

PROGRAMA ESPECIAL DE TREINAMENTO

EM

BIOTECNOLOGIA

ESALQ - USP

CAPES

Relatório Semestral número 2

2º semestre

1989

Piracicaba, 5 de março de 1989.

Flávio César Almeida Taveres

Fernando César Boscarol

Goran Kuhar Jesovsek

José Henrique Conti

Roberto Pedroso de Oliveira

RELATÓRIO SEMESTRAL DE ATIVIDADES
PROGRAMA ESPECIAL DE IBEINAMENIO
EEI = BIODIETECNOLOGIA

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 César Almeida Tavares
Prof. Associado.

Relatório 2: Período agosto 1989 a fevereiro 1990

II. Informações sobre os Bolsistas

1. Bolsas Docenciais

Fernando César Boscariol	□ 10- semestre Agronomia
Goran Kuhar Jezovsek	□ 8- semestre Agronomia
José Henrique Conti	□ 10- semestre Agronomia
Roberto Pedrosa de Oliveira	□ 8- semestre Agronomia

2. Desempenho acadêmico da graduação

2.1.	NOME	SEMESTRE	MÉDIAS
	F. C. Boscariol	10- ^o	7,9
	G. K. Jezovsek	8- ^o	5,8
	J. H. Conti	10- ^o	7,6
	R. P. Oliveira	8- ^o	6,7

Observação: Em anexo notas das disciplinas cursadas no segundo semestre de 1989.

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 do semestre

A Biotecnologia é um ramo de conhecimento bastante amplo, o que torna mais complicado a atuação integrada nos moldes PET/CAPEB. No semestre destacam-se atividades de caráter mais individual e voltadas à experimentação, com atividades internas no laboratório. Como o grupo conseguiu solidificar conceitos e perceber a área como atividade de cooperação pluridisciplinar, as atividades de pesquisa buscando despertar o interesse por problemas específicos, às vezes representado pelo domínio de uma técnica, foram compreendidas como tal.

Os resultados de pesquisa obtidos trouxeram grande satisfação quando expostos em reuniões científicas, reafirmando a atuação diferenciada do grupo e sua capacidade de motivar outros alunos.

III. Desenvolvimento dos Bolsistas no Programa Especial de Treinamento

1.1. Reuniões do Grupo com o Tutor

21/09 - 2 horas - Desenvolvimento dos trabalhos, visitas, atividades de divulgação - todos os bolsistas.

14/09 - 2 horas - Planejamento, estruturação, relatórios - todos os bolsistas.

23/09 - 1 hora - Discussão do andamento dos projetos - todos os bolsistas.

26/10 - 1 hora - Andamento projetos, programas e divulgação - todos os bolsistas.

07/12 - 2 horas - Balanço do semestre planejado - todos os bolsistas.

08/02/90 - 2 horas - Seleção novos bolsistas, programação, trabalhos, relatório.

1.3. Palestras de outros profissionais

- Obtenção de variedades comerciais de mamão, melão e café utilizando novas tecnologias no melhoramento. Pesquisador do IAC: Herculano Medina.

- Cultura de anteras em trigo e café visando fornecer suporte a programas de melhoramento. Pesquisador do IAC: Luiz Carlos Ramos.

- Melhoramento de cultivares de uvas sem sementes. Pesquisadora do IAC: Irene Ribeiro da Silva Passos.

- Estudos sobre a propagação "in vitro" de flores tropicais visando o mercado externo. Pesquisador do IAC: Carlos Eduardo Ferreira de Castro.

- O papel da universidade x empresa privada no melhoramento. Professor da UNICAMP: William José da Silva.

- Produção massal de vírus visando controle biológico. Professor da UNICAMP: Otávio Henrique Pavan.

1.4. - Outros Seminários, Conferências, Palestras assistidas pelos bolsistas = EEI

- Palestras (J.H. Conti e R.P. Oliveira)

- Situação e perspectiva da iniciação científica no Brasil.

- Introdução ao melhoramento de Pinus.

1.7. - Participação em Congressos

- III Reunião Brasileira de Micorrizas. Realizado de 11 a 14 de setembro de 1989, Piracicaba, SP. (J.H. Conti)

- IX Congresso Brasileiro de Iniciação Científica em Ciências Agrárias. Realizado de 4 a 8 de setembro de 1989, Curitiba, PR. (R.P. Oliveira e J.H. Conti)

- III Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas. Realizado de 9 a 11 de outubro de 1989, Piracicaba, SP. (R.P. Oliveira e J.H. Conti)

1.7. Monografias (Anual)

1.7.1. Orientador: F.C.A. Tavares

Bolsista: F.C. Boscarol

Título: Leveduras resistentes na Biotecnologia de
fermentação alcoólica

Fase atual: Ensaios laboratoriais

1.7.2. Orientador: F.C.A. Tavares

Bolsista: G.K. Jesovsek

Título: Transformação vegetal com *Agrobacterium*

Fase atual: Continuação da pesquisa laboratorial

1.7.3. Orientador: F.C.A. Tavares

Bolsista: J.H. Conti

Título: Cultura de tecidos: proteínas totais e
diferenciação

Fase atual: Análise eletroforética de várias
amostras de *Stylosanthes*

1.7.4. Orientador: F.C.A. Tavares

Bolsista: R.P. Oliveira

Título: Cultura de tecidos: micropropagação sob
diferentes formulações hormonais em *Stylosanthes*

Fase atual: Análise eletroforética de várias
amostras de *Stylosanthes*

1.8. PESQUISA

1.8.1. Título: (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 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, obtenção de mutantes, análises químicas e cromatografias e análise estatística de dados experimentais próprios. Espera-se concluir o projeto em tempo compatível com a apresentação da monografia.

1.8.2. Título: (idem 1.7.2.)

Objetivo: A pesquisa consta da avaliação de diferentes linhagens de *Agrobacterium*, com ênfase na espécie *A. tumefaciens* na sua capacidade de indução de tumores e formação de raízes em *Nicotiana glauca* e *N. glauca*. Esta pesquisa tem o objetivo básico de identificar linhagens eficientes visando 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 de exterior. Seu treinamento nas técnicas microbiológicas e de cultura de tecidos já foi superado estando o mesmo ativamente desenvolvendo 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. Título: (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 de nutrientes e hormônios tem influencia na capacidade de regeneração, o que implica na expressão e diferenciação genica. Estes processos são pouco estudados e a variação no padrão eletroforético em diferentes estágios de desenvolvimento poderá fornecer elementos indicadores para futuros trabalhos. Inclusive pela associação com os meios de cultivo podem ser feitas inferências importantes. O bolsista encontra-se em fase final do treinamento em técnicas de cultura de tecidos e eletroforese estando apto a conduzir os experimentos individualmente.

1.8.4. Título (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: Fermentação alcoólica

Coordenador: Dr. Flávio C.A. Tavares

Período: Setembro - Dezembro 1989

Participante: Fernando César Boscarol

Atividades: Acompanhamento a produção de álcool e das características de um processo desenvolvido em condições industriais, assim como o acompanhamento da ocorrência de contaminantes bacterianos e sua influência no processo fermentativo, realizado na Usina Costa Pinto S/A.

1.10. Leituras: vide em anexo

1.11. Visitas

Instituição: Instituto Agronômico de Campinas (IAC)

Local: Campinas, SP

Objetivo: Incrementar nossos conhecimentos sobre as técnicas de Biotecnologia utilizadas no melhoramento de plantas, tais como a eletroforese e a cultura de tecidos.

Participantes: todos os bolsistas

Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Local: Campinas - SP

Objetivo: Manter contato com professores de outras universidades de destaque nacional, possibilitando a transmissão de experiências sobre a estrutura da pesquisa no Brasil e no exterior.

Participantes: todos os bolsistas

Instituição: Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC)

- ESALOXUSP

Local: Piracicaba - SP

Objetivo: Discutir sobre as perspectivas da Biotecnologia Vegetal no Brasil e os contatos com pesquisadores no exterior e seu valor.

Participante: G. K. Jezovsek

Instituição: Instituto de Produccion y Sanidad
Vegetal, Universidad Austral de Chile

Local: Santiago - Chile

Objetivo: Discutir a situação da Biotecnologia no
Chile, bem como a do melhoramento vegetal como um todo

Participante: G. K. Jezovsek

1.12. Estudo de Língua Estrangeira

J.H. Conti

Cultura Inglesa - First Certificate in English

R.P. Oliveira

CCAA - Curso Básico Completo

F.C. Boscarini

LEBSA - Curso Básico

G.K. Jezovsek

Inglês Completo

1.13. Outras Atividades

a) PIB - Programa de Introdução à Biotecnologia

b) Divulgação do programa

Participantes: todos os bolsistas

B. Aplicação sobre o aproveitamento do grupo

O aproveitamento no semestre é considerado satisfatório e a programação aconteceu dentro das expectativas. Após um semestre com uma série de atividades bastantes diversificadas e obedecendo a uma programação ambiciosa, tivemos um período dedicado prioritariamente à pesquisa, com ênfase nas atividades individuais obedecendo o interesse de cada bolsista, mas contando com a participação grupal estimulada pelo convívio integrado desde o início do programa.

Pode-se afirmar que o grupo continuou mostrando correspondência aos objetivos do programa, desempenhando suas atividades com entusiasmo. O aproveitamento durante o período de férias escolares correspondeu aos objetivos do programa, quando então se obteve melhor desempenho experimental.

IV. Considerações sobre o relacionamento do Grupo

1. 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 disto, o coleguismo e o espírito de colaboração esteve sempre presente 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 agradável e sincero.

3. Com outros alunos que não pertencem ao PET:

Excelente, inclusive aproximando outros colegas que participam inclusive de algumas atividades conjuntas.

4. Com o corpo docente da ESALQ: Excelente, pois são

bons alunos, interessados e dedicados.

V. Resultados alcançados pelo PET

Após um ano de implantação do programa na ESALQ, tem-se verificado que o grupo de Biotecnologia cresceu significativamente. O espaço científico dimensionado pelos alunos foi amplificado conceitual, experimental e vivencialmente. A participação estimulada dentro do modelo PET, mais completa que a iniciação científica e mais envolvente, contribuíram para melhor definição do campo de trabalho. Inclusive dois dos alunos do grupo que concluíram o curso de graduação estão encaminhados para a pós-graduação (Mestrado).

A experiência adquirida permitirá melhorar a programação e também, a metodologia didático-científica para o próximo ano, para o que contribuirão sugestões e definições feitas pelo grupo. Espera-se obter melhor eficiência na condução do programa, com reorientação de algumas atividades e estímulo ao maior entrosamento com outros grupos PET.

VI. Elaboração das atividades eaca e enéxmo acadéico

Atividades

1. Sessões de reflexão - quinzenal
2. Curso de inglês - todo o ano
3. Pesquisa individual - todo o ano
4. Divulgação do programa na ESALQ
5. Participação de eventos científicos na ESALQ e em outras instituições.
6. Visitas técnicas a empresas, instituições de pesquisa, instituições de fomento à pesquisa e setores de administração universitária - todo o ano
7. Monografia individual de pesquisa.



SAG/214-90

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, CONCLUIU o Curso de Graduação em -ENGENHARIA AGRÔNOMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, em 08 de dezembro de 1989, tendo colado grau de ENGENHEIRO AGRÔNOMO em sessão solene realizada em 18 de janeiro de 1990.

ATESTO, outrossim, que o mesmo obteve os seguintes resultados nas disciplinas cursadas no 2º sem./89:

<u>disciplinas</u>	<u>freq.</u>	<u>nota</u>	<u>cred.</u>		<u>res.</u>
			<u>aula</u>	<u>trab</u>	
LAG638 Produção de Sementes	88%	7.4	4.0	-	AP
LER418 Construções Rurais	89%	7.6	4.0	-	AP
LTR653 Tecnologia do Açúcar	93%	8.4	4.0	-	AP
LZO514 Agroecologia e Agricultura Orgânica	96%	8.0	5.0	-	AP
LZT614 Melhoramento de Animais	90%	8.0	4.0	-	AP

Piracicaba, 14 de fevereiro de 1990.

Lúcio Assaf Jr.
 Lúcio Assaf Junior
 -TÉCNICO ADMINISTRATIVO-

V I S T O:

Eliana Filomena Zandoná
 Eliana Filomena Zandoná
 -CHEFE DA SEÇÃO DE ENG. AGRÔNOMICA-

OBS. AP - Aprovado



SAG/215-90

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. GORAN KUCHAR JEZOVSEK, natural de Temuco - CHILE, nascido a 22 de março de 1969, filho de Borivoj Kuhar Cop e de Vlasta Jezovsek, é aluno regularmente matriculado no 9º (nono) 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 das disciplinas cursadas no semestre anterior:

<u>disciplinas</u>	<u>freq.</u>	<u>nota</u>	<u>cred. aula</u>	<u>trab.</u>	<u>res.</u>
LAG630 Plantas Alimentícias	71%	5.6	4.0	-	AP
LER332 Mecânica e Máquinas Motoras	89%	6.4	3.0	-	AP
LER418 Construções Rurais	72%	6.1	4.0	-	AP
LER432 Máquinas e Implementos Agrícolas	88%	6.4	4.0	-	AP
LER571 Irrigação e Drenagem	100%	5.9	4.0	-	AP
LES604 Estudo de Problemas Brasileiros II	82%	6.5	1.0	-	AP
LHO528 Fruticultura I	81%	3.4	-	-	RN
LME602 Estatística Experimental	100%	6.5	5.0	-	AP
LZT450 Zootecnia III-Criação e Exploração Econômica de Animais	92%	5.7	4.0	-	AP

Piracicaba, 14 de fevereiro de 1990.

Lúcio Assaf Jr.
 Lúcio Assaf Júnior
 -TÉCNICO ADMINISTRATIVO-

V I S T O:

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

OBS. AP - aprovado
 RN - reprovado por nota



SAG/216-90

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, CONCLUIU o Curso de Graduação em ENGENHARIA AGRÔNOMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, em 08 de dezembro de 1989, tendo colado grau de ENGENHEIRO AGRÔNOMO em sessão solene realizada - em 18 de janeiro de 1990.

ATESTO, outrossim, que o mesmo obteve os seguintes resultados nas disciplinas cursadas no 2º sem./89:

<u>disciplinas</u>	<u>freq.</u>	<u>nota</u>	<u>cred.</u>		<u>res.</u>
			<u>aula</u>	<u>trab.</u>	
LAG638 Produção de Sementes	94%	7.6	4.0	-	AP
LER418 Construções Rurais	100%	8.5	4.0	-	AP
LES675 Crédito Rural e Mercados Financeiros	100%	5.5	3.0	1.0	AP
LH0651 Paisagismo: Parques Jardins e Floricultura	100%	8.9	4.0	-	AP

Piracicaba, 14 de fevereiro de 1990.

Lúcio Assaf Jr.
 Lúcio Assaf Junior
 -TÉCNICO ADMINISTRATIVO-

V I S T O:

Eliana F. Zandoná
 Eliana Filomena Zandoná
 -CHEFE DA SEÇÃO DE ENG. AGRÔNOMICA-

OBS. AP - Aprovado



SAG/217-90

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. **ROBERTO PEDROSO DE OLIVEIRA**, - natural de Sorocaba - Estado de São Paulo, nascido a 27 de abril de 1967, filho de Walter Pedroso de Oliveira e de Bruna Pedroso de Oliveira, é aluno regularmente matriculado no 9º (nono) semestre do Curso de Graduação em ENGENHARIA AGRO NÔMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, tendo obtido os seguintes resultados nas disciplinas cursadas no semestre anterior:

<u>disciplinas</u>	<u>freq.</u>	<u>nota</u>	<u>.cred.</u> <u>aula</u>	<u>trab.</u>	<u>res.</u>
LAG630 Plantas Alimentícias	100%	8.1	4.0	-	AP
LER571 Irrigação e Drenagem	100%	8.9	4.0	-	AP
LES604 Estudo de Problemas Brasileiros II	76%	7.5	1.0	-	AP
LET692 Entomologia Aplicada	100%	8.2	4.0	-	AP
LFT625 Doenças de Plantas Frutíferas e Hortícolas	100%	10.0	4.0	-	AP
LH0528 Fruticultura I	84%	8.9	4.0	-	AP
LZ0411 Artrópodos Nocivos	93%	9.5	4.0	-	AP
LZT450 Zootecnia III-Criação e Exploração Econômica de Animais	92%	7.4	4.0	-	AP

Piracicaba, 14 de fevereiro de 1990.

Lúcio Assaf Junior
 Lúcio Assaf Junior
 -TÉCNICO ADMINISTRATIVO-

V I S T O:

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

OBS. AP - Aprovado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ

RELATÓRIO

CONGRESSO BRASILEIRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

4 a 8 de setembro de 1989 / Curitiba - PR

José Henrique Conti
Roberto Pedroso de Oliveira

PIRACICABA 1989

O CBICCA (Congresso Brasileiro de Iniciação Científica em Ciências Agrárias) é um evento realizado anualmente com a finalidade de divulgar e incentivar a pesquisa de graduação, além de promover discussões sobre os problemas da área de ciências agrárias.

A filosofia do grupo PET inclui a participação em eventos científicos. Desta forma decidimos apresentar o trabalho "Estudos básicos da cultura de *Sthylosanthes humilis* in vitro" que representa os primeiros resultados de um amplo projeto de pesquisa, referente ao nosso estudo sobre a estrutura gênica de vegetais.

Durante a realização deste congresso tivemos a oportunidade de participar de debates sobre a área de biotecnologia, bem como sobre outros temas importantes das ciências agrárias. Comparecendo a apresentação de trabalhos científicos, pudemos ter uma idéia sobre aquilo que está sendo feito em termos de pesquisa nas escolas de agronomia das diferentes partes do Brasil. Por intermédio dessas sessões verificamos a potencialidade dos recursos oferecidos pela ESALQ os quais estão ao nosso alcance. Acharmos construtivos os trabalhos de iniciação científica apresentado por colegas de escolas com poucos recursos os quais, na medida do possível, realizam trabalhos de média complexidade. Dentro desse aspecto ressaltamos a importância do nosso trabalho, o qual foi muito bem aceito no congresso por representar um passo além da iniciação científica, rumo a abordagens inéditas no Brasil e que necessitam de estudos profundos para a compreensão dos processos envolvidos.

Portanto este congresso foi proveitoso por permitir uma troca de idéias entre estudantes interessados em pesquisar e em propor soluções para o incremento do processo de produção agropecuário.

ESTUDOS BÁSICOS DA CULTURA DE *STHYLOSANTHES HUMILIS*
'IN VITRO'

J.H. Conti*

R.P. Oliveira*

F.C.A. Tavares**

RESUMO

A cultura de *Sthylosanthes* representa uma importante alternativa em relação a composição de pastagens. Esta leguminosa apresenta vantagens relacionadas à tolerância a seca e adaptação a solos pobres. Este trabalho teve por objetivo a avaliação da regeneração de calos de *Sthylosanthes humilis*, comparando-se 4 tipos de explantes em 8 meios de cultura MS contendo diferentes concentrações dos hormônios BAP e NAA. A metodologia utilizada na cultura de tecidos constitui na obtenção dos explantes 'in vitro', em meio MS/4, e posterior inoculação destes nos respectivos meios de cultura. Foram realizadas 12 repetições para cada tratamento. Os resultados permitiram-nos concluir que a maior porcentagem de regeneração de calos ocorreu em meios de cultura que apresentavam as menores concentrações dos hormônios utilizados. Pretendemos, no próximo trabalho, definir os padrões para a cultura de tecidos de *Sthylosanthes humilis*, visando a realização de um estudo sobre a expressão gênica. Para tal analisaremos as diferentes fases de diferenciação da cultura 'in vitro' através de eletroforese de proteínas.

* Alunos de Graduação da ESALQ/USP

** Professor Associado do Departamento de Genética ESALQ/USP

*** Agradecimentos a CAPES.

INTRODUÇÃO

A cultura de *Sthylsanthes* representa uma importante alternativa em relação a composição de pastagens. Esta leguminosa apresenta vantagens relacionadas à tolerância à seca e a adaptação a solos pobres.

A eletroforese é uma técnica que 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 (MEIRELLES *et alii*, 1988). A mesma autora cita que a corrida eletroforética só acaba quando se atinge o ponto isoelétrico de cada proteína e que a corrida depende do pH do meio, do tamanho, da carga e da configuração das proteínas.

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

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.

Desta forma, pretendeu-se realizar um estudo básico sobre a expressão gênica da cultura de *Sthylsanthes humilis* utilizando a técnica da eletroforese de proteínas. Esse estudo seria conduzido 'in vitro', visando a eliminação de fatores exter-

nos que pudessem interferir nos resultados. Neste estudo iremos avaliar se ocorre influência dos hormônios utilizados no meio de cultura e do explante na produção de proteínas específicas. Estudaremos também a variação na expressão gênica das fases de formação de calos, emissão de radícula e regeneração de partes das plantas. Pretende-se também fazer este mesmo estudo em outras culturas de grande importância econômica.

Como a literatura é escassa com relação a cultura de tecidos de *Stylosanthes humilis*, tivemos que procurar definir uma concentração adequada de hormônios para a formação de calo e para a regeneração de plantas. Estes aspectos são o objetivo deste trabalho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Uma das nossas preocupações era a capacitação para a execução correta da técnica de eletroforese, uma vez que os seus maiores limites se relacionem a erros na técnica (HEIDRICH SOBRINHO, 1982). Foram também realizadas algumas eletroforeses visando a adequação desta técnica ao material proveniente de cultura de tecidos, visando estabelecer concentrações adequadas de poliacrilamida nos géis utilizados.

Temos realizado a cultura de tecidos de *Stylosanthes humilis* e as eletroforeses em laboratórios do Departamento de Genética da ESALQ.

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 seu efeito de dormência. 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 250 ml 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; 0,5 mg/l BAP e 2,0 mg/l NAA), meio B (MS; 1,0 mg/l BAP e 2,0 mg/l NAA), meio C (MS; 2,0 mg/l BAP e 2,0 mg/l NAA), meio D (MS; 3,0 mg/l BAP e 2,0 mg/l NAA), meio E (MS; 0,5mg/l BAP e 3,0 mg/l NAA), meio F (MS; 1,0 mg/l BAP e 3,0 mg/l NAA), meio G (MS; 2,0 mg/l BAP e 3,0 mg/l NAA) e meio H (MS; 3,0 mg/l BAP e 3,0 mg/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 7 ml do meio, sendo que o experimento totalizou a utilização de 384 tubos de cultura.

Trinta dias depois foi feita a avaliação do material e o estudo de possíveis meios de regeneração dos calos obtidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação a eletroforese de proteínas, verificamos que com uma concentração de poliacrilamida de 12% pode

mos visualizar nos gêis a expressão gênica dos calos de *Stylosanthes humilis*.

Durante todo o experimento notou-se uma elevada taxa de contaminação, a qual provocou o reinício do experimento por várias vezes. Analisando as variáveis envolvidas concluímos que o tratamento das sementes nos moldes citados não é eficiente para conter a contaminação. Portanto sugerimos que estudos sejam feitos a este respeito, visando a solução deste problema.

Com relação a formação de calos, observamos que os cotilédones apresentam as maiores porcentagens nas concentrações de hormônios utilizados. As folhas por outro lado apresentam os piores resultados.

Dentre os meios de cultura utilizados para formação de calos nos explantes estudados, observamos que as maiores porcentagens foram encontradas nos meios A e B. Estes, respectivamente, eram compostos por MS + 0,5 mg/L BAP + 2,0 mg/l NAA e MS + 1,0 mg/l e BAP + 2,0 mg/l e NAA). Como estes meios eram os que continham as menores concentrações de hormônios, sugerimos que o experimento seja repetido utilizando tratamentos com menores concentrações dos hormônios citados.

CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi realizado permitiu-se concluir que:

- A eletroforese de calos de *S. humilis* deve ser feita com uma concentração de poliacrilamida de 12% .
- Os cotilédones são os melhores explantes para formação de calos.

- Os meios A e B são os melhores para formação de calos, dentre os meios de cultura estudados.

LITERATURA CITADA

- HEIDRICH-SOBRINHO, E. Isoensimas como marcadores na identificação de nove linhagens de milho. IN: Pesq. Agropecuária Brasileira, 1982. 17:281-6.
- MEIRELLES, L.D.P. et alii Manual de técnicas eletroforéticas em microorganismos. Piracicaba, FEALQ, 1988. 54p.
- 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, McMillan 1983, volume 1, p.607-28.

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

ESTUDOS BÁSICOS DA CULTURA DE *STHYLOSANTHES HUMILIS*
'IN VITRO'

PET- BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

José Henrique Conti

Roberto Pedroso de Oliveira

P I R A C I C A B A

Outubro/1989

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

MELHORAMENTO DE CITROS

ROBERTO PEDROSO DE OLIVEIRA
(PET - Biotecnologia Agrícola)

P I R A C I C A B A

Janeiro/1990

INTRODUÇÃO

O Brasil é o 1º produtor mundial e o maior exportador de suco de laranja, sendo os citros uma das maiores fontes de renda do país (SIMÕES, 1988).

Acredita-se que as espécies do gênero, **Citrus** sejam nativas de regiões tropicais e subtropicais da Ásia, tendo sido trazidas para o Brasil nos primeiros anos da colonização (AMARAL, 1982).

O método mais utilizado para a propagação da laranjeira tem sido a enxertia por borbúlia devido as vantagens: uniformidade na produção e qualidade dos frutos; precocidade na produção; maior facilidade na colheita; e a maior tolerância às condições desfavoráveis (PLATT & OPITZ, 1973). Os mesmos autores citam que a propagação por sementes só é recomendada para a produção de porta-enxertos.

Porém, a citricultura brasileira é extremamente vulnerável, devido ao limitado número de cultivares. Segundo GIACOMETTI (1980) justifica-se a necessidade de um programa de melhoramento genético amplo e contínuo para os **Citrus**, objetivando obter novas cultivares precoces de laranja e tangerina e porta-enxertos que se adaptem às variadas condições de solo e que sejam tolerantes à tristeza, à gomose, à seca e a nematoides.

Segundo PASQUAL (1985), o melhoramento das espécies cítricas pelos métodos convencionais muito pouco tem contribuído, pois é seriamente limitado pela ocorrência de poliembrionia, esterilidade masculina, incompatibilidade e lon

go período de juvenilidade dos "seedlings". O mesmo autor cita que a maioria das cultivares tem sido obtidas a partir de mutações espontâneas, o que demonstra um potencial de resposta destas espécies a tratamentos com agentes mutagênicos.

Devido ao grande valor econômico da cultura de **Citrus**, o reduzido número de cultivares existentes e aos impedimentos ao melhoramento genético pelos métodos convencionais decidiu-se fazer um levantamento bibliográfico sobre o emprego das técnicas de biotecnologia no melhoramento genético dessa cultura.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A base genética

Ao iniciarmos um programa de melhoramento devemos primeiramente conhecer a base genética da espécie em questão, suas relações com outras espécies, o germoplasma disponível e o modo pelo qual a espécie se reproduz.

Segundo BUTTON & KOCHBA (1977) as espécies cítricas são alógamas, altamente heterozigotas e as cultivares tem-se mantido inalteradas, por gerações, devido a propagação vegetativa. Esse elevado grau de heterozigose ocorre devido a polinização cruzada, facilidade de mutações espontâneas e prevalescimento da poliembrionia (PASQUAL, 1985).

O número básico de nove cromossomas aparece em algumas variedades, porém existem também as variedades triplóides e tetraplóides. A ausência de sementes normalmente ocorre em variedades poliplóides e, por isso, merece destaque o seu estudo (MOREIRA, 1980).

Muitas espécies e cultivares do gênero **Citrus** possuem a característica de reproduzir-se agamicamente por apomixia ou poliembrionia (MOREIRA et alii, 1947). A poliembrionia em citros é um caráter recessivo e controlado por uma série de genes múltiplos (MAHESHWARI & RANGAS WAMY, 1958).

Segundo MOREIRA (1980) todas as espécies do gênero **Citrus** se inter cruzam, sendo também possível o cruzamento com espécies dos gêneros **Fortunella** e **Poncirus**. Porém, embora as plantas cítricas se inter cruzem, a produção de híbridos de valor comercial é limitada pela alta heterozigose e embrionia nucelar quase sempre presentes.

A cultura de tecidos

A cultura de tecidos vem despontando como método alternativo e vantajoso para a propagação de plantas (SIMÕES, 1988). Segundo a mesma autora a cultura de tecidos permite investigar processos morfológicos, auxilia estudos citogenéticos, proporciona o estudo do desenvolvimento de órgãos isolados das influências de outros tecidos e vem desempenhando papel fundamental nas pesquisas de reguladores de crescimento. Além disso, pode-se destacar o seu uso na recuperação de substâncias farmacêuticas, como ferramenta para hibridação e desenvolvimento de novos cultivares. na multiplicação segura de cultivares desejáveis, na propagação rápida e como auxiliar na manutenção do patrimônio genético de plantas ameaçadas pela exploração humana.

A totipotencialidade é, provavelmente, característica de todas as células vegetais e consiste na propriedade que permite a realização da cultura de tecidos. Segundo

THAN THANH VAN (1981) a cultura de tecidos tem demonstrado a capacidade de diferenciação de tecidos maduros, que assumem característica meristemática para, a seguir, tomar novo rumo de diferenciação na direção de um determinado padrão morfogenético (gema vegetativa, raiz, gema floral ou embrião).

Porém o sucesso do desenvolvimento "in vitro" depende principalmente da escolha apropriada do explante e do meio de cultura (substâncias orgânicas complexas, vitaminas e reguladores de crescimento). Com relação ao explante devemos considerar o tipo, tamanho, idade, época do ano e condições gerais da planta matriz. CHENG (1975) demonstrou que a capacidade de regeneração dos tecidos de uma planta está inversamente relacionada com o grau de juvenilidade do explante. As auxinas e citocininas são os compostos de maior significância na cultura de tecidos de plantas. SKOOG & MILLER (1957) mostraram que com um adequado balanço nos níveis destes dois fatores poder-se-ia estabelecer um controle sobre o crescimento e diferenciação das culturas 'in vitro'. Normalmente uma alta concentração de auxina e baixa de citocinina promove o desenvolvimento de raiz e abundante proliferação de células com formação de calos, enquanto que, o inverso resulta na multiplicação de gemas.

A regeneração de uma planta 'in vitro' pode ocorrer por dois processos morfológicos distintos: através de organogênese com a produção direta de brotações e raízes; e por embriogênese adventícia pela formação prévia de embrião não-zigótico (SIMÕES, 1988).

Novas tecnologias

Como já foi exposto anteriormente, existe uma grande variabilidade dentro dos citros e gêneros estreitamente relacionados, no entanto algumas barreiras como apomixia, esterelidade genética e incompatibilidade tem impedido sua plena utilização em programas de melhoramento. Para ultrapassar essas barreiras estão sendo realizadas a cultura de embriões 'in vitro', o isolamento e fusão de protoplastos, a indução de mutação por irradiação ou por outros agentes mutagênicos e a propagação vegetativa 'in vitro'.

As mutações naturais de gemas em plantas cítricas tem sido importante fonte para obtenção de novas variedades comerciais. Seguindo este exemplo dado pela natureza, pesquisadores têm realizado a mutagênese experimental visando melhorar cultivares selecionados em uma ou poucas características sem alterar o restante do genótipo e induzir variabilidade onde esta inexistente ou é difícil de introduzir, como por exemplo, em cultivares sexualmente estéreis ou apomíticos. Segundo CONSTANTIN (1984) podem ser tratadas grandes populações de indivíduos com agentes mutagênicos e estes serem sujeitos à pressão de seleção sob condições uniformes. Porém o grande impedimento à utilização desta técnica reside na formação de quimeras, onde a mistura de células geneticamente diferentes raramente pode ser evitada quando órgãos multicelulares são submetidos a tratamentos mutagênicos, levando a instabilidade do caráter mutante.

Inúmeras referências tem surgido sobre a instabilidade genética de tecidos de plantas em culturas. As variações mais comumente observadas são alterações no número de

cromossomos, quebras de cromossomos e fragmentações nucleares, mutações de ponto e variações epigenéticas (PASQUAL, 1985). O mesmo autor cita que estas modificações podem pré-existir nos tecidos das plantas ou serem reduzidas por diversos fatores como intensidade de luz, temperatura, tempo de subcultivo e principalmente, por determinados componentes do meio, a exemplo do 2,4-D.

O estabelecimento do "sistema de protoplastos" (regeneração de plantas funcionais a partir de protoplastos isolados) possibilita a aplicação de tratamentos mutagênicos em células individualizadas evitando o quimerismo (GOLDMAN, 1988). A mesma autora acrescenta que esta técnica permite também a seleção em grande escala de diversas características desejadas com economia de tempo e de recursos; a fusão de protoplastos entre espécies incompatíveis; a transferência de organelas celulares; e o uso de técnicas de engenharia genética. ERIKSSON (1985) cita que o termo protoplasto é usado para descrever células livres de parede celular. Essa ausência de parede celular faz com que os protoplastos sejam úteis para uma variedade de manipulações experimentais e de grande relevância em diversos aspectos da cultura de tecidos vegetais, incluindo pesquisas básicas na área de biologia vegetal. No caso específico dos citros, PASQUAL (1985) destaca a importância da fusão de protoplastos para o melhoramento por permitir a indução de mutações pelo tratamento dos protoplastos com agentes mutagênicos e pela possibilidade de hibridação somática inter e intra-específica.

Obtidas as populações devemos realizar a seleção. Segundo o IAEA (1985) a seleção 'in vitro' possibilita a economia de espaço, tempo e de recursos, tanto humanos como finan-

ceiros, pois somente as plantas com chances de possuir a característica desejada, são selecionadas e levadas ao campo.

Porém, embora a seleção 'in vitro' apresente muitas vantagens em relação à seleção no campo, deve ficar claro que algumas características não podem ser avaliadas 'in vitro' como por exemplo, seleção para aumento de produção (GOLDMAN, 1988). A mesma autora acrescenta que a seleção 'in vitro' nunca elimina a necessidade da posterior avaliação no campo, mas acarreta uma grande diminuição no número de plantas a serem testadas no campo, aumentando a probabilidade na obtenção de plantas com as características desejadas.

Caso seja identificado um mutante com características de interesse, este precisa ser multiplicado em grande escala e rapidamente, o que é possível com o uso das técnicas de cultura de tecidos (ALTMAN & GOREN, 1977).

CONCLUSÃO

Neste trabalho procurei estudar e relatar a situação atual do melhoramento de citros, abordando suas dificuldades e as metodologias que prometem trazer as soluções. Fica evidente pelo exposto, que muito temos que estudar e pesquisar para que possamos produzir as cultivares com as características que todos nós desejamos.

LITERATURA CITADA

- ALTMAN, A. & GOREN, R. Horticultural and physiological aspects of citrus bud culture. Acta Horticultural. 1977.78: 51-60.

- AMARAL, J.D. Os citrinos. 3 ed. Lisboa, Clássica, 1982.78lp.
- BUTTON, J. & KOCHBA, J. Tissue culture in the citrus industry. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. eds. Applied and fundamental aspects of plant all tissue and organ culture. Springer -Verlag, 1977, p.70-92.
- CHENG, T.Y. Adventitious bud formation in culture of douglas fir. Plant Sci. Letters, 5: 97-102, 1975.
- CONSTANTIN, M.J. Potential of in vitro mutation breeding for the improvement of vegetatively propagated crop plants. In: IAEA, ed. Induced mutation for crop improvement in Latin America. Vienna, IAEA, 1984. p.59.77.
- ERIKSSON, T.R. Protoplast isolation and culture. In: Fowle, L.C. & Constabel, F. , eds. Plant protoplasts, Florida, CRC. Press, 1985. p.1-20.
- GIACOMETTI, D.C. Taxonomia e nomenclatura dos citros. In: RODRIGUEZ, O. & VIEGAS, F. eds. Citricultura Brasileira, 1980. V.1. p.185-94.
- GOLDMAN, M.H.S. Cultura de tecidos nucelares, isolamento e Radiossensitividade de protoplastos de Citrus sinensis L. Piracicaba, 1988. 127p. (Tese de Mestrado).
- IAEA - International Atomic Energy Agency/joint.FAO. Mutation breeding for disease resistance using 'in vitro' culture techniques. Vienna, 1985. 42p.
- MAHESHWARI, P. & RANGASWAMY, N.S. Polyembryony and in vitro culture of citrus and mangifera. Indian J. Hort. Bangalore. India, 15: 275-286. 1958.
- MOREIRA, C. S. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O. &

- VIEGAS, F. eds. Citricultura Brasileira, 1980. v.1. p.197-218.
- MOREIRA, S.; GURGEL, J.T.A.; ARRUDA, L.F. Poliembrionia em Citrus. Bragantia. Campinas, São Paulo, 7:69-106.1947.
- PASQUAL, M. Regeneração de plantas 'in vitro' e radiosensitividade de tecidos nucelares de citros. Piracicaba, 1985. 106p. (Tese de Doutorado).
- PLATT, R.G. & OPITZ, K.W. The propagation of citrus. In:REUTER, W. ed. The citrus industry. Riverside, University of California, 1973. vol.3,p.1-47.
- SIMÕES, M.O.M. Antogênese de gemas e raízes adventícias de Citrus sinensis cultivadas 'in vitro'. Viçosa, 1988.56p. (Tese de Mestrado).
- SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated in vitro. In:Biological action of growth substances. 1957.11: 118-31.
- TRAN THANH, VAN,M. Control of morphogenesis 'in vitro' cultures. Ann. Rev. Plant Physiol., 32:291-311. 1981

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

OBTENÇÃO E ENSAIOS ELETROFORÉTICOS EM CALOS DE
Stylosanthes humilis H.B.K.

Roberto Pedroso de Oliveira

José Henrique Conti

P I R A C I C A B A

Fevereiro / 1990

RESUMO

A espécie *Stylosanthes humilis* é uma importante forrageira em áreas tropicais, pois pode ser utilizada em solos pouco férteis, arenosos e regiões secas.

A cultura de tecidos e a eletroforese são métodos vantajosos para estudos de biologia das espécies. A cultura de tecidos auxilia estudos citogenéticos, possibilita investigar processos morfológicos, serve como ferramenta para hibridação e possibilita a multiplicação de cultivares desejáveis. A eletroforese constitui o melhor instrumento para estudos sobre a variação genética, a diversidade genética entre populações e como marcadores genéticos independentes da interferência do homem e do ambiente.

Este trabalho teve como objetivos a determinação de uma metodologia para formação de calos da espécie *Stylosanthes humilis* H.B.K. e a realização de estudos sobre a estrutura genética desta espécie através da eletroforese de proteínas totais.

Com relação a formação de calos utilizou-se 9 combinações de NAA e BAP em meio MS e 3 tipos de explantes. A análise estatística foi realizada obedecendo a um esquema fatorial, onde foram estudados os efeitos do explante independentemente do meio e vice-versa, bem como os efeitos da interação meio x explante.

Neste trabalho também são fornecidos detalhes importantes sobre a execução da eletroforese de proteínas totais em calos de *Stylosanthes humilis* H.B.K..

INTRODUÇÃO

O gênero *Stylosanthes* ocorre na América do Sul e Central, África, Sri Lanka e sudeste da Índia (ROBINSON & MEGARRITY, 1974). No Brasil, a ocorrência de diferentes espécies do gênero se verifica desde o norte até o sul do país, com predominância no Nordeste e Brasil Central (FERREIRA & COSTA, 1979).

Segundo VIEIRA (1988) o interesse científico pelo gênero *Stylosanthes* Sw. tem aumentado desde a última década devido a descobertas de muitas espécies que são potencialmente importantes como forrageiras para áreas tropicais. Dentre estas espécies, GILLARD & FISHER (1978) citados por MARCON (1988) destacam o *Stylosanthes humilis* por poder ser utilizada em solos pouco férteis, arenosos e regiões secas tropicais e subtropicais. Outra vantagem do *Stylosanthes* se refere a grande variabilidade inter e intra-específica apresentada pelo gênero (CAMERON, 1974), o que consiste num excelente germoplasma para um programa de melhoramento.

A cultura de tecidos vem despontando como método vantajoso para estudos de biologia das espécies. Segundo SIMDES (1988) a cultura de tecidos permite a demonstração da totipotencialidade das células vegetais, auxilia estudos citogenéticos, possibilita investigar processos morfológicos, proporciona o estudo do desenvolvimento de órgãos isolados das influências de outros tecidos e vem desempenhando papel fundamental nas pesquisas de reguladores de crescimento. Além

disso, segundo a mesma autora, pode-se destacar seu uso na recuperação de substâncias farmacêuticas, como ferramenta para hibridação e desenvolvimento de novos cultivares, na multiplicação segura de cultivares desejáveis, na propagação rápida e com alto coeficiente de multiplicação e como auxiliar na manutenção do patrimônio genético de plantas ameaçadas pela exploração humana.

Estudos de SKOOG & TSUI (1948) sobre os processos organogenéticos demonstraram que o balanço entre os reguladores de crescimento é o principal fator que define o sucesso da cultura de tecidos. Os hormônios atuam nas plantas regulando, coordenando e guiando os processos de desenvolvimento normal, tanto no crescimento como na diferenciação de tecidos, uma vez que controlam as atividades e os metabolismos celulares (RACHAVAN, 1975).

As auxinas e as citocininas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos. Segundo THIMANN (1972) as auxinas controlam os processos de dominância apical, alongação da célula em raízes e brotos, alteração na permeabilidade do plasmalema, formação de etileno, indução e formação de raízes adventícias, aumento na taxa de respiração e a formação de frutos partenocárpicos em algumas espécies. O mesmo autor acrescenta que elas também inibem a formação de embrião em cultura de células em suspensão, causam irregularidades mitóticas em cultura de tecidos de longa duração e, em altas concentrações, induzem a desorganização do crescimento.

As auxinas mais utilizadas em meio de cultura para diferenciação são classificadas de acordo com sua atividade em IAA, IBA, NAA, CPA e 2,4-D; sendo as concentrações comumente utilizadas de 0,01 a 10,0 mg/l (SOEDING, 1961).

Por outro lado, as citocininas atuam no crescimento celular; diferenciação do tecido; várias fases do florescimento, frutificação e da senescência; duplicação do DNA (mitose); desenvolvimento dos cloroplastos; estímulo da germinação; pegamento e crescimento dos frutos; retração na senescência da folha (SKOOG, 1971).

A variabilidade constitui um dos fatores chave da evolução dos eucariotos e sua presença possibilita a adaptação das espécies às mudanças ambientais (PANDEY, 1969). Segundo MARCON (1988) a variabilidade genética surge como resultado da atuação de várias forças como a mutação, a recombinação e o fluxo gênico, sendo importante a compreensão desses mecanismos para condução de um programa racional de melhoramento.

Dentre as técnicas que são de grande valia em estudos genéticos, populacionais, taxonômicos e evolucionários de seres vivos destaca-se a eletroforese (FACCOLA-MEIRELLES et alii, 1988). Segundo BROWN (1978) a eletroforese como técnica que revela as proteínas, tem ampla aplicação na avaliação da estrutura genética em plantas, pois detecta com facilidade as diferenças genéticas a nível de DNA em amostras representativas de populações.

O princípio geral da eletroforese envolve a separação de proteínas pela passagem de uma corrente elétrica através de um meio suporte que contém uma solução ionizada, onde esta aplicada uma mistura de proteínas. Estas são separadas pelas diferenças moleculares de carga elétrica, tamanho e forma, determinando assim diferenças na velocidade de migração num gel com porosidade homogênea (MARCON, 1988).

GOTTLIEB (1977) relaciona outras vantagens da eletroforese tais como a colinearidade que assegura as comparações sistemáticas poderem ser produtos de genes homólogos e a possibilidade de comparações poderem ser feitas com enzimas que são pouco influenciadas por fatores ambientais. O mesmo autor cita, como desvantagens desta técnica, o pequeno número de enzimas amostradas e a redundância do código genético, o que faz com que, sem o uso de técnicas especiais, apenas 30% das substituições de nucleotídeos sejam detectadas.

Apesar de seus limites a eletroforese constitui o melhor instrumento para estudos sobre a variação genética, a diversidade genética entre populações e como marcadores genéticos independentes da interferência do homem e do ambiente (HUBBY & LEWONTIN, 1966; HEIDRICH SOBRINHO, 1982).

Este trabalho teve como objetivos a determinação de uma metodologia para estabelecimento da cultura de tecidos da espécie *Stylosanthes humilis* H.B.K. e a realização de estudos sobre a expressão gênica desta espécie nas diferentes fases de diferenciação de seus tecidos através da eletroforese de proteínas totais.

MATERIAL E MÉTODOS

Temos realizado a cultura de tecidos "in vitro" de *Stylosanthes humilis* H.B.K. no Laboratório Central de Cultura de Tecidos da ESALQ e as eletroforeses no Laboratório de Genética de Leveduras do Departamento de Genética da ESALQ.

a) Cultura de tecidos

Com relação ao procedimento adotado para a cultura de tecidos, utilizamos a seguinte sequência. Inicialmente é feita a escarificação das sementes de *Stylosanthes* com a finalidade de diminuir o efeito de dormência. As sementes são esterelizadas através de seu mergulho, 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 germinam em frascos de 250 ml contendo 20 ml de meio de cultura, tendo permanecidas sob condições controladas de luz e temperatura. Nestas condições teremos plantas saudáveis e jovens, as quais consistem em material ideal para fornecimento de explantes (SUNDERLAND, 1974; ANAGNOSTAKIS, 1984).

Após 20 dias faz-se a inoculação dos explantes. Esclarecemos que os explantes são produzidos "in vitro" para diminuirmos a taxa de contaminação. Os explantes utilizados foram os de epicótilo, hipocótilo e cotilédone. Estes foram inoculados em nove meios de cultura MS com concentrações distintas de NAA e BAP.

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

A composição do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) foi a seguinte:

Macronutrientes: NH₄ NO₃ ----- 20,6 ml/l
 KNO₃ ----- 18,8 ml/l
 CaCl₂ ----- 3,0 ml/l
 MgSO₄ ----- 1,5 ml/l
 KH₂ PO₄ ----- 1,25 ml/l

Micronutrientes: NaFeEDTA 5mM ----- 5 ml/l
 Micro 100 x ----- 1 ml/l

Carboidratos: Sacarose ----- 30 g/l

Vitaminas e outros compostos orgânicos:

tiamina ----- 1,0 mg/l
 ác nicotínico ----- 10,0 mg/l
 piridoxina ----- 10,0 mg/l
 glicina ----- 10,0 mg/l

Agar: 7 g/l

pH do meio 5,8 + 0,1

Com relação a inoculação dos explantes utilizou-se três plantas para cada meio, onde em cada planta eram retiradas duas amostras de cada tipo de explante. Esta etapa foi conduzida em tubos de cultura de 7 ml do meio, sendo que o experimento totalizou a utilização de 240 tubos de cultura.

Trinta dias depois se fez a avaliação dos calos obtidos, selecionando-se os melhores para se fazer a eletroforese.

O delineamento estatístico utilizado foi um fatorial. Avaliou-se a porcentagem de calos formados a partir dos diferentes tratamentos estudados, visando a definição da melhor combinação de hormônios no meio e do melhor explante.

b) Eletroforese

Utilizou-se o sistema SDS-PAGE. Este consiste na desnaturação de proteínas e determinação do número de cadeias polipeptídicas em gel de poliacrilamida.

A eletroforese é uma técnica repleta de detalhes, o que exige para sua perfeita realização um treinamento adequado para correta execução de suas etapas: montagem e vedação do suporte, preparação e colocação dos géis, preparação e colocação das amostras, corrida eletroforética.

Porém não basta conhecermos o princípio da técnica, mas também há a necessidade de adaptarmos esta a cultura que desejamos trabalhar, para que possamos obter os resultados desejados. Este trabalho foi realizado com relação a calos de *Stylosanthes humilis* H.B.K. e os resultados encontram-se a seguir.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

a) Cultura de tecidos

Os resultados obtidos, quanto as médias das porcentagens de calos formados a partir de diferentes explantes de *Stylosanthes humilis* H.B.K. em meios de cultura MS com diferentes concentrações de NAA e BAP encontram-se na Tabela I. Nesta tabela verifica-se que os explantes epicótilo e hipocótilo apresentaram maior diferenciação nos meios A, B, D, I o que demonstra haver pouca diferença entre eles com relação ao melhor meio para sua diferenciação. Com relação ao explante cotilédone, este apresentou uma maior capacidade de diferenciação, não dependendo tanto do balanço dos hormônios, como aconteceu com os outros tipos de explante. Apenas no meio C houve baixa porcentagem de formação de calos utilizando-se o cotilédone como explante.

Avaliando-se a porcentagem de formação de calos nos meios de cultura MS com diferentes concentrações de NAA e BAP, obteve-se que os melhores meios de cultura são o A, B e D, independentemente do explante utilizado (Tabela I).

Nas tabelas II e III podemos verificar a análise estatística levando em consideração os resultados produzidos pela diferenciação de cada explante em cada meio. Observa-se que nos meios A,B,C,D,F,I não houve diferença significativa produzida pela utilização de diferentes explantes. Porém houve diferenças nos meios E,G,H, onde o cotilédone apresentou os melhores resultados de diferenciação.

Com relação às médias das porcentagens de calos formados nos explantes cotilédone, hipocótilo e epicótilo, independentemente do meio utilizado, verificamos que o explante cotilédone apresentou o melhor resultado (Tabela III). Os explantes epicótilo e hipocótilo apresentaram média inferior e não diferiram estatisticamente entre si.

Após a realização do trabalho e análise dos resultados sugerimos que seja realizado um estudo utilizando-se 0 mg/l de cada hormônio para observar se há diferenciação simplesmente no meio MS e que se teste concentrações de auxinas sem citocininas e vice-versa, para se estudar o efeito isolado de cada hormônio na diferenciação desta espécie.

Tabela I - Médias das porcentagens de calos formados a partir de diferentes explantes de *Stylosanthes humilis* H.B.K. em meios de cultura MS com diferentes concentrações de NAA e BAP. Piracicaba, 1990.

meio de cultura	explante			
	cotil.	epic.	hipoc.	total
% calos formados				
A	90,0 a	90,0 a	90,0 a	90,0 a
B	90,0 a	90,0 a	60,0 abc	80,0 ab
D	75,0 a	60,0 ab	75,0 ab	70,0 abc
I	75,0 a	45,0 abc	45,0 abc	55,0 bcd
F	60,0 ab	30,0 bc	45,0 abc	45,0 cde
G	90,0 a	30,0 bc	15,0 c	45,0 cde
E	90,0 a	15,0 bc	30,0 bc	45,0 cde
H	75,0 a	00,0 c	30,0 bc	35,0 de
C	15,0 b	15,0 bc	45,0 abc	25,0 e
DMS (Tukey 5%)	51,2	51,2	51,2	29,5
CV (%)	35,6	35,6	35,6	35,6

(*) Dados transformados para $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$.

Tabela II - Médias das porcentagens de calos formados em meios de cultura MS com diferentes concentrações de NAA e BAP a partir de diferentes explantes de *Stylosanthes humilis* H.B.K. Piracicaba, 1990.

explante	meio de cultura				
	A	B	C	D	E
	% calos formados				
cotilédone	90,0 a	90,0 a	15,0 a	75,0 a	90,0 a
epicótilo	90,0 a	90,0 a	15,0 a	60,0 a	15,0 b
hipocótilo	90,0 a	60,0 a	45,0 a	75,0 a	30,0 b
DMS (Tukey 5%)	38,1	38,1	38,1	38,1	38,1
CV (%)	35,6	35,6	35,6	35,6	35,6

(*) Dados transformados para arc sen $\sqrt{x/100}$

Tabela III - idem Tabela II.

explante	meio de cultura				
	F	G	H	I	Total
	% calos formados				
cotilédone	60,0 a	90,0 a	75,0 a	75,0 a	73,3 a
epicótilo	30,0 a	30,0 b	00,0 b	45,0 a	41,7 b
hipocótilo	45,0 a	15,0 b	30,0 b	45,0 a	48,3 b
DMS (Tukey 5%)	38,1	38,1	38,1	38,1	12,7
CV (%)	35,6	35,6	35,6	35,6	35,6

(*) Dados transformados para arc sen $\sqrt{x/100}$.

b) Eletroforese

A primeira etapa de uma eletroforese vertical se refere ao preparo das amostras. Esta etapa é fundamental pois a presença de proteínas em quantidade suficiente para a corrida é necessária. Como nos interessa a avaliação da expressão gênica de calos, deve-se tomar o máximo cuidado para que toda proteína seja extraída possibilitando a corrida. Para que esta etapa obtenha sucesso devem ser macerados os calos em "eppendorff", utilizando-se um bastão de vidro com ponta modificada de modo a ter o mesmo formato do fundo do recipiente. Faz-se, então, a extração em solução 10 mM Tris HCl pH 8,0. Nesta etapa deve-se utilizar o mínimo possível da solução extratora para que não se obtenha uma amostra com baixa concentração de proteínas.

Em seguida deve-se utilizar a acetona como agente desidratante para precipitação das proteínas. Após deixar a acetona agindo por 30 minutos deve-se centrifugar e em seguida remover esse produto deixando os "eppendorffs" de ponta cabeça para eliminação do desidratante. As proteínas são, então, ressuspensas em tampão composto por 10 mM Tris HCl pH 8,0.

Posteriormente deve-se fazer a quantificação e padronização das amostras. A quantificação nos fornece a concentração de proteínas existente nas amostras e é necessária para verificarmos se existe material suficiente para a corrida. A padronização consiste em igualarmos as concentrações de proteínas das amostras, possibilitando a análise comparativa de variantes a serem estudadas. A quantificação deve ser realizada comparando-se a coloração da amostra com colorações produzidas por diferentes

concentrações de albumina. Em seguida constrói-se a curva de padronização e são igualadas as concentrações de proteínas das amostras.

A obtenção de uma concentração de proteínas de 60 ug é suficiente e ideal para se fazer a eletroforese. Concentrações baixas acabam levando a não aparição das bandas, ao passo que elevadas concentrações levam a corridas que apresentam baixa resolução.

As amostras podem, então, ser submetidas a eletroforese ou armazenadas em congelador. Esse período de armazenamento não deve exceder 10 dias, pois começará a ocorrer diminuição da resolução da corrida. Em se tratando de fazer a eletroforese, as amostras devem ser misturadas ao tampão carregador, o qual é composto por 2 mercapto-etanol, azul de bromofenol 0,1%, SDS 10%, tampão superior, glicerol e água deionizada.

A etapa seguinte consiste na montagem e vedação do suporte para colocação dos géis. Dois tipos de géis são utilizados nesse sistema vertical: o empilhador e o separador. O gel empilhador visa organizar a frente de proteínas, fazendo com que todas as amostras empilhem-se a uma mesma altura do gel. O gel separador, por ser denso, impõe uma resistência a corrida das proteínas, a qual é proporcional ao seu tamanho.

Observamos que para que haja uma boa resolução, deve-se utilizar concentrações de poliacrilamida de 4,5% e 12% nos géis empilhador e separador respectivamente.

A composição dos géis recomendadas é a seguinte:

componente	gel empilhador	gel separador
	concentração de acrilamida	
	4,5%	12%
Acrilamida 30% e Bis acrilamida 0,8%	1,5 ml	16,0 ml
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	0,0 ml	10,0 ml
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 ml	0,0 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,4 ml
Água	5,4 ml	13,1 ml
TEMED	10,0 ul	10,0 ul
Persulfato de amônio 10%	0,1 ml	0,4 ml
Total	10,0 ml	40,0 ml

Após a adição do gel separador devemos adicionar um filme de água para que seja evitada a deformação do gel durante a polimerização, pois a solução não se polimeriza na presença de oxigênio. Um detalhe importante a ser acrescentado se refere a deixarmos o pente da eletroforese em solução de triton 1%, para que não haja rompimento das canaletas na ocasião da sua retirada.

A última etapa consiste na corrida, devendo-se preencher o tanque inferior com tampão de corrida, tendo-se o cuidado de inclinar a cuba para evitar a formação de bolhas.

Posteriormente devemos colocar as amostras já preparadas nas canaletas, não devendo serem superiores a 50 ul, o que poderia levar a contaminações.

Estando as canaletas cheias, pode-se encher o tanque superior com tampão de corrida e iniciar a eletroforese propriamente dita.

A corrida é realizada em geladeira trabalhando-se com uma voltagem de 75 volts até se atingir o gel separador e de 150 volts até o final da corrida.

Neste trabalho foram realizadas várias eletroforeses de calos de *Stylosanthes humilis* H.B.K.. Infelizmente as amostras de calos obtidas da cultura de tecidos não foram suficientes para proporcionar um estudo da expressão gênica nesta cultura como se pretendia. Porém acreditamos que a técnica de eletroforese de proteínas totais foi assimilada, bem como tivemos uma boa experiência da necessidade de planejamento prévio de experimentos. Este trabalho também nos permitiu uma familiarização com o material e técnicas de laboratório, bem como com os estudantes de pós graduação, que juntamente com o tutor do programa, colaboraram para a solução dos problemas que surgiram.

CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi conduzido, permitiu-se concluir que:

a) Cultura de tecidos

- O cotilédone é o explante que proporciona maior porcentagem de diferenciação nas combinações de hormônios estudadas.

- Ocorre um comportamento semelhante entre os explantes hipocótilo e epicótilo com relação às melhores combinações de hormônios estudadas.

- Elevadas concentrações de NAA e BAP são, em geral, ruim para a diferenciação dos tecidos.

- Os tratamentos A,B e D apresentaram as maiores porcentagens de formação de calos, independentemente do explante utilizado.

- A melhor combinação de explante x balanço hormonal encontrada foi: meio MS mais 0,5 mg/l de NAA e 0,1 mg/l de BAP usando o cotilédone como explante.

b) Eletroforese

Neste item são fornecidos detalhes importantes sobre a execução da eletroforese em calos de *Stylosanthes humilis*, os quais foram obtidos após várias repetições da técnica em questão:

- Extração das proteínas em "ependorff" para se evitar a perda de amostra.

- Utilizar o mínimo possível de solução extratora de proteínas para não reduzir muito a concentração de proteínas.

- Remover totalmente o agente desidratante.

- Fazer a quantificação e padronização das amostras para possibilitar uma corrida com a presença de bandas com boa definição.

- Utilizar amostras com uma concentração de 60 ug de proteínas para se fazer a eletroforese.

- Não armazenar as amostras em congelador por muito tempo.

- Usar concentrações de acrilamida de 4,5% e 12% nos géis empilhador e separador respectivamente, para que haja boa distribuição das bandas no gel.

- Deixar o pente em solução triton 1%, para facilitar a sua remoção e evitar o rompimento das canaletas.

- Usar no máximo 50 ul em cada canaleta de corrida, para evitar contaminações.

LITERATURA CITADA

- ANAGNOSTAKIS, S.L. Haploid plants from anthers of tobacco-enhancement with charcoal. *Planta*, Berlin, 155:281-3, 1984.
- BROWN, A.H.D. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 52: 145-57, 1978.
- CAMERON, D.F. Novel variation from wide crosses in the *Stylosanthes* genus. In: *International Grassland Congress*, 12, Moscou, 1974. Proceedings, Moscou, 1974. v.2 p.40-4.
- FERREIRA, M.B. & COSTA, N.M.S. O genero *Stylosanthes* no Brasil. Belo Horizonte, 1979, 107p.
- GOTTLIEB, L.D. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Annals Missouri Garden*, Davis, 64:161-80, 1977.
- HEIDRICH-SOBRINHO, E. Isoenzimas como marcadores na identificação de nove linhagens de milho. *Pesq. Agropec. Bras.*, 17:281-86, 1982.
- HUBBY, J.L. & LEWONTIN, R.C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations: I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, Princeton, 54:577-94, 1966.

- MARCON, G. Estrutura genética de populações de *Stylosanthes humilis* H.B.K. (Leguminosae) de três regiões ecogeográficas do estado de Pernambuco. Piracicaba, 1988. 177p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP)
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*, 1962, 15:473-97.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D. et alii Manual de Técnicas Eletroforéticas em Microorganismos. Piracicaba. FEALQ, 1988, 54p.
- PANDEY, K.H. Elements of S gene complex. V. Interspecific cross-compatibility relationship and theory on the evolution of the S complex. *Genetics*, Princeton, 40:447-74, 1969.
- RACHAVAN, V. Induction of haploid plants from anther culture of henbane. *Z. Pflanzenerphysiol.*, Jena, 76:89-92, 1975.
- ROBINSON, P.J. & MEGARRITY, R.G. Characterization of *Stylosanthes* introductions by using seed protein patterns. *Australian Journal of Agricultural Research*, Melbourne, 26(3):467-79, 1974.
- SIMÕES, M.O.M. Antogênese de gemas e raízes adventícias de *Citrus sinensis* cultivados "in vitro". Viçosa, 1988. 56p. (Tese de Mestrado).

- SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated in vitro. In: *Biological action of growth substances*. 1957. 11:118-31.
- SKOOG, F. Aspects of growth factor interactions in morphogenesis of tobacco tissue cultures. In: *Les cultures de tissus de plantes*. Colloques Intern. C.N.R.S., 193. Paris, 1971.
- SOEDING, H. Die auxine-historische uebersicht. In: Ruhland, W., ed. *Encycloepedia of plant physiology*. Berlin, Springer-Verlag, 1961. p.450-84.
- SUNDERLAND, N. Anther culture as a means of haploid induction. In: KASHA, K.J., ed. *Haploids in higher plants: advances and potentials*. Guelph, University of Guelph, 1974. p.91-122.
- THIMANN, K.V. The natural plant hormones. In: STEWARD, F.C., ed. *Plant physiology: a treatise*. New York, Academic Press, 1972. p.1-359.
- VASIL, I.K. Cell culture and somatic cell genetics of plants. Orlando. Academic press, vol.2. 1985. 330p.
- VIEIRA, M.L.C. Estudo citotaxonômico de espécies brasileiras do gênero *Stylosanthes* Sw. Piracicaba, 1988. 135p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP)

Opinião sobre o programa

O programa é sensacional para incrementar a formação do aluno. Os trabalhos no laboratório, as visitas, a participação em congressos e as sessões de reflexão permitiram um maior relacionamento com professores de outras universidades, pós graduandos e pesquisadores de empresas, proporcionando uma visão global sobre a pesquisa em biotecnologia no Brasil e no exterior.

O grupo FET realmente está aumentando o contato entre pesquisadores pois o relacionamento entre estes, os membros do grupo e o tutor é muito bom. Isto está permitindo uma intensa troca de informações que está ajudando no entendimento e na formação de uma visão crítica e realista sobre todas as áreas que compõem a biotecnologia.

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 desenvolvo. A atuação do tutor nas sessões de reflexão é excepcional; ele orienta as leituras a serem discutidas e incentiva a formação de uma visão crítica do assunto. O tutor se mostrou sempre preocupado com a visão que está se formando em nós sobre a maneira de resolver problemas nacionais através da pesquisa científica.

José Henrique Conti

OPINIAO SOBRE O PROGRAMA:

Ao contrário do que se possa pensar, a vida de alguns estudantes não é uma festa continua em sua república. Existem pessoas que desejam ouvir o que os professores têm a contar e que não se contentam com isso. Vontade de aprender e de construir o novo, faz com esse trabalho que é o aprendizado, seja uma atividade quase profissional.

O único fator limitante na vida dessas pessoas é o tempo. Por mais vontade que se tenha em continuar, o dia acaba com suas vinte e quatro horas, e no seguinte somam-se mais tarefas a serem vencidas.

Porém o limite de um ser é pura ilusão e só existe para aqueles que nele acreditam ou que preferem acreditar para justificar sua incompetência. Quanto maior a dedicação, maior é o envolvimento com a atividade desempenhada. Se envolvendo estimulamos nossa mente criadora a sermos mais perfeitos e objetivos no nosso dia a dia. Como somente a eficiência é capaz de vencer a falta de tempo e somente uma gama de atividades leva a necessidade de eficiência, acredito nesse programa de treinamento para alunos especiais.

Vejo o programa PET como um complemento a minha formação, uma oportunidade de conhecer desde o bēcker do laboratōrio atē os grandes homens da biotecnologia, obtendo com todos eles a experiēncia necessāria a continuidade de meu trabalho, que é aprender para poder ensinar, trabalhar para poder ajudar e, principalmente, conhecer para poder criar.

OPINIÃO SOBRE O TUTOR:

Acredito que o tutor em questão tem exercido um papel de destaque dentro do programa, procurando resolver, sempre que possível, as dúvidas e problemas que têm surgido no cotidiano de nossas atividades.

Destaco que ele sempre esteve interessado em promover e estimular eventos e tarefas que contribuam para uma melhor formação dos integrantes do grupo, o que é admirável.

Concluo, portanto, que sua presença é essencial a continuidade do programa.

ROBERTO PEDROSO DE OLIVEIRA

Relatório Individual de Atividades

Goran Kuhar Jezovsek

PET-Biotecnologia

CAFES/ESALQ-USP

1. Introdução

Neste período de atividades, deu-se seqüência aos trabalhos desenvolvidos, procurando sempre, um maior aprofundamento nos estudos, além de buscar informações em assuntos correlatos, para o melhor desenvolvimento das pesquisas efetuadas.

Buscou-se também, conforme os objetivos do programa, aliados ao interesse pessoal, o contato com outros pesquisadores, com a finalidade de intercâmbio de informações.

2. Andamento dos Trabalhos

2.1. Transformação Vegetal:

Das inoculações realizadas, obteve-se resultado com *N. tabacum*, inoculado com três linhagens de *Agrobacterium rhizogenes* (A4, 307 e 642)

Como primeira observação, tivemos a comparação das infecções das três linhagens, obtendo os seguintes resultados:

a.44: obtenção de raízes das infecções em pequena escala e regeneração de plantas.

b.307: ao invés de raízes, conforme o esperado, apareceram 'callus' nos ferimentos. Descartou-se a possibilidade de serem estas, bactérias da espécie *A. tumefaciens*, pois o tipo de 'callus' encontrado é bastante diferente dos provocados por esta outra espécie. Supõe-se haver diferença no tipo de octopina induzida pelo plasmídeo Ri dessa linhagem. Não foram obtidos vegetais regenerantes

c.642: obtava-se uma maior quantidade de raízes, assim como de vegetais regenerantes. A regeneração, em alguns casos, foi espontânea, não havendo a necessidade da cultura das raízes em meio MS com hormônios vegetais.

Em seguida, tomou-se as raízes c, através de extração com HCl, fez-se uma eletroforese em papel, para detectar a presença de octopinas, mais precisamente de Agropina, composto este, só presente nas raízes se o plasmídeo Ri estiver anexado ao genoma, ou seja, se completou-se a transformação. Com isso, comprovou-se, comparando com raízes normais, a obtenção de transformantes.

Através destas raízes, crescidas em meio MS com hormônios vegetais (BAP 1,0 mg/mL), foram obtidas plantas transgênicas de tabaco, que foram comparadas entre si e com

plantas normais de campo e de cultura de tecidos, através de eletroforeses em gel de acrilamida de proteínas totais e de isozimas.

Na eletroforese de proteínas totais, verificou-se que além da alteração de concentração de várias proteínas (dados comparados por análise densitométrica), ocorreram o aparecimento e o desaparecimento de bandas, de forma diferenciada em plantas obtidas por infecção com A4 e com 642.

Na análise de peroxidases, houve uma grande concentração destas nos vegetais transformados, e nenhum traço nos normais. Assim, descartou-se a possibilidade das diferenças ocorrerem por efeito hormonal, já que plantas normais submetidas por um ano a 2,4-D e a Benziladenina não apresentavam traços destas isozimas. Já, na comparação de esterases, não houve diferenças.

2.2. Genética Bacteriana:

Devido à utilização de plasmídeos bacterianos como vetores para a transformação vegetal, é de extremo interesse o estudo e a manipulação destes, com destaque para a inclusão de genes marcadores nestes plasmídeos.

Com essa finalidade, tomou-se as linhagens A4, 642, 8196 e 15834 de *A. rhizogenes* e através do método 'Freeze-thaw' (Anexo I), transformaram-se as bactérias com os plasmídeos pMRKn, pARC4 e pCTW, todos contendo genes marcadores para a resistência a antibióticos, obtendo assim, mais uma marca para ser utilizada na transformação vegetal.

3. Perspectivas

Após estes resultados obtidos com *N. tabacum*, serão realizados experimentos semelhantes com *Solanum tuberosum* (batata), por se tratar de um vegetal de alto valor econômico e alimentício.

Paralelamente, espera-se obter progênies dos transformantes de tabaco, para tentar avaliar a transmissão dos caracteres recebidos.

Em outro plano, serão inoculadas plantas de *Atropa belladonna* para a avaliação das quantidades produzidas de atropina por raízes transformantes, em relação às raízes normais.

4. Trabalhos

Enviado resumo do trabalho "Variações Proteicas em Transformantes de Tabaco com *A. rhizogenes*." para apresentação no XXXVI Congresso Nacional de Genética (cópia em anexo).

5. Contatos Individuais

5.1. Visitas:

-Dr. Otto J. Crocomo, Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) ESALQ/USP - 09/11/89. Discussão sobre as perspectivas da Biotecnologia Vegetal no Brasil e os contatos com pesquisadores no exterior e seu valor.

-Dr. Paulo Arruda, Departamento de Genética UNICAMP - 06/12/89. Apresentação dos projetos de transformação vegetal desenvolvidos na UNICAMP. Estes são basicamente dois, um com tabaco utilizando *A. tumefaciens*, e outro com milho utilizando a técnica da eletroporação.

-Dr. Patricio Barriga, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile - 02/01/90. Visita realizada durante as férias, sob recomendação do tutor Dr. Flávio C. A. Tavares. Foi discutida a situação da Biotecnologia no Chile, bem como a do melhoramento vegetal como um todo. Além disso, foram apresentados os trabalhos do professor com trigo, visando obter, via cultura de tecidos, plantas resistentes à deficiência de Fósforo e, via radiação, mutantes do vegetal.

5.2. Correspondência:

-Dr. A. Petit, INRA/CNRS, Orsay - França. Pedido das linhagens 15834 e 8196 de *A. rhizogenes* e de informações sobre seus experimentos de transformação.

-Dr. Ch. H. Haenisch ten Cate, ITAL, Wageningen - Holanda. Pedido das linhagens LBA900 e 15834 de *A. rhizogenes* e de informações sobre seus experimentos de transformação.

6. Opinião sobre o programa

Já passada a fase de implementação, entrou-se na rotina, com cada bolsista tendo a independência necessária para realizar seus trabalhos, sem perder, no entanto, o contato com o grupo. Houve porém, um relaxamento com as atividades em grupo, e o não cumprimento do programa de visitas, provocado pela não coincidência de horários livres dos bolsistas. Há uma grande expectativa com a continuação do programa e a entrada de novos bolsistas, dos quais seremos uma espécie de tutores, e com os programas de divulgação que estão em planejamento.

7. Opinião sobre o tutor

O Dr. Flávio C. A. Tavares continua tendo uma boa atuação como tutor, dando a liberdade necessária aos bolsistas mantendo um espírito crítico, não permitindo nossa dispersão. Como grande qualidade o tutor revelou-se além de um bom orientador, um grande amigo, o que ajuda a manter o grupo unido.

Goran Kuhar Jezovsek

Anexo I: Método 'Freeze-thaw' de transformação bacteriana.

1. Cultivar uma linhagem de *A. rhizogenes* contendo um plasmídeo R1 auxiliar apropriado em 5 ml de meio MYA overnight a 28°C.
2. Juntar 2 ml da cultura overnight a 50 ml de meio MYA em um frasco de 250 ml e agite fortemente (250 rpm) a 28°C até que a cultura atinja um crescimento OD₆₀₀ de 0,5 a 1,0.
3. Centrifugar a cultura a 3000 g, 5 minutos a 4°C e descartar o sobrenadante. Ressuspender as células em 1 ml de CaCl₂ 20 mM (frio). Colocar 0,1 ml da solução em tubos "Eppendorf".
4. Juntar aproximadamente 1 micrograma de DNA plasmidial às células.
5. Congelar as células em N₂ líquido.
6. Incubar os tubos em banho-maria a 37°C por 5

minutos.

7. Adicionar 1 ml de meio MYA ao tubo e incubar a 28°C por 2 a 4 horas, com agitação suave. Esse período permite a bactéria expressar os genes de resistência a antibióticos.

8. Centrifugar os tubos por 30 segundos em uma centrífuga 'Eppendorf'. Descartar a solução sobrenadante. Ressuspender as células em 0,1 ml de meio MYA.

9. Espalhar as células em placas contendo meio MYA sólido contendo 3 a 5 microgramas por ml de tetraciclina e 10 a 25 microgramas por ml de canamicina. Incubar as placas a 28°C. Transformantes devem aparecer em 2 ou 3 dias.

ATIVIDADES INDIVIDUAIS: Fernando Ce'sar Boscariol

I)-Projeto de pesquisa: Obtenção de linhagens de levedura alcoólica(*Sacharomyces cerevisiae*) tolerantes a ácidos orgânicos

-Descrição das atividades:

Foram realizados novos ensaios de fermentação com os híbridos selecionados anteriormente em meios com bactérias encontradas normalmente no processo fermentativo. Tais bactérias foram isoladas de uma unidade produtora local (Usina Costa Pinto) e são predominantemente pertencentes aos gêneros Leuconostoc, Lactobacillus, Bacillus e outros de menor importância. Os resultados obtidos são ainda inconclusivos, o que indica a necessidade de se realizar mais testes sob diferentes condições de fermentação.

O próximo estágio deverá ser a confirmação da resistência a ácidos orgânicos nos produtos de fusão selecionados e se possível um teste em escala maior e sob condições normalmente encontradas na indústria.

II)- Aprendizado de novas técnicas:

-Durante este período foram utilizadas as técnicas aprendidas anteriormente e o acompanhamento de outras, tais como: Eletroforese de proteínas vegetais e microbianas, cultura de tecidos vegetais, fusão de protoplastos, etc, utilizadas em projetos de pesquisa em andamento no Laboratório de Genética de Leveduras.

III)-Revisões bibliográficas:

- Durante este período foi realizada uma ampla revisão bibliográfica sobre o processo de condução da fermentação alcoólica na indústria e os problemas e características que afetam o mesmo, visando a realização de um futuro projeto nesta área.

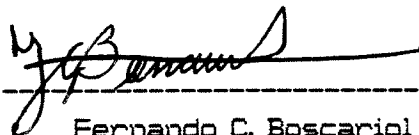
IV)-Opinião pessoal:

- Sobre o programa:

- O programa, em minha opinião, cumpriu seus objetivos e serviu para um aprendizado de técnicas e procedimentos utilizados em pesquisa, assim como para uma visão mais aprofundada sobre algumas áreas que compõem a Biotecnologia.

- Sobre o tutor:

- O Dr. Flávio C. A. Tavares mostrou-se extremamente competente na orientação do grupo e sempre disponível a atender todas as questões e dificuldades que surgiram.

----- || -----


Fernando C. Boscariol

RELATÓRIO DE VISITA

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS (IAC)

12 de Outubro de 1989

Seção de Genética

Recepção: Herculano Medina

Tópicos abordados

- Programa de limpeza de vírus em alho e caracterização de clones por eletroforese de proteínas.
- Identificação de híbridos naturais de palmito por eletroforese e sua propagação por cultura de tecidos.
- Programa de obtenção de cultivares de mamão tolerantes ao mosaico através de cultura de embrião.
- Utilização da variação somaclonal e da cultura de tecidos como suporte a um programa de melhoramento de cultivares de café.
- Utilização da técnica da eletroforese para separação de plântulas zigóticas e nucelares de citros.
- Variação somaclonal em cana de açúcar para teste de tolerância ao carvão.
- Detecção da expressão de genes alelos em tomate através da eletroforese, visando acelerar o processo de obtenção de resistência a nematóides.

Recepção: Luiz Carlos Ramos

Ídeicos abordados

- Cultura de anteras em trigo e café visando a suporte no programa de melhoramento.

Secção de Viticultura

Recepção: Irene Ribeiro da Silva Passos

Ídeicos abordados:

- Obtenção de bagas de maior tamanho de uvas de cultivares sem sementes através de cultura de embrião e uso de colchicina.

Secção de Floricultura

Recepção: Carlos Eduardo Ferreira de Castro

Ídeicos abordados

- Obtenção de antúrio resistente a *Xanthomonas* sp.
- Obtenção de cravo por microestaquia.
- Propagação "in vitro" de xaxim
- Estudos sobre a propagação "in vitro" de flores tropicais visando a exportação.

Conclusões

Esta visita foi proveitosa por incrementar nossos conhecimentos sobre as técnicas de biotecnologia utilizadas no melhoramento de plantas.

Dentro dessas técnicas notou-se a grande importância da eletroforese e cultura de tecidos. Através do contato com outros pesquisadores, procurando tomar lições e ganhar experiência, esperamos aperfeiçoar nossa visão sobre a área da Biotecnologia Agrícola.

participantes: Fernando César Boscarol

José Henrique Conti

Roberto Pedroso de Oliveira

RELATÓRIO DE VISITA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

12 de Outubro de 1989

Instituto de Biologia

Recepção: William José da Silva

Temas abordados:

- Utilização de gens marcadores de milho, dando ênfase a antocianina.
- Banco de sementes de milho e sua importância ao melhoramento.
- O papel da universidade x indústria privada no melhoramento.
- Recursos financeiros à pesquisa.
- Pesquisadores brasileiros no exterior.
- Transposons e gens saltadores em milho.

Relatório sobre a visita Hum. José de Azevedo

Objetos da visita

- Utilização do controle microbiano da levedura de cerveja e de broca de cana.
- Acompanhamento das etapas de processo massal de vírus.
- Funcionamento de convênios universidade e iniciativa privada.

Conclusões

Esta visita permitiu a aquisição de maiores conhecimentos sobre a área de biotecnologia e suas perspectivas.

Conhecemos novas abordagens e estruturas a serem utilizadas no melhoramento, e uma mensagem que nos ficou clara, foi a da necessidade de recursos humanos competentes para a condução desse programa. Algo que nos foi mencionado se refere ao ótimo êxito que alguns pesquisadores brasileiros têm tido no exterior, demonstrando que temos potencialidade de criar tecnologias de ponta, bastando para isso nossos recursos físicos e financeiros.

Participantes: Fernando Costa, Sônia Lira

João Henrique Dória

Roberto Pereira de Oliveira

Edital de inscrição e seleção para o grupo
PET - Biotecnologia agrícola

Em vista de dois membros do grupo PET - Biotecnologia agrícola terem concluído o curso de Eng. Agrônoma e se encaminhado para a pós-graduação (Mestrado) na mesma escola, decidiu-se convocar candidatos para o preenchimento dessas 2 vagas.

1. Requisitos para a Inscrição dos candidatos

- Estar cursando, preferencialmente, o sétimo semestre dos cursos de graduação em Eng. Agrônoma e Florestal. Poderão ser aceitas inscrições de alunos do nono semestre desde que tenham exercido atividade na área de biotecnologia agrícola.

- Possuir excelente rendimento acadêmico, não apresentando reprovação em disciplinas cursadas. Esta é uma exigência da DAPEE. Casos excepcionais, devidamente justificados, de reprovação em disciplinas não relacionadas diretamente à área do programa, poderão ser apreciados.

- Não estar participando de outros programas de bolsas (Monitoria, Iniciação Científica, etc.)

- Ter carga horária disponível de no mínimo 12 horas semanais.

Em sua essência o PET é um programa que estimula a participação e convivência de um grupo seleto de alunos, em uma gama ampla de atividades acadêmicas, diferenciando-se, porém, do programa de Iniciação Científica que enfatiza o desenvolvimento de projetos específicos de pesquisas científicas. Difere, também, dos Programas de Estágios, cujo objetivo é promover oportunidades de aplicação prática dos conhecimentos teóricos adquiridos nos cursos de graduação.

Os três grupos PET aprovados para a ESALQ terão como característica fundamental um alto grau de conhecimentos interdisciplinares. Cada grupo, atendendo à sua natureza peculiar, terá um conjunto planejado de atividades a serem desenvolvidas durante o ano de 1990.

2. Documentos exigidos para a inscrição

- Histórico escolar
- Currículo resumido das atividades extracurriculares dos candidatos: estágios, cursos, congressos, seminários, publicações, etc.
- Carta de intenções, dirigida ao Tutor do Grupo, demonstrando o interesse e as razões de participar do programa, bem como do grau de conhecimentos nesta área de atuação, além de descrição de proficiência em língua estrangeira.

3. Critério de Seleção dos Candidatos

- Avaliação do Histórico Escolar, Currículo e da Carta de Intenções.
- Prova escrita de Conhecimentos Gerais e Específicos da área de Biotecnologia Agrícola
- Entrevista com os candidatos, previamente selecionados

4. Os objetivos e a filosofia do EEI

O Programa Especial de Treinamento tem como objetivos gerais:

- Propiciar condições favoráveis para o desenvolvimento e desempenho de atividades acadêmicas a grupos selecionados de alunos de graduação, que tenham potencial, interesse e habilidades acadêmicas destacadas.

- Promover oportunidades para que o aluno possa desenvolver uma postura crítica perante a ciência e integrar os conhecimentos de sua área, visando a formação de um profissional de alto nível.