

# IICA



Consultant Final Report  
IICA/EMBRAPA-PROCENSUL II

BIOLOGIA MOLECULAR

BIBLIOTECA

IICA  
PM-A4/  
BR-89-  
040

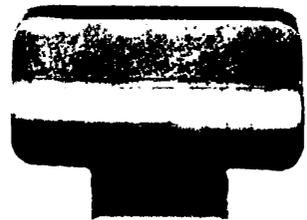
ESCRITÓRIO NO BRASIL

1954

1954

1954

1954



Centro Interamericano de  
Documentación e  
Información Agrícola

10 NOV 1993

**IICA — CIDIA**

Consultant Final Report  
IICA/EMBRAPA-PROCENSUL II

BIOLOGIA MOLECULAR

**00001645**

Série Publicações Miscelâneas Nº A4/BR-89-040  
ISSN-0534-0591

✓  
**BIOLOGIA MOLECULAR**

**Consultant Final Report  
IICA/EMBRAPA-PROCENSUL II**

**Philippe Guerche**

**Brasília, junho de 1989**

**INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERAÇÃO PARA A AGRICULTURA  
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA**

IICA PM/a-11-BR  
89-040  
BV-6378

Guerche, Philippe.

Biologia Molecular. Consultant final report  
IICA/EMBRAPA-PROCENSUL II/por Philippe Guerche  
.-Brasília:IICA/EMBRAPA, 1989.

11 p. (IICA. Série Publicações Miscelâneas,  
A4/BR 89-040).

ISSN 0534-0591

1. Biologia Molecular. I. Título. II. Série.

CDU 631.523

AGRIS F30.

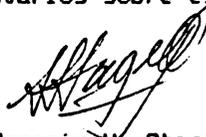
## APRESENTAÇÃO

A reprodução e difusão dos Relatórios de Consultores, no âmbito restrito das Diretorias das Unidades do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária, vinculado à EMBRAPA, tem como objetivo principal o de divulgar as atividades desenvolvidas pelos consultores e as opiniões e recomendações geradas sobre os problemas de interesse para a pesquisa agropecuária.

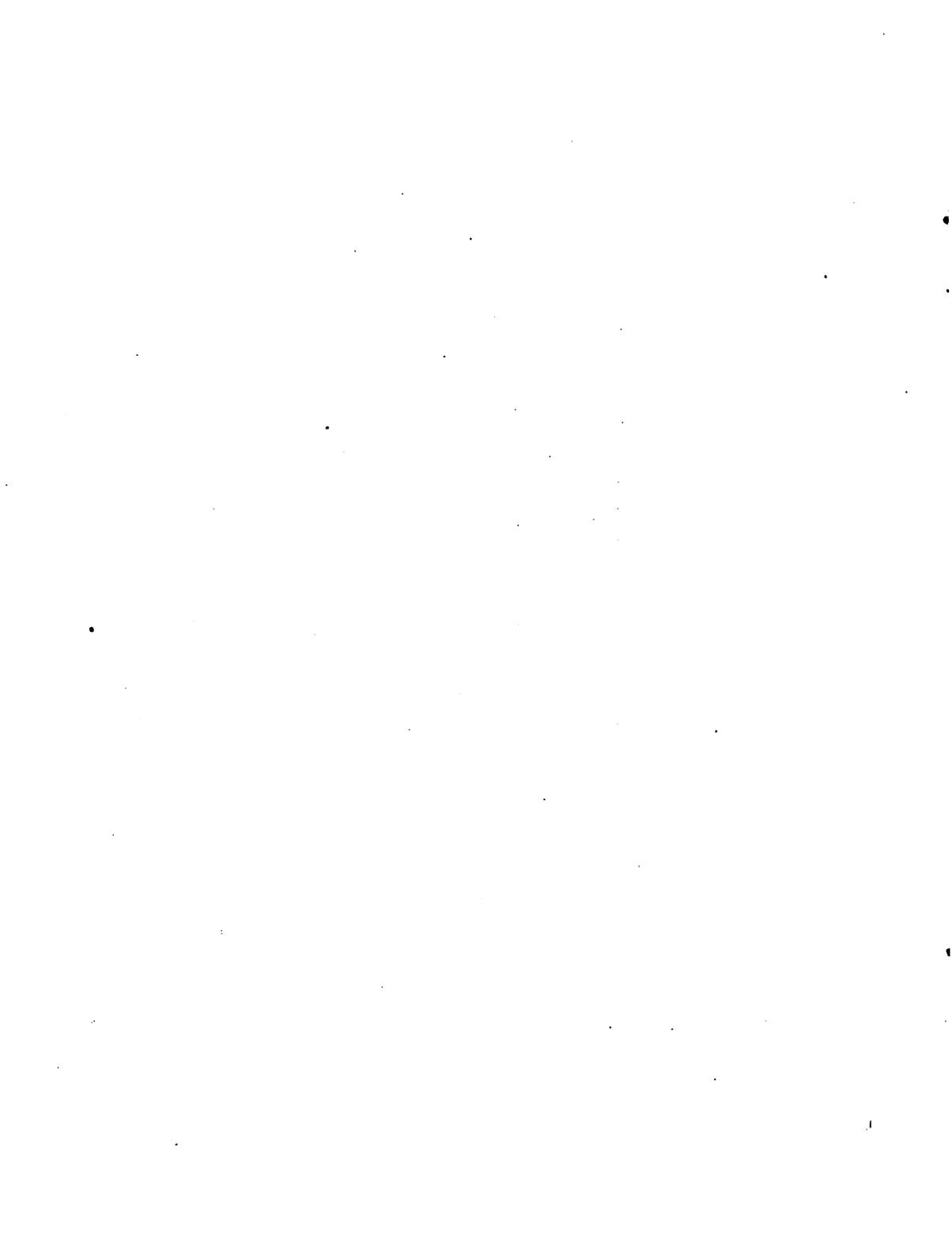
As atividades de consultoria são realizadas no âmbito do Projeto de Desenvolvimento da Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia na Região Centro-Sul do Brasil - PROCENSUL II, financiado parcialmente pelo Banco Interamericano de Desenvolvimento - BID e a EMBRAPA conforme os contratos de Empréstimo 139/IC-BR e 760/SF-BR, assinados em 14 de março de 1985 entre o Governo Brasileiro e o BID.

As opiniões dos consultores são inteiramente pessoais e não refletem, necessariamente, o ponto de vista do IICA ou da EMBRAPA.

A coordenação dos Contratos IICA/EMBRAPA agradecerá receber comentários sobre estes relatórios.



Horacio H. Stagno  
Coordenador Contratos IICA/EMBRAPA



INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERAÇÃO PARA A AGRICULTURA  
CONVÊNIO IICA/EMBRAPA

RELATÓRIO FINAL DE CONSULTORIA

1. Nome do consultor: *Philippe Guerche*
2. Especialista em: *Biologia Molecular*
3. Nome do Projeto do IICA: *2.SB.3*

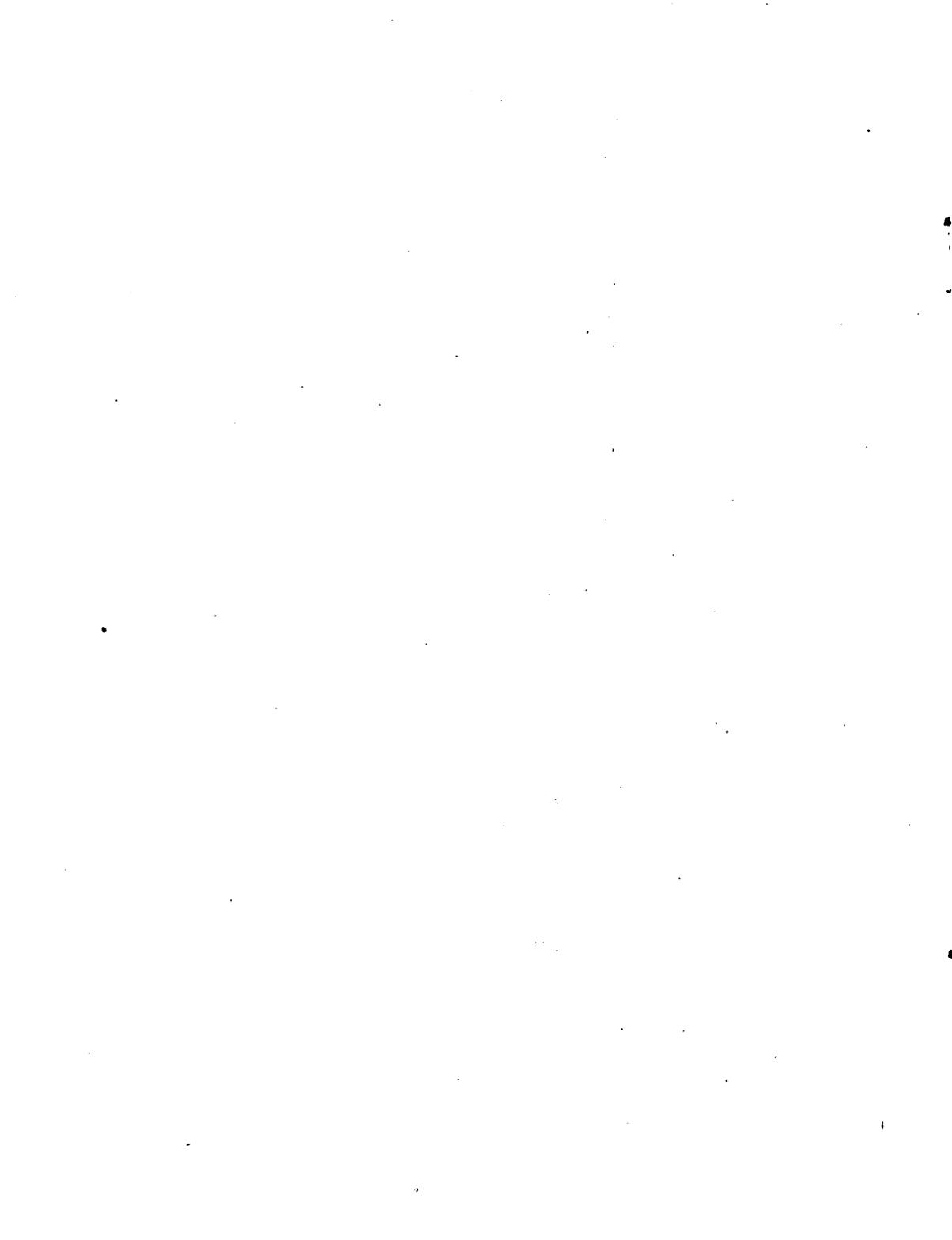
4. Especificar qual o Programa da EMBRAPA em que a consultoria está sendo prestada:

PROGRAMA : *PROCENSUL II*

SUB-PROGRAMA: *05 CONTROLE BIOLÓGICO*

Código Atividade Projeto IICA: <i>2.SB.3.05</i>		Código contábil: <i>R 4894 BiB 03 05</i>	
Título da Atividade do Projeto do IICA correspondente a esta consultoria		<i>Apoio ao desenvolvimento de pesquisa da EMBRAPA em estudos e aplicações sobre recursos genéticos, biotecnologia e controle biológico de pragas, enfermidades e males de ervas daninhas.</i>	
PERÍODO DE CONTRATAÇÃO		SEDE DA CONSULTORIA	
<i>13 a 28 de fevereiro de 1989</i>		<i>CENARGEN/EMBRAPA</i>	
PERÍODO DE PRORROGAÇÃO		SEDE DA PRORROGAÇÃO	

5. Fonte financiadora: *PROCENSUL II*



## 6. ACTIVITIES UNDERTAKEN BY THE CONSULTANT AND RESULTS

### 6.1 RESEARCH DONE UNDER DIRECT RESPONSIBILITY OF THE CONSULTANT

---

Research activities developed

Results Achieved

---

A expressão transitória é uma ferramenta para otimizar a eficiência de transformação de protoplastos e também utilizada para medir a eficácia da expressão de genes quiméricos.

A Consultoria realizada na empresa, no período de 13 a 28 de fevereiro de 1989, nos laboratórios de Biologia Molecular e Vegetal, teve como principal objetivo a transmissão de uma técnica de dosagem da expressão transitória do gene CAT codificando para a CHLORAMPHENICOL ACETYL TRANSFERASE e do gene GUS codificando para a BETA GLUCURONIDASE, com a utilização do aparelho de eletroporação do CENARGEN.

**ELETROPORAÇÃO DE PROTOPLASTOS DE TABACO E CENOURAS UTILIZANDO PLASMÍDEOS "pCaMVCAT" e "pDE4".**

6.1.1 - Foram feitas variações nas condições de eletroporação:

- TABACO:

Foi difícil a obtenção de protoplastos de tabaco em bom estado e livres de contaminação. Isso se deveu às condições de crescimento das plantas na Casa de Vegetação que se encontra em péssimas condições de cultura.

Para o sucesso da técnica fomos obrigados a recomeçar três vezes as manipulações.

- CENOURA:

Protoplastos foram isolados a partir de uma cultura de células.

Os experimentos de eletroporação foram realizados primeiramente utilizando-se as mesmas condições conhecidas para o tabaco.

Como os protoplastos de cenoura são bem menores que os de tabaco, é possível que precisem de choques elétricos de maior tempo para inserção do DNA.

De fato, não detectamos expressão transitória posteriormente. Os experimentos foram então rejeitados e desta vez refeitos com a utilização de capacitores mais potentes. Para isso, instalaram-se capacitores novos no eletroporador.

Esses experimentos estão em andamento.

6.1.2 - Dosagem da expressão transitória dos genes CAT e GUS

- CAT: A CAT é uma enzima que cataliza a acetilação do cloramfenicol usando como substrato Acetil - Co A.

Usando cloramfenicol marcado C14, o produto da reação pode ser separado por cromatografia de camada fina e detectado por autoradiografia.

- GUS: A GUS é uma enzima que cataliza a liberação do ácido glucurônico ligado a outras moléculas que possuem cromóforos. Para fazer um ensaio espectrofotométrico usamos como substrato da reação o p-nitrofenil glucuronido. Os produtos da reação são o ácido glucurônico e o p-nitrofenol que tem absorve a luz a 415 nm.

Com esta enzima também pode ser feito um ensaio fluorométrico e histoquímico, usando outros cromóforos.

A vantagem maior desta técnica é o fato de ela não precisar de um substrato radioativo.

#### 6.2 SUPPORT TO RESEARCH UNDERTAKEN BY OTHER ENBRAPA RESEARCHERS

Research activities developed	Results achieved
-------------------------------	------------------

Durante este período foi iniciado pela pesquisadora VERA CARNEIRO o trabalho de inserção de genes de expressão transitória em cenoura, dentro do projeto "Enriquecimento proteico da mandioca."

Estes genes foram usados para estabelecimento das condições ideais de eletroporação e a aquisição destas técnicas é de grande interesse da equipe de Biologia Molecular para o trabalho de análise de expressão de promotores.

6.3 TRAINING ACTIVITIES DEVELOPED BY THE CONSULTANT

Date	Training subject matter	Type of event*	Number of beneficiaries	
			From EMBRAPA	From other institutions

Seminário sobre o trabalho realizado na P. G. S. - Bélgica a respeito do estudo da expressão e regulação dos genes codificantes da proteína 2S da *ARABIDOPSIS THALIANA* e a expressão do gene da Castanha-do-Pará em plantas transgênicas de colza.

DATA: 20 de fevereiro de 1989.

\* Short courses, seminars, conferences, etc.

6.4 IN-SERVICE TRAINING PROVIDED BY THE CONSULTANT

In-service training subject matter	Names of counterparts
------------------------------------	-----------------------

A dosagem de expressão transitória de GUS e CAT será usada por grande parte dos pesquisadores da área de Biologia Molecular e Celular para testar a eficiência de expressão de diferentes construções. O trabalho foi acompanhado pelos pesquisadores VERA CARNEIRO e LEILA BARROS e pela estagiária CRISTINE BARRETO.

## 6.5 ACTIVITIES IN SUPPORT OF RESEARCH STRATEGY AND PLANNING

Research subject matter	Research program to which subject matter is concerned
-------------------------	---

Protocolos completos de dosagem de CAT e GUS foram fornecidos os pesquisadores.

A dosagem histoquímica da GUS é muito interessante para determinação do número de protoplastos transformados por eletroporação. Além disso, essa dosagem pode ser feita sobre tecidos de plantas transformadas para analisar a expressão de uma construção que contém a sequência codificadora para o GUS sob o controle de um promotor tecido-específico.

## 5.6 ACTIVITIES IN SUPPORT OF OTHER CENTERS AND UNIVERSITIES IMPROVING THE RESEARCH CENTERS LINKS WITH ABROAD

Subject matter on which links were recommended	Persons, centers and universities recommended for contact
--	---

Foi construído na FRANÇA um eletroporador que foi fornecido à Universidade Federal do Rio de Janeiro ( UFRJ ) na pessoa do Dr. Benedito Timmerman.

6.7 PUBLICATIONS AND REPORTS UNDERTAKEN WITH THE CONSULTAT'S PARTICIPATION

Author(s)*	Title of publication or Report and other bibliographic identification
<p>LEILA MARIA GOMES BARROS CRISTINE CHAVES BARRETO PHILIPPE GUERCHE</p>	<p>"Progeny studies from <u>N. tabacum</u> plants co-transformed by eletroporation."  Manuscrito in preparação para ser submetido para a "Revista Brasileira de Genética. (Brazilian Journal of Genetics)."</p>

\* Personal, institutional, etc.

6.8 SUPPORT PROVIDED TO EMBRAPA RESEARCHERS IN THESIS AND DISSERTATION WORK

Name of the student	Thesis subject matter and sinthesis of advice
<p>LEILA MARIA GOMES BARROS</p>	<p>"Transformação genética de <u>Nicotiana tabacum</u> utilizando <u>Agrobacterium tumefaciens</u> e eletroporação."  OBS: Este trabalho de tese foi sugerido por PHILIPPE GUERCHE, no CENARGEN, no ano de 1986.  Discussão sobre os resultados e conclusão.</p>

8. CONSULTANT'S SUGGESTIONS AND TECHNICAL OR INSTITUTIONAL RECOMMENDATIONS FOR THE IMPROVEMENT OF THE RESEARCH SERVICE

---

Os Laboratórios de BIOLOGIA MOLECULAR e BIOLOGIA CELULAR possuem os equipamentos indispensáveis para a realização de experiências de expressão transitória, usando o gene GUS e CAT, havendo sido removido o obstáculo às experiências desenvolvidas, fruto da insalubridade da Casa de Vegetação que resultaram na obtenção de protoplastos contaminados e em mau estado.

É extremamente importante para os dois Laboratórios a utilização da técnica de dosagem de expressão transitória do gene. Assim, o sucesso desse tipo de experimento é muito ligado ao bom estado fisiológico do explante vegetal.

Esta Casa de Vegetação permite, teoricamente, cultivar plantas de tabaco (e outras) em ótimas condições desde que sejam observados cuidados para evitar o crescimento de plantas daninhas e o desenvolvimento de fungos e de insetos.

O ideal é que o Laboratório possua duas Casas de Vegetação, ambas cimentadas, e que a cada seis meses faça-se rotação das culturas e limpeza total da desocupada.

É muito importante a designação de pessoa, ativa e com autoridade bastante, para zelar pelas condições de otimização das culturas das Casas de Vegetação, mantendo-as nas melhores disposições para sua ideal utilização.

Sou de parecer que as pesquisadoras LEILA e VERA, e a estagiária CRISTINE, são suficientemente competentes para desenvolverem pesquisas desse tipo, sem qualquer tipo de auxílio externo.

Para que as pesquisas se desenvolvam em condições mais propícias, repercutindo assim nos resultados, convém uma permanente integração de todos os pesquisadores dos dois Laboratórios, de CULTURA DE TECIDOS e de BIOLOGIA MOLECULAR.

9. AGREEMENTS OR COMMITMENTS ESTABLISHED WITH EMBRAPA RESEARCHERS IN-SERVICE OF  
THE FUTURE DEVELOPMENT OF RESEARCH IN THE CONSULTANT'S FIELD OF SPECIALIZATION

---

Até a presente data, cinco cooperantes franceses foram enviados pelo INRA (mais particularmente pelo Laboratoire de Biologie Cellulaire, Versailles) ao Laboratório de Cultura de Tecidos do Cenargen, com dezesseis meses de duração para cada cooperante.

Os pesquisadores e a Chefia do Cenargen desejam a manutenção dessa cooperação.

De outro lado, uma jovem pesquisadora ANA CRISTINA MIRANDA BRASILEIRO, fazendo doutorado, e a estagiária do Cenargen SILVIA ROSSI, em estágio de curto prazo, encontram-se no Laboratoire de Biologie Cellulaire do INRA / Versailles, que mantém interesse de receber outros pesquisadores brasileiros, como MAURO e VERA CARNEIRO. Com a ida desta pesquisadora talvez seja possível elaborar-se um projeto entre o Cenargen e o LBC de Versailles sobre a cultura "in vitro" e a transformação genética do feijão.

10. CONSULTANT'S COMMENTS ON CIRCUMSTANCES WHICH AFFECTED THE CONSULTANCY WORK

---

Várias reuniões foram necessárias para serem definidos que tipos de projetos deveriam ser realizados com intensa colaboração entre os pesquisadores dos Laboratórios de Cultura de Tecidos e de Biologia Molecular. A nomeação do Dr. L. A. B. de Castro para a chefia do LC<sup>m</sup> contribuirá para o fortalecimento desse Laboratório e da integração proposta.

Numerosos projetos do LEM têm necessidade de dominar a cultura e a transformação de uma outra planta modelo ARABIDOPSIS THALIANA, sendo muito importante a vinda de outro cooperante francês, também para essa finalidade.

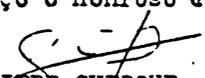
O anterior conhecimento por este Consultor, tanto dos trabalhos desenvolvidos, quanto dos pesquisadores, facilitaram o bom nível do relacionamento, permitindo uma melhor avaliação da progressão dos projetos desenvolvidos nos últimos dois anos. Convém ressaltar também que o interesse e a dedicação da Chefia do Cenargen foram partes relevantes para os resultados obtidos.

Resta-me agradecer a todas as pessoas que trabalham no Cenargen e que de uma forma ou de outra facilitaram os trabalhos desenvolvidos, mais particularmente ao Dr. L. A. B. de Castro, Leila Barros, Vera Carneiro, Dr. Mauro Carneiro pelo entusiasmo e confiança nos resultados, que permitiram que esta Consultoria não se restringisse apenas a uma mera transferência de tecnologia.

Não se pode deixar de patentear a necessidade do trabalho da Dra. MARIA JOSÉ A. SAMPAIO no Cenargen, a quem agradeço o honroso convite e as continuadas provas de confiança.

Date-03 de março de 1989.

Signature:

  
PHILIPPE GUERCHE

## **Programa II. Geração e Transferência de Tecnologia**

O Programa de Geração e Transferência de Tecnologia é a resposta do IICA a dois aspectos fundamentais: (i) o reconhecimento, por parte dos países e da comunidade técnico-financeira internacional, da importância da tecnologia para o desenvolvimento produtivo do setor agropecuário; (ii) a convicção generalizada de que, para aproveitar plenamente o potencial da ciência e da tecnologia, é necessário que existam infra-estruturas institucionais capazes de desenvolver as respostas tecnológicas adequadas às condições específicas de cada país, bem como um lineamento de políticas que promova e possibilite que tais infra-estruturas sejam incorporadas aos processos produtivos.

Nesse contexto, o Programa II visa a promover e apoiar as ações dos Estados membros destinadas a aprimorar a configuração de suas políticas tecnológicas, fortalecer a organização e administração de seus sistemas de geração e transferência de tecnologia e facilitar a transferência tecnológica internacional. Desse modo será possível fazer melhor aproveitamento de todos os recursos disponíveis e uma contribuição mais eficiente e efetiva para a solução dos problemas tecnológicos da produção agropecuária, num âmbito de igualdade na distribuição dos benefícios e de conservação dos recursos naturais.

## INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERAÇÃO PARA A AGRICULTURA

O Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura (IICA) é o organismo especializado em agricultura do Sistema Interamericano. Suas origens datam de 7 outubro de 1942, quando o Conselho Diretor da União Pan-Americana aprovou a criação do Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas.

Fundado como uma instituição de pesquisa agrônômica e de ensino, de pós-graduação para os trópicos, o IICA, respondendo às mudanças e novas necessidades do Hemisfério, converteu-se progressivamente em um organismo de cooperação técnica e fortalecimento institucional no campo da agropecuária. Essas transformações foram reconhecidas oficialmente com a ratificação, em 8 de dezembro de 1980, de uma nova convenção, que estabeleceu como fins do IICA estimular, promover e apoiar os laços de cooperação entre seus 31 Estados membros para a obtenção do desenvolvimento agrícola e do bem-estar rural.

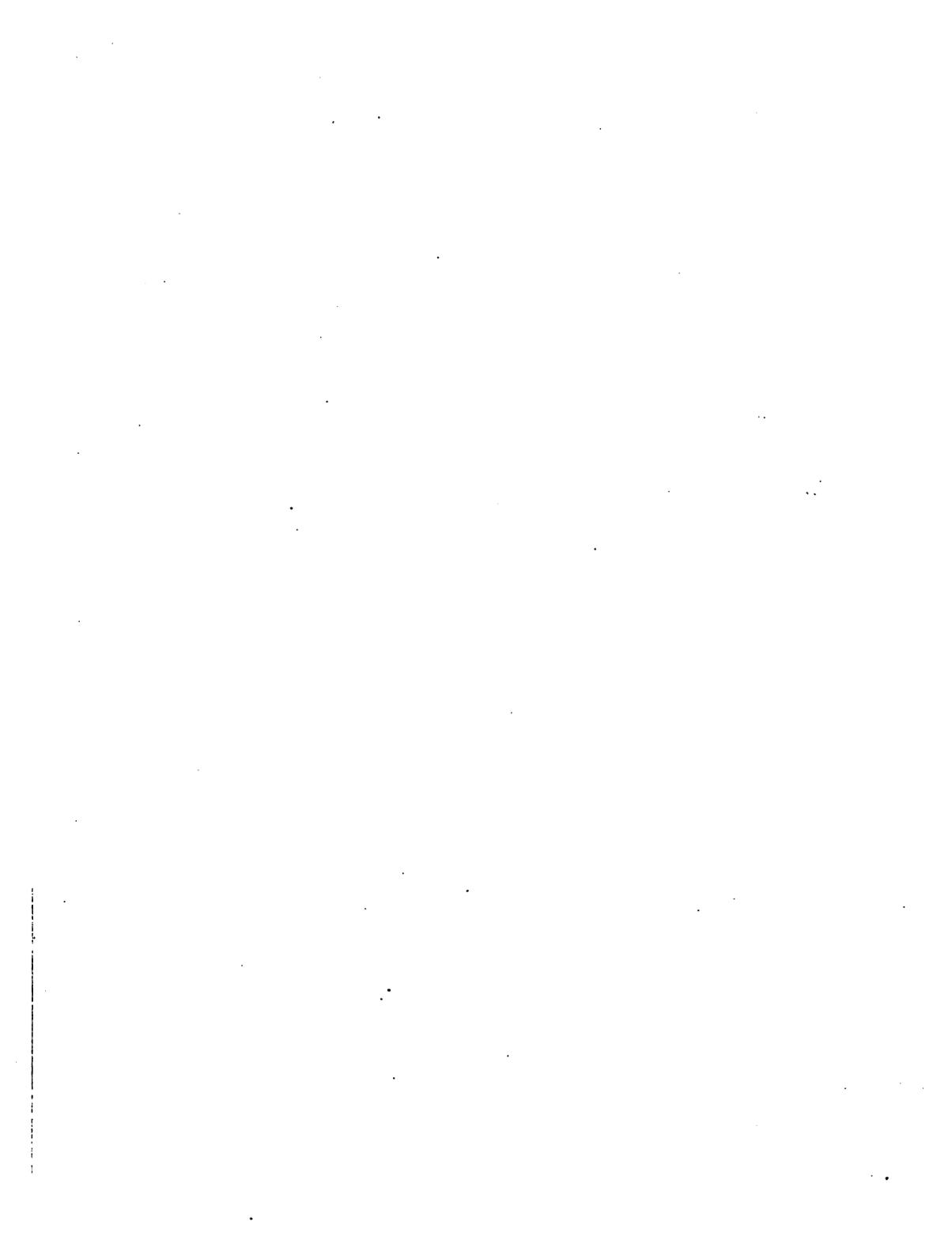
Com um mandato amplo e flexível e com uma estrutura que permite a participação direta dos Estados membros na Junta Interamericana de Agricultura e em seu Comitê Executivo, o IICA conta com ampla presença geográfica em todos os países membros para responder a suas necessidades de cooperação técnica.

As contribuições dos Estados membros e as relações que o IICA mantém com 12 Países Observadores, e com vários organismos internacionais, lhe permitem canalizar importantes recursos humanos e financeiros em prol do desenvolvimento agrícola do Hemisfério.

O Plano de Médio Prazo 1987-1991, documento normativo que assinala as prioridades do Instituto, enfatiza ações voltadas para a reativação do setor agropecuário como elemento central do crescimento econômico. Em vista disso, o Instituto atribui especial importância ao apoio e promoção de ações tendentes à modernização tecnológica do campo e ao fortalecimento dos processos de integração regional e sub-regional.

Para alcançar tais objetivos o IICA concentra suas atividades em cinco áreas fundamentais, a saber: Análise e Planejamento da Política Agrária; Geração e Transferência de Tecnologia; Organização e Administração para o Desenvolvimento Rural; Comercialização e Agroindústria, e Saúde Animal e Sanidade Vegetal.

Essas áreas de ação expressam, simultaneamente, as necessidades e prioridades determinadas pelos próprios Estados membros e o âmbito de trabalho em que o IICA concentra seus esforços e sua capacidade técnica, tanto sob o ponto de vista de seus recursos humanos e financeiros, como de sua relação com outros organismos internacionais.



Esta publicação foi reproduzida em  
Brasília, em julho de 1989, numa tiragem  
de 100 exemplares.





