10962

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SERINGUEIRA E DENDÊ

EMBRAPA

RELATÓRIO DE VIAGEM

TREINAMENTO EM ELETROFORESE E CITOGENÉTICA

Período: 18.05 à 04.06.1986

ANTONIO PESSOA REBELLO

Téc. Laboratório do CNPSD

Manaus-AM
1986

Pessoas Contactadas:

Dr. Eric Derbshyre - Chefe do Setor de Proteínas Vegetais e Eletroforese
Drª Maria Tereza Derbshyre - Chefe do Laboratório de Proteínas Vegetais e Eletroforese
Dr. Gerhard Bandell - Prof. Adjunto Deptº Genética
Drª Margarida L.R.A. Perecin - Prof. Adjunto Deptº Genética
Dr. Paulo R.C. Castro - Chefe do Deptº Botânica da ESALQ
Prof. Beatriz Appezzato - Prof. de Botânica ESALQ
Sr. Marcos Figueiredo - Aluno de mestrado da ESALQ
Sr. Adonias C.V. Filho - Aluno de mestrado da ESALQ
Sr. José Edson F. Figueiredo - Aluno de mestrado da ESALQ
Srtª Clarice Matraia - Técnica de laboratório do C.E.N.A.
Srtª Marianne Schmettow - Aluna de mestrado do C.E.N.A.
Sr. Paulo de Souza Gonçalves - Pesquisador do CNPSD e Aluno de Doutorado da ESALQ
Sr. Frederico O.M. Durães - Pesquisador do CNPSD.

I - INTRODUÇÃO

Este relatório refere-se à participação do relator nos treinamentos de: preparação de géis para eletroforese (C.E.N.A.), preparação do corante de Feulgen, utilização do contraste de fase em microscopia (Deptº Genética-ESALQ), além de ter dado uma orientação técnica sobre análises anatômicas de casca de seringueira (Deptº Botânica-ESALQ).

II - OBJETIVOS PRINCIPAIS

1 - Assimilação da metodologia e das técnicas utilizadas na preparação dos géis e das placas de eletroforese.

2 - Tiramos algumas dúvidas sobre a preparação do corante de Feulgen, da utilização do contraste de fase e sobre a montagem de lâminas permanentes - Citogenética).

III - PROGRAMA DO TREINAMENTO

Mês	Dia	
Maio	18	- Chegada a Piracicaba às 19:15 horas
"	19	- Nos apresentamos ao Dr. Eric Derbshyre que primeiramente inteirou-se sobre os meus conhecimentos de laboratório e bioquímica. Passando então a explicar-me de modo sintético o que é eletroforese e seus objetivos. Pela parte da tarde fomos apresentados à Drª Mª Tereza C. Derbshyre , responsável por 3 laboratórios, entre eles, o de Biologia de Proteínas Vegetais e Eletroforese onde fiquei, ja com a incumbência de observar e copiar algumas técnicas de preparação de gel para eletroforese.
	20	- Chegamos ao C.E.N.A., levando em mãos, sementes de *Hevea brasiliensis* e *pauciflora* a fim de extraírmos os extratos brutos das partes que compoem, a mesma, sendo esta dividida em embrião, cotilédone e endosperma. Assim feito, foi preparado o gel de poliacrilamida, às 16:30 horas tinhamos em mãos o gel pronto para ser corado o que ocorreria durante as próximas 14:00 horas.
	21	- Voltamos ao C.E.N.A., onde o Dr. Eric nos deu algumas explicações sobre as bandas que foram coradas e fixadas no gel. Bandas conseguidas de extrato bruto de sementes de *H.pauciflora*. Feitas as devidas anotações , começamos a trabalhar na extração do extrato bruto de *H.brasiliensis* e

na preparação do gel alcalino, orientado agora pela Drª Mª Tereza

Quando o gel estava pronto para ser corado procedemos de forma idêntica ao dia anterior.

22 - Ao chegarmos ao C.E.N.A., mantivemos contato com a técnica de laboratório, onde ficou acertado o empréstimo de seu caderno de anotações, a fim de que pudessemos melhor nos orientar perante o trabalho que tinhamos a desenvolver.

De posse dos resultados obtidos em géis alcalinos, foi nos pedido a repetição dos extratos só, que agora a corrida seria processada em gel ácido ou de pH 4,5.

Ás 17:25 h, o gel esta pronto para ser corado.

23 - Mantivemos contato com o Dr. Prof. Gerhard Bandell, que informou-nos da disponibilidade do seu laboratório de Genética, indicando-nos o aluno de mestrado Marcos Figueiredo, o qual está terminando a sua tese em citogenética de babaçú e a aluna de graduação Silvia, que é a responsável pela organização e preparação das soluções feitas dentro do laboratório de genética da ESALQ sobre a responsabilidade do Dr. Prof. Bandell. Ao chegarmos ao C.E.N.A., recebemos algumas orientações da Drª Mª Tereza, quanto à preparação do gel de S.D.S. que é um gel especial, por permitir a identificação de proteínas dissociadas ou seja, de polipeptídeos. Desenvolvemos a metodologia conforme a prescrição técnica e as 17:35 horas o gel estava pronto para ser corado.

24 - No Laboratório de Genética da ESALQ, Marcos já nos aguardava. Colocamos-lhe a par do nosso objetivo e as dúvidas que deveriam ser esclarecidas dentro, é claro, das possibilidades. Marcos nos forneceu uma nova metodologia sobre a preparação do corante e da montagem das lâminas permanentes as quais passamos a copiar.

Ao voltarmos do almoço, fomos apresentados à Srtª Silvia; passamos então à parte prática da preparação do corante.

26 - Feriado - Chegamos ao laboratório de Genética onde a Srtª Silvia nos aguardava; para nossa surpresa, o corante estava incolor e bastante ativo. Tentamos primeiramente fazer a coloração em primórdios foliares, no qual obtivemos uma boa resposta.

A Srtª Silvia, fez algumas observações quanto à dureza do material com referência ao tempo de fixação e a solução de pré- tratamento onde afirmou que obteve melhores resultados com 8 hidroxiquinoleína.

Fizemos também algumas lâminas usando ponta de raízes, o que não correspondeu ao esperado, pois o material encontrava-se duro, o que dificultou muito o bom "Smear"

27 - Ao chegarmos ao C.E.N.A., o Dr. Eric, passou a nos orientar sobre os cuidados que devemos ter na preparação dos géis em placa horizontal. Depois, a Drª Mª Tereza nos forneceu algumas publicações antes pedidas por nós para que pudéssemos tirar xerox, e ter maior fonte de pesquisa e referências de outros trabalhos realizados com eletroforese.

Pela parte da tarde, passamos à preparação do gel de amido em placa horizontal; depois de pronta esta foi conservada dentro da própria cuba para prosseguimento no dia seguinte.

28 - Ao chegarmos ao C.E.N.A., demos continuidade à preparação da placa horizontal.

O tempo de corrida das enzimas em gel de amido foi de aproximadamente 6:00 horas. Nesse intervalo passamos a desenhar as bandas e a calcular o Rm, de cada uma em géis diferentes, que o Dr. Eric havia nos pedido por ser este um dos ítens essênciais no que se refere a parte de interpretação dos resultados em eletroforese.

Passado o tempo de corrida das enzimas, providenciamos a parte de coloração e após 1:30 horas já estava pronta.

29 - Voltamos ao laboratório de genética na ESALQ, onde mantivemos entendimentos com Sr. Marcos Figueiredo, o qual mostrou-nos sua habilidade na preparação de lâminas de pontas de raízes, pelo método de Shiff. Foi pedido-nos que fizéssemos o mesmo com primórdios foliares, pois ele ainda não tinha utilizado em suas análises. De nossa parte tudo fizemos para orientá-lo sobre a nossa metodologia. As lâminas foram analisadas e alguns campos nos permitiram uma boa visualização quanto à contagem de cromossomos.

Pela parte da tarde o Sr. Marcos apresentou-nos ao Sr. José Edson Fontes outro aluno de mestrado, com trabalhos junto ao departamento de genética da ESALQ, que por hora encontra-se trabalhando com citogenética de feijão e milho. O Sr. José, preparou algumas lâminas de ponta de raízes de feijão Goiano precoce e nos permitiu a visualização das mesmas. Orientou-nos sobre alguns cuidados na preparação das lâminas e o meio de transformá-los em permanentes.

Fizemos ainda algumas lâminas de pontas de raízes, mas sem grande sucesso em obtenção de metáfase.

30 - Mantivemos entendimento com o Dr. Prof. Gerhard Bandell, sobre a possibilidade da utilização do laboratório no dia 31, sábado onde fomos atendidos de pronto.

No laboratório voltamos a fazer novas lâminas para contagem de cromossomos, usando ponta de raízes, usando como corante o carmin acético e a orceína acética porém, em termos comparativos o Reativo de Schiff, nos deu um contraste bem mais nítido.

Pela parte da tarde as lâminas preparadas foram de flôres, várias fases foram examinadas sendo que a célula mãe de pólen só foi encontrada no primeiro estágio do botão floral.

Por volta das 18:10 horas, quando saíamos do laboratório encontramos a Professora Margarida L.R. A. Perecin, onde fomos apresentados pelo Sr. Marcos, mantivemos então entendimento sobre a aplicação do contraste de fase em microscopia; a professora pediu-nos que procurássemos a Srª Mª Silvia, em seu laboratório logo pela manhã, a qual nos daria as orientações necessárias.

31 - Chegando ao laboratório de genética sob a responsabilidade da professora Margarida onde a Srtª Mª Silvia, nos aguardava, passamos então à aplicação da metodologia e logo já estavamos inteirados de sua utilização.

Fizemos algumas lâminas as quais foram analisadas em contraste de fase. Mantivemos contato com o Sr. Adonias C.V. Filho que adiantou-me sobre o entendimento mantido através do Frederico O.M. Durães com o Prof. Paulo Roberto C. Castro responsável pelo departamento de Botânica na ESALQ, sobre a permanência no departamento de botânica por dois dias, pois havia necessidade de assimilação da

técnica de análise de casca por dois técnicos de laboratório daquele departamento; esta autorização foi concedida pela Chefia do CNPSD.

Junho 02 - Fomos ao Departamento de Botânica da ESALQ, onde mantivemos entendimento com o Sr. Adonias, deslocamo-nos para o laboratório deste departamento onde encontravam-se os dois técnicos e a professora de botânica a Srtª Beatriz Appezzato.

Providenciamos a coleta das amostras de casca de seringueira, passamos a demonstrar, como fazer os cortes e como orientar-se, no transversal e no longitudinal radial; em seguida preparamos o corante e fizemos as colorações devidas.

Os técnicos tiveram alguma dificuldade na preparação das lâminas, pois as mesmas ficavam com muitas bolhas de ar, voltamos a repetir a montagem e o problema foi minorado.

Ao utilizarmos o microscópio, notamos a inexistência da escala de ocular, o que nos impossibilitaria as medidas micrométricas dos parâmetros anatômicos.

Providenciaram a escala junto ao setor de Fitopagologia e medições microscópicas, tivemos que ensinar a usar a escala para a obtenção do fator correspondente a cada objetiva.

03 - Nosso primeiro contato foi com um dos técnicos do laboratório de botânica, o qual chamaou-nos a atenção para a diferença existente entre a coloração do corante preparado por eles e a que nós havíamos feito, certificando-nos da metodologia empregada por eles, notamos uma diferença na quantidade de glicerina utilizada; nossa metodologia foi anotada e passamos para a análise em microscópio. Orientamos e ensinamos tudo que nos foi pedido, dentre estes o número de anéis, diâmetro dos vasos, distância média entre anéis consecutivos, densidade de vasos em 5mm linear, espessura de células pétreas, densidade de vasos em casca macia e casca dura.

Ao final da tarde o Sr. Adonias, levou-nos ao encontro do prof. Paulo R.C.Castro, onde agradeceu-nos a colaboração e prontificou-se a cooperar conosco caso precisássemos de sua colaboração junto ao setor de botânica da ESALQ.

Sem mais, nos despedimos e voltamos ao hotel.

04 - Retorno

Conclusão: O estágio dividiu-se, basicamente, 2 etapas: na primeira delas, apreendemos a técnica de eletroforese de isoenzimas sob a metodologia mais refinada atualmente (gel de acrilamida), além de detalhes em citogenética, como coloração cromossômica, contraste de fase, etc.

Na segunda, transmitimos a técnica de análise de casca. Passamos por 3 laboratórios: 1 - Laboratório de Proteínas Vegetais e Eletroforese do CENA; 2 - Laboratório de Citogenética do Deptº de Genética da ESALQ e 3 - Laboratório do Deptº de Botânica da ESALQ.

Agradecimentos:

A todos quanto, diretamente ou indiretamente, contribuiram para a realização deste estágio de aprendizado, e também de ensino, especialmente à Chefia Técnica do CNPSD na pessoa do Dr. Márcio de Miranda Santos e ao Dr. Antonio Nascim Kalil Filho, do Setor de Genética e Melhoramento do CNPSD.