultados contrastantes ou inconclusivos.

Torna-se, portanto, extremamente interessante um estudo específico das principais enzimas envolvidas na glicólise, assim como sua associação com parâmetros cinéticos da fermentação, o que permitiria um conhecimento adequado do estado fisiológico da levedura durante as diferentes etapas da fermentação, visto que tal processo apesar de extensamente utilizado é realizado em bases empíricas.

Tal conhecimento permitiria o fornecimento de condições e práticas que levariam a uma melhor eficiência do processo fermentativo na produção de Etanol.

#### 4. LITERATURA CITADA

DOMBEK, K.M. & INGRAM, L.O. Produção de etanol em fermentação descontínua com Saccharomyces cerevisiae: mudanças em enzimas glicolíticas e pH interno. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 53: 1286-91, 1987.

FRANKEL, D.G. Metabolismo de carboidratos. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. The molecular biology of the yeast Saccharomyces; metabolism and gene expression New York, Cold Spring Harbor Laboratories, cap. 1. 1982. p. 2-9.

GOKHALE, D.V.; RAO, B.S.; SIVVARAMAKRISHNAN, S. Atividade de álcool desidrogenase e invertase em leveduras tolerantes a Etanol. Enzyme Microbial Technol., Guilford, 8: 623-6, 1986.

HOLLAND, M.J.; HOLLAND, J.P.; McALLISTER, L. Estrutura e expressão dos genes glicolíticos de levedura. In: HOLLANDER, A., ed. Genetic engineering of microorganisms for chemicals. New York, Plenum Press, 1982. p. 291-2.

LIAO, J.C.; LIHTFOOT, F.N.; JOLLY, S.C.; JACOBSEN, G.K. Aplicação de via de reação característica; taxa de limita

ção de fosfofrutokinase em levedura de fermentação Saccharomyces cerevisiae; potencial de melhoramento de linhagens. Biotechnol. Bioeng., New York, 31: 855-68, 1988.

PASCUAL, C.; ALONSO, A.; GARCIA, I.; ROMAY, C.; KOTYK, A. Efeito do etanol no transporte de glucose, enzimas glicolíticas e extrusão de prótons em Saccharomyces cerevisiae. Biotechnol. Bioeng., New York, 32: 374-8, 1988.

SAURA, A.; LOKKI, J.; OURA, E.; SUOMALAIEN, H. Análise qualitativa de enzimas de levedura por eletroforese. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., Berlin, 7: 355-64, 1979.

WELCH, P. & SCOPES, R.K. Estudos em "cell free" metabolism: produção de etanol por um sistema glicolítico de levedura reconstituído por enzimas purificadas. J. Biotechnol., Amsterdam, 2: 257-73, 1985.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

A TÉCNICA DA ELETROFORESE E SUA UTILIZAÇÃO NA  
DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA GÊNICA

Roberto Pedroso de Oliveira  
José Henrique Conti

P I R A C I C A B A

Junho/1989

## 1. INTRODUÇÃO

A informação genética é armazenada no ácido desoxirribonucleico (DNA), que é a macromolécula informacional dos cromossomos. Esta informação instrui cada célula a produzir um conjunto característico de proteínas e, portanto, a informação genética flui na direção DNA → RNA → proteína (BIER, 1959).

É a sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica de cada tipo de proteína que é, em última análise, especificada ou codificada pela sequência dos resíduos de nucleotídios no ácido desoxirribonucleico (DNA). O segmento de uma molécula de DNA que especifica uma cadeia polipeptídica completa é denominado um cistron ou gene. Cada aminoácido é codificado por um conjunto de três resíduos de nucleotídeos sucessivos no DNA, denominado código de triple (trinca). A mensagem genética do gene é transcrita enzimaticamente, primeiro, para originar um tipo específico de ácido ribonucleico, denominado RNA-mensageiro (mRNA), cuja sequência de nucleotídeos, é complementar à do gene do DNA. No mRNA, as trincas de codificação, ou códon, complementares às do DNA, servem como os moldes imediatos e fornecem a informação genética que especifica a sequência de aminoácidos durante a síntese proteica nos ribossomos (LEHNINGER, 1976).

A separação de proteínas pode ser feita tendo como base o seu peso molecular, solubilidade, carga elétrica, diferenças nas características de adsorção ou por afinidade biológica por outras moléculas (NAKAMURA, 1966).

A separação das proteínas tendo-se como base sua carga elétrica, depende em última análise, de suas propriedades ácido-básicas, que são grandemente determinadas pelo número e tipo dos agrupamentos R ionizáveis de suas cadeias polipeptídicas. Uma vez que as proteínas diferem em sua composição e sequência de aminoácidos cada proteína possui propriedades ácido-básicas distintas. (SHAW, 1969). Em qualquer pH acima de seu ponto isoelétrico, uma proteína apresenta carga elétrica negativa e irá se deslocar no sentido do anódio. Sua carga negativa aumenta em magnitude à medida que o pH se eleva. De maneira semelhante em qualquer pH inferior ao ponto isoelétrico, a proteína apresenta uma carga positiva efetiva, e irá se deslocar para o catódio. O conhecimento das propriedades ácido-básicas de uma proteína determinada torna possível assim prever seu comportamento em campo elétrico (LEHNINGER, 1976):

O pH isoelétrico é o pH no qual a molécula não apresenta carga efetiva, sendo incapaz de migrar em um campo elétrico. A eletroforese se baseia nestas propriedades ácido-básicas das proteínas (SHAW, 1969).

A eletroforese é uma técnica que tem os seus primórdios em 1930, com os trabalhos de Arne Tiselius, quando foi utilizado um meio líquido, para a migração das proteínas (MEDINA FILHO, 1983). Hoje existem diversas formas de eletroforese que são úteis para analisar e separar misturas de proteínas. Segundo LEHNINGER (1976) o protótipo de todos os métodos modernos é a eletroforese livre ou de frente móvel.

Na eletroforese livre, uma solução tamponada da mistura proteica é colocada em uma célula de observação em formade U, em que a camada de tampão está colocada sobre a solução de proteína. A célula é imersa em um banho de temperatura constante isolado de vibrações, e um campo elétrico é estabelecido entre os

eletródios; as proteínas carregadas negativamente se deslocam no sentido do anódio e as proteínas carregadas positivamente se deslocam no sentido de catódio. Para se obter um quadro completo de todas as proteínas em uma mistura, escolhe-se um pH em que a maioria ou todas as proteínas têm a mesma carga, porém mobilidades diversas. A medida que as proteínas carregadas negativamente se deslocam no sentido do anódio, elas migram da solução proteica para a zona de tampão livre de proteína, formando uma frente ou fronteira.

As medidas ópticas das alterações de índice de refração ao longo da célula de eletroforese fornecem padrões eletroforéticos, que mostram a direção e a velocidade relativa de migração das principais proteínas na mistura. Por muitos anos, a eletroforese livre foi o método mais importante para a análise quantitativa de misturas complexas de proteínas, por exemplo as proteínas plasmáticas. (LEHNINGER, 1976). O mesmo autor cita que a eletroforese livre foi suplantada amplamente pelas diversas formas de eletroforese de zona, que são muito mais simples, possuem poder de resolução maior, e utilizam volumes menores da amostra. Na eletroforese de zona, a solução aquosa de proteína é imobilizada em uma matriz sólida ou suporte, um material poroso e hidratado que apresenta rigidez mecânica, eliminando assim a convecção e os distúrbios por vibração. O processo de eletroforese é mantido até que os componentes principais tenham sido separados em zonas nítidas; daí o nome de eletroforese de zona. A posição e quantidade das proteínas nas zonas separadas são determinadas pelo uso de um corante da proteína; a densidade de coloração, que é proporcional à quantidade de proteína, pode ser avaliada em um densitômetro adequado. A eletroforese de zona é capaz de resoluções significativamente maiores do que a eletroforese livre (MEDINA FILHO, 1983). Essa forma de eletroforese de zona pode separar uma mistura proteica tendo como base ambos, a carga elétrica e o tamanho molecular. Com essa

finalidade, emprega-se usualmente o gel de amido de batata ou a poli-acrilamida.

Numa outra variação da eletroforese de zona, denominada eletroforese de disco, a mistura proteica a ser analisada é submetida a um campo elétrico em um suporte de gel que retarda o deslocamento das moléculas, sendo dividido em duas seções que diferem em porosidade e são tamponadas em pHs diferentes. A mistura proteica migra da parte mais porosa para a parte menos porosa do gel, ao mesmo tempo que ocorre uma alteração no pH. Em consequência, cada tipo de proteína torna-se concentrada em uma faixa muito delgada e nítida, produzindo uma resolução maior do que se obtém com um tampão único contínuo. Essa forma de eletroforese de zona é chamada de disco devido ao tampão descontínuo utilizado e a aparência discóide das zonas de concentração das proteínas (LEHNINGER, 1976).

Talvez o método eletroforético mais engenhoso e eficiente para a separação de proteínas seja a focalização isoelétrica ou eletrofocalização, inventada por H. Svensson, na Suécia, na qual uma mistura de proteínas é submetida a um campo elétrico em um suporte em gel no qual se estabeleceu inicialmente um gradiente de pH. Cada proteína migra então no sentido, e é "focalizada", na porção do gradiente de pH em que o pH é igual a seu pH isoelétrico, formado aí uma faixa estacionária.

#### 1.a. A ELETROFORESE E A ESTRUTURA GÊNICA

Entre muitas técnicas existentes para a análise de proteínas, a da eletroforese de zona (SMITHIES, 1955), seguida de métodos histoquímicos de coloração, para localizar as regiões de atividade enzimática diretamente no meio suporte (HUNTER & MARKERT, 1957), é a mais apropriada ao estudo de variações individuais em populações.

Excetuando alterações pós-síntese, as proteínas são o resultado da transcrição do DNA em mRNA e da tradução deste, de sorte que a ordem dos aminoácidos é geneticamente determinada, bem como as modificações decorrentes da estrutura primária. (GOTHARDO, 1988).

Diferentes formas moleculares de proteínas, exibindo a mesma especificidade enzimática num organismo, é o que MARKERT & MOLLER (1959), e o "Standing Committee on Enzymes of the International Union of Biochemistry" (WEBB, 1965), definiram respectivamente de isozima e isoenzima.

A mobilidade eletroforética das proteínas possibilita, segundo HUBBY & LEWONTIN (1966), obter informações genéticas mais precisas no que se refere à detecção de diferenças fenotípicas causadas por substituições alélicas de um loco e a estimativa da proporção de locos que mostram variação na população. Apesar de seus limites, a eletroforese constitui excelente instrumento para estudos sobre variação gênica, diversidade genética entre populações e como marcadores genéticos independentes da interferência do homem e do ambiente.

FRANKEL (1977), considerou importante, ao analisar uma população, fazer a distinção entre as populações naturais e as domesticadas. As primeiras são estruturadas em condições geográficas e ecológicas distintas, enquanto que as cultivadas, segundo BROWN (1978), não tiveram seus caracteres naturalmente selecionados. Tal diferenciação fornece à variabilidade eletroforética funções distintas.

Sabe-se, hoje, que as variedades múltiplas de uma enzima são necessárias para catalizar a mesma reação, mas sob diferentes condições metabólicas, ou em diferentes lugares na mesma célula, ou em células diferentes, ou na mesma célula em sucessivos estágios na diferenciação (MARKERT, 1975). As isoenzimas propi-

ciam um material rico para investigar a estrutura e função de enzimas e para analisar seu papel no metabolismo celular. Mas elas também facilitam o estudo na diferenciação celular e na Genética de Populações e Evolução, porque apresentam excelentes marcadores da função gênica. No campo da evolução as isoenzimas são extensamente usadas porque permitem obter parâmetros de pressões de seleção no processo evolutivo (MARKERT, 1975).

Segundo ROSALKI (1974), os recursos que se podem obter das diferentes formas de uma molécula enzimática, podem ter como causa suas propriedades físicas (tamanho e carga da molécula), suas propriedades químicas, suas propriedades catalíticas e suas propriedades imunológicas. Portanto, isto representa um riqueza de informação bem superior e com maior pureza genética do que informações morfológicas onde muitos fatores atuam e poucos podem ser identificados. A combinação da especificidade eletroforética e da reação corante, torna possível distinguir enzimas particulares entre centenas de outras que podem estar presentes no extrato de um tecido da planta.

As isoenzimas são chamadas aloenzimas (ou alozimas), se seus polipeptídeos são especificados por diferentes alelos de um mesmo loco. Aloenzima é a consequência bioquímica da substituição, deleção ou adição de aminoácidos nos peptídeos que compõem a enzima, e elas podem ser distinguidas se estas alterações afetam sua migração eletroforética. Desde que a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo é co-linear com a sequência dos nucleotídeos que formam o código estrutural de um gene, as aloenzimas resultam da mutação gênica. Assim sendo, uma análise indireta da estrutura proteica usando a eletroforese é, em princípio a análise de um gene. É precisamente esta simples relação entre as bandas no gel e a sequência dos nucleotídeos dos genes que faz das enzimas eletroforéticas um consistente método analítico de estudos genéticos de

de populações (GOTTLIEB, 1977).

GOTTLIEB (1977) também relaciona as principais vantagens e limites da eletroforese: a. colinearidade que assegura às comparações sistemáticas poderem ser produtos de genes homólogos (que tenham origem comum); b. precisão e possibilidade de serem diretamente quantificada em termos de números e tipos de enzimas; c. possibilidade das comparações poderem ser feitas com enzimas que são pouco influenciadas por fatores ambientais; d. ausência da influência do peso do caráter, pois todas as enzimas tem o mesmo valor em similaridade na avaliação da divergência genética. LEWONTIN (1974) cita mais algumas vantagens, entre elas se destacam: e. o efeito de substituição alélica no genótipo não depender do ambiente; f. a substituição alélica num loco geralmente pode ser distinguida em relação as outras substituições: g. os locos que são estudados representam uma amostra casual de todos os genes estruturais independente de seu nível de variação. Entre as limitações GOTTLIEB (1977), cita as seguintes: a. o pequeno número de enzimas amostradas, representadas pelas enzimas solúveis envolvidas no metabolismo intermediário; b. a redundância do código genético, que faz com que, sem o uso de técnicas especiais, apenas 30% das substituições de nucleotídeos sejam detectadas (SHAW, 1970). As aloenzimas que possuem mobilidade idêntica, não possuem necessariamente a mesma sequência de aminoácidos. Entretanto, testes adicionais são possíveis para determinar quais aloenzimas com a mesma mobilidade possuem diferentes sequências de aminoácidos.

Mesmo com estas limitações na elucidação eletroforética, a relação entre o fenótipo e genótipo, permanece aceitável, porque suas limitações podem ser especificadas e a direção e margem de erro são geralmente conhecidas (GOTTLIEB, 1977).

A análise genética pode ser simplificada com os dados eletroforéticos porque as bandas de enzimas, com poucas exce-

ções, mostram uma herança do tipo codominante e segregam como simples fatores mendelianos (SCANDALIOS, 1969, 1974). Isto possibilita utilizar testes de progênes para se determinar a ação gênica de um grande número de locos num curto espaço de tempo.

Analisando a íntima relação da eletroforese com a detecção de produtos gênicos diferentes, pode-se ter uma idéia dos diferentes campos da genética aos quais ela pode ser adicionada como ferramenta útil na resolução dos problemas existentes nestas áreas (OLIVEIRA, 1988).

Segundo HUBBY & LEWONTIN (1966) a mobilidade eletroforética das proteínas possibilita obter informações genéticas mais precisas no que se refere a detecção de diferenças fenotípicas causadas por substituições alélicas de um único locus e a estimativa da produção de loci que mostram a variação na população.

Segundo HEIDRICH SOBRINHO (1982) embora a eletroforese possua limites, estes principalmente relacionados a erros na técnica, ela constitui o melhor instrumento para estudos sobre a variação genética e a diversidade genética entre populações.

A técnica da eletroforese pode servir de auxílio a programas de melhoramento vegetal, no sentido de economia de tempo e de dinheiro. Por exemplo, em citrus e mangueiras, plantas originadas de sementes podem ser apomíticas ou derivadas de reprodução sexual. A distinção entre esses dois tipos de plantas é necessária, para a condução de um programa de melhoramento e neste aspecto, a eletroforese permite que a distinção seja feita muito mais precocemente (MEDINA FILHO, 1983).

Segundo HALL (1969), citado por PACCOLA-MEIRELLES et alii a análise genética de isozimas tem demonstrado segregação monogênica para a maioria dos polimorfismos, principalmente em plantas. Disto se conclui que as isozimas são excelentes marcadores genéticos. Espécies e linhagens podem, portanto, serem distinguidas

através do perfil eletroforético em zimogramas. Estas determinações são um excelente auxílio para a taxonomia. Mc. MILLIN(1983) cita que isozimas são enzimas com mesma atividade catalítica, mas com diferentes configurações espaciais.

CHEREMISINOFF et alii(1985) cita que as técnicas de eletroforese são as mais utilizadas com relação ao mapeamento genético.

Segundo WETTER & DICK (1984), afirmam que com a eletroforese, um grande número de amostras podem ser realizadas em rotinas básicas e os resultados são relativamente fáceis de interpretar, comprovando a aplicabilidade desta técnica no estudo da estrutura gênica dos vegetais.

#### 1.b. TIPOS DE GÉIS UTILIZADOS

Os géis de poliacrilamida e de agarose são mais comumente empregados na eletroforese.

Segundo PACCOLA-MEIRELLES, L. D. et alii (1988) o uso de géis de poliacrilamida foi efetivamente introduzido no início da década de 60 e demonstrou ser um dos tipos de suporte mais versáteis. A mesma autora cita que esses géis apresentam a vantagem de serem bem sensíveis, de alto poder de resolução, combinados com economia e simplicidade. Além disso, sua principal qualidade é a de combinar as capacidades fracionadoras da eletroforese livre, fundamentalmente dependente da soma algébrica das cargas eletrostáticas da molécula e da filtração molecular dependente das dimensões das moléculas e das malhas do gel.(GUIMARÃES, 1978).

Já os géis de agarose tem sido utilizados para separar, indentificar ou purificar fragmentos de DNA, bem como na detecção e caracterização preliminar do DNA plasmidial presentes em células bacterianas e de outros microorganismos. Segundo PACCOLA-MEIRELLES, L. D. et alii (1988) a agarpectina e a agarose são dois tipos de polis

sacarídeos constituintes do ágar. A agaropectina, contém ácidos que formam coroas negativas em tampão alcalino provocando deslocamento das frações eletroforéticas por eletroendosmose em direção ao polo negativo, contrariando a migração anódica. Devido este fator, a agarose obtida por purificação do ágar tem sido utilizada com frequência em eletroforese para separação de DNA e análise genética de plasmídios. A localização do DNA dentro do gel, pode ser determinada diretamente através de coloração das bandas com baixas concentrações de agentes fluorescentes, tais como brometo de etídio (SHAPR et alii, 1973).

MEYERS et alii (1976) observaram que a estimativa de massa plasmidial a partir de migração de DNA em géis foi compatível com resultados obtidos por microscópio eletrônico de gradiente de densidade por centrifugação.

PACCOLA-MEIRELLES et alii (1988) cita que em um procedimento eletroforético há que se considerar que o movimento dos íons em um campo elétrico pode ser efetuado por vários fatores, tais como, sinal e intensidade da carga, gradiente de tensão, tempo de corrida, viscosidade do meio e concentração. Desta forma conclui-se que a taxa de migração do DNA através do gel de agarose é dependente do tamanho da molécula de DNA, da concentração da agarose, da conformação do DNA e da corrente elétrica.

#### 1.c. METODOLOGIA

Descreveremos aqui uma das metodologias usadas pelo autor desta revisão.

A eletroforese é uma técnica cheia de minúscias e para o seu êxito um bom treinamento em cada etapa deve ser realizado.

Trata-se de uma eletroforese em gel de poliacrilamida, para determinação da estrutura gênica de vegetais.

O primeiro passo a ser realizado se refere a extração das proteínas do material vegetal. Deve-se, então, macerar o material vegetal a ser estudado em recipiente contendo 5 ml de 10mM TRIS

-HCl pH 8,0. Quando se obter uma pasta cessa-se a masceração e faz-se a filtração em algodão para se separar a parede celular do restante do tecido celular. Obteremos então um extrato que será misturado a acetona (-10°C). A quantidade de acetona a ser utilizada deverá ser 1,5 vezes o volume de 10mM-HCl pH 8,0 acrescentado. Posteriormente deixa-se a -10°C por uma hora para que haja a precipitação da proteína. Centrifuga-se a 7000 RPM por 5 a 10 minutos e descarta-se o sobrenadante. Acrescenta-se 0,2 ml de 10mM TRIS-HCl pH 8,0 e centrifuga-se novamente. Terminado esta etapa pode-se guardar o extrato de proteína em geladeira (-10°C).

Temos que preparar dois géis: Lower gel e upper gel .  
Pode-se usar as seguintes concentrações de acrilamida:

Lower gel	8%	10%	12%	14%	16%
4 x lower buffer	10 ml				
SDS 10%	0,4 ml				
Acril-bis stock	10,6 ml	13,3 ml	16,0 ml	18,7 ml	21,4 ml
Água	18,5 ml	15,8 ml	13,1 ml	10,4 ml	7,7 ml
Persulfato de Amônio					
10%	0,4 ml				
Temed UL	10,0 ml				
Total	40 ml				

	Conc. de acrilamida		
UPPER GEL	3%	4,5%	6,0%
4 x upper buffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Acril. bis stock	1,0 ml	1,5 ml	2,0 ml
água	6,3 ml	5,8 ml	5,3 ml
Resulfato de amônio	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Temed	10,0 ul	10,0 ul	10,0 ul
Total	10 ml	10 ml	10 ml

Sendo:

- a) Acrilamida 30 g Bis - acrilamida 0,8 g/100 ml
- b) 4 x lower buffer TRIS HCl 1,5 M pH 8,8 (181,7 g TRIS/L)

- c) 4 x upper buffer TRIS HCl 0,5M pH 6,8 (60,6/g TRIS/L)
- d) SDS 10%
- e) Persulfato de amônio 10%
- f) 4 x Running buffer stock (RBS) pH, 8,4 (TRIS 60g mais 288g de glicina por 5 litros de água).

Deve-se preparar o seguinte material:-

- espaçador de acrílico de 0,8 mm de espessura - 3 unidades
- duas placas de vidro devidamente limpas e sem riscos
- ágar - água 4%
- presilhas
- pente
- seringa
- pipeta de Pasteur
- micropipetas
- cubas verticais

Montar as placas e vedar as bordas das placas com ágar-água(4%). Então deve-se verter a solução do lower gel com o auxílio de uma seringa, tendo o cuidado para não se formarem bolhas. No caso da formação de bolhas deve-se movimentar vagarosamente a placa para a direita e para a esquerda até que as bolhas desapareçam. A quantidade de solução do "lower gel" é calculada para atingir 4,5 cm da extremidade superior do gel. O restante é preenchido com água desmineralizada. Este processo é necessário para que ocorra a polimerização uniforme da borda superior do gel, pois a acrilamida não polimeriza em presença de oxigênio.

Uma vez polimerizado o gel, verter a placa deixando escoar a água. Secar cuidadosamente com papel de filtro, tomando o cuidado para não tocar no gel.

Posteriormente deve-se preencher o restante da placa com a solução do "upper gel" (gel empilhador), introduzindo-se imediatamente o pente sobre este gel.

Uma vez polimerizado o gel empilhador, retira-se o espaçador inferior da placa. Limpa-se o ágar-água das superfícies e coloca-se a placa, contendo o gel na cuba de corrida. Retira-se, o pente e coloca-se o tampão do eletrodo no tanque inferior com cuidado para não haver formação de bolhas entre o gel e o tampão. Aplica-se as amostras cuidadosamente nos poços com auxílio de micropipetas. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, completa-se os poços contendo as amostras com o tampão. Uma vez preenchidos os poços completa-se o tanque superior da cuba com o tampão do eletrodo.

Leva-se o conjunto ao refrigerador e liga-se à fonte. Normalmente se trabalha com uma voltagem de 70 V até a frente de corrida atingir o final do gel empilhador. Posteriormente se usa 150 V que permanece até o final da corrida.

Assim que a linha azul de bromofenol atingir cerca de 0,5 cm da extremidade inferior do gel, desliga-se a fonte, retira-se cuidadosamente os espaçadores laterais e a placa superior. Corta-se e descarta o gel empilhador.

Posteriormente faz-se a coloração do gel. Para tal operação deve-se deixar o gel já recortado por 12 horas em solução de azul de bromofenol. Para descolorir usa-se ácido acético a 7%.

Depois deve-se proceder a secagem do gel, o qual, então, poderá ser estudado.

#### 1.d. OBJETIVO DO TRABALHO

De uma forma geral este trabalho teve por objetivo promover um estudo sobre a estrutura gênica dos vegetais, dando ênfase a utilização de técnicas eletroforéticas.

#### 2. CONCLUSÃO

O mapeamento genético das plantas é de extrema im

portância ao melhoramento, por criar condições significativas para a compreensão da variação genética e da diversidade genética entre as populações. Destacamos neste aspecto as técnicas eletroforéticas, as quais criam condições viáveis para a execução dos mapas genéticos.

## 3. LITERATURA CITADA

- BIER, M. Electrophoresis: Theory, methods and applications. Academic press inc publishers; 1959. 563p.
- BROWN, A.H.D. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 52:145-57, 1978.
- CHEREMISINOFF, P.N. & OVELLETTE, R.P. Biotechnology; Applications and Research. Lancaster, Technomic, 1985. 669p.
- FRANKEL, O.H. Genet resources. Annals of the New York Academy of Sciences, New York, 287:332-44. 1977
- GOTTLIEB, L.D. Electrophoretic evidence and plant systematics. Annals Missouri Garden, Davis, 64: 161-80, 1977.
- GUIMARÃES, R.C. Eletroforese em gêis de poliacrilamida. Ciência e Cultura, Simp. II, 1978. 137-146.
- HALL, R. Molecular approaches to taxonomy of fungi. Botanic, Rev., 1969. 35: 285-304.
- HEIDRICH-SOBRINHO, E. Isoenzimas como marcadores na identificação de nove linhagens de milho. Pesq. Agropecuária Brasileira. 1982. 17:281-286.
- HUBBY, J.L. & LEWONTIN, R.C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. Genetics. 1966. 54: 577-594.
- HUNTER, R.L. & MARKET, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science. Lancaster, 125:1294-5, 1957.

- LEHNINGER, A.L. Bioquímica: Componentes moleculares das células. Ed. Edgard Blucher Ltda. Vol.1, 1976, 262 p.
- LEWONTING, R.C. Genetic basis of evolutionary change. New York, Columbia University Press, 1974. 346p.
- MARCON, G. Estrutura genética de populações de Stylosanthes humilis, de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Piracicaba, 1988. 179p. (Tese de Doutorado).
- MARKERT, C.L. Biology of isoenzymes. In: MARKERT, C.L., ed. Isozymes; I. Molecular Structure. New York, Academic Press, 1975.p.1-9.
- MARKERT, C.L. & MOLLER, F. Multiple forms of enzymes tissue, ontogenetic and species specific patterns. Biochemistry, New York, 45 : 753-63, 1959.
- McMILLIN, D.E. Plant isozymes; a historical perspective. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, J.J., ed. Isosymes in plant genetics and breeding. Amsterdam, Elsevier, 1983. p.3-15.
- MEDINA FILHO, H.P. Eletroforese em gel de amido: aplicações em genética e melhoramento de plantas. Circular IAC, Campinas, 1983. 121:1-15.
- MEYERS, J.A. et alii, Simple Agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid desoxyribonucleic acid. Journal Bacteriology, 1976. 127:1529-1537.
- NAKAMURA, S. Cross electrophoresis; its principle and applications. Elsevier publishing company, New York, 1966. 194p.
- OLIVEIRA, A.C. Utilização de técnicas eletroforéticas para o estudo de heterose em arroz. Piracicaba, 1988. 105p. (Tese de Mestrado).

- PACCOLA-MEIRELLES, L.D. et alii Manual de Técnicas Eletroforéticas em Microorganismos. FEALQ, 1988. 54p.
- ROSALKI, S.B. Methods in the study of isoenzymes. Histochemical, London, 6: 361-8, 1974.
- SCANDALIOS, J.G. Isozymes in development and differentiation. Annual Review Plant Physiology, Standford, 25: 225-58, 1974.
- SHAW, C.R. Howmany genes envolve? Biochemical Genetic, New York, 4: 275-83, 1970.
- SHAW, D. J. Electrophoresis. Academic press London, 1969. 144p.
- SMITHIES, O. Zone eletrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. Biochemical Journal, London, 61:629-40, 1955.
- WEBB, E.C. The nomenclature of multiple enzyme forms. Enzimologia Bilógica et Clinica. Basel, 5: 124-5, 1965.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

ESTRUTURA GÊNICA DE VEGETAIS

José Henrique Conti

Roberto Pedroso de Oliveira

P I R A C I C A B A

Março, 1989

## INTRODUÇÃO

Nas espécies animais e vegetais, onde um grande número de marcas morfológicas tem sido mapeadas, é possível localizar a posição cromossômica do locus da isozima. Este processo foi realizado em tomate e milho, respectivamente por SCHWARTZ (1971) e RICK & FOBES (1977). A maioria dos mapas relacionam gens que afetam as características morfológicas, como por exemplo, a cor dos olhos em animais e pigmentos em plantas. Como o número de gens que afetam estas características é muito grande, torna-se difícil determinar quais locus são homólogos nas diferentes espécies. Ultimamente, segundo TANKSLEY (1983) tem-se desenvolvido a aplicação de técnicas de caracterização proteica nos estudos genéticos, técnicas estas que tem possibilitado identificar os locus homólogos e comparar o número e a ordem dos locus nas espécies. Estes dados permitem que se faça o estudo da evolução dos cromossomos nas espécies, bem como permite a obtenção de informações necessárias à determinação das relações entre as diferentes taxas genéticas.

Hoje em dia, está bem claro que para cada enzima encontrada em um dado organismo, existem frequentemente mais do que uma forma de isozima, usualmente resultante da atividade de um ou mais gen (TANKSLEY, 1983). Tem-se procurado, desta forma, estudar as propriedades das várias formas de isozimas. Desta forma tem-se feito estudos sobre a posição das bandas, a especificidade dos tecidos, a estrutura quaternária, a localização das isozimas, o seu peso molecular, substratos específicos e sobre a resposta das isozimas à ação de inibidores.

Com relação a posição das bandas, tem-se utilizado técnicas eletroforéticas que promovem a separação das isozimas através de sua carga e tamanho molecular. As isozimas apresentam uma corrida em gel específico e podem ser comparadas em zimogramas. As isozimas homólogas irão apresentar a mesma posição das bandas no gel.

A literatura está repleta de exemplos onde a especificidade dos tecidos tem sido utilizada como uma evidência na identificação de homólogos com isozimas específicas em diferentes espécies (LESLIE & PONTIER, 1980). Como exemplo, TANKSLEY & RICK (1980) citam que no tomate, muitas esterases e peroxidases podem ser distinguidas com base na especificidade dos tecidos.

Com relação aos estudos da estrutura quaternária das isozimas, tem-se utilizado comparações de peso molecular ou técnicas eletroforéticas com gel de poliacrilamida para se determinar a sua estrutura.

Segundo TANKSLEY (1983) as isozimas estão localizadas em compartimentos das células, ou seja, nas mitocôndrias, nos cloroplastos, etc. Através da localização das isozimas codificadas pode-se tirar conclusões sobre os gens homólogos em estudo. Desta forma, se duas espécies de plantas são comparadas e verifica-se que em uma espécie a isozima se encontra na mitocôndria e na outra no cloroplasto, torna-se racional pensarmos que estas formas são homólogas se catalizarem a mesma reação. Para se identificar a localização sub-celular de uma isozima particular, é necessário isolar várias organelas e comparar os zimogramas de seus estratos. Este procedimento, segundo WOMACK & SHARP (1976) tem sido utilizado com sucesso por vários pesquisadores em comparações interespecíficas.

Com base no peso molecular das isozimas pode-se estudá-las utilizando-se a cromatografia ou eletroforese, sendo que nesta última pode-se utilizar diversas concentrações de acrilamida. (HEDRICK & SMITH, 1968).

Um grande número de substratos artificiais tem sido utilizado em diversos ensaios de isozimas, que incluem esterases, fosfatases e peptidases. Usando estes substratos torna-se possível determinar especificidade para cada isozima e fazer comparações interespecíficas por meio destes dados. LESLIE & PONTIER (1980) utilizaram este método para comparar dois gêneros de peixe.

Substâncias que reduzem ou eliminam a atividade de enzimas específicas podem ser usadas para caracterizar e diferenciar as isozimas. Estas substâncias são os inibidores e cada isozima apresenta uma dada resposta a estas substâncias. WOMACK & SHARP (1976) acompanharam as respostas das esterases de ratos na presença de cinco inibidores desta enzima.

Tendo-se compreendido as propriedades das isozimas, torna-se possível a comparação dos mapas genéticos das diferentes espécies. Segundo TANKSLEY (1983) as bandas cromossômicas tem-nos sugerido as semelhanças genéticas entre espécies, linhagens e mutantes. Estes dados são fornecidos através de estudos eletroforéticos e, segundo o mesmo autor, nos mostram alguns blocos de genes semelhantes em diversas espécies. LALLEY et alii (1973) encontrou 60 grupos de locus idênticos entre o homem e o rato, o que sugere estabilidade desses segmentos cromossômicos por mais de 10 milhões de anos desde a divergência entre as espécies. Porém, infelizmente, o número de espécies bem mapeadas é reduzido e é difícil por esse motivo, falarmos sobre a conservação de um gene dentro de grupos taxonômicos acima de famílias. Porém em plantas tem-se observado que os cariótipos não são altamente conservados. Segundo

TANKSLEY (1983) o fato de cariótipos serem similares não necessariamente significa que o arranjo da informação genética tenha sido o mesmo. Como exemplo o mesmo autor cita que grande variação no significado do tamanho do cromossomo e no conteúdo do DNA existem entre as espécies com o mesmo número de cromossomos e sendo estas pertencentes à mesma família. A este fato muitas explicações são possíveis, pois um grande conteúdo de DNA nuclear pode indicar um grande número de gens estruturais ou uma grande quantidade de sequências repetidas. Outro problema da herança é que nem toda mudança cromossômica pode ser detectada.

Hoje em dia as plantas melhores mapeadas são o milho (Zea mays), o trigo (Triticum Aestivum) e tomate (Lycopersicon esculentum) (TANKSLEY, 1983)

Com relação ao mapeamento genético as técnicas de eletroforese são mais utilizadas (CHEREMISINOFF et alii, 1985). Segundo MEIRELLES et alii (1988) a eletroforese é uma técnica que consiste na separação de moléculas (no nosso caso, proteínas) eletricamente carregadas em uma solução, sob influência, de um campo elétrico. Permite separar qualitativamente e quantitativamente os componentes de uma mistura de várias espécies iônicas, onde num campo elétrico unidirecional, cada íon migra isoladamente em direção ao polo de carga oposta, sem modificar sua estrutura e propriedade. Os fatores que afetam a corrida de cada enzima são: carga, configuração, tamanho e pH do meio. A corrida de cada enzima só acabará quando esta atingir o seu ponto isoelétrico.

Como aplicações de eletroforese em genética podemos citar a sua ajuda significativa nos estudos da variação genética e na diversidade genética entre populações (MEIRELLES et alii, 1988). São inúmeros os trabalhos na literatura sobre este assunto. Outras aplicações se referem ao auxílio a programas de melhoramento vege

tal, no sentido de economia de tempo e dinheiro. Por exemplo, em citrus e mangueiras, plantas originadas de sementes podem ser apomíticas ou derivadas de reprodução sexual. A distinção entre esses dois tipos de plantas é necessária para a condução de um programa de melhoramento e neste aspecto a eletroforese permite que a distinção seja feita muito mais precocemente (MEDINA FILHO, 1983).

Segundo WETTER & DICK (1984) afirmam que com a eletroforese, um grande número de amostras podem ser realizadas em rotinas básicas e os resultados são relativamente fáceis de interpretar, comprovando a aplicabilidade técnica desta técnica no estudo da estrutura gênica dos vegetais.

De uma forma geral este trabalho teve por objetivo promover um estudo sobre a estrutura gênica dos vegetais, dando ênfase a utilização de técnicas eletroforéticas.

## CONCLUSÃO

O mapeamento genético das plantas é de extrema importância ao melhoramento, por criar condições significativas para a compreensão da variação genética e da diversidade genética entre as populações. Destacamos neste aspecto as técnicas eletroforéticas, as quais criam condições viáveis para a execução dos mapas genéticos.

## LITERATURA CITADA

CHEREMISINOFF, P.N. & OVELLETTE, R.P. Biotecnology; applications and research. Lancaster, Technomic, 1985. 669p.

HEDRICK, J.L. & SMITH, A.J. Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys, New York, 126: 155-64, 1968.

- LALLEY, P.A.; FRANCKE, U.; MINNA, T.P. Homologous genes for enolase phosphogluconate dehydrogenase, phosphoglucomutase and adenylate Kinase are syntenic on mouse chromosome 4 and human chromosome 1p. Proc. Natl. Acad. Sci. New York 75: 2332-6.1978.
- LESLIE, J.F. & PONTIER, P.J. Linkage conservation of homologous esterase loci in fish, Biochem. Genet., New York, 18: 103-14, 1980.
- MEDINA FILHO, H.P. Eletroforese em gel de amido; aplicações em genética e melhoramento de plantas. Circular IAC, Campinas, 127: 1529-37, 1976.
- MEIRELLES, L.D.P. et alii. Manual de técnicas eletroforéticas em microorganismos. Piracicaba, FEALQ, 1988. 54p.
- RICK, C.M. & FOBES, J.F. Linkage relations of some isozymic loci. Rep. Tomato Genet. Coop. <sup>local</sup> 27:22-4, 1977.
- SCHWARTZ, D. Genetic control of alcohol-dehydrogenase, a competition model for regulation of gene action. Genetics, Chapel Hill, 67:411-25, 1971.
- TANKSLEY, S.D. Isozymes. Amsterdam, Elsevier Science, 1983. 615p. (Developments in plant genetics and breeding, 1A).
- WETTER, L. & DYCK, J. Isoenzyme analysis of cultured cells and somatic hybrids. In: EVANS, D.A.; <sup>todos os autores:</sup> et alii, ed. Hand-book of plant cell culture; techniques for propagation and breeding. New York, MacMillan, 1983. ~~Volume~~ 1, p.607-28.
- WOMACK, J. E. & SHARP, M. Comparative autosomal linkage in mammals: genetics of esterases in Mus musculus and Rattus norvegicus. Genetics, <sup>local</sup> 82:665-75, 1976.

*Handwritten signature*  
10.04.89

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

ESTRUTURA GÊNICA DE VEGETAIS

José Henrique Conti

Roberto Pedroso de Oliveira

P I R A C I C A B A

Março, 1989

## INTRODUÇÃO

Nas espécies animais e vegetais, onde um grande número de marcas morfológicas tem sido mapeadas, é possível localizar a posição cromossômica do locus da isozima. Este processo foi realizado em tomate e milho, respectivamente por SCHWARTZ (1971) e RICK & FOBES (1977). A maioria dos mapas relacionam gens que afetam as características morfológicas, como por exemplo, a cor dos olhos em animais e pigmentos em plantas. Como o número de gens que afetam estas características é muito grande, torna-se difícil determinar quais locus são homólogos nas diferentes espécies. Últimamente, segundo TANKSLEY (1983) tem-se desenvolvido a aplicação de técnicas de caracterização proteica nos estudos genéticos, técnicas estas que tem possibilitado identificar os locus homólogos e comparar o número e a ordem dos locus nas espécies. Estes dados permitem que se faça o estudo da evolução dos cromossomos nas espécies, bem como permite a obtenção de informações necessárias à determinação das relações entre as diferentes taxas genéticas.

Hoje em dia, está bem claro que para cada enzima encontrada em um dado organismo, existem frequentemente mais do que uma forma de isozima, usualmente resultante da atividade de um ou mais gen(TANKSLEY, 1983). Tem-se procurado, desta forma, estudar as propriedades das várias formas de isozimas. Desta forma tem-se feito estudos sobre a posição das bandas, a especificidade dos tecidos, a estrutura quaternária, a localização das isozimas, o seu peso molecular, substratos específicos e sobre a resposta das isozimas à ação de inibidores.

Com relação a posição das bandas, tem-se utilizado técnicas eletroforéticas que promovem a separação das isozimas através de sua carga e tamanho molecular. As isozimas apresentam uma corrida em gel específico e podem ser comparadas em zimogramas. As isozimas homólogas irão apresentar a mesma posição das bandas no gel.

A literatura está repleta de exemplos onde a especificidade dos tecidos tem sido utilizada como uma evidência na identificação de homólogos com isozimas específicas em diferentes espécies (LESLIE & PONTIER, 1980). Como exemplo, TANKSLEY & RICK (1980) citam que no tomate, muitas esterases e peroxidases podem ser distinguidas com base na especificidade dos tecidos.

Com relação aos estudos da estrutura quaternária das isozimas, tem-se utilizado comparações de peso molecular ou técnicas eletroforéticas com gel de poliacrilamida para se determinar a sua estrutura.

Segundo TANKSLEY (1983) as isozimas estão localizadas em compartimentos das células, ou seja, nas mitocôndrias, nos cloroplastos, etc. Através da localização das isozimas codificadas pode-se tirar conclusões sobre os gens homólogos em estudo. Desta forma, se duas espécies de plantas são comparadas e verifica-se que em uma espécie a isozima se encontra na mitocôndria e na outra no cloroplasto, torna-se racional pensarmos que estas formas são homólogas se catalizarem a mesma reação. Para se identificar a localização sub-celular de uma isozima particular, é necessário isolar várias organelas e comparar os zimogramas de seus estratos. Este procedimento, segundo WOMACK & SHARP (1976) tem sido utilizado com sucesso por vários pesquisadores em comparações interespecíficas.

Com base no peso molecular das isozimas pode-se estudá-las utilizando-se a cromatografia ou eletroforese, sendo que nesta última pode-se utilizar diversas concentrações de acrilamida. (HEDRICK & SMITH, 1968).

Um grande número de substratos artificiais tem sido utilizado em diversos ensaios de isozimas, que incluem esterases, fosfatases e peptidases. Usando estes substratos torna-se possível determinar especificidade para cada isozima e fazer comparações interespecíficas por meio destes dados. LESLIE & PONTIER(1980) utilizaram este método para comparar dois gêneros de peixe.

Substâncias que reduzem ou eliminam a atividade de enzimas específicas podem ser usadas para caracterizar e diferenciar as isozimas. Estas substâncias são os inibidores e cada isozima apresenta uma dada resposta a estas substâncias. WOMACK & SHARP(1976) acompanharam as respostas das esterases de ratos na presença de cinco inibidores desta enzima.

Tendo-se compreendido as propriedades das isozimas, torna-se possível a comparação dos mapas genéticos das diferentes espécies. Segundo TANKSLEY (1983) as bandas cromossômicas tem-nos sugerido as semelhanças genéticas entre espécies, linhagens e mutantes. Estes dados são fornecidos através de estudos eletroforéticos e, segundo o mesmo autor, nos mostram alguns blocos de gens semelhantes em diversas espécies. LALLEY et alii (1973) encontrou 60 grupos de locus idênticos entre o homem e o rato, o que sugere estabilidade desses segmentos cromossômicos por mais de 10 milhões de anos desde a divergência entre as espécies. Porém, infelizmente, o número de espécies bem mapeadas é reduzido e é difícil por esse motivo, falarmos sobre a conservação de um gene dentro de grupos taxonômicos acima de famílias. Porém em plantas tem-se observado que os cariótipos não são altamente conservados. Segundo

TANKSLEY (1983) o fato de cariótipos serem similares não necessariamente significa que o arranjo da informação genética tenha sido o mesmo. Como exemplo o mesmo autor cita que grande variação no significado do tamanho do cromossomo e no conteúdo do DNA existem entre as espécies com o mesmo número de cromossomos e sendo estas pertencentes à mesma família. A este fato muitas explicações são possíveis, pois um grande conteúdo de DNA nuclear pode indicar um grande número de gens estruturais ou uma grande quantidade de sequências repetidas. Outro problema da herança é que nem toda mudança cromossômica pode ser detectada.

Hoje em dia as plantas melhores mapeadas são o milho (Zea mays), o trigo (Triticum Aestivum) e tomate (Lycopersicon esculentum) (TANKSLEY, 1983)

Com relação ao mapeamento genético as técnicas de eletroforese são mais utilizadas (CHEREMISINOFF et alii, 1985). Segundo MEIRELLES et alii (1988) a eletroforese é uma técnica que consiste na separação de moléculas (no nosso caso, proteínas) eletricamente carregadas em uma solução, sob influência, de um campo elétrico. Permite separar qualitativamente e quantitativamente os componentes de uma mistura de várias espécies iônicas, onde num campo elétrico unidirecional, cada íon migra isoladamente em direção ao polo de carga oposta, sem modificar sua estrutura e propriedade. Os fatores que afetam a corrida de cada enzima são: carga, configuração, tamanho e pH do meio. A corrida de cada enzima só acabará quando esta atingir o seu ponto isoelétrico.

Como aplicações de eletroforese em genética podemos citar a sua ajuda significativa nos estudos da variação genética e na diversidade genética entre populações (MEIRELLES et alii, 1988). São inúmeros os trabalhos na literatura sobre este assunto. Outras aplicações se referem ao auxílio a programas de melhoramento vege

tal, no sentido de economia de tempo e dinheiro. Por exemplo, em citrus e mangueiras, plantas originadas de sementes podem ser apomíticas ou derivadas de reprodução sexual. A distinção entre esses dois tipos de plantas é necessária para a condução de um programa de melhoramento e neste aspecto a eletroforese permite que a distinção seja feita muito mais precocemente (MEDINA FILHO, 1983).

Segundo WETTER & DICK (1984) afirmam que com a eletroforese, um grande número de amostras podem ser realizadas em rotinas básicas e os resultados são relativamente fáceis de interpretar, comprovando a aplicabilidade técnica desta técnica no estudo da estrutura gênica dos vegetais.

De uma forma geral este trabalho teve por objetivo promover um estudo sobre a estrutura gênica dos vegetais, dando ênfase a utilização de técnicas eletroforéticas.

#### CONCLUSÃO

O mapeamento genético das plantas é de extrema importância ao melhoramento, por criar condições significativas para a compreensão da variação genética e da diversidade genética entre as populações. Destacamos neste aspecto as técnicas eletroforéticas, as quais criam condições viáveis para a execução dos mapas genéticos.

#### LITERATURA CITADA

- CHEREMISINOFF, P.N. & OVELLETTE, R.P. Biotechnology: applications and research. Lancaster, Technomic, 1985. 669p.
- HEDRICK, J.L. & SMITH, A.J. Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys., New York, 126: 155-64, 1968.

- LALLEY, P.A.; FRANCKE, U.; MINNA, T.P. Homologous genes for enolase phosphogluconate dehydrogenase, phosphoglucomutase and adeny late Kinase are syntenic on mouse chromosome 4 and human chromosome 1p. Proc. Natl. Acad. Sci. New York 75: 2332-6.1978.
- LESLIE, J.F. & PONTIER, P.J. Linkage conservation of homologous esterase loci in fish, Biochem. Genet., New York, 18: 103-14, 1980.
- MEDINA FILHO, H.P. Eletroforese em gel de amido; aplicações em genética e melhoramento de plantas. Circular IAC, Campinas, 127: 1529-37. 1976.
- MEIRELLES, L.D.P. et alii. Manual de técnicas eletroforéticas em microorganismos. Piracicaba, FEALQ, 1988. 54p.
- RICK, C.M. & FOBES, J.F. Linkage relations of some isozymic loci. Rep. Tomato Genet.Coop. 27:22-4.1977.
- SCHWARTZ, D. Genetic control of alcohol-dehydrogenase, a competition model for regulation of gene action. Genetics, Chapell Hill, 67:411-25. 1971.
- TANKSLEY, S.D. Isozymes. Amesterdam, Elsevier Science, 1983.615p. (Developments in plant genetics andbreeding, 1A).
- WETTER, L. & DYCK, J. Isoenzyme analysis of cultured cells and somatic hybrids. In: EVANS, D.A. et alii, ed. Hand-book of plant cell culture; techniques for propagation and breeding. New York, MacMillan, 1983. Volume 1, p.607-28.
- WOMACK, J. E. & SHARP, M. Comparative autosomal linkage in mammals: genetics of esterases in Mus musculus and Rattus nordvegicus. Genetics, 82:665-75,1976.