

BROTÉRIA GENÉTICA

REVISTA QUADRIMESTRAL

ÓRGÃO DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA



ÓRGÃO DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

CONSELHO DE REDACÇÃO :

Prof. Dr. Luís J. Archer (Director e Proprietário)
Cristina Marinho (Secretário)
Prof. Dr. Jorge Antunes-Correia
Prof. Dr. Miguel Pereira Coutinho
Eng.º Tristão Mello-Sampayo
Prof. Dr. Luís Sieuve Monteiro
Prof. Dr. Amândio S. Tavares

ADMINISTRADOR : Januário Geraldes

CONDIÇÕES DE ASSINATURA :

Portugal: Esc.: 400\$00 (oferecida gratuitamente pela Sociedade Portuguesa de Genética aos seus sócios)
Espanha e Países de expr. portuguesa: Dol. \$7.00
Outros Países: Dol. \$12.00
Número avulso: Esc. 150\$00

REDACÇÃO E ADMINISTRAÇÃO :

BROTÉRIA GENÉTICA

R. Maestro António Taborda, 14
1293 LISBOA CODEX
Telef. 66 16 60

Composto e Impresso nas oficinas gráficas da Editorial Império, Lda.
Rua do Salitre, 155, 1.º — Telef. 57 31 73 — 1296 Lisboa Codex — Portugal

ÍNDICE

TEMAS EM FOCO

- Manifesto do Triticale. Contramanifesto das espécies afins do Trigo. Reacção do Trigo 5
por *Henrique Guedes Pinto*
e *Tristão Mello-Sampayo*
- Aspectos Actuais da Selecção Clonal da Videira 11
por *Antero Martins*

ARTIGOS GERAIS E DE REVISÃO

- Engenharia Genética em *Bacillus subtilis*.
I. Plasmídeos Nativos 15
por *Hermínia de Lencastre*

ARTIGOS DE INVESTIGAÇÃO

- Resistência Específica — Escolha de Genes 39
por *Alberto Palyart do Carmo e Freitas*
- Induced Mutation in Wild Pea (*Pisum sativum var. arvense L*) 55
por *G. Bhowmik, P. Kalita and B. Chowdhury*

NOTAS E NOTÍCIAS

- Assembleia Geral da Sociedade Portuguesa de Genética 63
Ficheiro de Actividades dos Sócios 65

CARTA AO EDITOR

Se os cromossomas falassem...

MANIFESTO DO TRITICALE

Nós pertencemos ao partido dos cromossomas R, os cromossomas do centeio, essa espécie que tanto tem sido subestimada e marginalizada, destinada desde há séculos aos solos mais pobres, às condições de inverno mais rigorosas e ao qual raramente se aplicam boas e correctas adubações.

E tudo isto porquê, tudo isto a favor de quem?

Do trigo, dessa cultura desde os tempos bíblicos sempre privilegiada, sempre beneficiando de benesses e privilégios do homem que lhe tem atribuído os valores e as terras mais férteis, as melhores adubações, os melhores cuidados e estudos, a melhor mecanização e as mais altas cotações no mercado.

E perguntamos nós: quais as consequências desta situação elitista que renega o centeio relativamente ao trigo?

As consequências estão bem à vista: a monocultura, com os seus inegáveis perigos de alastramento de doenças e pragas, os grandes monopólios de cereais (e todo o seu cortejo de interesses económicos e políticos) e, mais grave, o já alarmante suicídio cerealífero resultante da progressiva depauperação da variabilidade genética — essa riqueza única que a mãe natureza conseguiu acumular ao longo da história da evolução e que é agora perdida através da massificação cultural de uns quantos (poucos) génotipos de trigo eleitos, pomposamente designados por cultivares, com a eliminação e perda de todas as outras combinações genéticas existentes ou potencialmente existentes.

O centeio, como planta alogâmica que é, orgulha-se de ser um bastião que conservou e preservou uma parte importante da variabilidade genética, isto apesar de grande vítima da contínua redução da área de cultivo todos os anos.

Há que alertar a todos para este estado de coisas. Há que acabar de vez com esta situação elitista e classista e tanto mais injusta quanto pernicioso para o futuro.

Porém, como não pretendemos acabar com uma injustiça (a da situação privilegiada do trigo) para instaurar uma nova que também o seria (a mono-

cultura extensiva do centeio) propomos uma frente conjunta dos cromossomas do trigo e do centeio, em que cromossomas de uma e outra espécie, trabalhando lado a lado, possam participar na gigantesca e epopeica tarefa da construção de um novo cereal: o Triticale.

Cromossomas do trigo e do centeio! Unamo-nos nesta frente comum que tem por finalidade acabar de vez com injustiças e privilégios antigos e construamos com a união das informações genéticas que ambos transportamos o Cereal Novo, o cereal do futuro.

**CROMOSSOMAS DO TRIGO E DO CENTEIO UNIDOS VENCEREMOS!
VIVA O TRITICALE!**

CONTRAMANIFESTO DAS ESPÉCIES AFINS DO TRIGO

Não foi sem alguma surpresa e causando-nos o mais vivo repúdio que nós, as espécies afins do trigo dos géneros *Aegilops*, *Agropyron*, *Elymus*, etc., tomámos conhecimento desse panfleto que dá pelo nome de «Manifesto do Triticale».

Pretende nesse documento o cereal centeio auto proclamar-se de cereal «marginalizado», «vítima» da segregação que por vezes o trigo lhe impõe.

Curiosa situação esta a dum cereal que como ele sempre viveu de benesses de ser um cereal alternativo para zonas que o trigo não pretendia para si próprio por nelas responder de modo menos satisfatório.

Mais curiosa ainda é a maneira como o centeio, alegando uma pretensa «marginalização» e denunciando privilégios e injustiças do trigo, se esqueceu das próprias espécies suas afins do mesmo género, o *Secale vavilovii*, o *Secale segetale*, etc., etc., essas sim, bem mais desprezadas do que ele, quando não mesmo sujeitas a persistente eliminação da cerealicultura.

Mas se essa marginalização se pudesse dizer acerca do centeio, que dizer então da escandalosa situação em que se encontram os géneros *Aegilops*, *Agropyron*, *Hyanaldia*, etc., cujas espécies, essas sim, são as verdadeiras vítimas da discriminação.

Parece assim que o centeio se esquece de toda uma série de géneros e suas espécies nas *Triticinae*, que desempenharam um papel fulcral na evolução dos próprios trigos e que se encontram hoje totalmente devotadas a uma segregação e esquecimento tanto mais prepotente e injusto quanto elas constituem os descendentes legítimos dos antepassados do trigo e são repositórios vivos da variabilidade das *Triticinae*.

Ou esquece o centeio ao falar da erosão genética, que o trigo infelizmente sofreu e sofre (fruto duma perspectiva de produtividades elevadas conseguidas pela colonização massiça de uns poucos genótipos e conseqüente perda de muitos outros), de que a preservação da variabilidade genética está em nós, espé-

cies ditas «selvagens» ou condescendentemente designadas por vezes de «afins» do trigo?

Não foi ao *Aegilops ventricosa* que se foi buscar para o trigo o(s) gene(s) da resistência à *Cercospora herpotricoides* (acama parasitária) que o trigo não possuía (ou já não possuía?) E não foi ao *Aegilops umbellulata* que se foi achar a resistência à ferrugem castanha? E quantas mais resistências e outras características desejáveis não se foram ou se esperam ainda vir buscar?

É por isso que denunciámos de forma vigorosa os falsos lamentos agora apresentados pelos apoiantes do centeio através do seu «manifesto do triticales» e que outra coisa não é do que um novo elitismo escamoteado sob uma outra capa.

É por isso que lançamos um novo manifesto, que não contemple apenas alianças estritas e classistas entre o trigo e o centeio, mas que seja uma vaga de fundo nova nos cereais, seja quais forem as suas constituições genómicas e níveis de ploidia. Um movimento em que todos os cromossomas de cereais nos unamos, não apenas num dito *cereal novo* (pomposamente denominado como «primeiro cereal fabricado pelo homem») mas em outros cereais novos além do triticales como o *Hordecale* (anfidiplóide de cevada e centeio), o *Triticordeum* (anfidiplóide do trigo e cevada) e muitos mais, não desprezando a contribuição quer cromossómica ou quer apenas de alguns genes que se podem ir encontrar em tantas e tantas outras gramíneas e de inegável interesse para o melhoramento de inúmeros cereais.

Cromossomas! Constituamo-nos numa *verdadeira frente* na luta por cereais — novos ou com provas já dadas ao longo dos tempos — em que unidos, independentemente de níveis de ploidia ou constituições genómicas, possamos avançar na batalha por uma maior e melhor produção cerealífera.

OS CROMOSSOMAS UNIDOS JAMAIS SERÃO VENCIDOS!
VIVAM OS CEREAIS!

REACÇÃO DO TRIGO

Oh Deuses estremecei! Oh gentes pasmai! As minhas irmãs, espécies da sub-Tribu *Triticinae*, manifestam-se contra mim, considerando-se ofendidas e marginalizadas! E o mais grave é que me lançam calúnias, a mim, cereal nobre e com pergaminhos, que tudo tenho feito para as promover, procurando com o fulgor do meu brilho, iluminar-lhes o caminho difícil desde um qualquer lugarejo remoto do Próximo Oriente ou orla desértica ou gélida dos confins da Terra até aos férteis e gloriosos campos de cultura do agricultor progressivo! Eu, que por duas vezes contraí aliança com essas minhas pobres parentes, que agora se queixam de eu as menosprezar! Primeiro quando eu, gozando do

conforto e da paz do meu reduto exclusivo no Crescente Fértil, na minha forma original de trigo diploide ou *Triticum monococcum*, travei relações de boa vizinhança com uma parente pobre e também diplóide da Secção Sitopsis do Género *Aegilops*; e logo aí, enamorados um do outro, juntámos os nossos genómos (o meu A com o seu B) e, espontaneamente cruzados, duplicámos as nossas guarnições cromossómicas para originar o trigo alotetraploide, antepassado selvagem do actual e mui nobre trigo rijo das massas alimentícias. E assim unidos expandimos a nossa área até encontrarmos, mais ao Norte, outra parente diplóide, pobre e isolada, a espécie *Aegilops squarrosa* com a qual, a meu alvítrio, nos juntámos novamente, acrescentando o seu genómio D aos nossos dois, numa união em tudo semelhante à anterior mas somada duma incomensurável potencialidade genética que permitiu ao trigo alohexaploide assim formado originar muitas outras espécies, até alcançar o prodígio de perfeição e de ubiquidade do *Triticum aestivum*, o trigo mole ou trigo de pão que hoje somos.

E graças a essa potencialidade pôde o homem, nosso amo e senhor, isolar, criar e seleccionar esse sem número de cultivares que hoje envolvem num circundante abraço de amor fraterno o Mundo de lés a lés, desde o Círculo Polar Ártico até aos contrafortes do Kilimanjaro e às férteis planícies do Hemisfério Sul, chegando ao ponto de constituirmos o alimento básico para mais de 40 países, representando 35 % da população do Globo. Com o seu saber e engenho aquele nosso amo moldou-nos nestes cultivares atendendo apenas às suas exigências de ocasião e local, só possíveis de concretizar devido a essa imensa capacidade de variação que os nossos três genómos nos imprimiram.

Assim e gradativamente conseguimos fixar o homem à terra propondo-nos fornecer-lhe o pão de cada dia, libertando-o das trevas e da apatia do nomadismo e pastorícia e oferecendo-lhe o ensejo duma vida sedentária, platónica, estável e comunitária tão necessária à criatividade contínua e colectiva, motor fundamental da Civilização.

Para atingirmos essas áreas remotas viajámos nos bornais e alforjes dos peregrinos, guerreiros e navegantes, estivemos sempre presentes nos grandes momentos da História, vimos o construir de cidades, o nascer e o tombar dos poderosos, o erguer e o destruir de impérios, o fundar de religiões, acompanhando os grandes pensadores, sábios, poetas e homens bons. Nosso pão foi sacralizado desde as mais antigas civilizações e, feito amor e esperança, alcançou as bocas dos humildes e famintos. Para nos abrigarem construíram-se grandes pirâmides. Constituídas elas em mausoléus de reis e senhores poderosos, fomos avaramente conservados por milénios nas suas antecâmaras fúnebres. Partimos, enfim, para essa maravilhosa e ao mesmo tempo aterradora aventura que é a civilização moderna, na qual somos tão desejados e disputados.

Duvidam essas minhas irmãs que lhes quero bem? Vede, como pacificamente acedi em conceder uma aliança a essa pária dos terrenos marginais que é a espécie *Secale cereale*, o centeio, para formar o tritcale, sem ainda ter de

modo nenhum esgotado os meus recursos naturais de variabilidade própria e como já negoceio pactos com outras irmãs, espécies dos Géneros *Aegilops*, *Agropyron*, *Haynaldia*, etc. permitindo, sem protesto, que me retirassem os meus supressores Ph de emparelhamento homoeólogo para que, nos híbridos, os meus preciosos cromossomas emparelhassem, durante a meiose, com os dessas espécies. Concedi-lhes assim o privilégio de sofrerem comigo a recombinação genética. E a este propósito direi mesmo que já tenho concedido uma audiência privada à minha prima afastada, a cevada.

Reconheço que entre as primeiras alianças que estabeleci, medearam milhares de anos. Aliás o que é que isso significa no relógio do tempo e na paciência de que as minhas irmãs deveriam dar mostras dada a sua enorme longevidade? No entanto e esquecendo muitas ligações, sem sucesso, que tenho tentado ao longo dos anos, o momento chegou para que essa sua ansiedade milenária possa ser apaziguada pois a engenharia genética, desde a cromossómica à molecular, vão dando já indícios e mesmo provas da sua capacidade para fazer transferir e associar, numa mesma planta, as características favoráveis precursoras ou mesmo paradigmática dum cereal novo, no qual, seguramente eu terei o predomínio!

Não esqueçam portanto essas irmãs, que sem mim nada valem mas que eu estou sempre a seu lado para as ajudar a tirar os pés do lodo. E nada de desânimos, provocações e ameaças.

UNIDAS A MIM, E POR MIM GUIADAS VENCERÃO!

Henrique Guedes-Pinto

Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

Tristão Mello-Sampayo

Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras

Post-Scriptum — Os conceitos atrás desenvolvidos, — para além do aspecto formal escolhido —, correspondem a uma visão pessoal dos autores, e poderão ser aprofundados e glosados pelos interessados em várias publicações entre as quais se destacam:

A. MÜNTZING — «*Triticale. Results and Problems*». *Advances in Plant Breeding*, Suppl. N.º 10. J. Pl. Breeding. Ed. Verlag Paul Parey. 1979.

M. FELDMAN and E. SEARS — «*The Wild Gene Resources of Wheat*». *Scientific American* 244 (1) 98-109. 1981.

E. SEARS — «*The Wheats and Their Relatives*». *Handbook of Genetics*, Vol. 2. Robert C. King (Plenum Press). 1975.

ASPECTOS ACTUAIS DA SELECÇÃO CLONAL DA VIDEIRA

Antero Martins

A convicção de que as castas de videira seriam populações homogéneas e geneticamente estáveis, em resultado dos processos de propagação vegetativa próprios do regime cultural, não é uma ideia antiga. Pelo contrário, ela conheceu alguma generalização só a partir dos fins do século passado. Os estudos de ampelografia, que então se desenvolviam em grande força, careciam de objectos de análise bem definidos e permanentes e, por isso, terão tido certamente a sua dose de responsabilidade na introdução dum conceito de homogeneidade e estabilidade da casta que o conhecimento empírico até então acumulado não avaliava. Com efeito, é muito frequente encontrarem-se na bibliografia antiga referências à existência de «tipos» no interior das castas, e da alteração do seu valor cultural e enológico ao longo dos tempos. Estudos sistemáticos de selecção e análise da variabilidade intravarietal, em grande desenvolvimento desde há cerca de 30 anos, vieram confirmar inteiramente o que durante algumas décadas esteve em dúvida: os processos de multiplicação somática utilizados na cultura da videira (enxertia, enraizamento de estacas...) se, por um lado, garantem uma relativa estabilidade genética das populações em cultura, por outro lado, fomentam também um certo nível de variação, nomeadamente quanto a importantes características de interesse cultural e tecnológico.

Esta pressão de variação, em termos de evolução das populações-castas, pode ter dois desfechos possíveis: a degeneração das boas castas tradicionais, geralmente no sentido de reduções de produtividade incompatíveis com a economia da cultura, ou a acumulação dum leque de variabilidade susceptível de utilização positiva mediante metodologias de selecção adequadas.

Situações do primeiro tipo verificam-se actualmente em relação a muitas castas tradicionais portuguesas, sujeitas a um processo de progressivo abandono em favor de outras mais produtivas mas de baixa qualidade o que, em última análise, conduz à degradação da tipicidade e qualidade dos vinhos. Por outro lado, é possível inverter o curso desta tendência, seleccionando no interior da casta os tipos (clones) correspondentes ao padrão antigo, ou mesmo, novos tipos capazes de responderem melhor a objectivos culturais e tecnológicos em permanente evolução. Ora, é isto precisamente o que se vem fazendo no país duma

forma sistemática desde 1978, ano em que se iniciou a selecção massal e clonal da casta Touriga Nacional na região do Douro. De ano para ano o trabalho vem sendo alargado a outras castas nobres das mais importantes regiões vitícolas, atingindo-se já actualmente um total de 26 castas tradicionais em selecção.

A selecção produz habitualmente resultados notáveis no plano da produtividade mas é uma metodologia demorada (ordem dos 15 anos para a selecção clonal) sendo aconselhável, portanto, o alargamento urgente de tais acções à generalidade das boas castas tradicionais portuguesas.

De resto, tais metodologias são já largamente aplicadas em todos os países vitícolas desenvolvidos e assiste-se presentemente a um grande intercâmbio internacional de informações e materiais neste domínio, nomeadamente através do Simpósio Internacional sobre Selecção Clonal da Videira, de que se realizaram três edições até ao presente, primeiro na Alemanha e na França, e a última na Itália (Mogliano, Veneza) em Junho de 1981. Este Simpósio reuniu cerca de 100 participantes de praticamente todos os importantes países vitícolas do mundo, incluindo três portugueses (um deles, o signatário) ligados às acções de selecção em curso no país.

As cerca de 60 comunicações presentes (compreendida uma portuguesa) foram agrupadas em três grandes temas e o seu tratamento antecedido de exposições introdutórias a cargo de investigadores de grande projecção internacional nos domínios do melhoramento genético e da virologia da videira. Porque umas e outras exprimem em certa medida os últimos progressos e o estado actual da selecção clonal no mundo, fazem-se-lhe a seguir algumas referências sumárias.

1.º Tema — Princípios e metodologia da selecção clonal

M. Rives, da França, introduziu o assunto, referindo-se em particular às fontes de variabilidade intravarietal em plantas de propagação vegetativa. A mutação natural responderá certamente por uma parte apreciável dessa variabilidade, mas outras causas devem ser procuradas (e estão a sê-lo em alguns laboratórios franceses). Certos resultados experimentais e estudos comparativos de segregação nas descendências de clones fenotipicamente distintos e análises de heterosis entre clones normais e cultivados *in vitro* parecem indicar que parte da variabilidade residirá no citoplasma.

Outras comunicações abordaram ainda a questão da variabilidade intravarietal como «matéria-prima» da própria selecção clonal. J. Bisson (França) constatou que clones de *Pinot noir* apresentam variações de produção de 300 %, de teor de açúcar de 20 %, de acidez total de 50 % e de substâncias corantes das películas de 70 %, o que abre imensas perspectivas à selecção clonal, no sentido do aumento da produtividade e da qualidade.

Progressos têm sido feitos recentemente no apuramento de metodologias com vista à avaliação qualitativa dos clones com base no menor tempo e no menor peso de material possíveis. Ph. Leclair (França) conclui ser possível actualmente fazer microvinificações representativas a partir de 10 kg de colheita.

Questão de grande interesse presente no domínio da selecção clonal é o encurtamento temporal do esquema metodológico clássico, que se estende habitualmente por 15 a 20 anos. Várias comunicações relataram avanços recentes neste campo, nomeadamente nos aspectos de cultura de meristemas e micropropagação *in vitro*.

2.º Tema — Selecção clonal aplicada

Exposições introdutórias estiveram a cargo de A. Caló (Itália) e H. Schoffling (Alemanha) que chamaram a atenção para as grandes potencialidades da selecção clonal no aumento da produtividade mas também no sentido da melhoria de numerosas componentes da qualidade, e resistências, domínios que até ao presente têm sido insuficientemente explorados.

Várias comunicações apresentadas nesta Secção vieram a corroborar as opiniões precedentes, relatando resultados positivos da selecção obtidos em diversos países quanto a parâmetros de qualidade, sanitários e culturais.

Bem significativas foram algumas comunicações da Alemanha (certamente o país mais evoluído no domínio da selecção clonal da videira) que relataram trabalhos de selecção clonal no interior de outras populações clonais, com uma origem ainda relativamente recente, da ordem dos 10-20 anos, e estudos económicos sobre a rentabilidade da selecção. Quanto ao 1.º aspecto não pode deixar de causar algum espanto verificar quão rápida é a acumulação de variabilidade no interior dos clones, estruturas até há poucos anos consideradas geneticamente homogéneas ou pelo menos muito estáveis (é curioso notar que pelo fim da 1.ª metade deste século ainda se punha em dúvida que a própria população-casta contivesse variabilidade genética no seu interior). Mas ainda bem que assim acontece pois enquanto com outras espécies é indispensável o recurso a métodos mais sofisticados de melhoramento genético — hibridações baseadas em estudos de aptidão combinatória e heritabilidade, mutagénesis artificial, engenharia cromossómica, manipulação genética... — com a videira continuamos a hervir-nos graciosamente do manancial de variabilidade fornecido pela natureza.

Quanto aos aspectos económicos da selecção, soube-se pela comunicação de H. Sievers que a produção dum clone seleccionado na Alemanha custa uma soma da ordem dos 3000 contos, para um «período de validade» de 20 anos (estimativa baseada em inquéritos junto de seleccionadores públicos e privados) informação aliciante para os participantes portugueses, que pensam ser possível produzir os primeiros clones em Portugal por custos significativamente menores, e portanto com uma relação custos-benefícios mais favorável.

3.º Tema — Aspectos da selecção sanitária

O tema foi introduzido por R. Bovey, da Suíça, que se referiu longamente à situação e às perspectivas de evolução da luta antivírus em vários dos mais importantes países vitícolas, com destaque para as técnicas de indexagem e termoterapia. As técnicas serológicas (quando aplicáveis) tendem a substituir as tradicionais indexagens em indicadores herbáceos e lenhosos, com apreciáveis vantagens de ordem técnica e económica.

No laboratório de R. Bovey (Changins, Suíça) vêm-se fazendo esforços para a relativa automatização da aplicação do teste ELISA tendo-se conseguido desde 1980 resultados prometedores.

A termoterapia continua a ser encarada como técnica de recurso quanto às variedades europeias, pelo menos enquanto não forem melhor compreendidas as consequências de ordem morfológica e fisiológica que lhe estão directa ou indirectamente associadas. Fazem-se actualmente esforços para o melhor conhecimento dessas modificações e para o acerto de metodologias de aplicação do calor com menores consequências nesse campo.

Diversas comunicações dentro desta rúbrica permitiram colher uma imagem das metodologias da selecção sanitária nos diversos países vitícolas, bem como da importância relativa das viroses mais frequentes na videira. No que toca à Itália o sistema de defesa sanitária (que compreende não só a selecção propriamente dita como todo o processo de produção de materiais de propagação isentos) parece bastante, ou mesmo, excessivamente descentralizado, pelo menos se comparado com os padrões francês, e até o alemão, o que pode ter consequências negativas nos planos científico e económico. Algumas visitas técnicas vieram posteriormente a corroborar esta ideia de um certo toque de «anarquia» no sistema de selecção italiano.

O próximo Simpósio realizar-se-á em Changins, na Suíça, sob a organização de R. Bovey, daqui a 5 anos.

Com algum optimismo, poderemos esperar que nessa altura já muitos viticultores portugueses estejam a fazer os seus repovoamentos com material de selecção massal, que muitos campos experimentais estejam montados para avaliação do potencial cultural e tecnológico dos clones (selecção clonal) e que várias comunicações portuguesas, exprimindo essa desejável realidade, venham a ser apresentadas ao 4.º Simpósio...

ENGENHARIA GENÉTICA EM *BACILLUS SUBTILIS*

I. PLASMÍDEOS NATIVOS

Hermínia de Lencastre

Grupo de Genética Molecular, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal.
Departamento de Química e Biotecnia, Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade Nova de Lisboa

ABSTRACT

Several reasons recommend the use of *B. subtilis* as an host for molecular cloning. A major barrier to reach this aim was the absence of convenient vectors for cloning in this bacterium. This fact has led to intensive research programs of screening *B. subtilis* strains for the presence of plasmids and to introduce plasmids from species of other genera in *B. subtilis*.

Although 8-10 % of the *B. subtilis* strains studied so far have plasmids, all but one were cryptic.

From the large number of plasmids isolated from different species of the genus *Bacillus* three seem to be useful as cloning vectors in *B. subtilis*. Moreover, taken as the whole, the plasmids of the *Bacilli* are of great interest not only in genetic engineering but also for studies of plasmid biology.

The successful introduction in *B. subtilis* of several *Staphylococcus aureus* plasmids was of major importance. The presence of antibiotic resistance markers and of a low number of recognition sites for several restriction enzymes in these plasmids, pointed out their potential use as cloning vectors. Different processes were used to transfer these plasmids between different strains of *B. subtilis*. In particular plasmid transformation of competent cells of *B. subtilis* was characterized in great detail.

INTRODUÇÃO

Os termos *Engenharia Genética* ou *Manipulação Genética* designam a recombinação artificial de genomas que podem pertencer a espécies afastadas entre as quais não são conhecidas permutas genéticas naturais.

Esta recombinação é obtida por ligação *in vitro* duma molécula de DNA capaz de replicação autónoma (*vector*) a um fragmento de DNA heterólogo, seguida da introdução desta molécula recombinada numa célula hospedeira que permita a sua replicação e expressão.

A subsequente multiplicação dessa célula origina um clone, ou seja uma linha de organismos semelhantes, contendo, todos eles a mesma molécula recombinada. Por isso este processo se designa como *clonização molecular* («molecular cloning») (COHEN 1975).

A manipulação artificial de genomas conducente à sua clonização processa-se em várias fases e exige determinadas condições (COHEN 1975, 1976a) que podem ser assim resumidas:

(i) Existência de um vector capaz de replicação autónoma no organismo receptor (*hospedeiro da clonização*). O vector é portanto o transportador do DNA estranho, podendo ser um plasmídeo ou um genoma viral.

(ii) Possibilidade de fragmentação conveniente do vector e do DNA a clonizar.

(iii) Capacidade de ligação do segmento de DNA heterólogo ao vector.

(iv) Mecanismo para introduzir a molécula recombinada numa célula receptora.

(v) Possibilidade de seleccionar, entre a população de células receptoras, aquelas que de facto adquiriram o plasmídeo recombinado.

Desde as experiências pioneiras de COHEN *et al.* (1973) uma elevadíssima percentagem dos trabalhos de Engenharia Genética têm sido realizadas com *E. coli* como hospedeiro, por ser este o organismo melhor caracterizado em termos de genética, bioquímica e biologia molecular. Além disso são conhecidos numerosos plasmídeos que se replicam em *E. coli* e o fago λ desta bactéria é o bacteriófago mais completamente estudado.

Interessa, no entanto, por várias razões, desenvolver em *B. subtilis* um sistema de clonização paralelo ao de *E. coli*.

B. subtilis é uma bactéria gram-positiva, capaz de esporular, filogeneticamente muito distante de *E. coli*, que não é patogénica nem comensal do homem. É transformável, são conhecidos numerosos mutantes auxotróficos e de esporulação, e possui um mapa genético bem caracterizado.

A possibilidade de clonização molecular em *B. subtilis* poderá ser útil para uma variedade de estudos em esporulação, transformação ou expressão génica, e poderá ter interesse industrial, dado que várias espécies de *B. subtilis* são comercialmente importantes nas indústrias de fermentação assim como na produção de antibióticos, enzimas e insecticidas (GRYZAN & DUBNAU 1978). Permitirá também comparar a expressão dos mesmos genes em dois ambientes celulares diferentes (*B. subtilis* e *E. coli*).

Dois outros aspectos de grande interesse para a utilização de *B. subtilis* como hospedeiro para a clonização de genes são a inexistência de endotoxinas nas paredes de *Bacillus* e a grande variedade de proteínas excretadas por diferentes espécies deste género.

Tal como foi referido por YOUNG (1980) a clonização de genes, que codificam produtos com interesse para consumo humano em *B. subtilis*, tem o enorme

interesse de não exigir a sua purificação de endotoxinas (tóxicas para o Homem). Diferentemente acontece em *E. coli*.

Relativamente a proteínas solúveis como proteases, amilases, fosfatase alcalina, penicilase, ribonuclease e outras, excretadas para o meio por espécies de *Bacillus* (SIMONS *et al.* 1978; MANTSALA & ZALKIN 1979), a co-clonização em genes que as codificam facilitará muito o método de extracção do produto.

A principal barreira à utilização de *B. subtilis* como hospedeiro em Engenharia Genética tem sido a falta de vectores para a clonização nesta bactéria.

Este facto motivou uma intensa procura de plasmídeos nesta espécie e em outras do mesmo género, bem como a tentativa de introduzir em *B. subtilis* plasmídeos provenientes de géneros diferentes.

Paralelamente têm-se explorado as possibilidades de utilização de fagos temperados de *B. subtilis* como vectores da clonização nesta bactéria.

PLASMÍDEOS HOMOSPECÍFICOS

Têm-se encontrado plasmídeos em praticamente todos os géneros de bactérias onde a sua presença foi investigada (NOVICK 1969; HELINSKI & CLEWELL 1971; HOLLOWAY *et al.* 1971; CLOWES 1972; HELINSKI 1973; COHEN 1976 b; REANNEY 1976; NOVICK 1980).

Na sua maior parte, os plasmídeos foram inicialmente detectados em consequência de fenótipos que determinam no hospedeiro como capacidade de conjugação, resistência a antibióticos, a metais pesados ou a ultravioletas, produção de colicinas, toxinas, enzimas de restrição e de modificação, indução de tumores em plantas, e metabolismo de compostos como a cânfora e de diversas fontes de carbono e azoto (NOVICK 1969; COHEN 1976 b; NOVICK *et al.* 1976).

O desenvolvimento de técnicas como a centrifugação em gradientes de cloreto de céσιο-brometo de etídio (RADLOFF *et al.* 1967) ou a electroforese em gel de agarose (AAIJ & BORST 1971; FISCHER & DINGMAN 1971; HAYWARD & SMITH 1972; HELLING *et al.* 1974; SHARP *et al.* 1973) permitiram isolar pequenas moléculas de DNA circular em estrutura dupla e superespiralada (CCC) mesmo que não estejam associadas a marcas fenotípicas. Estes chamados *plasmídeos crípticos* (NOVICK 1969; NOVICK *et al.* 1976) têm sido encontrados em numerosas espécies (ROWND *et al.* 1966; COZARELLI *et al.* 1968; LEE & DAVIDSON 1968; RUSH *et al.* 1969).

O aparecimento das técnicas de recombinação artificial de genomas e o interesse da utilização de *B. subtilis* como hospedeiro para a clonização de genes estimulou a procura de plasmídeos em *B. subtilis* e noutras espécies de *Bacillus*.

Verificou-se que 10 a 20 % das estirpes contêm plasmídeos, os quais, com excepção de pIM13 (Quadro 3), são crípticos. No entanto as estirpes de *B. subtilis*

melhor caracterizadas (168 e W23) (HEMPHILL & WHITELEY 1975) não têm plasmídeos (LOVETT & BRAMUCCI 1975 b).

Os primeiros plasmídeos isolados de *B. subtilis* foram designados por pPL1 e pPL2 (Quadro I) e extraídos respectivamente das estirpes ATCC15841 e ATCC 7003. Destas, a última encontra-se mais próxima de *B. subtilis* 168 do que a primeira, no que respeita a critérios genéticos, fisiológicos e bioquímicos (LOVETT & BRAMUCCI 1975 b).

TANAKA *et al.* (1977) isolaram das estirpes de *B. subtilis* IFO3022, IFO 3215, IAM1232 e IAM1261 respectivamente os plasmídeos crípticos pLS11, pLS12, pLS13 e pLS14 (Quadro 1). Embora pLS11 e pLS12 tenham características idênticas foram considerados como distintos, dadas as diferenças existentes

QUADRO I

Características de plasmídeos isolados de estirpes de *B. subtilis*

Bactéria hospedeira	Plasmídeo	P. M. (1) (Md)	N.º de cópias por cromos.	Enz. de restrição (2)			Ref.
				N.º de seq. de reconh. <i>EcoRI</i>	<i>Bam</i> N1	<i>Hind</i> III	
ATCC15841	pPL1	4,7 α	8-16				a)
ATCC7003	pPL2	46,3 α	1-2				a)
IFO3022	pLS11	5,4 α , β	7	1	1	5	b)
IFO3215	pLS12	5,4 α , β	5	1	1	5	b)
IAM1232	pLS13	4,6 α ; 4,9 β	10	4	0	3	b)
IAM1261	pLS14	5,0 α ; 5,3 β	7	3	0	4	b)
2588	pGY1	40 α	1-2	várias			c)
1264	pGY31	7,6 α , γ ; 8,74 β	7	1			c)
1264	pGY32	3,6 α , β , γ	15	1			c)
14A1	pGY5	4,9 α	~ 10	2			c)
X35	pGY6	4,9 α	~ 11	2			c)
X36	pGY7	4,9 α , γ ; 5,76 β	16-20	2			c)
X43	pGY8	4,9 α	~ 13	2			c)

Referências — a) LOVETT & BRAMUCCI (1975b); b) TANAKA *et al.* (1977); c) LE HÉGARAT & ANAGNOSTOPOULOS (1977).

(1) Determinação do peso molecular (P. M.) por: centrifugação em gradientes de sacarose (α), medição em fotografias ao microscópio electrónico (β) e electroforese em gel de agarose (γ).

(2) Enz. de restrição (N.º de seq. de reconh.) = Enzimas de restrição (N.º de sequências de reconhecimento).

entre as estirpes de que foram isolados, nomeadamente em relação à capacidade dos seus DNAs de transformarem *B. subtilis* 168. Esta estirpe é transformável por DNA de IFO3215, mas não o é pelos DNAs das outras três estirpes.

LE HÉGARAT & ANAGNOSTOPOULOS (1977) estudaram 83 estirpes de *B. subtilis* tendo detectado DNA extracromossómico em oito delas. Os plasmídeos crípticos presentes em seis destas estirpes foram caracterizados (Quadro 1), mas o DNA satélite presente nas outras duas (11A1 e 13F3) é muito heterogéneo e não foi estudado. Das oito estirpes com plasmídeos a única cujo DNA é capaz de transformar *B. subtilis* 168 para marcas cromossómicas é a 2588 que contém o plasmídeo pGY1.

TANAKA & KOSHIKAWA (1977) estudaram 15 estirpes de *B. subtilis* var. *natto*, de 10 das quais isolaram um total de 18 plasmídeos crípticos (Quadro 2).

QUADRO 2

Características físicas de plasmídeos de *B. subtilis*
var. *natto* (TANAKA & KOSHIKAWA 1977)

Bactéria hospedeira	Plasmídeo	Grupo	P. M. (1) (Md)	N.º de cópias por cromos.	N.º de seq. de reconh. Enz. de restrição		
					<i>EcoRI</i>	<i>BamNI</i>	<i>HindIII</i>
IF03009	pLS15	1	3,6 α , γ	5	1	2	4
	pLS16	3	33 α	0,5	16	5	0
IF03013	pLS17	1	3,9 α ; 3,6 γ	6	1	2	4
	pLS18	3	33 α	0,9	15	3	0
IF03335	pLS19	1	3,6 α , γ	4	1	2	4
	pLS20	3	34 α	0,4	17	4	0
IF03936	pLS21	1	3,6 α , γ	4	1	2	4
IF013169	pLS22	1	3,4 α ; 3,6 γ	4	1	2	4
	pLS23	3	34 α	0,7	16	4	0
IAM1143	pLS24	1	3,3 α ; 3,6 γ	3	1	2	4
	pLS25	3	31 α	0,7	16	4	0
IAM1207	pLS26	1	3,7 α ; 3,6 γ	4	1	2	4
	pLS27	3	33 α	0,6	16	4	0
IAM1114	pLS28	2	3,6 α ; 4,0 γ	5	2	1	5
	pLS29	3	35 α	0,6	17	5	0
IAM1168	pLS30	2	4,1 α ; 4,0 γ	3	2	1	5
	pLS31	3	32 α	0,7	16	4	0
IAM1163	pLS32	4	40 α	0,9	20	9	0

(1) Determinação do pe.o molecular — ver legenda do Quadro 1.

BERNHARD *et al.* (1978) detectaram a presença dos plasmídeos crípticos pBS1 e pBS2 (Quadro 3) em duas estirpes de *B. subtilis* (Sm^r). O primeiro não se replica em *B. subtilis* 168.

Num estudo que incluiu oito estirpes de *B. subtilis*, NIAUDET & EHRLICH (1979) encontraram duas estirpes (1721 e B8) que contêm plasmídeos. Apenas o plasmídeo críptico presente na estirpe 1721 (designado pHV400) foi caracterizado (Quadro 3).

ERMAKOVA *et al.* (1978) isolaram de *B. subtilis* 1000 quatro frações de DNA extracromossômico (pesos moleculares 1,6; 3,2; 4,7 e 8,7 Md) cuja presença depende de condições da cultura, o que torna questionável a sua origem.

UOZUMI *et al.* (1980) detectaram plasmídeos em 20 das 67 estirpes que estudaram. Os 20 plasmídeos que são crípticos foram classificados em 6 grupos (Quadro 4). Alguns dos plasmídeos dos grupos 1 a 5 são idênticos aos isolados por TANAKA *et al.* (1977) e TANAKA & KOSHIKAWA (1977). Um plasmídeo diferente foi designado por pTA1030.

Recentemente, MAHLER & HALVORSON (1980) isolaram do solo a estirpe de *B. subtilis*, RC242, cuja resistência à eritromicina está condicionada à presença de um plasmídeo, pIM13 (Quadro 3). O plasmídeo pode ser transferido para estirpes Rec⁺ e Rec⁻ de *B. subtilis* 168 por transformação. A sua presença não interfere com o processo de esporulação enquanto mutações cromossômicas que conferem resistência à eritromicina alteram a capacidade de esporulação de *B. subtilis* (DOMOTO *et al.* 1975; GRAHAM & BOTH 1975; TIPPER *et al.* 1977).

De estirpes de *B. subtilis* superprodutoras de α -amilase foi isolado um plasmídeo, pMI10 (Quadro 3) (TICHY *et al.* 1981). Estes autores puseram a hipótese, ainda não confirmada, da relação entre a presença de pMI10 e a superprodução de α -amilase, dado que em estirpes que não produzem esta enzima ou em que o nível de produção é baixo, não foi possível isolar o plasmídeo. pMI10 pode ser introduzido em estirpes derivadas de *B. subtilis* 168, nas quais se replica estavelmente (TICHY *et al.* 1981).

No total foram já detectados em *B. subtilis* 45 plasmídeos cujos pesos moleculares variam entre 1,5 e 46 Md. Alguns têm seqüências de reconhecimento únicas para diferentes enzimas de restrição. A ausência de funções conhecidas para estes plasmídeos (com exceção de pIM13, apenas descrito recentemente) limitou o interesse da sua utilização como vectores de clonização em *B. subtilis*.

Para obviar a esta dificuldade estudaram-se os plasmídeos que ocorrem em outras espécies bacterianas, incluindo as do género *Bacillus*.

Características físicas de plasmídeos isolados de *B. subtilis*

Bactéria hospedeira	Plasmídeo (Md)	P. M. (1)	N.º de cópias (2)	Enz. de restrição [N.º e P.M. (Md) dos fragmentos]							Ref.	
				BamHI	EcoRI	HhaI	HindIII	HindII	HpaI	PstI		SacI
GP5	pBS1	5,26β	5-7	1	1		6	0				a)
GP6	pBS2	9,00α	1-2									a)
1721	pHV400	5,10γ	ND				2,0 1,8 5	0,6 0,55 0,2				b)
RC242	pIM13 (3)	1,50	15		1		2	1,40 0,10		1,50		c)
A18	pMI10	3,40β,γ	ND	0	0	2	2,62 3,40 0,81	1,40 1,09 0,94	1	3,40	0	d)

Referências — a) BERNHARD *et al.* (1978); b) NIAUDET & EHRLICH (1979);

c) MAHLER & HALVORSON (1980); d) TICHY *et al.* (1981).

(1) Determinação do peso molecular: ver legenda do Quadro 1.

(2) N.º de cópias por cromos. (N.º de cópias por cromossoma).

(3) Confere resistência à eritromicina.

QUADRO 4

Caracterização de plasmídeos de *B. subtilis*

Grupo (a)	Plasmídeo			Bactéria hospedeira (a)	P. M. (a) (Md)	Fragmentação com enz. de restrição (a)					
	a)	b)	ou c)			N.º de fragm.	P. M. (Md)				
1	pTA1012	—	—	IF03021	3,55	<i>EcoRI</i>	— 1	3,52			
	pTA1014	—	—	IF03336		<i>BamHI</i>	— 2	2,50; 1,04			
	pTA1015	—	—	IAM1028		<i>HindIII</i>	— 4	2,21; 0,66; 0,42; 0,29			
	pTA1016	—	—	IAM1071							
	pTA1019	—	—	IAM1230							
	pTA1010	pLS15	—	IF03009							
	pTA1011	pLS17	—	IF030113							
	pTA1013	pLS19	—	IF03335							
	pTA1017	pLS24	—	IAM1143							
	pTA1018	pLS26	—	IAM1207							
2	pTA1020	—	—	IAM1076	4,04	<i>EcoRI</i>	— 2	2,27; 1,75			
	pTA1023	—	—	IAM1246		<i>BamHI</i>	— 1	4,05			
	pTA1021	pLS28	—	IAM1114		<i>HindIII</i>	— 5	1,37; 1,04 0,92; 0,42; 0,29			
	pTA1022	pLS30	—	IAM1168							
3	pTA1040	pLS13	—	IAM1232	4,80	<i>EcoRI</i>	— 4	2,32; 1,23; 0,99; 0,28			
						<i>BamHI</i>	— 0	—			
						<i>HindIII</i>	— 3	2,00; 1,72; 1,05			
4	pTA1050	pLS14	—	IAM1261	5,13	<i>EcoRI</i>	— 3	2,25; 1,65; 1,25			
						<i>BamHI</i>	— 0	—			
						<i>HindIII</i>	— 5	1,66; 1,60; 0,94; 0,62; 0,29			
5	pTA1060	—	—	IF03022	5,28	<i>EcoRI</i>	— 1	5,24			
	pTA1061	pLS12	—	IFO3215		<i>BamHI</i>	— 1	5,34			
						<i>HindIII</i>	— 6	1,42; 1,37; 1,22; 0,64; 0,43; 0,29			
6	pTA1030	—	—	IAM1113	4,48	<i>EcoRI</i>	— 4	2,11; 1,05; 1,00; 0,29			
						<i>BamHI</i>	— 0	—			
						<i>HindIII</i>	— 2	2,55; 1,96			

Referências: — a) UOZUMI *et al.* (1980); b) TANAKA & KOSHIKAWA (1977);
c) TANAKA *et al.* (1977).

PLASMÍDEOS HETEROESPECÍFICOS NATIVOS

1. Plasmídeos de *Bacillus*

A ocorrência de DNA extracromossômico em espécies de *Bacillus* foi demonstrada inicialmente em *B. megaterium* 216 e 58. Em ambas as estirpes 15

a 40 % do DNA é extracromossômico e tem estrutura circular e superespiralada (CARLTON & HELINSKI 1969) mas uma percentagem elevada deste DNA deve representar uma mistura de fragmentos circularizados de DNA cromossômico (HENNEBERRY & CARLTON 1973). A determinação dos pesos moleculares das frações de DNA extracromossômico mostrou que existem de oito a dez classes de moléculas cujos pesos moleculares variam de 3,9 a 112 Md (CARLTON & SMITH 1974), cuja manutenção na célula depende possivelmente de polimerases distintas (CARLTON 1974, 1976). Dois dos plasmídeos, um de 4 Md e outro de 30,9 Md (pBM309) foram caracterizados (CARLTON & BROWN 1978, 1979; ROSTÁS *et al.* 1980). Este último é transferível entre estirpes de *B. megaterium* (ROSTÁS *et al.* 1980). A sua transferência foi obtida por fusão de protoplastos (FODOR & ALFÖLDI 1976, 1979) ou por transformação em presença de polietileno glicol (PEG) (VOROBEVA *et al.* 1980).

O estudo dos plasmídeos de *B. thuringiensis* foi iniciado por DEBABOV *et al.* (1977) que lançaram a hipótese atraente da relação entre a presença destes plasmídeos e a formação de cristais parasporais de natureza proteica, cuja acção letal sobre várias espécies de Insectos tem interesse aplicado (FAUST 1979). Mas essa relação ainda não foi inequivocamente estabelecida (STAHLY *et al.* 1978; ERMAKOVA *et al.* 1978) para todas as variedades de *B. thuringiensis*. Recentemente SCHNEPF & WHITELEY (1981) clonizaram dois plasmídeos de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 no plasmídeo pBR322 de *E. coli*. O plasmídeo quimérico obtido codifica em *E. coli* a síntese de uma proteína, idêntica à sintetizada na estirpe de onde os plasmídeos foram isolados e com a mesma acção letal que esta contra larvas do Insecto *Manduca sexta*.

Em todas as variedades de *B. thuringiensis* até agora analisadas foi demonstrada a ocorrência de DNA extracromossômico. Em alguns casos existem vários tipos de plasmídeos na mesma estirpe e uma grande heterogeneidade nas suas dimensões (Quadro 5). A instabilidade dos plasmídeos de algumas das estirpes (ERMAKOVA *et al.* 1978) sugere que parte do DNA extracromossômico de *B. thuringiensis* resulte de excisão, amplificação e circularização de determinados segmentos do cromossoma, não sendo portanto verdadeiros plasmídeos.

Em *B. brevis* var. G.-B. foi detectado um plasmídeo críptico pAD1, com o peso molecular de 47,1 Md (DOBRITSA *et al.* 1978) cujo mapa físico foi construído com base nos resultados obtidos pela digestão com *SmaI*, *SalI* e *BamHI*.

BERNHARD *et al.* (1978) detectaram 21 plasmídeos diferentes (designados pBC1 a pBC21) em 12 de 15 estirpes de *B. cereus* que isolaram do solo. Em algumas das estirpes existe apenas um plasmídeo mas a maior parte contém dois ou mais, cujos pesos moleculares variam entre 1,6 e 105 Md. Verificou-se que a presença do plasmídeo pBC7 está associada à produção de uma bacteriocina e a do plasmídeo pBC16 à resistência à tetraciclina (Tc^r). No entanto não foi possível demonstrar a relação entre os restantes plasmídeos e as características apresentadas pelas estirpes.

QUADRO 5

Características físicas de plasmídeos de *B. thuringiensis*

Bactéria hospedeira	Número de plasmídeos	P. M. (Md)	Enz. de restrição		Ref.
			N.º de seq. de reconheç.	<i>EcoRI</i> <i>Sall</i>	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i> 351	3	12,0; 10,0; 6,0			a)
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>alesti anduze</i>	12	44,58; 36,72; 18,12; 9,96; 8,67; 8,10; 7,29; 6,29; 5,32; 4,75; 3,80; 2,60			b)
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>	3	7,20 6,13 5,11	2 1 0	1 1 1	c)
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i> 612	3	pVD1 — 5,9 pVD2 — 10,0 pVD3 — 10,9	0 2 4		d) f)
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	12	>50; 45; 29,9; 17,1; 7,4; 4,2; 3,9; 3,6; 1,1; 0,87; 0,80; 0,74			e)
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>sotto</i>	3	23,5; 0,80; 0,62			e)
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>finitimus</i>	4	>50 (2); 0,98; 0,79			e)

Referências — a) DEBABOV *et al.* (1977); b) STAHLY *et al.* (1978); c) MITEVA (1978b); d) ERMAKOVA *et al.* (1978); e) FAUST *et al.* (1979); f) DEBABOV *et al.* (1980); g) ALIKHANIAN *et al.* (1981).

Outras variedades de *B. thuringiensis* contêm plasmídeos cujas características físicas não foram ainda estudadas; existem de 2 a 5 plasmídeos nas variedades *kenyae*, *subtoxicus*, *aizawai*, *morrisoni*, *tholworthi darmstadiensis* e *toumanoff* (MITEVA, 1978a) e *thompsoni* (ERMAKOVA *et al.* 1978).

O plasmídeo pBC16 parece ser particularmente interessante e potencialmente útil como vector de clonização. É transferível por transformação para *B. subtilis* 168 onde expressa a resistência à tetraciclina e se replica estavelmente. Além disso, este plasmídeo tem baixo peso molecular (2,77 Md) encontra-se presente em cerca de 20 cópias por cromossoma e possui um baixo número de sequências de reconhecimento para as enzimas *EcoRI* e *BamHI* (BERNARD *et al.* 1978). O plasmídeo pBC16 também se replica em *B. thuringiensis* var. *galleria* 69-6 na

qual foi introduzido por transformação de protoplastos na presença de PEG (ALIKHANIAN *et al.* 1981).

MITEVA (1978 a) detectou a presença de plasmídeos em três estirpes de *B. cereus* (ATCC 6464, ATCC 9139 e NRRL 569), mas a sua caracterização não foi efectuada.

BINGHAM *et al.* (1979) isolaram 29 estirpes de *B. stearothersophilus* resistentes a cinco antibióticos diferentes. De cinco destas estirpes foram isolados plasmídeos: pAB118A (Sm^r) e pAB118B (Sm^r) de TB118 e TB150; pAB124 (Tc^r) de TB124 e TB144 e pAB128 (Tc^r) de TB128. A sua caracterização foi feita pelo tipo de fragmentação obtido com 19 diferentes enzimas de restrição (Quadro 6). Dos quatro plasmídeos apenas pAB124 tem capacidade de transformar *B. subtilis* 168, no qual se replica e em que expressa resistência à tetraciclina (BINGHAM

QUADRO 6

restrição (BINGHAM *et al.* 1979)

Fragmentação dos plasmídeos pAB118A, pAB118B, pAB124, pAB128 com enzimas de

Enzimas de restrição	N.º de seq. de reconh.			
	pAB118A	pAB118B	pAB124	pAB128
<i>Bam</i> H1	1	1	0	0
<i>Bcl</i> I	4	2	3	4
<i>Bgl</i> I	3	0	0	1
<i>Bgl</i> II	0	0	0	0
<i>Cau</i> I	7	4	4	5
<i>Cau</i> II	3	2	1	1
<i>Eco</i> RI	2	0	4	3
<i>Hae</i> III	6	3	4	3
<i>Hha</i> I	6	5	2	3
<i>Hind</i> II	4	2	2	2
<i>Hind</i> III	3	0	0	0
<i>Hin</i> FI	10	6	6	6
<i>Hpa</i> I	2	0	1	1
<i>Kpn</i> I	1	1	0	0
<i>Pst</i> I	4	2	0	0
<i>Sal</i> I	1	1	0	0
<i>Sst</i> I	0	0	0	0
<i>Xba</i> I	1	1	1	0
<i>Xma</i> I	1	0	0	0

et al. 1979). Estes plasmídeos são potencialmente utilizáveis para a clonização de genes em *B. stearothermophilus* e pAB124 em *B. subtilis* 168.

A expressão do gene tet^r de pAB124 foi analisada em *B. subtilis* e *E. coli*. A expressão desta resistência em *B. subtilis* é indutível e está associada a uma diminuição da acumulação do antibiótico dentro das células, enquanto que em *E. coli* não se encontra relacionada com uma menor entrada do antibiótico na célula e não é indutível (ECCLES et al. 1981).

Plasmídeos isolados de outras espécies de *Bacillus* ou são crípticos ou possuem marcas para as quais não existe um método directo de selecção.

B. pumilus é uma das espécies geneticamente mais próximas de *B. subtilis* 168 (DUBNAU et al. 1965; LOVETT & YOUNG 1969, 1970 e 1971; YOUNG & WILSON 1972). LOVETT (1973) iniciou a identificação de plasmídeos desta espécie com o isolamento de pPL576 (Quadro 7) na estirpe NRS576, a qual é

QUADRO 7

Características físicas de plasmídeos de *B. pumilus*

Bactéria hospedeira	Plasmídeos	P. M. (Md) *	Densid. g cm ⁻³	N.º de cópias por cromos.	Enz. de restrição		Ref.
					N.º de fragmentos <i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	
NRS576	pPL576	33,8 α ; 28 β	1,698	2	3 **	—	a) b) c)
ATCC7065	pPL7065	4,7 α ; 5,9 β	1,696	10	—	2	b) d) e) f)
ATCC12140	pMB1	6,3 α ; 7,0 β	—	10	—	—	e) g)
		pMB2	5,0 α ; 5,6 β	—	10	—	e) g)
L10	pPL10	4,4 α	1,698	10-20	2	1	e) f) h)

Referências — a) LOVETT (1973); b) LOVETT & BRAMUCCI (1974); c) LOVETT & BRAMUCCI (1975a); d) LOVETT & BURDICK (1973); e) LOVETT & BRAMUCCI (1976); f) LOVETT et al. (1977); g) LOVETT & BRAMUCCI (1975b); h) LOVETT et al. (1976).

Peso molecular * — ver legenda do Quadro 1. Peso molecular dos fragmentos ** (Md): 13(A); 9,5(B) e 6,5(C) [Ref. e)].

oligoesporogénica. Isto significa que, mesmo em condições favoráveis para a esporulação, mais de 99 % das células não esporulam. Visto que mutantes desta estirpe que espontaneamente perderam o plasmídeo recuperam, em mais de 50 % das células, a capacidade de esporular, poderá haver relação entre a presença do plasmídeo e a oligoesporogenia da estirpe NRS576.

O plasmídeo pPL7065 (Quadro 7) foi isolado de *B. pumilus* ATCC7065 (LOVETT & BURDICK 1973). Verificou-se que a sua presença confere imunidade ou resistência à acção lítica que desencadeia sobre outras estirpes de *B. pumilus* e à qual *B. subtilis* 168 é resistente (LOVETT et al. 1977). Existem seme-

lhanças entre esta actividade lítica e a da bacteriocina ou colicina (NOMURA 1967; NOVICK 1969). A sua transferibilidade para outras estirpes de *B. pumilus* por transdução mediada por PBP1 (LOVETT *et al.* 1974) permitiu demonstrar que é compatível com pPL576 (LOVETT *et al.* 1977). O fago PBS1 também transduz pPL7065, mas menos eficientemente que PBP1 (LOVETT *et al.* 1977).

Da estirpe *B. pumilus* ATCC12140 foram isolados dois plasmídeos crípticos, pMB1 e pMB2 (LOVETT & BRAMUCCI 1975 b) e da estirpe L10 derivada de ATCC12140, o plasmídeo pPL10 (Quadro 7) cuja presença determina a produção de uma bacteriocina (LOVETT *et al.* 1976, 1977).

O plasmídeo pPL10 pode ser transferido por transdução mediada por PBP1 para estirpes de *B. pumilus* sem plasmídeos, ou para NRS576, mas não para ATCC7065 o que permitiu demonstrar que pPL10 é compatível com pPL576 (LOVETT *et al.* 1976) e incompatível com pPL7065 (LOVETT *et al.* 1977). Os fagos PMB1 e PBS1 também transduzem pPL10 mas este último com uma eficiência muito baixa (BRAMUCCI & LOVETT 1976). Outro fago de *B. pumilus*, o fago temperado $\phi 75$ é capaz de transduzir pPL10, embora não tenha capacidade transdutora para marcas cromossómicas (BRAMUCCI & LOVETT 1977) ou para outros plasmídeos (MARRERO & LOVETT 1980). A especificidade de transdução de $\phi 75$ para pPL10, parece estar relacionada com a existência de homologia entre o DNA plasmídico e o genoma fágico. Este mecanismo foi designado *transdução selectiva de plasmídeos* («selective plasmid transduction») por MARRERO & LOVETT (1980).

O plasmídeo pPL10 pode ser transferido por transformação para células competentes de *B. subtilis* 168. O plasmídeo replica-se estavelmente nesta estirpe e expressa a actividade lítica mencionada contra estirpes de *B. pumilus*, mas não contra estirpes de *B. subtilis*, visto que estas não são sensíveis à sua acção (LOVETT *et al.* 1976).

Do elevado número de plasmídeos nativos em espécies de *Bacillus* três parecem ser potencialmente úteis como vectores em *B. subtilis* 168: pBC16, pAB124 e pPL10. No entanto todos poderão ser de interesse após manipulação genética apropriada.

A pesquisa de plasmídeos em *Bacillus* mostrou que há uma grande variabilidade na percentagem de estirpes que os contêm, entre as diferentes espécies, desconhecendo-se o significado ecológico e evolutivo desta observação.

O modo de replicação e regulação dos plasmídeos, particularmente nas estirpes em que existe um número elevado de plasmídeos, poderão revelar modelos de controlo do DNA extracromossómico, diferentes dos já conhecidos.

Os plasmídeos de *Bacillus* constituem um campo de investigação atraente não só pelo seu potencial interesse de utilização em técnicas de manipulação genética, como também em estudos de biologia de plasmídeos.

2. Plasmídeos de *Staphylococcus aureus*

O facto de a maior parte dos plasmídeos de *B. subtilis* e de espécies afins serem crípticos ou possuírem genes de difícil selecção, conduziu à tentativa de introduzir em *B. subtilis* plasmídeos de outros géneros de bactérias.

Foi EHRLICH (1977) o primeiro a demonstrar que alguns plasmídeos de *S. aureus* introduzidos por transformação em células competentes de *B. subtilis* são capazes de replicação autónoma nesta bactéria. Estes plasmídeos conferem resistência a antibióticos, têm baixo peso molecular e apresentam pequeno número de sequências de reconhecimento para algumas enzimas de restrição.

Por isso foram considerados como vectores potencialmente úteis para a clonização de genes em *B. subtilis* (EHRLICH 1977) o que impulsionou a descoberta de outros plasmídeos de *S. aureus* que se podem manter estavelmente em *B. subtilis* (Quadro 8). As características relevantes destes plasmídeos incluindo estabilidade, número de cópias por cromossoma e possibilidade de amplificação em *B. subtilis* encontram-se resumidas nos Quadros 8 e 9.

2.1. Mecanismos de transferência

2.1.1. Por transdução

A transdução dos plasmídeos pUB110 e pC194 entre estirpes Rec⁺ e Rec⁻ de *B. subtilis* foi demonstrada com os fagos AR9 (GRYCZAN *et al.* 1978) e PBS1 (KEGGINS *et al.* 1978 a), sendo a eficiência de transdução mais elevada (10 — 100 x) que a de marcas cromossómicas.

A transdução do plasmídeo pUB110 é sensível (mas em menor grau que a do DNA cromossómico) à acção da enzima *BsuR* (PROZOROV *et al.* 1980), que é responsável pela acção restritiva e modificativa das estirpes R de *B. subtilis* (TRAUTNER *et al.* 1974).

2.1.2. Por transformação celular

Diversos plasmídeos de *S. aureus* podem ser introduzidos por transformação e com idêntica eficiência, em células competentes de estirpes de *B. subtilis* 168 Rec⁺ (EHRLICH 1977) ou Rec⁻ (*recE4*, GRYCZAN *et al.* 1978). Estas últimas não são transformáveis por DNA cromossómico (DUBNAU *et al.* 1973). O facto de o serem por DNA plasmídico mostra que esta transformação é independente do produto do gene *recE4* e permitiu confirmar que a replicação desses plasmídeos em *B. subtilis* é autónoma.

Interessa referir as principais características deste sistema, em vista da sua relação com a actual utilização daqueles plasmídeos como vectores.

(1) A eficiência de transformação com plasmídeos purificados e isolados de *S. aureus* é pouco elevada e da ordem de 10⁻⁹ transformantes por equivalente de genoma ou 100 transformantes por µg de DNA (EHRLICH 1977). Obtém-se também transferência de plasmídeos com idêntica eficiência, pondo em contacto

QUADRO 8

Características de plasmídeos de *S. aureus*

Plasmídeo	Marca de resistência (1)	P. M. (Md)	N.º de cópias cromos.	Sensibilidade à temperatura	Amplif. (2)		Estabil. (3)	Ref.
					Temp.	HU		
pT127	Tc ^r	2,9					+ (2%)	c) e)
pUB112	Cm ^r	3,0					+ (10%)	a) c) e) f)
pC221	Cm ^r	3,0					±(20%)	c) d) e)
pC223	Cm ^r	3,0					±(20%)	c) e)
pBD25 (4)	Cm ^r	4,7						m)
pCI94 = pCM194	Cm ^r	1,8-2,0	35	R	+	+(125)	+ (2%)	b) c) d) e) f) h) i) o)
pSA0501 (5)	Sm ^r	2,7-2,8	8	S	—	+(46)	+	b) d) f) h) i) j) o)
pSA2100 (6)	Cm ^r , Sm ^r	4,7	14	S	—	+(33)		b) f) h) i) j)
pUB110 (7)	Km ^r -Nm ^r	3,0	40-50	R	+(1000)	+(80-260)	+ (0%)	f) g) i) j) o) q)
pE194	Em ^r	2,3-2,4	10	S	—	+(50)		d) i) l) n) o)
pBD15 (8)	Em ^r	2,3-2,4	50-100	S	—	+(140)		i) n) p)

(1) Marcas de resistência — a nomenclatura usada segue as recomendações de NOVICK *et al.* (1976). (2) Amplificação — à temperatura não permissiva em mutantes *ts* de *B. subtilis* ou em presença de hidroxiureia (HU); ocorrência (+) ou não (—) de amplificação; os números entre parênteses indicam o n.º de cópias do plasmídeo quando há amplificação. (3) Estabilidade; os números entre parênteses referem a % de células que perdem o plasmídeo ao fim de 20 gerações na ausência do antibiótico selectivo. (4) pBD25 deriva de pSA2100 por mutagênese com etilmetano sulfonato; contém uma mutação pontual (ver m)). (5) pSA0501, mutante *seg* de pSI94 (ver b) e d)). (6) pSA2100, plasmídeo híbrido, resultante de fusão *in vivo* entre pCI94 e pSA0501 (ver b) d) e f)). (7) pUB110 é compatível com pPL2, pM110 (Quadros 1 e 5), pPL576, pPL10 e pPL7065 (Quadro 7 (ver g) e q)). (8) pBD15, mutante de pE194; a presença destes plasmídeos não interfere com o processo de esporulação (ref. p).

Referências — a) CHOPRA *et al.* (1973); b) IORDANESCU (1975); c) NOVICK (1976); d) IORDANESCU (1977); e) EHRlich (1977); f) GRYCZAN *et al.* (1978); g) KEGGINS *et al.* (1978); h) LÖFDAHL *et al.* (1978); i) SHIVAKUMAR & DUBNAU (1978a); j) SHIVAKUMAR *et al.* (1979); l) CONTENTE & DUBNAU (1979a); m) CONTENTE & DUBNAU (1979b); n) WEISBLUM *et al.* (1979); o) GRYCZAN *et al.* (1980a); p) MAHLER & HALVORSON (1980); q) TICHY *et al.* (1981).

com culturas competentes de *B. subtilis*, lisados de estirpes de *S. aureus* tratados com antibióticos (FEITELSON & LEDERBERG 1980).

(2) Usando os mesmos plasmídeos, mas multiplicados em *B. subtilis* elevam-se os valores para 10^{-5} - 10^{-7} transformantes por equivalente de genoma ou 10^3 - 10^5 transformantes por μg de DNA (EHRlich 1977; GRyczan *et al.* 1978; KEGGINS *et al.* 1978 a).

(3) A eficiência de transformação com DNA plasmídico é aumentada na presença de CaCl_2 (0,5 mM) e EGTA (1mM); a função deste último composto é a de reduzir a concentração dos iões Ca^{++} no meio, diminuindo-se assim a inativação nucleolítica dos plasmídeos durante a sua incubação com as células competentes (CONTENTE & DUBNAU 1979 a). De acordo com MAZZA *et al.* (1980) o cálcio inibe a transformação por DNA plasmídico.

(4) A cinética de desenvolvimento da competência, para os DNAs plasmídico e cromossômico, é idêntica (CONTENTE & DUBNAU 1979 a) e os receptores para os dois tipos de DNAs são os mesmos (MAZZA *et al.* 1980). Também é possível dar-se transferência dos plasmídeos por transformação espontânea, de culturas não submetidas a um regime especial de desenvolvimento da competência, embora neste caso a eficiência do processo seja inferior ao da transformação de culturas competentes com o plasmídeo purificado (PROZOROV & GLUMOVA 1980).

(5) A determinação do número de transformantes em função da concentração de DNA mostrou que a transformação com DNA plasmídico segue uma cinética de 1.^a ordem (inclinação das rectas ≤ 1), tal como a transformação com DNA cromossômico (CANOSI *et al.* 1978; SGARAMELLA *et al.* 1978). Concluiu-se assim que uma molécula de DNA plasmídico é suficiente para originar um transformante (CANOSI *et al.* 1978; CONTENTE & DUBNAU 1979 a).

(6) A introdução de cortes, em cadeia simples (com DNAaseI) ou em cadeia dupla (com enzimas de restrição), no DNA plasmídico inactiva a sua actividade transformadora, a qual pode ser recuperada para níveis iguais (EHRlich 1977; GRyczan *et al.* 1978; KEGGINS *et al.* 1978 a) ou superiores (CANOSI *et al.* 1978; CONTENTE & DUBNAU 1979 a) aos iniciais, por incubação com ligase de T4. Também se pode dar transformação com DNA plasmídico linearizado se as células receptoras contiverem um plasmídeo residente com sequências homólogas das do plasmídeo dador. Este processo envolve recombinação entre as zonas de homologia de ambos os plasmídeos e é dependente do produto do gene *recE4* (CONTENTE & DUBNAU 1979 b).

(7) O DNA de diversos plasmídeos de *S. aureus* isolados de *B. subtilis*, pode ser fraccionado em várias bandas correspondentes a diversas formas moleculares: monómeros, dímeros e também polímeros de maiores dimensões. A análise da sua actividade transformadora mostrou que os monómeros (que constituem 70 a 80 % do DNA plasmídico) têm uma actividade muito inferior (1:1000) à do DNA multimérico, o que permite explicar a baixa eficiência de transformação

QUADRO 9

Fragmentação de plasmídeos de *S. aureus* com enzimas de restrição

Plasmídeos	Enzimas de restrição (N.º e dimensões dos fragmentos em Md)											
	<i>AluI</i>	<i>BamHI</i>	<i>BglII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>HindII</i>	<i>HindIII</i>	<i>HpaI</i>	<i>HpaII</i>	<i>PstI</i>	<i>PvuII</i>
pC194 (1)	6	0	0	0	1 2,00	1	0	1 1,97	0	1 2,06	0	
pT127			0					3 1,5 0,9 0,4				
pUB110 (1) (3)	5 1,34 0,60 0,30 0,30 0,20	1 3,05	1 3,04	1 2,97	4 2,39 0,32 0,22 0,09	4	2 2,63 0,28	0	0	4 1,99 0,49 0,45 0,10	0	
pUB112				0				1				
pSA0501 (1)	6	0	0	1 2,81	0		1 2,94	1 2,79	0	2 1,61 1,22	0	
pSA2100 (1)	12	0	0	1 4,40	1 4,50		1 4,75	2 3,10 1,63	0	3 2,13 1,47 1,22	0	
pC223				0				1				
pE194 (2)												
pBD15	6	0	0	0	1	2		0	1	2	1	2
pC221			0	0	0			1			0	

Referências — a) EHRLICH (1977); b) GRYZAN & DUBNAU (1978); c) GRYZAN *et al.* (1978); d) KEHLER & DAHL *et al.* (1978); f) WEISBLUM *et al.* (1979); g) GRYZAN *et al.* (1980a); h) SHIVAKUMAR & BALDWIN (1978); j) EHRLICH (1978); l) JALANKO *et al.* (1981).

(1) Estes plasmídeos não apresentam sequências de reconhecimento para *KpnI*, *SmaI*, *SstI* e *XhoI* (ver c)).

(2) pE194 e pBD15 são também fragmentados pelas enzimas: *BclI* (1); *BclII* (1); *HinfI* (7); *MboI* (5) (ver g) e h)

(3) pUB110 é também fragmentado pelas enzimas *AvaI* (1); *BstNI* (2); *HincII* (2); *PvuII* (1); *TaqI* (3) (ver l)).

de *B. subtilis* com estes plasmídeos (CANOSI *et al.* 1978; GRYCZAN *et al.* 1980 b).

(8) A actividade transformadora residual da fracção de DNA monomérico resulta da sua contaminação com formas multiméricas, visto que o primeiro é totalmente inactivo (em consequência de inactivação nucleolítica durante os processos de adsorção e penetração do DNA nas células) na transformação de culturas competentes de *B. subtilis* 168 (MOTTES *et al.* 1979), embora tenha capacidade para transformar protoplastos desta estirpe.

(9) O DNA monomérico do plasmídeo pHV14, plasmídeo recombinante que se replica em *E. coli* e em *B. subtilis*, transforma apenas a primeira destas espécies, o que permitiu sugerir a hipótese de que a penetração e o subsequente processamento do DNA transformante se verifiquem de forma diversa nas duas espécies (MOTTES *et al.* 1979).

(10) Os plasmídeos de *S. aureus* multiplicados nesta bactéria têm menor percentagem de formas oligoméricas que os mesmos plasmídeos multiplicados em *B. subtilis* (CANOSI *et al.* 1978; MOTTES *et al.* 1979). Esta observação poderia explicar, segundo MOTTES *et al.* (1979), a menor eficiência dos primeiros na transformação de *B. subtilis*, já anteriormente verificada por outros autores (ver (1) e (2)) e interpretada como resultado de fenómenos de restrição e modificação (EHRlich 1977; GRYCZAN *et al.* 1978) a que, no entanto, o DNA plasmídico pode também ser susceptível (ver (13)). A interpretação de MOTTES *et al.* (1979) é apoiada também pela verificação de que o DNA monomérico extraído de *S. aureus* ou *B. subtilis*, transforma com igual eficiência protoplastos desta espécie.

(11) A transformação com formas monoméricas de plasmídeos é possível desde que na célula receptora exista um plasmídeo residente, parcialmente homólogo do plasmídeo dador (ver (6)). A recombinação entre as zonas homólogas do plasmídeo dador e receptor permite a recuperação de genes («marker rescue») do dador (CONTENTE & DUBNAU 1979 b). Este processo depende do produto do gene *recE4* (CONTENTE & DUBNAU 1979 b), tal como a recombinação entre zonas homólogas de plasmídeos compatíveis (KEGGINS *et al.* 1978 b).

(12) A transformação de *B. subtilis* com plasmídeos quiméricos constituídos por pBR322 e pUB110, e que contém repetições internas deste último (MICHEL, B., PALLA, E. & EHRlich, S. D., Abstracts of the 5th European Meeting on Bacterial Transformation, p. 19, Florence, 1980) mostrou que as eficiências relativas de transformação com plasmídeos constituídos por 1, 2 e 3 cópias de pUB110 são respectivamente de 1, 100 e 500. Determinou-se também que uma repetição interna de 750 nucleotídeos é suficiente para tornar activas em transformação formas monoméricas de plasmídeos de 10Kb (Kb — 1000 pares de bases) e que formas linearizadas de plasmídeos com repetições internas são activas em transformação.

(13) A transformação com DNA plasmídico é afectada pelos sistemas de restrição e modificação conhecidos em *B. subtilis* (TRAUTNER *et al.* 1974; SHIBATA & ANDO 1974; UOZUMI *et al.* 1980) tal como foi demonstrado em estirpes de *B. subtilis* 168 por TANAKA (1979 b) e em *B. subtilis* BsuR por PROZOROV *et al.* (1980).

2.1.3. Por transformação de protoplastos

CHANG & COHEN (1979) demonstraram que é possível obter transformação de protoplastos de *B. subtilis* 168 com DNA plasmídico. Este processo envolve a penetração do DNA na presença de PEG e a subsequente regeneração da parede celular.

Este processo é altamente eficiente (4×10^7 transformantes por μg de DNA) e obtêm-se valores da ordem dos 80 % para a frequência de transformação. Além disso, formas monoméricas dos plasmídeos são activas nesta transformação (CHANG & COHEN 1979) enquanto o não são na de células competentes.

2.1.4. Por fusão de protoplastos

DANCER (1980) obteve, por fusão de protoplastos, transferência de plasmídeos de *S. aureus* para *B. subtilis* e entre *B. subtilis* e outras espécies de *Bacillus*.

A transferência de plasmídeos por este processo parece depender unicamente da capacidade de regeneração da parede celular, das estirpes para as quais se pretende transferir os plasmídeos.

Este processo é eficiente e apresenta o atractivo de não exigir o isolamento de DNA plasmídico, nem o desenvolvimento da competência das células.

CONCLUSÕES

O interesse em desenvolver em *B. subtilis* um sistema de clonização molecular paralelo ao de *E. coli* conduziu ao desenvolvimento de programas de prospecção de plasmídeos em estirpes de *B. subtilis* e de introdução nesta bactéria de plasmídeos isolados de espécies de outros géneros.

Foram isolados 45 plasmídeos diferentes de estirpes de *B. subtilis* todos crípticos com excepção de um. De outras espécies de *Bacillus* foram isolados numerosos plasmídeos, três dos quais parecem ser potencialmente úteis como vectores em *B. subtilis*. No seu conjunto os plasmídeos de *Bacillus* constituem um campo de investigação atraente não só pelo seu potencial interesse de utilização em manipulação genética como também em estudos de biologia de plasmídeos.

Contudo foi a introdução de plasmídeos de *S. aureus* em *B. subtilis* que maior impulso deu ao desenvolvimento da Engenharia Genética de *B. subtilis*.

Nos artigos seguintes desta revisão será apresentada a actual utilização dos plasmídeos referidos no presente artigo, na clonização de DNA plasmídico, fágico e cromossómico em *B. subtilis*, bem como a clonização de genes usando, como vectores, genomas de fagos temperados.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Luís J. Archer agradeço as suas valiosas sugestões durante a redacção deste trabalho. À Sr.^a D. Júlia Pinto e à Sr.^a D. Maria Adelaide Madureira a grande eficiência e dedicação com que dactilografaram o texto e quadros. À Sr.^a D. Maria Cândida Lopes a sua colaboração na revisão dos quadros e referências bibliográficas.

BIBLIOGRAFIA

- AAIJ, C. & BORST, P. (1971). The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 269: 192-200.
- ALIKHANIAN, S. I., RYABCHENKO, N. F., BUKANOV, N. O. & SAKANYAN, V. A. (1981). Transformation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleria* protoplasts by plasmid pBC16. *J. Bacteriol.* 146: 7-9.
- BERNHARD, K., SCHREMPF, H. & GOEBEL, W. (1978). — Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 133: 897-903.
- BINGHAM, A. H. A., BRUTON, C. J. & ATKINSON, T. (1979). — Isolation and partial characterization of four plasmids from antibiotic-resistant thermophilic bacilli. *J. Gen. Microbiol.* 114: 401-408.
- BRAMUCCI, M. G. & LOVETT, P. S. (1976). — Low-frequency, PBS1 — mediated plasmid transduction in *Bacillus pumilus*. *J. Bacteriol.* 127: 829-831.
- BRAMUCCI, M. G. & LOVETT, P. S. (1977). — Selective plasmid transduction in *Bacillus pumilus*. *J. Bacteriol.* 131: 1029-1032.
- CAMPBELL, A. (1962). — Episomes. *Adv. Genet.* 11: 101-145.
- CANOSI, U., MORELLI, G. & TRAUTNER, T. A. (1978). — The relationship between molecular structure and transformation efficiency of some *S. aureus* plasmids isolated from *B. subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 166: 259-267.
- CARLTON, B. C. & HELINSKI, D. R. (1969). — Heterogeneous circular DNA elements in vegetative cultures of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 64: 592-599.
- CARLTON, B. C. (1974). — Selective inhibition of plasmid DNA production in *Bacillus megaterium* by 6 — (p-hydroxy-phenylazo) — uracil: evidence for multiple maintenance systems. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 58: 719-727.
- CARLTON, B. C. & SMITH, M. P. W. (1974). — Size distribution of the closed circular deoxyribonucleic acid molecules of *Bacillus megaterium*: sedimentation velocity and electron microscope measurements. *J. Bacteriol.* 117: 1201-1209.
- CARLTON, B. C. (1976). — Complex plasmid system of *Bacillus megaterium*. In *Microbiology-1976*, pp. 394-405. Edited by D. Schlessinger. Washington D. C.: American Society for Microbiology.
- CARLTON, B. C. & BROWN, B. J. (1978). — Physical mapping of a plasmid from *Bacillus megaterium* by restriction endonuclease cleavage. *Federation Proceeding* 37: 1738.
- CARLTON, B. C. & BROWN, B. J. (1979). — Physical mapping of a plasmid from *Bacillus megaterium* by restriction endonuclease cleavage. *Plasmid* 2: 59-68.
- CHANG, S. & COHEN, S. N. (1979). — High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* 168: 111-115.
- CHOPRA, I., BENNETT, P. M. & LACEY, R. W. (1973). — A variety of staphylococcal plasmids present as multiple copies. *J. Gen. Microbiol.* 79: 343-345.
- CLOWES, R. C. (1972). — Molecular structure of bacterial plasmids. *Bacteriol. Rev.* 36: 361-405.

- COHEN, S. N. (1975).—The manipulation of genes. *Scientific American* 233, 24-33.
- COHEN, S. N. (1976 a).—Gene manipulation. *New Engl. J. Med.* 294: 883-889.
- COHEN, S. N. (1976 b).—Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature* 263: 731-738.
- COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y., BOYER, H. W. & HELLING, R. B. (1973).—Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70: 3240-3244.
- CONTENTE, S. & DUBNAU, D. (1979 a).—Characterization of plasmid transformation in *Bacillus subtilis*. Kinetic properties and the effect of DNA conformation. *Mol. Gen. Genet.* 167: 251-258.
- CONTENTE, S. & DUBNAU, D. (1979 b).—Marker rescue transformation by linear plasmid DNA in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 2: 555-571.
- COZZARELLI, N. R., KELLY, R. B. & KORNBERG, A. (1968).—A minute circular DNA from *Escherichia coli* 15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 60: 992-999.
- DANCER, B. N. (1980).—Transfer of plasmids among Bacilli. *J. Gen. Microbiol.* 121: 263-266.
- DEBABOV, V. G., AZIZBERKYAN, R. R., KHLEBALINA, O. N., D'YACHENKO, V. V., GALUSHKA, F. P. & BELYKA, R. A. (1977).—Isolation and preliminary characteristics of extrachromosomal elements of *Bacillus thuringiensis* DNA. *Genetika* 13: 496-501.
- DEBABOV, V. G., CHLEBALINA, O. I., GALUSHKA, F. P. & SLADKOVA, I. A. (1980). Studies on plasmids of *Bacillus thuringiensis* var. *galleria*. *Mol. Biol.* 14: 1039-1045.
- DOBRITSA, A. P., DOBRITSA, S. V. & TANYASHIN, V. I. (1978).—Isolation and characterization of plasmid from the *Bacillus brevis* var. G-B, cells. *Mol. Gen. Genet.* 164: 195-204.
- DOMOTO, T., KOBAYASHI, K. & KOBAYASHI, Y. (1975).—Erythromycin—resistant conditional asporogeneous mutants of *Bacillus subtilis*. In *Spores VI*, pp. 307-313. Edited by P. Gerhardt, R. M. Costilow and H. L. Sadoff. Washington D. C.: American Society for Microbiology.
- DUBNAU, D., SMITH, I., MORELL, P. & MARMUR, J. (1965).—Gene conservation in *Bacillus* species. I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54: 491-498.
- DUBNAU, D., DAVIDOFF-ABELSON, R., SCHER, B. & CIRIGLIANO, C. (1973).—Fate of transforming deoxyribonucleic acid after uptake by competent *Bacillus subtilis*: phenotypic characterization of radiation-sensitive recombination-deficient mutants. *J. Bacteriol.* 114: 273-286.
- ECCLES, S., DOCHERTY, A., CHOPRA, I., SHALES, S. & BALL, P. (1981).—Tetracycline resistance genes from *Bacillus* plasmid pAB124 confer decreased accumulation of the antibiotic in *Bacillus subtilis* but not in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 145: 1417-1420.
- EHRlich, S. D. (1977).—Replication and expression of plasmids from *Staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 1680-1682.
- EHRlich, S. D. (1978).—DNA cloning in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75: 1433-1436.
- EHRlich, S. D. & SGARAMELLA, V. (1978).—Barriers to the heterospecific gene expression among prokaryotes. *Trends in Biochemical Sciences* 3: 259-261.
- ERMAKOVA, L. M., GALUSHKA, F. P., STRONGIN, A. Ya., SLADKOVA, I. A., REBENTISH, B. A., ANDREEVA, M. V. & STEPANOV, V. M. (1978).—Plasmids of crystal-forming bacilli and the influence of growth medium composition on their appearance. *J. Gen. Microbiol.* 107: 169-171.
- FAUST, R. M. (1979).—Pathogenic bacteria of pest insects as host-vector systems. *Recombinant DNA Technical Bulletin* 2 1-8.

- FAUST, R. M., SPIZIZEN, J., GAGE, V. & TRAVERS, R. S. (1979).— Extrachromosomal DNA in *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, var. *finitimus*, var. *sette*, and in *Bacillus popilliae*. *J. Invert. Pathol.* 33: 233-238.
- FEITELSON, J. S. & LEDERBERG, J. (1980).— Crude lysates of *Staphylococcus aureus* can transform *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 116: 545-547.
- FISHER, M. P. & DINGMAN, C. W. (1971).— Role of molecular conformation in determining the electrophoretic properties of polynucleotides in agarose-acrylamide gels. *Biochemistry* 10: 1895-1899.
- FODOR, K. & ALFOLDI, L. (1976).— Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73: 2147-2150.
- FODOR, K. & ALFOLDI, L. (1979).— Polyethylene glycol induced fusion of bacterial protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 168: 55-59.
- GRAHAM, R. S. & BOTT, K. F. (1975).— Antibiotic-resistant mutants of *Bacillus subtilis* conditional for sporulation. *Mol. Gen. Genet.* 137: 227-237.
- GRYCZAN, T. J. & DUBNAU, D. (1978).— Construction and properties of chimeric plasmids in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75: 1428-1432.
- GRYCZAN, T. J., CONTENTE, S. & DUBNAU, D. (1978).— Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 134: 318-329.
- GRYCZAN, T., SHIVAKUMAR, A. G. & DUBNAU, D. (1980 a).— Characterization of chimeric plasmid cloning vehicles in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 141: 246-253.
- GRYCZAN, T., CONTENTE, S. & DUBNAU, D. (1980 b).— Molecular cloning of heterologous chromosomal DNA by recombination between a plasmid vector and a homologous resident plasmid in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 177: 459-467.
- HAYWARD, G. S. & SMITH, M. G. (1972).— The chromosome of bacteriophage T5. I. Analysis of the single-stranded DNA fragments by agarose gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 63: 383-395.
- HELINSKI, D. R. & CLEWELL, D. B. (1971).— Circular DNA. *Ann. Rev. Biochem.* 40: 899-942.
- HELINSKI, D. R. (1973).— Plasmid determined resistance to antibiotics: molecular properties of R factors. *Ann. Rev. Microbiol.* 27: 437-469.
- HELLING, R. B., GOODMAN, H. M. & BOYER, H. W. (1974).— Analysis of endonuclease R. *EcoRI* fragments of DNA from lambda doid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.* 14: 1235-1244.
- HEMPHILL, H. E. & WHITELEY, H. R. (1975).— Bacteriophages of *Bacillus subtilis*. *Bacteriol. Rev.* 39: 257-315.
- HENNEBERRY, R. C. & CARLTON, B. C. (1973).— Characterization of the polydisperse closed circular deoxyribonucleic acid molecules of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 114: 625-631.
- HOLLOWAY, B. W., KRISHNAPILLAI, V. & STANISCH, V. (1971).— Pseudomonas genetics. *Ann. Rev. Gen.* 5: 425-446.
- IORDĂNESCU, S. (1975).— Recombinant plasmid obtained from two different compatible staphylococcal plasmids. *J. Bacteriol.* 124: 597-601.
- IORDĂNESCU, S. (1977).— Relationships between cotransducible plasmids in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 129: 71-75.
- JALANKO, A., PALVA, I. & SODERLUND, H. (1981).— Restriction maps of plasmids pUB110 and pBD9. *Gene* 14: 325-328.
- KEGGINS, K. M., LOVETT, P. S. & DUVALL, E. J. (1978 a).— Molecular cloning of genetically active fragments of *Bacillus* DNA in *Bacillus subtilis* and properties of the vector plasmid pUB110. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75: 1423-1427.

- KEGGINS, K. M., DUVALL, E. J. & LOVETT, P. S. (1978 b). — Recombination between compatible plasmids containing homologous segments requires the *Bacillus subtilis* *recE* gene product. *J. Bacteriol.* 134: 514-520.
- LE HÉGARAT, J. C. & ANAGNOSTOPOULOS, C. (1977). — Detection and characterization of naturally occurring plasmids in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 157: 167-174.
- LEE, C. S. & DAVIDSON, N. (1968). — Covalently closed minicircular DNA in *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32: 757-762.
- LÖFDALL, S., SJÖSTRÖM, J. E. & PHILIPSON, L. (1978). — Characterization of small plasmids from *Staphylococcus aureus*. *Gene* 3: 149-159.
- LOVETT, P. S. & YOUNG, F. E. (1969). — Identification of *Bacillus subtilis* NRRL B-3275 as a strain of *Bacillus pumilus*. *J. Bacteriol.* 100: 658-661.
- LOVETT, P. S. & YOUNG, F. E. (1970). — Genetic analysis in *Bacillus pumilus* by PBS1-mediated transduction. *J. Bacteriol.* 101: 603-608.
- LOVETT, P. S. & YOUNG, F. E. (1971). — Linkage groups in *Bacillus pumilus* determined by PBS1-mediated transduction. *J. Bacteriol.* 106: 697-699.
- LOVETT, P. S. (1972). — FBPI; a flagella-specific bacteriophage mediating transduction in *Bacillus pumilus*. *Virology* 47: 743-752.
- LOVETT, P. S. (1973). — Plasmid in *Bacillus pumilus* and the enhanced sporulation of plasmid-negative variants. *J. Bacteriol.* 115: 291-298.
- LOVETT, P. S. & BURDICK, B. D. (1973). — Cryptic plasmid in *Bacillus pumilus* ATCC 7065. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54: 365-370.
- LOVETT, P. S. & BRAMUCCI, M. G. (1974). — Biochemical studies of two *Bacillus pumilus* plasmids. *J. Bacteriol.* 120: 488-490.
- LOVETT, P. S. & BRAMUCCI, M. G. (1975 a). — Evidence for a nonrandom base sequence in a *Bacillus pumilus* plasmid: *EcoRI* endonuclease digestion of pPL576. *J. Bacteriol.* 123: 377-379.
- LOVETT, P. S. & BRAMUCCI, M. G. (1975 b). — Plasmid deoxyribonucleic acid in *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*. *J. Bacteriol.* 124: 484-490.
- LOVETT, P. S. & BRAMUCCI, M. G. (1976). — Plasmid DNA in Bacilli. In *Microbiology — 1976*, pp. 388-393. Edited by D. Schlessinger. Washington D. C.: American Society for Microbiology.
- LOVETT, P. S., BRAMUCCI, D., BRAMUCCI, M. G. & BURDICK, B. D. (1974). — Some properties of the PBPI transduction system in *Bacillus pumilus*. *J. Virol.* 13: 81-84.
- LOVETT, P. S., DUVALL, E. J. & KEGGINS, K. M. (1976). — *Bacillus pumilus* plasmid pPL10: properties and insertion into *Bacillus subtilis* 168 by transformation. *J. Bacteriol.* 127: 817-828.
- LOVETT, P. S., DUVALL, E. J., BRAMUCCI, M. G. & TAYLOR, R. (1977). — Host function specified by *Bacillus pumilus* plasmid pPL7065. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 435-437.
- MAHLER, I. & HALVORSON, H. D. (1980). — Two erythromycin-resistance plasmids of diverse origin and their effect on sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 120: 259-263.
- MANTSALA, P. & ZALKIN, H. (1979). — Membrane-bound and soluble extracellular — amylase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 254: 8540-8547.
- MARRERO, R. & LOVETT, P. S. (1980). — Transductional selection of cloned bacteriophage ϕ 105 and SP02 deoxyribonucleic acids in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 143: 879-886.
- MAZZA, G., MARIONE, R. & FERRARI, E. (1980). — Plasmid transformation in *Bacillus subtilis* with pHV15 cloning vector. *Microbiologica (Bologna)* 3: 247-258.

- MITEVA, V. I. (1978 a).— Isolation of plasmid DNA from various strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Comptes rendus de l'Académie Bulgare des Sciences* 31: 913-916.
- MITEVA, V. I. (1978 b).— Characteristics of three plasmids of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (B), I serotype. *Comptes rendus de l'Académie Bulgare des Sciences* 31: 1059-1062.
- MOTTES, M., GRANDI, G., SGARAMELLA, V., CANOSI, U. MORELLI, G. & TRAUTNER, T. A. (1979).— Different specific activities of the monomeric and oligomeric forms of plasmid DNA in transformation of *B. subtilis* and *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* 174: 281-286.
- NIAUDET, B. & EHRlich, S. D. (1979).— *In vitro* genetic labeling of *Bacillus subtilis* cryptic plasmid pHV400. *Plasmid* 2: 48-58.
- NOMURA, M. (1967).— Colicins and related bacteriocins. *Ann. Rev. Microbiol.* 21: 257-284.
- NOVICK, R. P. (1969).— Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 33: 210-263.
- NOVICK, R. (1976).— Plasmid-protein relaxation complexes in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 127: 1177-1188.
- NOVICK, R. P. (1980).— Plasmids. *Scientific American* 243: 77-90.
- NOVICK, R. P., CLOWES, R. C., COHEN, S. N., CURTISS III, R., DATTA, N. & FALKOW, S. (1976).— Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol. Rev.* 40: 168-189.
- PROZOROV, A. A. & GLUMOVA, E. F. (1980).— Transfer of pUB110 plasmid via spontaneous transformation in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 3: 231-232.
- PROZOROV, A. A., BELOVA, T. S. & SURIKOW, N. N. (1980).— Transformation and restriction of *Bacillus subtilis* strains with the *BsuR* restriction-modification system by means of modified and unmodified DNA of pUB110 plasmid. *Mol. Gen. Genet.* 180: 135-138.
- RADLOFF, R., BAUER, W. & VINOARD, J. (1967).— A dye-buoyant density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 57: 1514-1521.
- REANNEY, D. (1976).— Extrachromosomal elements as possible agents of adaptation and development. *Bacteriol. Rev.* 40: 552-590.
- ROSTAS, K., DOBRITSA, S. V., DOBRITSA, A. P., KONCZ, C. S. & ALFÖDI, L. (1980).— Megacinogenic plasmid from *Bacillus megaterium* 216. *Mol. Gen. Genet.* 180: 323-329.
- ROWND, R., NAKAYA, R. & NAKAMURA, A. (1966).— Molecular nature of the drug resistance factors of the Enterobacteriaceae. *J. Mol. Biol.* 17: 376-393.
- RUSH, M. G., GORDON, C. N. & WARNER, R. C. (1969).— Circular deoxyribonucleic acid from *Shigella dysenteriae* Y6R. *J. Bacteriol.* 100: 803-808.
- SGARAMELLA, V., BERTAZONNI, U., CREMASCHI, S., GRANDI, G., MORANDI, C., MOTTES, M., NOLLI, M. L. & ZONTA-SGARAMELLA, L. A. (1978).— Characterization and use as vector of a bifunctional *B. subtilis* plasmid. In *Genetic Engineering* pp. 33-45. Edited by H. W. Boyer and S. Nicosia. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- SCHNEPF, H. E. & WHITELEY, H. R. (1981). Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78: 2893-2897.
- SHARP, P. A., SUDGEN, B. & SAMBROOK, J. (1973).— Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose — ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055-3063.
- SHIBATA, T. & ANDO, T. (1974).— Host controlled modification and restriction in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 131: 275-280.

- SHIVAKUMAR, A. G. & DUBNAU, D. (1978 a).—Plasmid replication in *dnaT*s mutants of *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 1: 405-416.
- SHIVAKUMAR, A. G. & DUBNAU, D. (1978 b).—Differential effect of hydroxyurea on the replication of plasmid and chromosomal DNA in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 136: 1205-1207.
- SHIVAKUMAR, A. G., HAHN, J. & DUBNAU, D. (1979).—Studies on the synthesis of plasmid-coded proteins and their control in *Bacillus subtilis* minicells. *Plasmid* 2: 279-289.
- SHIVAKUMAR, A. G., GRYZCAN, T. J., KOZLOV, Y. I. & DUBNAU, D. (1980).—Organization of the pE194 genome. *Mol. Gen. Genet.* 179: 241-252.
- SIMONS, K., SARVAS, M., GAROFF, H. & HELENIUS, A. (1978).—Membrane-bound and secreted forms of penicillase from *Bacillus licheniformis*. *J. Mol. Biol.* 126: 763-690.
- STAHLY, D. P., DINGMAN, D. W., IRGENS, R. L., FIELD, C. C., FEISS, M. G. & SMITH, G. L. (1978).—Multiple extrachromosomal deoxyribonucleic acid molecules in *B. thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Letters* 3: 139-141.
- TANAKA, T. & KOSHIKAWA, T. (1977).—Isolation and characterization of four types of plasmids from *Bacillus subtilis natto*. *J. Bacteriol.* 131: 699-701.
- TANAKA, T. (1979 a).—*recE4*—independent recombination between homologous deoxyribonucleic acid segments of *Bacillus subtilis* plasmids. *J. Bacteriol.* 139: 775-782.
- TANAKA, T. (1979 b).—Restriction of plasmid mediated transformation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 175: 235-237.
- TANAKA, T. & KAWANO, N. (1980).—Cloning vehicles for the homologous *Bacillus subtilis* host—vector system. *Gene* 10: 131-136.
- TANAKA, T., KURODA, M. & SAKAGUCHI, K. (1977).—Isolation and characterization of four plasmids from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 129: 1487-1494.
- TICHY, P., PAZLAROVÁ, J., HARTMANN, M., FENCL, Z., ERBENOVÁ, L., BENADA O. & KRUMPHANZL, V. (1981).—Isolation of the pIM10 plasmid from the α -amylase strain of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 181: 248-253.
- TIPPER, D. J., JOHNSON, C. W., GINTHER, C. L., LEIGHTON, T. & WITTMANN, H. G. (1977).—Erythromycin resistant mutations in *Bacillus subtilis* cause temperature sensitive sporulation. *Mol. Gen. Genet.* 150: 147-159.
- TRAUTNER, T. A., PAWLEK, B., BRON, S. & ANAGNOSTOPOULOS, C. (1974).—Restriction and modification in *Bacillus subtilis*. *Biological Aspects. Mol. Gen. Genet.* 131: 181-191.
- UOZUMI, T., OZAKI, A., BEPPU, T. & ARIMA, K. (1980).—New cryptic plasmid of *Bacillus subtilis* and restriction analysis of other plasmids found by general screening. *J. Bacteriol.* 142: 315-318.
- VOROBEVA, I. P., KHMEL, I. A. & ALFÖLDI, I. (1980).—Transformation of *Bacillus megaterium* protoplasts by plasmid DNA. *FEMS Microbiol. Letters* 7: 261-263.
- WEISBLUM, B., GRAHAM, M. Y., GRYZCAN, T. & DUBNAU, D. (1979).—Plasmid copy number control: isolation and characterization of high-copy—number mutants of plasmid pE194. *J. Bacteriol.* 137: 635-643.
- WILSON, C. R. & BALDWIN, J. N. (1978).—Characterization and construction of molecular cloning vehicles within *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 136: 402-413.
- YOUNG, F. E. & WILSON, G. A. (1972).—Genetics of *Bacillus subtilis* and other gram-positive sporulating bacilli. In *Spores V*, pp. 77-106. Edited by H. O. Halvorson, R. Hanson and L. L. Campbell. Washington, D. C.: American Society for Microbiology.
- YOUNG, F. E. (1980).—Impact of cloning in *Bacillus subtilis* on fundamental and industrial microbiology. *J. Gen. Microbiol.* 11: 1-15.

RESISTÊNCIA ESPECÍFICA — ESCOLHA DE GENES

Alberto Palyart do Carmo e Freitas

Estação Agronómica Nacional, 2780 Oeiras, Portugal

SUMMARY

The choice of low receptivity genes to be included in the varieties, in order to get resistance and allow good possibilities in the future, require a careful analysis of the parasite pathogenicity characters.

The genetic spectrum of pathogenicity of the parasite population, the prevalence and the presence coefficient of the races, the pathogenicity genes frequency and the total level of frequency are proposed as main elements for that analysis.

An example based on data obtained in Portugal on *Puccinia recondita* of wheat is analysed to show the way of performing it and also to present other factors to be considered in order to get conclusions.

INTRODUÇÃO

A hipótese de FLOR (1955, 1956, 1971) permitiu actuar por método científico em melhoramento de plantas, na obtenção de cultivares com caracteres apropriados à resistência a doenças causadas por parasitas, nos casos em que são observadas relações de gene-para-gene entre hóspede e hospedeiro.

Largos benefícios foram conseguidos com a produção de cultivares de trigo através de esquemas de melhoramento, adequados ao aproveitamento dessa resistência do tipo específico, baseados em numerosos e minuciosos estudos realizados em ambos os membros das associações no sentido da análise das suas interações. Muito há no futuro a esperar ainda da aplicação desse tipo de resistência (DAY, 1974, FREITAS 1980), cujo âmbito cada vez se torna mais amplo englobando em si casos inicialmente admitidos como independentes de interações específicas. Um dos exemplos mais típicos destes casos foi descrito numa publicação de MILUS & LINE (1980) referente à característica designada por «slow rusting».

Para se conseguir maior eficácia através da resistência específica há que observar todas as deficiências dos resultados já obtidos e procurar superá-las, analisando mais pormenorizadamente os factores em jogo e ensaiando novas técnicas. Isto não obsta a que se considere de importância relevante o estudo

aprofundado de outros tipos de resistência ainda pouco conhecidos no seu modo de acção, cujos efeitos se apresentam como favoráveis, numa perspectiva do consciente aproveitamento de conhecimentos científicos para obtenção de respostas cada vez mais ajustadas ao interesse económico.

Na aplicação da resistência específica, uma análise sistematizada dos dados, usando esquematização apropriada, pode permitir destacar factores genéticos favoráveis e, conseqüentemente, realizar escolha de progenitores ajustados à obtenção de cultivares com características apropriadas à manifestação desse tipo de resistência que sejam vantajosas à resolução dos problemas verificados localmente em dado momento.

BROWDER, LION & EVERSMEYER (1980) destacaram as vantagens da descrição genética das culturas dos parasitas e preconizaram a análise das fórmulas de patogenicidade, como processo imediato apropriado à escolha de genes de baixa receptividade que permitam obtenção de resistência. DWURAZANA, BIALOTA & GAJDA (1980) utilizaram método semelhante para essa finalidade.

Aquelas fórmulas constituem de facto uma base para o estabelecimento de um esquema que, todavia, deverá incluir outros elementos complementares de modo a que se torne suficientemente simples e claro para se realizar com prontidão e facilidade uma análise tão completa quanto possível que permita determinar os correspondentes genes de baixa receptividade que maior vantagem possam conseguir, quando incluídos em cultivares melhoradas.

O presente trabalho propõe esquema desse tipo, usando como exemplo concreto os dados obtidos em diferentes complexos *Puccinia recondita*: *Triticum* analisados em Portugal Continental.

Procede-se ao estudo dos elementos que o compõem, indica-se o interesse que possuem na interpretação desse esquema e exemplifica-se o tipo de discussão considerado conveniente na escolha de genes de baixa receptividade (*Prn: T*, no caso apresentado) para conseguir resistência e ainda estabelecer perspectivas futuras favoráveis à substituição de genes, sempre que necessária à manutenção de isenção de epifitias nas plantas em cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

O exemplo apresentado neste trabalho diz respeito a culturas de *Puccinia recondita* isoladas em amostras obtidas de plantas de trigo colhidas de Norte a Sul de Portugal Continental e baseia-se fundamentalmente nos resultados das prospecções, já publicados, bem como das análises de patogenicidade realizadas anteriormente nas culturas (FREITAS, 1966, 1967, 1972, 1973, FREITAS & FREITAS, 1972, 1978) muitos dos quais foram submetidos a confirmação (de que resultou algumas poucas rectificações) e, ainda, doutros obtidos posteriormente.

Na identificação de genes de alta patogenicidade nas culturas, foram usadas linhas de cruzamentos-retrógrados consideradas, cada uma, como contendo um único gene de baixa receptividade reconhecido (DYCK, 1973 SAMBORSKI & DYCK, 1976) amavelmente cedidas pelo DR. P. L. DYCK e pelo DR. SAMBORSKI. A estas linhas foram adicionadas três cultivares (Freitas 1968 a). No Quadro I foram inscritas as designações indicadas pelos seus AA.

QUADRO I

Linhas de trigo usadas na identificação de genes de alta patogenicidade
Wheat lines used for identification of high pathogenicity genes

Genes <i>Genes</i>	Linhas de trigo <i>Wheat lines</i>
<i>Pr1: T</i>	Thatcher ⁶ x Centenário (R. L. 6033)
<i>Pr2a: T</i>	Thatcher ⁶ x Webster (R. L. 6016)
<i>Pr2b: T</i>	Thatcher ⁶ x Carina (R. L. 6019)
<i>Pr2c: T</i>	Thatcher ⁶ x Loros (R. L. 6025)
<i>Pr3: T</i>	Thatcher ⁶ x Democrat (R. L. 6002)
<i>Pr3ka: T</i>	Thatcher ⁶ x Aniversario (R. L. 6035)
<i>Pr9: T</i>	Transfer x Thatcher ⁶ (R. L. 6010)
<i>Pr10: T</i>	Thatcher ⁶ x Exchange (R. L. 6004)
<i>Pr14a: T</i>	Selkirk x Thatcher ⁶ (R. L. 6036)
<i>Pr16: T</i>	Thatcher ⁶ x Exchange (R. L. 6037)
<i>Pr17: T</i>	Klein Lucero x Thatcher ⁶ (R. L. 6008)
<i>Pr18: T</i>	Thatcher ⁷ x Africa 43 (R. L. 6009)
<i>Prx: T</i>	Tremês Rijo E. A. N. 854)
<i>Pry: T</i>	Xérés (E. A. N. 1165)
<i>Prz: T</i>	Ardito (E. A. N. 61 534)

nas amostras de sementes dos cruzamentos-retrógrados recebidas. As três outras linhas de trigo mencionadas são cultivares seleccionadas em Portugal apropriadas à distinção de culturas de *P. recondita* portuguesas não diferenciáveis por outros diferenciadores (FREITAS, 1973) nem por aquelas linhas de cruzamento-retrógrados. Dado que se desconhece a composição genética de receptividade dessas cultivares, foram atribuídos, respectivamente, os símbolos x, y e z aos genes ou grupos de genes de baixa receptividade que aquelas cultivares contenham.

Das culturas de *P. recondita*, obtidas de amostras em trigo provenientes do campo, foram isoladas outras a partir de soros-únicos ou de esporos-únicos (em especial sempre que numa primeira diferenciação se suspeitava da existência de associações de raças fisiológicas) tendo-se considerado como única todas aquelas culturas provenientes de uma mesma amostra que nas posteriores diferenciações se manifestavam como idênticas entre si.

Esta análise diz respeito a 1277 culturas isoladas durante sucessivos anos, desde 1959 a 1971, em que as amostragens foram mais representativas entre as prospecções já publicadas.

Os dados referentes à identificação de genes de patogenicidade das culturas dos primeiros anos deste grupo foram obtidas a partir de culturas-tipo das raças fisiológicas isoladas, mantidas em colecção. Em relação aos anos mais recentes aqueles elementos foram determinados para cada cultura isolada das amostras, usando os trigos diferenciadores adicionais e os de cruzamentos-retrógrados juntamente com o grupo dos diferenciadores-padrão internacionais.

Para fácil apreciação da representatividade das raças identificadas no período considerado e bem assim dos genes de patogenicidade que contém, estabeleceram-se os seguintes índices, no intuito de auxiliar eficientemente na escolha de genes de baixa receptividade a incluir em cultivares melhoradas para obtenção de resistência em condições mais convenientes:

— A Frequência de Isolamento (FI) que representa para cada raça a percentagem do número de isolamentos, naquele período, expressa em relação ao total de isolamentos de todas as raças. O valor assim determinado, para cada raça, foi considerado atribuível também à frequência de cada um dos genes de patogenicidade nela detectados.

— O Coeficiente de Presença (CP) que representa, para cada raça, o valor da fracção do período em estudo em que ela foi detectada, dá ideia da persistência com que foi isolada. Assim, o coeficiente de presença com valor 1,0, em relação a dada raça, indica a sua detecção em todos os anos desse período.

— O Total do Nível de Frequência (TNF) que, para cada gene de alta patogenicidade, permite obter ideia da sua representatividade na população do parasita. Este índice é determinado, para o conjunto das diferentes raças fisiológicas, pela soma das frequências em que cada gene se manifestou.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez identificados os genes de alta patogenicidade presentes nas culturas do parasita e agrupadas estas consoante as raças fisiológicas a que pertencem, indicaram-se no Quadro II as respectivas composições genéticas de alta patogenicidade e inscreveram-se os valores de frequência de isolamento, de coeficiente de presença e de total de nível de frequência que lhes dizem respeito.

As referências de presença de genes de alta patogenicidade para dada raça indicam que os correspondentes genes de baixa receptividade, quando existentes em cultivares de trigo, não são efectivos em relação a essa raça. Em contraposição, as casas em branco, nas colunas daquele Quadro II, indicam

Genes de alta patogenicidade (Tn: Pr) e níveis de detecção
High pathogenicity genes (Tn: Pr) and detection levels

Designação Designation	Raças Races														Genes Genes			
	FI	CP	T1	T2a	T2b	T2c	T3	T3ka	T9	T10	T14a	T16	T17	T18	Tx	Ty	Tz	
1A	3,1	0,5																
1B	1,6	0,5																
1C	0,7	0,3																
11A	45,3	1,0																
11B	0,9	0,4																
11C	1,6	0,5																
11D	1,6	0,4																
11E	0,1	0,1																
11F	3,8	0,8																
14	0,5	0,3																
15A	3,4	0,8																
15B	0,5	0,1																
20	0,5	0,2																
57	6,2	1,0																
58A	7,8	1,0																
58B	1,1	0,3																
58C	4,5	0,5																
58D	0,2	0,2																
68	6,2	0,8																
75	4,7	0,6																
84	0,4	0,2																
87	0,7	0,2																
107	2,3	0,7																
131	2,3	0,5																
TNF			0,5	15,9	23,3	90,7	24,1	3,0	0,0	89,9	9,6	7,8 ⁽¹⁾	1,0	94,6	8,2	19,7	24,3	

(1) Variável com as condições de ambiente — Variable with environmental conditions

FI — Frequência de isolamento — Prevalence

CP — Coeficiente de Presença — Presence Coefficient

TNF — Total do Nível de Frequência — Total Level of Frequency

existir efectividade dos correspondentes genes de baixa receptividade em relação às raças indicadas nas respectivas linhas.

As frequências de isolamento (FI) representadas no Quadro II permitem avaliar a importância relativa a atribuir às respectivas raças fisiológicas no que se refere ao número de vezes em que foram detectadas. Consequentemente, indica numa primeira aproximação, o interesse, em relação a cada raça, a atribuir em melhoramento aos genes de baixa receptividade que lhe sejam efectivos. Assim, como exemplo no caso presente, o valor de 45,3 % de frequência de isolamento relativo à raça fisiológica 11A, sendo dectacadamente o mais elevado, indica ser imprescindível a existência nas cultivares melhoradas de pelo menos um dos genes correspondentes aos não assinalados como de alta patogenicidade na linha do Quadro II que se refere àquela raça. Com efeito, apenas um desses genes de baixa receptividade será necessário existir numa cultivar para se obter baixo tipo de infecção em relação àquela raça, uma vez que numa associação de parasitismo o fenótipo da interacção de um par de genes correspondentes em baixa condição se comporta como dominante em relação aos fenótipos próprios das interacções de todos os outros pares de genes correspondentes que originam mais alto tipo de infecção (LOEGERING, 1972, FREITAS, 1977). Em contraste nítido daquele valor de $FI=45,3$ da raça 11A, destaca-se o valor de $FI=0,1$ da raça 11E.

O coeficiente de presença (CP) representando, tal como se indicou, o grau de persistência com que cada raça fisiológica se apresentou durante o período considerado, tomará valor tanto mais alto quanto maior for o número de anos em que a raça foi detectada.

É fundamentalmente em confronto com a frequência de isolamento que esse coeficiente pode fornecer melhores indicações sobre a importância relativa das raças fisiológicas do ponto de vista epifitilógico.

Assim (Quadro II) no caso de duas raças que apresentem semelhante valor de frequência de isolamento, como se observa com a 107 e a 131, o coeficiente de presença permite atribuir maior importância à 107 uma vez que se manifesta em mais alto valor (0,7) do que a outra raça (0,5). O mesmo se passa em relação às raças 57 e 68, crescendo a importância da raça 57 em relação à 68. Por outro lado, no caso de iguais valores de CP, como sucede com as raças 57 e 58A, por exemplo, os valores de FI, respectivamente de 6,2 e de 7,8, concedem maior importância à raça 58A.

O total do nível de frequência, referido a cada gene de alta patogenicidade, correspondendo à soma das frequências de isolamento das raças que o manifestam, permite obter uma ideia global da maior ou menor necessidade que de momento exista em o combater, segundo a ordem directa do valor que apresenta em relação aos outros genes. Além disso, os valores do total de nível de frequência dos genes de alta patogenicidade podem dar indicação sobre o interesse na utilização em melhoramento dos correspondentes genes de baixa

receptividade. Com efeito, em regra estes genes mostrar-se-ão tanto mais favoráveis quanto menores forem os valores do total de nível de frequência dos correspondentes genes de alta patogenicidade na população.

Na coluna referente a dado gene, o aparecimento de poucos ou de um único caso de alta patogenicidade, normalmente associado a baixo TNF, poderá indicar, no entanto, pequeno ou grande interesse na utilização em melhoramento do correspondente gene de baixa receptividade, conforme os valores dos respectivos índices inseridos no Quadro II, assim como de outras condições de que haja conhecimento e porventura possam auxiliar esta análise.

Como exemplo, considere-se o gene de alta patogenicidade *T16* que, conquanto no caso considerado se manifeste apenas numa raça fisiológica, se apresenta com altos valores de FI e de CP, o que poderia constituir razão impeditiva de utilização isoladamente do correspondente gene de baixa receptividade *Pr16*, muito em especial se aquela raça tivesse tomado a posição de predominância. Contudo, afigura-se que ele deve ser considerado como um gene de interesse, mesmo em condição de gene único, visto ter-se verificado que a linha de cruzamentos retrógrados que o contém, em condição considerada monogénica, se manifesta, normalmente, sem sintomas de ataque ou, quando os apresenta, ele atinge apenas o grau de vestígios, tanto em estufa como no campo quando as plantas atingem o estado de planta adulta. De resto, o mesmo sucede com a cultivar 'Exchange' que além do gene *Pr16* contém também, ao que se sabe, *Pr10* e *Pr12*. Deve notar-se a propósito que o gene *Pr10* é inefectivo em relação à grande maioria das raças e que o seu correspondente para alta patogenicidade se apresenta com muito alto valor de TNF (Quadro II). Aquela cultivar 'Exchange' tem sido frequentemente utilizada como progenitor resistente; no entanto, no caso particular a que nos referimos, verifica-se não ser conveniente a sua utilização directa sem as devidas precauções uma vez que contém o gene de baixa receptividade *Pr10* cuja presença poderá ser impeditiva da redução ou desaparecimento do correspondente gene *T10* na população do parasita.

Casos semelhantes se verificam com outros genes. Assim, no Quadro II destacam-se nitidamente os genes *T2c* e *T18* que, de modo semelhante ao *T10*, apresentavam elevados valores de TNF, sendo de salientar também e fundamentalmente a sua presença na grande maioria das raças isoladas, incluindo aquelas de mais elevados valores de FI. Esta circunstância merece especial atenção em melhoramento visando o futuro, dando indicação de dever evitar-se que as cultivares melhoradas com características que motivem resistência possuam os correspondentes genes de baixa receptividade *Pr2c*, *Pr10* e *Pr18*. A possibilidade de se verificar a redução ou eliminação de genes de alta patogenicidade foi admitida por PERSON, SAMBORSKI & ROHRINGER (1962) e esboçado por PERSON (1967), considerando que os genes de alta patogenicidade apenas se mantêm na população do parasita enquanto se encontram pre-

sentes no hospedeiro os correspondentes genes para baixa receptividade. VAN DER PLANK (1968) considera, porém, que selecção de estabilização actua naquele sentido apenas em relação a alguns genes, a que atribui a designação de «Fortes». DAY (1974) por sua vez admite que estes constituem pequena parcela da totalidade dos genes.

Conquanto não haja completa confirmação do desaparecimento dos genes de alta patogenicidade quando desnecessários e, ainda, suceda que os genes *T2c*, *T10* e *H18* se apresentem em alta frequência numa população que se admite não ter sido sujeita a controlo genético, por efeito do uso de cultivares melhoradas quanto à resistência, nada se perde em tentar eliminá-los.

O facto de um único gene de baixa receptividade num hospedeiro, correspondente a um gene de baixa patogenicidade do parasita, ser suficiente para que em resultado das interacções parasita: hospedeiro se obtenha a manifestação de resistência tem permitido aos melhoradores usar técnicas relativamente simples de indução de um único gene de baixa receptividade em cultivares melhoradas.

No caso apresentado (Quadro II), além do que se refere ao gene *Pr16* já discutido, a obtenção de cultivares com o gene *Pr9* merece consideração. O uso deste gene tornou-se facilitado (SOLIMAN, HEINE & JOHNSTON, 1963) em consequência da sua translocação realizada por Sears de *Aegilops umbellulata* para o trigo 'Chinese'. Ele encontra-se fixado no trigo 'Transfer' bem como na linha de cruzamento-retrógrado RL 6010 (Transfer x Thatcher⁶) onde se considera existir em condição monogénica, além de outras cultivares (BROWDER, 1980).

A utilização desse gene afigura-se de interesse dado que nenhuma das raças de *P. recondita* representadas no Quadro II manifestou a posse do correspondente gene para alta patogenicidade de *T9*.

A este respeito deverá anotar-se como caso muito particular que o trigo «Transfer», quando cultivado no Algarve e muito em especial em Vila do Bispo, tem apresentado em alguns anos pústulas de ferrugens. No entanto, os ataques verificados limitam-se normalmente a vestígios, raramente atingindo 5 % de intensidade de ataque, com pústulas do tipo de infecção 1 ou 2, manifestando formação de soros teleutospóicos muito precocemente. Por vezes não são visíveis necroses ou cloroses e as pústulas, de dimensões muito restritas e de esporulação diminuta, reúnem-se em grupos de duas ou de três sem coalescerem, formando conjuntos que a olho nu tomam aspecto de pústulas do tipo 4. Os tipos de infecção produzidos nos diferenciadores pelas culturas provenientes do trigo 'Transfer' parecem divergir dos observados com as culturas comuns de *P. recondita* isoladas de outros trigos.

No Quadro II não se incluíram indicações de culturas provenientes de 'Transfer' pela razão das suas características muito peculiares e porque não se afigura terem condições de constituir epifítia. Com efeito, além de prati-

camente apenas se encontrarem no trigo 'Transfer' e de se restringirem ao Algarve, estas culturas são de multiplicação difícil, inclusivamente nas próprias plantas daquela originária linha de trigo. Observa-se, além disso que o número de pústulas formadas após a inoculação é pequeno e a esporulação dos soros uredospórios é muito restrita, verificando-se em muitos casos não romperem a epiderme.

Realizaram-se tentativas de identificação de genes de alta patogenicidade nas várias culturas isoladas de 'Transfer', admitindo aquele aspecto (pústulas pequenas e agrupadas quando observadas à lupa e sem clorose nem necroses) como representativo do alto tipo de infecção, dado que era esse o que quase sempre se manifestava nos complexos formados com a linha de cruzamento-retrógrado que contém o gene *T9*. Agrupando os resultados considerados como de alto tipo de infecção obtidos nas culturas provenientes de 'Transfer' que se possuíam, considerou-se que além do gene *T9* se detectavam os genes *T2c*, *T3*, *T10*, *T14a*, *T17* e *Tz*.

De qualquer modo, dada a limitação da área de que se obtiveram este tipo de culturas e das cultivares em que foram detectadas, bem como das intensidades de ataque e do tipo de infecção manifestado, afigura-se que o cultivo extensivo de trigos contendo o gene *Pr9* poderá ser eficiente no País, restringindo, por precaução, apenas a província do Algarve.

O gene de baixa receptividade *Pr16* correspondente a *T16* (Quadro II) representa, como se indicou anteriormente, uma hipótese favorável à indução de resistência. Pelas razões já expostas, a existência da linha considerada como monogénica contendo *Pr16* bem como de outros híbridos, desde que isentos de *Pr10*, podem tornar facilmente viável a indução daquele gene em novas cultivares melhoradas.

O gene *Pr1*, apenas inefectivo em relação à raça 20 no exemplo apresentado (Quadro II) e cujo correspondente se manifesta com baixos valores de FI, CP e TNF, encontra-se nas cultivares 'Malakof', 'Centenário', 'Sonora 64', 'Blueboy' e várias outras. Este gene tem sido usado isoladamente em vários países para indução de condições de resistência. No entanto, a pressão de selecção resultante tem provocado o aparecimento de raças fisiológicas contendo o gene de alta patogenicidade *T1* que motiva ataque às novas cultivares assim obtidas. Foi o caso por exemplo da região do SE dos Estados Unidos com o uso da cultivar 'Blueboy' (BROWDER & EVERSMEYER, 1977). Estes factos podem representar motivo de alerta para o nosso País no que se refere à utilização isolada deste gene tanto mais que existe já a raça 20, possuidora do correspondente gene de alta patogenicidade *T1*, que poderá facilmente tornar-se generalizada e predominante, conquanto até ao presente se tenha apresentado com baixos índices (Quadro II).

O gene *T17* apresenta-se com valores também muito baixos de FI, de CP e de TNF (Quadro II). O correspondente gene de baixa receptividade *Pr17*

encontra-se isolado na linha de cruzamento-retrógrado RL 6008 (Klein Lucero x Thatcher⁶) e existe em várias cultivares tais como 'Maria Escobar' e 'Klein Lucero'. Esta última cultivar, além de manifestar resistência no estado de planta adulta no campo em ensaios regionais, tem apresentado na estufa, em estado de planta jovem, baixo tipo de infecção em relação às diversas culturas de *P. recondita* já isoladas. Este facto conduz a admitir que aquela cultivar possua outro gene, além de *Pr17*, dado, ainda, esse gene só por si não ser efectivo em relação às raças 15B e 20 (Quadro II).

Assim, o gene *T17* situa-se em condição muito semelhante à do gene *T1*, tornando-se portanto duvidosa a eficácia da utilização do correspondente gene *Pr17*, em condição de gene único em cultivares melhoradas.

O uso de um único gene de baixa receptividade em cultivares tem-se mostrado em regra eficiente apenas por alguns anos. Em especial nos Estados Unidos e na Austrália foi estudado atentamente o facto do aparecimento de ataques em cultivares com as quais se tinha obtido resistência. Verificou-se deste modo que, simultaneamente, se encontravam alterações na constituição genética de patogenicidade na população do parasita, tendo-se formado novas raças capazes de atacar aquelas cultivares. Estas alterações foram atribuídas em especial ao efeito da pressão de selecção originada sobre a população do parasita pela condição de baixa receptividade do hospedeiro.

Uma vez que a alteração numa população do parasita de um único gene seria necessariamente mais facilitada do que simultaneamente de um grupo de genes surgiu a ideia da incorporação de dois ou mais factores em associação e WATSON & SINGH (1952) indicaram o interesse na inclusão no programa da Universidade de Sydney do sistema de indução de pares de genes de baixa receptividade em cultivares. ATHWAL (1953) apresentou para esse efeito a proposta de método de melhoramento em que, numa primeira fase, se reunisse um par de genes em linhas de cruzamento-retrógrado, seguindo-se o uso dessa linha como progenitor para indução dos factores de resistência nos trigos a melhorar.

Dando apoio ao uso de genes em associação, PERSON (1959) estabeleceu teoricamente que por cada gene adicional de baixa receptividade incluído numa cultivar se originava redução a metade do número de genótipos do parasita que pudesse vir a atacar essa cultivar.

A ideia do uso em simultâneo de mais de um gene de baixa receptividade em cada cultivar melhorada tem-se mantido válida e DAY (1974) confirma e justifica o seu interesse considerando a dificuldade originada ao parasita em desenvolver raças que contenham simultaneamente genes de alta patogenicidade correspondentes ao conjunto dos de baixa receptividade presentes nas cultivares, numa população que não os manifestava, em conjunto ou até isoladamente. Para maior segurança na manutenção da sanidade das culturas, FREITAS (1968 b) apresentou uma proposta de planeamento de produção de

várias linhas com genes diferentes de baixa receptividade, cada uma utilizável de cada vez em zona ampla e que a intervalos de tempo apropriados deveriam ser trocadas entre zonas não contíguas.

Examinando o Quadro II é possível encontrar vários pares de genes de baixa receptividade que, incluídos em cultivares, sejam efectivos em relação a todas aquelas culturas, considerando que cada um desses genes actua independentemente e que o mais baixo tipo de infecção, entre os possíveis de obter nas diversas interacções do complexo, actua como dominante na manifestação do genótipo, podendo até originar-se por vezes tipo de infecção inferior a qualquer dos próprios das interacções que produzem baixo tipo de infecção (LOEGERING, 1972).

Para determinar pares de genes de baixa receptividade que originem condições favoráveis convém, em especial, procurar os genes de alta patogenicidade que não se apresentem em associação em qualquer das raças. Este procedimento pode originar a vantagem de se agruparem genes de baixa receptividade cujos correspondentes genes de alta patogenicidade no parasita tenham quiçá menor probabilidade de se manifestarem em associação, dado que esta não foi detectada ou, possivelmente, esses genes sejam até incompatíveis para formar associação; condições estas, em especial a segunda, que devem ser consideradas como do maior interesse.

O exemplo real apresentado (Quadro II) permite encontrar trinta e dois pares de genes eficientes do ponto de vista da resistência; desde que, pelas razões já expostas, se exclua a utilização de qualquer dos genes *Pr2c*, *Pr10* e *Pr18* e considere o gene *Pr16* como efectivo em relação a todas as raças.

Como método prático de detecção no Quadro II de pares de genes de alta patogenicidade não associados, sugere-se a utilização da coluna de cada gene como matriz a sobrepor a cada um dos outros genes. Os genes referentes às colunas em que não se verifique coincidência de qualquer dos sinais, representativos de alta patogenicidade, não se encontrarão combinados em qualquer das raças detectadas. Além disso, o seu correspondente par de genes de baixa receptividade será efectivo em relação a todas as raças, dado que, para cada uma, pelo menos um desses genes será correspondente a um dos de baixa patogenicidade que ela possua.

Nos pontos de cruzamento das colunas com as linhas do Quadro III indicam-se com sinal de «+» as combinações de pares de genes de baixa receptividade efectivas para o conjunto das raças indicadas no Quadro II.

Na generalidade, as considerações apresentadas anteriormente acerca de alguns genes para utilização em condição isolada são aplicáveis aos componentes de pares desses factores. Em relação a alguns outros convém ainda apresentar certos reparos.

Como se indicou, não é conhecido se *Prx*, *Pry* e *Prz* representam genes isolados ou grupos de genes. Do Quadro II pode porém inferir-se o facto

QUADRO III

Pares de genes efectivos
Effective pairs of genes

Genes Genes	<i>Pr3</i>	<i>Pr3ka</i>	<i>Pr9</i>	<i>Pr16</i>	<i>Prx</i>	<i>Pry</i>	<i>Prz</i>
<i>Pr1</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pr2a</i>			+	+	+	+	
<i>Pr2b</i>			+	+	+	+	
<i>Pr3</i>			+	+			
<i>Pr3ka</i>			+	+			
<i>Pr9</i>				+			
<i>Pr14a</i>			+	+			
<i>Pr17</i>		+	+	+	+		
<i>Prx</i>			+	+			
<i>Pry</i>			+	+			
<i>Prz</i>			+	+			

importante das cultivares usadas como possuidoras de *Prx* ou de *Pry* (colunas *Tx* e *Ty*) não se manifestarem como contendo *Pr2c*, *Pr10* ou *Pr18* (colunas *T2c*, *T10* e *T18*); genes estes que no caso concreto em análise não convém, tal como foi dito, serem incluídos em trigos melhorados. Aquela ilação torna-se patente ao observar que a raça fisiológica 1 origina alto tipo de infecção em associação com os trigos que contêm *Prx* e *Pry*, conquanto produza baixo tipo de infecção nas interacções com os genes *Pr2c*, *Pr10* ou *Pr18*.

É interessante ainda reparar no Quadro II o facto de todas as raças que manifestam alto tipo de infecção perante *Prx* (coluna *Tx*) também o originam na presença de *Pry*, (coluna *Ty*), ao passo que certas culturas que produzem baixo tipo de infecção em confronto com *Prx* apresentam alto tipo de infecção em relação a *Pry*. Assim poderá admitir-se que a cultivar que possui *Prx* é possível que contenha *Pry*, ao passo que a que contém *Pry* não manifesta a presença de *Prx*, a partir dos dados apresentados.

Por seu turno pode ainda inferir-se que, em virtude do comportamento da raça 15B, a cultivar que manifesta *Prz* (coluna *Tz*) não contém o gene *Pr2c*, *Pr10* ou *Pr18*.

Em face dessas observações torna-se possível pelo menos a utilização de *Prx* ou de *Pry* em associação com outros genes, sem receio de se introduzir nas cultivares melhoradas qualquer dos genes de baixa receptividade *Pr2c*, *Pr10* ou *Pr18*.

Se outras razões de maior importância não existirem para escolha entre *Prx* e *Pry*, o facto da cultivar que contém *Prx* poder possuir, em hipótese, o gene ou grupo de genes *Pry* leva a admitir ser mais vantajoso utilizar este último pela maior facilidade com que provavelmente se deparará no esquema de melhoramento a seguir. Se porém, após análise da hereditariedade de *Prx*, se verificar que ele representa apenas um gene, nada impede dar-lhe preferência em relação a *Pry* e, pelo contrário, ela torna-se aconselhável dado que o TNP que lhe corresponde é nitidamente inferior ao de *Pry* (Quadro II).

Do exame daquele Quadro pode por exemplo concluir-se também ser preferível associar *Prx* ao gene *Pr1* ou a *Pr17* do que associá-lo ao *Pr3*, por este apresentardestacadamente mais elevado valor de TNP.

A utilização de *Pr9*, se bem que possa manifestar eficiência em associação com qualquer dos outros genes, não se afigura merecer preferência especial pela razão indicada do seu comportamento no Algarve que, apesar de parecer não vir a originar sérios problemas, também não apresenta vantagens sensíveis em relação a outras associações (Quadro III).

O gene *Pr3ka*, que se manifesta com baixo valor de TNF, afigura-se valioso quando associado em especial a *Pr1*, a *Pr16* ou a *Pr17*, encontra-se no trigo 'Klein Aniversário' e foi isolado nas linhas de cruzamento-retrógrado Thatcher⁶ x Aniversário e Klein Aniversário x Prelude⁶. O interesse que aquele gene pode merecer evidencia-se no Quadro II pela efectividade que manifesta em relação a grande número de raças fisiológicas entre as quais se incluem não só a predominante (11A) mas ainda as que correspondem aos mais altos valores de FI e de CP. Assim, a utilização deste gene constitui um reforço de muito interesse contra os efeitos da pressão de selecção, quando em associação com outro daqueles genes. Atendendo aos valores de TNP (Quadro II) a ordem de preferência daqueles genes para constituir associação com *Pr3ka* deverá ser *Pr1*, *Pr17* e *Pr16*.

O esquema de agrupamento de dados apresentados no Quadro II permite também facilidade de escolha de três ou mais genes que, em conjunto, sejam apropriados à obtenção de resistência.

É evidente que a qualquer dos pares de genes seleccionados indicados anteriormente como efectivo poderá juntar-se um outro gene (Quadro II), escolhido segundo as indicações já apresentadas, que interesse a quaisquer especiais condições que se tenham em vista.

Dado que as circunstâncias reais de trabalho são por vezes limitantes das possibilidades teóricas de resolução dos problemas, poderá suceder que dificuldades em dispor de progenitores favoráveis conduzam à necessidade de utilização de grupos de mais de dois genes, independentes daqueles pares, para se obter efectividade em relação à população do parasita. Assim, por exemplo, poder-se-ão encontrar situações de utilização do gene *Pr17* sem possibilidade de se dispor de outros genes que, como pares, permitam aquele objectivo (Qua-

dro III). Se existe disponível o gene *Pr14a* e o *Pry*, o Quadro II mostra que poderá adicionar-se, como complemento a *Pr17* e *Pr14a*, o gene *Pry* para tornar aquele conjunto também efectivo em relação à raça 20, dado que nas circunstâncias deste exemplo ele é, entre os disponíveis, o que além de satisfazer este requisito apresenta mais baixo valor de TNF.

Assim, estabelecidas as condições de preferência do ponto de vista fitopatológico, a escolha entre os possíveis genes, para utilização em melhoramento, será condicionada pela disponibilidade de progenitores. Além disso, essa escolha depende também das exigências do melhoramento em relação a outras características, na perspectiva de possibilitar e facilitar a obtenção do conjunto dos caracteres pretendidos nas cultivares melhoradas. Por esse motivo, no que se refere ao complexo *P. recondita: Triticum* foram seleccionadas para o nosso País várias linhas do hospedeiro com características de «fontes de resistência». Entre estas contam-se cerca de noventa linhas de trigo no grupo das que manifestam resistência em relação a todas as raças isoladas em Portugal Continental e de outras tantas no grupo em que aquela manifestação diz respeito a algumas daquelas raças, constituindo assim material básico com características nítidas de resistência específica. Noutros trigos também seleccionados, cuja manifestação de resistência se verifica apenas em estado de planta adulta, não se encontra definido se o seu comportamento é consequência de relações específicas.

As sugestões do esquema e do processo de análise, bem como do tipo de discussão e de dados apresentados neste trabalho, utilizando como exemplo o complexo *P. recondita: Triticum*, poderão ser aplicadas noutro qualquer sistema parasitário em que a hipótese de FLOR seja reconhecidamente aplicável.

Os casos particulares, apresentados na discussão visaram fundamentalmente destacar a possibilidade da existência de condições especiais, certamente diferentes em cada sistema ou circunstância que interessem ser consideradas, no intuito de conseguir perspectivas presentes e futuras mais favoráveis ao combate às epifitias.

BIBLIOGRAFIA

- ATHWAL, D. S., 1953 — Gene interaction and the inheritance of resistance to stem rust of wheat. *Indian J. Genet. Pl. Breed.* 13: 81-103.
- BROWDER, L. E., 1980 — A compendium of information about named genes for low reaction to *Puccinia recondita* in wheat. *Crop Sci.* 20: 775-779.
- & EVERSMEYER, M. G., 1977 — Pathogenicity associations in *Puccinia recondita tritici*. *Phytopathology* 67: 766-771.
- LYON, F. L. & EVERSMEYER, M. G., 1980 — Races, pathogenicity phenotypes and type culture of plant pathogens. *Phytopathology* 70: 581-583.
- DAY, P. R., 1974 — Genetics of *host-parasite interaction*. W. H. FREEMAN & CO., San Francisco.

- DYCK, P. L. & KERBER, E. R., 1971—Chromosome location of three genes for leaf rust resistance in common wheat. *Can. J. Genet.* 13: 480-483.
- & SAMBORSKI, D. J., 1968a—Genetics of resistance to leaf rust in the common wheat varieties Webster, Loros, Brevit, Carina, Malakof and Centenario. *Can. J. Genet. Cytol.* 10: 7-17.
- 1978b—Host-parasite interactions involving two genes for leaf rust resistance in wheat. *Proce. 3rd Int. Wheat Genetics Symp., Camberra:* 245-250.
- 1970—The genetics of two alleles for leaf rust resistance at the *Lr14* locus in wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* 12: 689-694.
- 1974—Inheritance of virulence in *Puccinia recondita* on alleles at the *Lr2* locus for resistance in wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* 16: 323-332.
- DWURAZNA, M., BIALOTA, M. & GAJDA, Z., 1980—Resistance of wheat cultivars to rust in Poland. *Proc. V. eur. and med. Cereal Rusts Conf. 1980, Bari and Rome:* 147-150.
- FLOR, H. H., 1955—Host-parasit interaction in flax rust—Its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685.
- 1956—The complementary genic system in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8: 29-54.
- 1971—Current status of gene-for-gene concept. *A. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
- FREITAS, A. P. DO CARMO, 1966—*Puccinia recondita* Rob. III—Identificação de raças fisiológicas em Portugal Continental nos anos de 1959, 1960 e 1961 e grau de resistência de trigos no estado juvenil. *Agronomia lusit.* 26: 91-114.
- 1967—*Puccinia recondita* Rob IV—Novas raças fisiológicas em trigo para o Continente Português e prospecção nos anos de 1962 e 1963. *Agronomia lusit.* 28: 47-64.
- 1968a—Supplemental varieties for wheat leaf rust differentiation in Portugal. *Cereal Rusts Conf., Oeiras* 144-145.
- 1968b—On the control of wheat rusts. *Cereal Rusts Conf., Oeiras:* 193-195.
- 1972—*Puccinia recondita* Rob VI— Patogenicidade e frequência de isolamento de raças fisiológicas no material de 1964, 1965 e 1966 no Continente Português. *Agronomia lusit.* 33: 107-118.
- 1973—*Puccinia recondita* Rob. VII—Caracterização de raças fisiológicas. *Agronomia lusit.* 34: 209-218.
- 1977—Interações genéticas em sistemas parasitários. *Bol. Soc. port. Ciênc. nat.* 17: 63-78.
- 1980—Tipos de resistência às ferrugens do trigo. *I Cong. Port. Fitiatria e Fito-farmacologia, Lisboa.* 5: 13-27.
- & FREITAS, LUISA C. 1972—*Puccinia recondita* Rob. VIII—Genes for pathogenicity in some Portuguese cultures. *Actas III Cong. un. fitop. medit., Oeiras:* 501-506.
- 1978—*Puccinia recondita* Rob. IX—Patogenicidade de culturas obtidas em Portugal Continental (1969-1971). *Agronomia lusit.* 38: 275-284.
- HAGGAG, M. E. A. & DYCK, P. L., 1973—The inheritance of leaf resistance in four common wheat varieties possessing genes at or near the *Lr3* locus. *Can. J. Genet. Cytol.* 15: 127-134.
- LOEGERING, W. Q., 1972—Specificity in plant disease. In: *Biology of Rust Resistance in Forest trees. Proc. NATO-IUFRO advanced Study Inst., U. S. Dep. Agric. For. Serv., Misc. Publ. 1221:* 29-37.
- MILUS, E. A. & LINE, R. F., 1980—Characterization of resistance to leaf rust in Pacific Northwest wheats. *Phytopathology* 70: 167-172.
- PERSON, C., 1959—Gene-for-gene relationship in host-parasite systems. *Can. J. Bot.* 37: 1101-1130.
- 1967—Genetic aspects of parasitism. *Can. J. Bot.* 45: 1193-1204.

- SAMBORSKI, D. J. & ROHRINGER, R., 1962 — The gene-for-gene concept. *Nature, Lond.* 194: 561-562.
- SAMBORSKI, D. J. & DICK, P. L., 1976 — Inheritance of virulence in *Puccinia recondita* on six backcross lines of wheat with single genes for resistance to leaf rust. *Can. J. Bot.* 54: 1666-1671.
- SOLIMAN, A. S., HEYNE, E. G. & JOHNSTON, C. O., 1963 — Resistance to leaf rust in wheat derived from Chinese *Aegilops umbellulata* translocation lines. *Crop Science* 3: 254-256.
- VAN DER PLANK, J. E., 1968 — *Disease resistance in plants*. Academic Press. N. Y., London.
- WATSON, I. A. & SINGH, D., 1952 — The future for rust resistance wheat in Australia. *J. Aust. Inst. agr. Sci.* 190-197.

INDUCED MUTATION IN WILD PEA (*Pisum sativum* var. *arvense* L.)

G. Bhowmik, P. Kalita and B. Chowdhury

Department of Agric. Botany, Gauhati University, Gauhati — 781 914 INDIA

RESUMO

Sementes de ervilha (*Pisum sativum* var. *arvense* L.) colhidas na nossa região foram submetidas a radiações γ em doses de 0 (controlo), 10, 20, 30, 40, 50, e 60 Kr. Doses superiores a 40 Kr. causaram considerável declínio das taxas de sobrevivência. A dose óptima foi considerada como 40 Kr. A germinação foi afectada e a rebentação atrasada em consequência da irradiação. A fertilidade do pólen e das sementes, a meiose, e a taxa de sobrevivência foram grandemente afectadas pelas doses de radiação.

Na geração M_2 recolheram-se 29 tipos de mutantes, seis dos quais foram considerados clorofilinos, sete como estéreis e os restantes dezasseis como mutantes vitais. Estes mutantes foram obtidos a partir de 91 das plantas sobreviventes na M_1 . Em muitas das plantas M_2 dois ou três tipos de mutantes apareceram associados na mesma planta. Entre os mutantes vitais revelaram-se prometedores os de floração precoce, caule rijo, naveta anormal, entrenós curtos, variação no tamanho da semente, tipo de grão de amido e côr do tegumento.

INTRODUCTION

The pea, a self-fertilizer, became an important test plant in mutation studies as early as the thirties (RASMUSSEN, 1938). Since then many genetic changes have been induced with the help of radiotins, chemicals or both and isolated bountiful noble as well as deleterious mutants in pea.

This wild pea under study is hardy and can be grown under acute moisture stress condition. There is every possibility of it being used in the improvement of pea cultivars. HAWKES (1977) suggested that intensive search should be made in wild species and primitive cultivars to overcome the difficulties of locating the desired genes in the existing germ plasm. A programme of mutation studies was initiated with a view to exploring the feasibility of isolating promising mutants.

MATERIALS AND METHODS

Locally collected seeds of wild pea (known as «Kerao»), later identified as *Pisum sativum* var. *arvense* L. ($2n=14$), were selfed for few generations and used for the present studies. Dry seeds containing 21.5 per cent moisture were irradiated with gamma-rays at 0 (control), 10, 20, 30, 40, 50 and 60 Kr doses. Source of γ -rays was Co^{60} .

Fourty to 52 seeds of each irradiation doses were sown. For assessing the radiosensitivity of this species in M_1 , data were collected in respect of the percentage of pollen sterility, seed fertility, abdominal meiotic plants, plants survived at harvesting as well as percentage of seeds germinating after 15, 21 and 31 days.

Percentage for each dose was used for computing linear and non-linear regression of the above mentioned characters against doses.

M_2 -generation was raised as M_1 -plant progeny rows for scoring mutation frequency. The mutant types were classified into three classes *viz.* chlorophyll, sterile and vital. The chlorophyll mutants were further classified as per the scheme of BLIXT (1961).

RESULTS

Effect of γ -ray irradiation in the M_1 -generation:

Germination—Rate of germination was severely affected by seed irradiation at higher doses. In control and 10 Kr irradiated seeds, there was no change in germination rate after 21 days. In other doses, germination continued up to 31 days. The rate of germination was inversely related to increasing doses of irradiation (Table I). During the earliest period of growth the seedlings grew slowly after germination. Lethality of morphologically abnormal seedlings was observed.

Pollen and seed fertility—The M_1 plants showed considerable increase in pollen sterility. It seems most of the γ -ray doses produce semisterility. The variables may be explained by non-linear relation between dosage and pollen sterility percentage (Table I).

Seed setting per pod was not greatly affected in the M_1 -plant by γ -ray doses. The number of seeds per fruit varied from 0.2 to 6.4 after irradiation as compared to control 1 to 5.6. In some plants under higher doses there was no fruit formation in spite of pollen fertility. The fruit length was much shorter than in control and gapping of seed was commonly observed. Considerable seed size variation was observed in M_1 -plants.

Meiotic abnormality—Many plants showing high sterility were associated with various types of meiotic abnormalities. At diakinesis and metaphase I, ring

and chain of four chromosomes were prevalent, whereas, stickiness, chromosome bridges, laggards unequal separation and fragments mostly occurred at anaphase I and meiosis II. Table I clearly shows the increase in the percentage of meiotic abnormal plants is directly proportional to dose of γ -rays.

TABLE I

Effect of γ -irradiation on different characters in M_1 -generation

Doses in Kr	No. of seeds sown	% of seeds germinated			No. of seeds/ pod	% of pollen sterility	% of abnormal plants	% of plants survived
		15 days	21 days	31 days				
0	52	94	98	98	3.6	23.3	0.0	93.2
10	50	60	66	66	2.8	41.5	12.5	36.5
20	47	72	72	76	3.7	58.9	22.2	49.0
30	44	70	77	81	4.0	64.4	36.3	61.1
40	48	35	37	43	2.3	43.9	42.9	39.6
50	40	17	17	22	2.0	47.8	100.0	7.5
60	50	6	8	14	3.0	47.5	66.6	2.0

Plant survived at harvesting—Relationship between dosage of γ -rays and plant survival per cent was polynomial in nature. At 50 and 60 Kr there was drastic reduction in survival rate of plants.

Effect of γ -ray irradiation in the M_2 -generation:

In M_2 , various aberrant types were later found to be mutants. These mutants were classified into three groups viz. i) chlorophyll deficient, ii) sterile or seedless and iii) vital mutants. List of different mutant types segregated in M_2 -generation after γ -rays is given in table II.

Chlorophyll mutants—2.3 per cent of the M_2 -population showed chlorophyll mutations. Six common chlorophyll mutant types were recovered, of which xantho-alba was the most frequent (Table II). Except chlorina and virescent all other mutant types were observed in 10 Kr and the mutation rate was the maximum. In 50 Kr there was only one chlorophyll mutant *i. e.* xantho-alba but there was none in 60 Kr. Variegated and virescent produced viable seeds but other four chlorophyll mutants died within 10 to 15 days after germination.

TABLE II

Mutant types isolated from different doses of γ -irradiation in M_2 -generation

Mutants types	Doses of γ -rays in Kr						Total
	10	20	30	40	50	60	
<i>Chlorophyll mutants:</i>							
Albina	2	—	1	2	—	—	5
Xantha	6	—	4	—	—	—	10
Xantho-alba	18	6	10	10	1	—	45
Chlorina	—	—	—	1	—	—	1
Variegated	2	—	—	—	—	—	2
Virescent	—	—	—	4	—	—	4
Total	28	6	15	17	1	—	67
Mutation frequency per 100 M_2 -plants	7.3	1.1	1.1	3.6	1.0	0.0	2.3
<i>Sterile mutants:</i>							
Flowerless pedicel	—	—	6	4	2	4	16
Female sterile	—	—	4	6	3	16	29
Bushy	—	2	4	2	—	2	10
Tall creeping	8	7	15	10	—	2	42
Small leaf	—	2	16	4	—	2	24
Linear leaf	—	6	19	11	—	2	38
Desynaptic	—	5	6	2	3	4	20
Total	8	22	70	39	8	32	179
Mutation frequency per 100 M_2 -plants	2.1	3.9	5.3	8.2	8.2	200.0	6.3
<i>Vital mutants:</i>							
Early flowering	5	—	—	—	—	—	5
Late flowering	2	6	29	3	—	—	40
Hard stem	1	2	6	1	3	2	15
Short internode	2	2	15	2	—	—	21
Keel	—	4	18	12	2	6	42
Curly leaf	2	—	—	4	7	2	15
Thick leaf	—	1	4	1	3	—	9
Oval leaf	—	—	—	—	—	—	9
Seed size variation (Big)	6	—	5	2	2	—	15
(Small)	2	—	6	—	1	—	9
Shrunken seed	9	1	2	—	—	—	12
Brown seed coat	13	3	3	—	1	—	20
Black seed coat	8	5	4	2	3	—	22
Green seed coat	9	2	5	1	1	—	18
Starch grain type	5	—	—	—	—	—	5
Semi-sterile (Ab. meiosis)	—	7	7	4	3	4	25
Total	64	33	104	41	26	14	282
Mutation frequency per 100 M_2 -plants	16.7	5.9	7.8	8.6	26.8	87.5	9.9

Sterile mutants—6.3 per cent of the M_2 -population showed this type of mutants. Most of the sterile mutant types observed occurred in 30, 40 and 60 Kr (Table II). There is direct relationship between γ -ray dosage and the mutation rate. Among sterile mutants tall creeping and linear leaf types were most common. This group completely failed to produce any fruit or seed. Most of these mutants were associated with chromosome aberrations.

Vital mutants—9.9 per cent of the M_2 -population was of vital mutant types. Among the vital types, late flowering and abnormal keel types were frequent. Most of the mutant types appeared from 10 to 40 Kr. Seed mutant types occurred mainly in 10 and 30 Kr (Table II). Early flowering, hard stem, abnormal keel, short internodes, variation in seed size, type of starch grain and seed coat colour were some of the important mutants induced by γ -rays.

TABLE III
Mutant types induced per M_1 -affected seed in different doses of γ -rays

	γ -ray doses in Kr					
	10	20	30	40	50	60
No. of mutant types observed in M_2	17	16	22	22	14	11
No. of M_1 -plants showed mutation	10	5	10	9	3	1
Rate of mutant types induced per M_1 -affected seed	1.7	3.2	2.2	2.4	4.6	11.0

Table III shows that more than one mutant types occurred per M_1 — affected seed in all the doses of γ -rays.

DISCUSSION

GUSTAFSSON (1944) suggested that legume seeds in general are sensitive to doses 10,000 to 20,000 r. Wide spectrum of mutants in pea were obtained by LAMPRECHT (1956); GELIN *et al.* (1958); BLIXT *et al.* (1958); GOTTSCHALK (1960); JARANOWSKI (1976) and BONDAN *et al.* (1976) using critical dose between 5,000 and 15,000 r. However, SOBCHEEK (1973) was of the view that 15,000 r. of ionizing radiation was lethal in pea. ILIEVA-STANEVA (1971) suggested that radiosensitivity was related to the physiological state of the seeds and found the lethal dose for dry seeds was 20 Kr, for soaked seeds 10 Kr and for germinating seeds 5 Kr. Among various factors affecting the radiosensitivity of pea seeds, genotype of the cultivar is of importance (TARASENKOV, 1973). In the present studies, there was considerable decline in the survival percentage beyond 40 Kr, but three lines tolerated 50

Kr and one survived even at 60 Kr. The optimum dose of this wild pea (*Pisum sativum* var. *arvense*) lies around 40 Kr. JARANOWSKI (1970) observed sharp fall in survival rate with doses above 25 Kr but certain lines of *P. arvense* tolerated 50 Kr of γ -rays. From cytochemical analysis in pea cultivars HVOSTOVA and NEVZGODINA (1959) found that in cultivar Moscow 572 which has lower heteroauxin content in the root meristems than *P. arvense*, had higher chromosome aberrations.

The effect of radiation is evident from the inhibition and delay in seed germination. Occurrence of morphologically abnormal seedlings and their lethality in M_1 -generation are an index of radiation damage. Reduction in pollen and seed fertility with increasing doses is one of the important biological effects of radiation. Such sterilities are generally associated with meiotic irregularities. The effect of radiation is more pronounced in the degree of damage in the survival rate of the M_1 -plants. This experiment gives an idea of the sub-lethal doses of this biological material.

In M_2 -generation, 29 mutant types were obtained from 91 survived M_1 -plants. This high rate indicates that in most of the M_1 -affected seeds more than one mutation seems to have occurred (Table III). Three M_1 -plants in 50 Kr and one in 60 Kr gave rise to respectively, 14 and 11 mutant types in M_2 -generation. In many M_2 -plants two or three mutant types appeared together. This may be due to multiple phenotypic effect of single genes as reported in pea (GOTTSCHALK and SCHEIBE, 1960; GEAZACHEVA and SIDOROVA, 1973; BLIXT and GOTTSCHALK, 1975). High rate of mutation observed in this species, may be due to its primitiveness and untapped genes lying so far in a dormant condition.

From the frequency of occurrence of three group of mutants in various doses it is evident that chlorophyll and vital groups are prevalent in lower doses, whereas, sterile group is common in higher doses (Table II). High mutation rate seems to be limited to the production of some rare breeding stock. In this experiment early flowering, bigger seed size, hard stem and keel mutants appear to be of breeding value.

REFERENCES

- BLIXT, S., 1961. Quantitative studies of induced mutations in pea. V. Chlorophyll mutations. *Agri. Hort. Genet.*, 19: 402-447.
- BLIXT, S., EHRENBERG, L. and Gelin, O.E.V., 1958. Quantitative studies of induced mutations in peas. I. Methodological investigations. *Agri. Hort. Genet.*, 16: 238-250.
- BLIXT, S. and GOTTSCHALK, W., 1975. Mutation in the Leguminosae. *Agri. Hort. Genet.*, 33: 33-85.
- BONDAN, L. M., TSITLENOK, S. I. and DUBROVA, N. A., 1976. Experimental production of mutations induced by γ -rays in peas. II. The mutability of second generation irradiated plants. *Tr. NII biol. i biofiz. pri Tomsk. un-te*, 7: 52-54.

- GEAZACHEVA, L. I. and SIDOROVA, K. K., 1973. Nature of the inheritance of modified characteres in some mutant pea forms. Institut Genetika, 9: 46-53.
- GELIN, O. E. V., EHRENBERG, L. and BLIXT, S., 1958. Genetically conditioned influences on radiation sensitivity in peas. Agri. Hort. Genet., 16: 78-102.
- GOTTSCHALK, W., 1960. Über züchterisch verwendbare Strahlen induzierte Mutanten von *P. sativum*. Züchter, 30: 33-42.
- GOTTSCHALK, W. and SCHEIBE, A., 1960. Untersuchungen an Röntgen induzierten Mutant von *Pisum sativum*. Z. Pflanzenz. 42: 313-338.
- GUSTAFSSON, A., 1944. The X-ray resistance of dormant seeds. Hereditas, 30: 165-178.
- HAWKES, J. G., 1977. The importance of wild germ plasm in plant breeding. Euphytica, 26: 615-621.
- HVOSTOVA, V. V. and NEVZGODINA, L. V., 1959. The frequency of chromosome aberrations in the tissue of pea plants sensitive and resistant to radiation. Cytologia, 1: 403-407.
- ILIEVA-STANEVA, B., 1971. Effect of γ -rays on seed of peas in different physiological states. Genetika i Seleksiya, 4: 277-278.
- JARANOWSKI, J. K., 1970. Mutagenne dzialanie promieni gamma μ *Pisum arvense* i *Vicia sativa*. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roslin, 1-2: 45-49.
- JARANOWSKI, 1976. Gamma-ray induced mutations in *Pisum arvense*. Genetika Polonica, 17: 479-495.
- LAMPRECHT, H., 1956. Röntgen Empfindlichkeit und genotypische Konstitution bei *Pisum*. Agri. Hort. Genet., 17: 196-208.
- RASMUSSEN, J. O., 1938. Notes on some mutants in *Pisum*. Hereditas, 24: 231-257.
- SOBCHEEK, V. V., 1973. Induced mutation of pea. Nauch, tr. Ukr. s.-Kh akad, 75: 16-27.
- TARASENKOV, I. I., 1973. Influence of genotypic characters of some vegetable crop on their sensitivity to mutagens and mutability. Lithuanian SSR, 195-199.

ASSEMBLEIA GERAL DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

Sob a presidência do Prof. Pereira Coutinho, reuniu no passado dia 10 de Fevereiro, no Departamento de Genética da ESMV, mais uma Assembleia Geral Ordinária da S. P. G., de cuja ordem de trabalhos constava a apreciação do Relatório e Contas da Direcção, situação da revista Brotéria Genética, possível actualização das cotas e programação de reuniões sectoriais.

Se o número de presenças na Assembleia e o interesse posto na discussão dos temas da agenda podem ser tomados como índice de vitalidade da Sociedade, então podemos felicitar-nos pois a crise anda por longe e a S. P. G. progride em bom ritmo. De facto, acorreu à reunião e participou na discussão um número muito apreciável de associados, o que justifica bastante optimismo quanto ao desenvolvimento próximo futuro da Sociedade.

O Relatório e Contas da Direcção (1981) e o respectivo parecer do Conselho Fiscal foram aprovados por unanimidade.

A situação da Brotéria Genética foi analisada detalhadamente pelo Prof. Luís Archer, e discutida com interesse pela Assembleia, nos seus aspectos administrativo, financeiro e editorial.

Pôde concluir-se que a vida interna da revista não apresenta problemas de maior, sobretudo por se considerarem boas as perspectivas de obtenção de apoios financeiros do INIC e da JNICI, e que a reacção do público leitor vem sendo muito positivo.

De grande interesse para os associados foi a decisão de a partir do próximo número, a revista passar a ser-lhes gratuitamente distribuída, na condição de estarem em situação regular — uma boa razão para de agora em diante manter as cotas em dia e poupar algumas preocupações desnecessárias ao nosso diligente tesoureiro...

Relativamente ao problema sempre melindroso de actualização das cotas, o Dr. Madeira Lopes fez uma breve análise sobre o desgaste inflacionário desde a fundação da S. P. G. e a relação entre o seu valor real e os benefícios actuais, e possíveis no futuro, de se ser sócio da S. P. G., acabando por propor um aumento da cota anual para 450\$00. A proposta motivou uma certa polémica, com numerosas intervenções, umas no sentido da manutenção da cota antiga, outras a favor dum aumento, mesmo superior ao proposto. O Eng.º Gue-

des Pinto defendeu também esta segunda posição e propôs um aumento para 500\$00 anuais (motivando a imediata retirada da proposta do tesoureiro...) o que acabou por ser aprovado por consenso.

No âmbito do último ponto da agenda foram avançadas algumas intenções de realização de reuniões sectoriais, nomeadamente por parte do Prof. Amândio Tavares, relativamente a iniciativas a conduzir pela afiliada Sociedade Portuguesa de Genética Médica, e por parte do Prof. Pereira Coutinho, quanto a uma possível reunião no Instituto Superior de Agronomia. A propósito, o Eng.º Melo Sampaio acentuou a importância deste tipo de reuniões no quadro das actividades regulares da S. P. G. e propôs que fosse feita uma auscultação aos sócios sobre a possibilidade de concretização de maior número de tais iniciativas, o que justifica que daqui também se realce o interesse dum cada vez maior envolvimento dos sócios neste como em tantos outros campos de acção da Sociedade.

ANTERO MARTINS

SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

FICHEIRO DE ACTIVIDADES DOS SÓCIOS

- ALMEIDA, Luís Meneses de* (*)
 Instituto de Biologia Médica, Faculdade de Medicina, 3049 Coimbra
 Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Aconselhamento
 genético, osteopatias genótípicas. G.H.
 G.E.
- ALMEIDA, Maria Leonor Osório Solano de*
 Instituto Gulbenkian de Ciência, Ap. 14, 2781 Oeiras Codex. Ensino
 Universitário. Linhas de Investigação: Estrutura primária de ácidos nu-
 cleicos particularmente ácidos nucleicos de transferência de cloroplas-
 tos; localização de genes desses ácidos nucleicos no D. N. A. cloro-
 plástico. G.M.
- ALMEIDA, Vasco Manuel Leal Martins de*
 Centro de Genética Humana e Biologia Social, Faculdade de Medi-
 cina, 4200 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Citoge-
 nética e Genética Humana. C.G.
 G.H.
- ARCHER, Luís Jorge Peixoto*
 Instituto Gulbenkian de Ciência, Ap. 14, 2781 Oeiras Codex. Ensino
 Universitário. Linhas de Investigação: Mecanismos moleculares de trans-
 formação e transdução em *Bacillus subtilis*. Estudo dos genes da utili-
 zação da arabinose e da produção do antibiótico bacitracina. Engenharia
 genética com genes da esporulação. G.M.
- BAGULHO, Francisco João Cortes*
 Estação Nacional de Melhoramento de Plantas, 7351 Elvas Codex. G.P.
 Linhas de Investigação: Melhoramento de cereais autógânicos.
- BARRADAS, Manuel Torres*
 Estação Nacional de Melhoramento de Plantas, 7351 Elvas Codex. G.P.
 Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Melhoramento de trigos,
 triticales, aveiás e cevadas.

(*)

C.G.	...	Citogenética
G.A.	...	Genética e Melhoramento Animal
G.D.	...	Genética da Diferenciação e Desenvolvimento
G.E.	...	Genética das Populações e Evolutiva
G.H.	...	Genética Humana
G.M.	...	Genética Molecular e Microbiana
G.P.	...	Genética e Melhoramento de Plantas

- BARRADAS, Maria do Céu**
 Estação Nacional de Melhoramento de Plantas, 7351 Elvas Codex. C.G.
 Linhas de Investigação: Estudos citogenéticos em *Triticum* e *Hordeum*.
- BETTENCOURT, Aníbal Jardim**
 Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Estação Agronómica Nacional, 2780 Oeiras. Linhas de Investigação: Genética da resistência à «ferrugem» em *Coffea*; Melhoramento de *Coffea arabica* para a resistência à «ferrugem». G.P.
- BOAVIDA, Maria Guida**
 Laboratório de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 1699 Lisboa Codex. Linhas de Investigação: Mapa Genético Humano; Estudos Cromossómicos nas populações. G.H.
 C.G.
- BOELPAEPE, Robert Emile Angèle de**
 Laboratório de Ecologia Aplicada, Universidade dos Açores, 9502 Ponta Delgada Codex Açores. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Efeitos citotóxicos e mutagénicos de pesticidas ao nível da célula vegetal e animal. C.G.
- BRANCO, João António Frazão Rodrigues**
 Departamento de Bioquímica, Faculdade de Ciências Médicas 1198 Lisboa Codex, Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Isolamento e caracterização química dos fotoprodutos do triptofano e estudo dos seus efeitos biológicos em estirpes de *Salmonella typhimurium* de Ames. G.M.
- BRANDÃO, Celeste Fernandes da Silva**
 Instituto de Antropologia, Faculdade de Ciências, 4000 Porto. Linhas de investigação: Estudo do endocruzamento em algumas populações humanas. Biologia e Ecologia das populações humanas. G.H.
 G.E.
- CABRAL, Maria Antónia Sampaio Trigo**
 Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina, 4200 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Genética Médica — citogenética das Leucemias. G.H.
- CARNEIRO, Ana Paula Capelas da Conceição**
 Centro de Estudos de Bioquímica e Fisiologia Animal, Instituto Rocha Cabral, 1200 Lisboa, Linhas de Investigação: Regeneração Hepática.
- CARNIDE, Olinda da Conceição Pinto**
 Divisão de Genética e Melhoramento de Plantas, Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001 Vila Real Codex, Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Melhoramento de cereais (centeio, trigo e triticales) e citogenética dos mesmos. G.P.
- CARVALHO, Maria Egídia de Sousa Bettencourt de**
 Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 4000 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Sistemas autolíticos nos Gram. +. Lise de *S. faecalis* induzido por enzimas muralíticas. G.M.

- CARVALHO, Miguel António Ponces de*
Rua da Bela Vista à Lapa, 55, 1200 Lisboa. Ensino Liceal.
- CASTEDO, Sérgio Manuel Madeira Jorge*
Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina, 4200 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Genética Médica. Farmacogenética. Indução de anomalias cromossómicas por fármacos. G.H.
- CASTRO, António Ferreira de*
Departamento de Botânica, Instituto Superior de Agronomia, 1399 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Investigação Aplicada no âmbito do melhoramento do milho, com especial incidência na obtenção de plantas haplóides, a partir da cultura de anteras e posterior utilização em esquemas especiais de melhoramento. G.P.
- CATARINO, Fernando Pereira Mangas*
Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências de Lisboa, 1294 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Endopoliploidia na diferenciação de suculência salina. C.G.
G.D.
- CHAVECA, Maria Teresa Cardoso Marques da Cruz Franco*
Faculdade de Farmácia, 1699 Lisboa Codex. Ensino Universitário: Linhas de Investigação: Estudo genético da trissomia 21. C.G.
G.H.
- CONDEÇO, Filomena Marques*
Escola Secundária Rainha D. Leonor, 1700 Lisboa. Ensino Liceal. Linhas de Investigação: Marcadores bioquímicos em populações de peixes da costa portuguesa. G.E.
- CONSTANT, Ruth Arez*
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 1699 Lisboa Codex. Linhas de Investigação: Mapa Genético. C.G.
G.H.
- CORREIA, Aníbal Leal*
Laboratório Químico, EPAC—Empresa Pública de Abastecimento de Cereais, 1000 Lisboa. Linhas de investigação: Electroforese de proteínas dos cereais. Essa aplicação no melhoramento do trigo. G.M.
- CORREIA, Jorge Calado Antunes*
Departamento de Genética, Escola Superior de Medicina Veterinária, 1199 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Compensação de dosagem dos genes ligados ao sexo, polimorfismos bioquímicos em mamíferos e peixes. Melhoramento genético de porcos e coelhos. C.G.
G.E.
G.A.
- COSTA, José Eduardo Lima Pinto da*
Instituto de Medicina Legal do Porto, Faculdade de Medicina, 4000 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Hereditariedade das impressões digitais. Genética da Psiquiatria. Criminalidade e Genética. G.H.

- COUTINHO, Miguel Pereira**
Departamento de Botânica, Instituto Superior de Agronomia, 1399 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Melhoria-
mento da Videira particularmente no que se refere à resistência a
doenças criptogâmicas. G.P.
- FEIJÓ, Maria de Jesus Portas**
Serviço de Genética, Hospital Egas Moniz, 1300 Lisboa. Ensino Uni-
versitário. Linhas de Investigação: Genética clínica, Diferenciação e
Desenvolvimento sexual humano. G.H.
G.D.
- FERNANDES, Abílio**
Instituto Botânico, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 3049 Coim-
bra Codex. Linhas de Investigação: Citotaxonomia das plantas vas-
culares de Portugal. C.G.
- FERNANDES, Maria Emília Queirós dos Santos Ribeiro**
Faculdade de Medicina, 4200 Porto. Ensino Universitário. Linhas de
Investigação: Estudo do Cariótipo nas Neoplasias Pulmonares e alte-
rações do mesmo após terapêutica citostática. G.H.
- FIALHO, Maria da Graça Monteiro de Azevedo**
Instituto Gulbenkian de Ciência, Apartado 14, 2781 Oeiras Codex. En-
sino Universitário. Linhas de Investigação: Genética da Produção de
Bacitracina. G.M.
- FIGUEIREDO, Maria Teresa Rangel de**
Divisão de Genética e Melhoramento de Plantas, Instituto Universitário
de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001 Vila Real Codex. Ensino Uni-
versitário. C.G.
G.P.
- FREITAS, Alberto Palyart do Carmo e**
Departamento de Fitopatologia, Estação Agronómica Nacional, 2780
Oeiras. Linhas de Investigação: Fisiologia e genética de patogenicidade
de *Puccinia recondita* do trigo. Resistência do trigo à *P. recondita*. G.P.
- GONÇALVES, Aires Humberto da Penha**
Faculdade de Farmácia, 1699 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas
de Investigação: Mecanismos genéticos de resistência bacteriana. Muta-
ções induzidas em vírus. Microplasma anaeróbios. G.M.
- GONÇALVES, Maria Helena Lobo Maia**
Instituto de Ciências Biomédicas «Abel Salazar», 4000 Porto. Ensino
Universitário. Genética Molecular e Microbiana. Linhas de Investi-
gação: Localização cromossómica de genes em procariontes (*B. subtilis*). G.M.
- GUIMARÃES, Maria Ludovina Vieira Lopes Silva.**
Instituto Botânico, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 3049 Coimbra
Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Morfogénese em
cultura de tecidos vegetais. Cariótipo em cultura de tecidos vegetais. C.G.
G.P.

- INEZ, Maria de Lourdes Ulcêncio Fernandes Catroça*
Escola Secundária da Amadora. Ensino Liceal.
- LEÃO, Maria Cecília de Lemos Pinto Estrela*
Instituto Gulbenkian de Ciência, Ap. 14, 2781 Oeiras Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Termomicrobiologia. Produção de Etanol.
- LENCASTRE, Hermínia Garcez de*
Instituto Gulbenkian de Ciência, Ap. 14, 2781 Oeiras Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Clonização de Genes de Espo-
lação de *Bacillus subtilis*. Mecanismo de Transdução em *Bacillus subtilis*. Caracterização de mutantes de *Bacillus subtilis* resistentes ao fago SPPI. G.M.
- LOPES, Amândio Joaquim Madeira*
Instituto Gulbenkian de Ciência, Apartado 14, 2781 Oeiras Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Efeitos da temperatura e de antibióticos na morte e no crescimento de populações de leveduras. G.M.
- LOUÇÃO, Maria Amélia Martins*
Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências, 1294 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Estudo fisiológico e cito-
lógico de uma possível associação simbiótica fixadora de N em *Cera-
tonia siliqua* (alfarrobeira). C.G.
- MAIA, José dos Santos Nascimento*
INIA — CRIDA de Entre-Douro e Minho, Gualtar, 4700 Braga. Linhas de Investigação: Melhoramento de milho, melhoramento de milho no sentido de resistência a doenças e pragas; melhoramento do milho no sentido do aumento em conteúdo de proteína. C.G.
G.P.
- MALHEIRO, Maria Isabel da Silva Nogueira Bastos*
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 4000 Porto. Ensino Uni-
versitário. Linhas de Investigação: Cromossomopatias. G.H.
- MARQUES, Duarte Victorino*
Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Estação Agronó-
mica Nacional, 2780 Oeiras. Linhas de Investigação: Análise genética e transferência de genes de resistência em *Coffea sp.*. Cultura de tecidos de plantas *in vitro*, nomeadamente do gén. *Coffea*. G.P.
- MARTINS, Antero Lopes*
Departamento de Botânica, Instituto Superior de Agronomia, 1399 Lis-
boa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Melhora-
mento da videira em relação à resistência ao oídio; selecção clonal da videira. G.P.
- MARTINS, Deolinda da Costa*
Instituto de Higiene e Medicina Social, Faculdade de Medicina, 3049
Coimbra Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação; Níveis e evolução de imunoglobulinas e antitoxinas nas populações. G.E.

- MARTINS, João Manuel Neves**
Departamento de Botânica, Instituto Superior de Agronomia, 1399 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Caracterização, Selecção e melhoramento do Gen. *Lupinus*. Estudo da variabilidade em alcalóides, teores proteicos e teores em óleo do *L. albus*, *L. luteus* e *L. augustifolius*. G.P.
- MENDES, Benilde Simões**
Núcleo de Engenharia Sanitária, Faculdade de Ciências e Tecnologia 2825 Monte da Caparica. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Protozoários como agentes de depuração biológica e fonte de single CE11 protein. Estudo da relação predada-presa (protozoário-bactéria) em cultura contínua. Modelização. G.M.
- MENDES, Maria Cesaltina dos Santos**
Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, 1198 Lisboa. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Citogenética (carióticas, cromatina sexual) e Bioquímica (electroforese em gel, cromatografia). Determinação de alterações metabólicas. C.G.
G.H.
- MONTEIRO, Luis Sieuve**
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 4000 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Variação Genética da eficácia do crescimento. G.A.
G.E.
- MOTA, Miguel**
Departamento de Genética, Estação Agronómica Nacional, 2780 Oeiras. Linhas de Investigação: Poliploidia e anfidiplóidia. Estrutura e movimento dos cromossomas. Ultraestrutura celular. C.G.
G.M.
G.H.
G.P.
- PAIVA, Isabel Maria Palaio de Freitas Rodrigues**
Instituto Botânico, Faculdade de Ciências e Tecnologia. 3049 Coimbra Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Cultura de tecidos vegetais (cultura de anteras para indicação de androgénese). C.G.
G.P.
- PAVEIA, Helena**
Grupo de Botânica, Faculdade de Ciências, 1200 Lisboa. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Estudo da utilização da *L. arabinose* em *Bacillus subtilis*. G.M.
- PENEDA, Isabel Maria de Salles Guerra Jonet de Almeida.** INIA — Estação Agronómica Nacional, 2780 Oeiras. Linhas de Investigação: Localização de genes responsáveis por caracteres componentes da produção em trigo hexaploide. C.G.
G.P.
- PEREIRA, António da Silva Pinto de Nazaré**
Departamento de Microbiologia e Tecn. Prod. Aliment., Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001 Vila Real Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Mobilização microbiológica de recursos naturais, selecção e caracterização de m.o. para usos biotecnológicos. Estudo de mecanismo de controle. G.M.

- PINTO, Henrique Guedes*
 Divisão de Genética e Melhoramento de Plantas, Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001 Vila Real Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Citogenética de Cereais (triticale, trigo e centeio), com particular incidência em aspectos de estabilidade cromossómica de diploides e de emparelhamento cromossómico; melhoramento do Triticale e trigo. C.G.
 G.P.
- PINTO, Mary Claire Dolan Ferreira*
 Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 1699 Lisboa Codex. C.G.
- QUEIROZ, Maria Clara de Almeida de Barros*
 Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências, 1200 Lisboa. Ensino Universitário. Mutações. Linhas de Investigação: Processo de expressão da mutação.
- RAMOS, Albino Aroso*
 Hospital de Santo António, 4000 Porto. Ensino Universitário. G.H.
- REBIMBAS, Maria do Céu Tavares*
 Instituto de Antropologia, Faculdade de Ciências 4000 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Estudo dos coeficientes de consanguinidade das populações e sua evolução e o polimorfismo genético dessas mesmas populações. G.H.
- REYS, Lesseps José António Lourenço*
 Instituto de Medicina Legal de Lisboa, Faculdade de Medicina, Lisboa. Ensino Universitário. Linhas de investigação: Estudo de marcadores genéticos; Aplicações da genética em medicina forense: na identificação e estabelecimento de filiação. G.H.
- RIBEIRO, Ruy André Ferreira de Figueiredo*
 Departamento de Genética, Escola Superior de Medicina Veterinária, 1199 Lisboa Codex. Ensino Universitário. G.A.
- ROMANO, Maria da Conceição Gonçalves Silva*
 Estação Nacional de Melhoramento de Plantas, 7351 Elvas Codex. Linhas de Investigação: Citogenética de Trigo. Localização de genes em trigo cuja interferência tenha repercussão no melhoramento deste cereal. Estudos relativos à produção de trigo híbrido. C.G.
 G.P.
- ROSA, Maria Isabel Borrego Franco da*
 Escola Secundária de Sebastião e Silva, 2780 Oeiras. Ensino Liceal.
- ROSÁRIO, Jorge Luis A. Lopes do*
 Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, 1198 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Rastreamentos de doenças genéticas. C.G.
 G.H.
- RUEFF, José A.*
 Departamento de Bioquímica, Faculdade de Ciências Médicas, 1198 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Mutagenese ambiental, Cancerígenese. G.M.
 G.D.

- SALAVESSA, João José Duarte Santos*
 Departamento de Genética, Escola Superior de Medicina Veterinária,
 1199 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Me-
 lhoramento genético de coelhos, polimorfismos bioquímicos em ma-
 míferos. G.A.
- SAMPAYO, Tristão José de Mello de*
 Instituto Gulbenkian de Ciência, Apartado 14, 2781 Oeiras Codex. C.G.
 Linhas de Investigação: Citogenética do Trigo. G.H.
- SANTOS, António Manuel Amorim dos*
 Instituto de Antropologia, Faculdade de Ciências, 4000 Porto. Ensino
 Universitário. Linhas de Investigação: Marcadores Genéticos Humanos;
 Genética Populacional Humana; Localização Cromossómica de Marca-
 dores. G.H.
 G.E.
- SANTOS, Heloisa Gonçalves dos*
 Unidade de Genética, Serviço de Pediatria, Hospital de Santa Maria, C.G.
 1600 Lisboa. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Genética G.H.
 Médica.
- SEQUEIROS, António Jorge dos Santos Pereira de*
 Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
 Salazar, 4000 Porto. Ensino Universitário. Citogenética Clínica. Linhas
 de Investigação: Cromossopatias, Polineuropatia Amiloidótica Familiar,
 Doença de Machado-Joseph. C.G.
 G.H.
- SILVA, Alberto Manuel Barros da*
 Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina, 4200 Porto. En- C.G.
 sino Universitário. Linhas de Investigação: Genética Médica. Citogené- G.H.
 tica de meiose humanas. Factores genéticos na infertilidade masculina.
- SILVA, Maria Cecília Cabeça*
 Instituto Gulbenkian de Ciência, Apartado 14, 2781 Oeiras Codex. Li-
 nhas de Investigação: Acção do etanol e da temperatura na mutação
 para deficientes respiratórios em leveduras. G.M.
- SILVA, Rosa Maria Vieira da*
 Escola Secundária n.º 1, 2560 Torres Vedras. Ensino Liceal.
- SILVA, Rui Vidal Correia da*
 Faculdade de Farmácia, 1699 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas
 de Investigação: Caracterização e estudo de ácidos ribonucleicos ribosso-
 nais de P.M. baixo (2S a 6S, excluindo 4S), nomeadamente por sequen-
 ciação de RNA e DNA estudo de plasmídeos e de DNA mitocondrial
 por Engenharia Genética.
- TAVARES, Amândio Gomes Sampaio*
 Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina, 4200 Porto. En- C.G.
 sino Universitário. Linhas de Investigação: Citogenética do intersexo G.H.
 no homem. Genética das malformações congénitas multifactoriais. Efei- G.E.
 tos populacionais da acção médica e do conselho genético. Genética
 do cancro.

- TAVARES, Maria do Carmo Valenzuela Sampaio*
 Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina, 4200 Porto. Linhas de Investigação: Citogenética em Patologia Humana, Estudos dos cromossomas humanos em bandas finas. C.G.
 G.H.
- TAVARES, Maria da Purificação Valenzuela Sampaio*
 Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina, 4200 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Genética Médica. Genética e Citogenética dos casais com esterilidade ou abortamentos de repetição. Aconselhamento Genético e seu efeito Bio-social. G.H.
- TEIXEIRA, Rogério dos Santos Cardoso*
 Instituto de Biologia, Faculdade de Medicina, 3000 Coimbra. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Pesquisa de doenças monofactoriais, multifactoriais e por aberrações cromossómicas. Aconselhamento Genético. G.H.
- VIEIRA, Dina Manuela da Trindade Morais Masseneiro*
 R. Nery Delgado, 6, r/c. Dt.º, 2775 Parede. Ensino Liceal.
- VIEIRA, Maria da Graça Calisto Laureano Santos Alves*
 Grupo de Botânica, Faculdade de Ciências, 1200 Lisboa. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Mecanismos moleculares da transdução de *Bacillus subtilis* pelo bacteriófago PBS1.
- VIEIRA, Maria Rita de Almeida Madeira Clemente da Mota*
 Instituto Botânico, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 3049 Coimbra Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Citogenética do Triticales. Cultura de tecidos e protoplastos em cereais. C.G.
 G.P.
- VOUGA, Luis Carlos Ferreira Pinto*
 Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina, 4200 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Citogenética Humana. Esterilidade masculina, do ponto de vista genético. Cardiopatias congénitas. C.G.
 G.H.
- WARDEN, Juana*
 Laboratório de Botânica, Faculdade de Ciências, 1294 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Estudo dos mecanismos de controle de actividade meristemática no *Bryophyllum*. Estudo da variação da endopoliploidia em *Bryophyllum*. C.G.
 G.D.

Genética molecular bacteriana

Directores

Alfonso Jiménez-Sánchez y Ricardo Guerrero

Primeros autores de los diferentes capítulos

Luis J. Archer, M.^a Eugenia Armengod, Jorge Barbé, Manuel Blanco, Francisco del Castillo, Enrique Cerdá, Ricardo Guerrero, Enrique Herrero, Alfonso Jiménez-Sánchez, Rubens López García, José M.^a Monfort, Antonio Portolés, David Vázquez y Miguel Vicente
Pertenecientes a diversas universidades e institutos de investigación de España y Portugal

El desarrollo espectacular de la Biología Molecular en los últimos años ha motivado que muchos estudiantes y profesionales dirijan su atención hacia esta nueva área de las Ciencias de la Vida. De un modo particular, la Ingeniería Genética, tanto en sus aspectos básicos como en sus posibles aplicaciones futuras—que ahora apenas podemos intuir—ha despertado un gran interés, y, por qué no decirlo, preocupación, en el hombre de la calle y en los medios de difusión. En muchos casos, las polémicas surgidas se deben a un desconocimiento de los fundamentos de esa ciencia, que se basa en las investigaciones realizadas en las tres últimas décadas sobre la estructura y funcionamiento del material hereditario de los organismos, y en especial de los descubrimientos en el campo de la Genética Molecular de bacterias y virus.

Hace algún tiempo, y con ocasión de un encuentro científico sobre temas avanzados, nació la idea de recoger en un libro un conjunto de trabajos que mostrasen los aspectos más esenciales de la Genética Molecular Bacteriana. El principal objetivo era el de poner al alcance de los estudiantes universitarios un esquema básico del estado actual de los conocimientos, esquema que sería desarrollado por algunos investigadores de habla española y que expondría los resultados más directos del trabajo experimental realizado. Se intentaba, de manera didáctica, dar una formación más específica que la que pueden aportar los textos generales.

Con fines exclusivamente didácticos, el contenido del libro se ha distribuido en dos partes. Una que comprende temas de carácter general y otra con aspectos más específicos y/o aplicados; en todos ellos se ha considerado particularmente su valor docente. En los distintos capítulos se van desarrollando temas estrictamente genéticos, como pueden ser los mecanismos de mutación, reparación, transformación, conjugación y otros que, partiendo de la base genética, relacionan ésta con algunos aspectos esenciales de la fisiología bacteriana, como son los procesos de la división celular o la regulación de la síntesis de proteínas. Asimismo se tratan temas de importancia creciente tales como la Ingeniería Genética y la aplicación de los microorganismos a la detección de sustancias mutagénicas y carcinogénicas.

La presente obra pretende ofrecer una aproximación inquisitiva, operativa y experimental a algunos temas clave de la Genética Molecular, con objeto de despertar el interés por la investigación y ayudar a todos aquellos estudiosos de la Genética, la Microbiología y la Bioquímica no especialistas en el área molecular, y a los estudiantes que deseen apreciar más de cerca el sabor de la ciencia tal como se va construyendo.

ÍNDICE

Presentación. Capítulo 1. Fidelidad de la expresión génica y base molecular de la mutación espontánea. — 2. Mecanismos de reparación del DNA. — 3. La transformación como modelo de transferencias genéticas. — 4. Transfección en microorganismos. — 5. Mecanismos de conjugación bacteriana. — 6. Aspectos actuales de la transducción generalizada. — 7. Ciclo celular en bacterias. I. Aspectos moleculares. — 8. Ciclo celular en bacterias. II. Regulación. — 9. Elongación celular. — 10. Regulación de la división celular en *Salmonella typhimurium*: Efecto de la acumulación de RNA

y de la densidad celular. — 11. Empleo de DNA recombinante en la manipulación genética de microorganismos. Metodología, posibilidades y riesgos. — 12. Mecanismo de la reparación SOS. — 13. Utilización de microorganismos en la detección de sustancias con acción mutagénica y carcinogénica. — 14. Bases moleculares de la acción de los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas. — 15. Complementación. Apéndice I. Localización en el mapa de *Escherichia coli* de diversos marcadores genéticos. Apéndice II. Desarrollo histórico de la genética molecular y bacteriana.

PIDA ESTA OBRA EN SU LIBRERÍA O DIRECTAMENTE A
EDITORIAL REVERTÉ, S. A.

Encarnación, 86-88 — Tel. (93) 219 34 52 — BARCELONA 24

— Na

REVISTA PORTUGUESA DE BIOQUÍMICA APLICADA

(Ano IV, vol. IV, n.º 5-6, 1981)

(Assinaturas e números avulso na Editorial Matriz, R. do Salitre, 155-2.º
1296 Lisboa Codex)

Plasma monoamine oxidase activity in a group of patients with
liver disease 209

por *M. S. Azevedo, Paula Alexandrino, J. Pinto Correia e Carlos Manso*

Société Française de Biologie Clinique. Comité Scientifique. Section
de Standardisation. Commission «Lípidos — Lipoproteínas» —
Document H. Stade 1 Version 3 213

por *J. C. Fruchart et al*

Apoio à gestão de um laboratório de análises clínicas por mini-
computador 217

por *João C. Magalhães*

H. D. L.: Questões por esclarecer 227

por *E. M. Campos*

Société Française de Biologie Clinique, Comité Scientifique, Section
de Standardisation. Commission «Lípidos-Lipoproteínas» 233

por *J. C. Fruchart et al*

— Na Revista

MEDICINA & CIRURGIA

(n.º 1, vol. 2, Jan. 82)

(Assinaturas e números avulso na Editorial Império, R. do Salitre, 155-2.º
1296 Lisboa Codex P)

Editorial — *J. Rueff* 1-57

Raquitismo por défice congénito de $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_2$ -Hidroxilase 5

*Amílcar Mota, M. Alberta Almeida, Luís Leal, Jenny Cardoso e M. Elisa
S. Monteiro*

Principais anomalias no metabolismo das lipoproteínas.	
Parte III — Apoproteínas e aterosclerose	13
<i>E. M. Campos</i>	
Traqueostomias	17
<i>Nuno Santiago</i>	
Complicações urológicas das doenças inflamatórias do intestino	27
<i>George E. Block e Armando E. Giuliano</i>	
Esclerose em placas: diagnosticável e tratável	37
<i>Labe C. Scheinberg e Christopher Abissi</i>	
Prós e contras da heparina em baixas doses	47
<i>George Brandon Patrick</i>	
A basofilia pituitária — Meio século depois de Cushing	51
<i>W. F. Collins</i>	