

Para a extração das proteínas, as amostras foram cortadas com aproximadamente 10 cm de comprimento e a casca de suas extremidades removidas. As extrações se deram com o tampão de extração de proteínas PBS, pH 7,4, acrescido de 1% de betamercaptoetanol. Em um quitasato adaptado e através de uma bomba de vácuo, passaram-se 400 µl do tampão PBS, nos vasos lenhosos de cada amostra.

A eletroforese foi feita em géis de sódio dodecil sulfatopoliacrilamida gel (SDS-PAGE), com 12,5% de acrilamida e com 1,5 mm de espessura, em sistema descontínuo. A visualização dos padrões protéicos nos géis foi obtida através da coloração das mesmas com o corante "Coomassie Blue R-250".

A diferenciação entre plantas saudas e com declínio dos citros através dos seus perfis protéicos pode ser observada na Figura 27. Pode-se visualizar três bandas protéicas bem características, presentes nos extratos dos vasos lenhosos de raízes de três plantas saudas (colunas 2 e 4) e cinco bandas protéicas no extrato de duas plantas com declínio dos citros (colunas 5 e 6). Essas bandas, visualizadas de cima para baixo, quando comparadas com os marcadores de pesos moleculares (colunas 1 e 7), apresentam pesos moleculares de aproximadamente 43, 35, 31, 26 e 23 KD, respectivamente.

As proteínas 31 e 26 KD, presentes nos extratos de raízes e que são exclusivas de plantas com declínio dos citros, foram posteriormente purificadas e podem ser visualizadas na Figura 28 (colunas 4 e 5).

Com os resultados deste trabalho, ou seja, a identificação e purificação das proteínas exclusivas de plantas com declínio dos citros, sugere-se, numa etapa seguinte, a produção de anticorpos específicos contra essas macromoléculas. Esses anticorpos produzidos poderão ser utilizados em técnicas imunológicas tipo ELISA, para se fazer o diagnóstico precoce da doença. - Luciano Vilela Paiva, Edilson Paiva, Maurício de Souza.

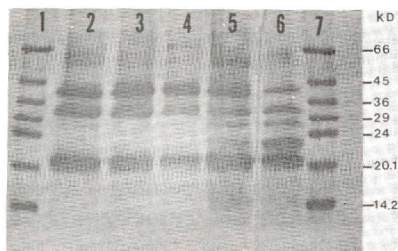


FIGURA 27. Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas dos vasos lenhosos de raízes de três plantas saudas (coluna 2 a 4) e duas com declínio dos citros (colunas 5 e 6), cujos pesos moleculares (kD) encontram-se nas colunas 1 e 7. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1994.

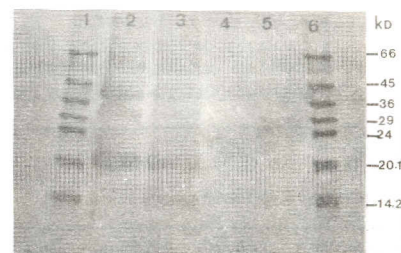


FIGURA 28. Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas não purificadas dos vasos lenhosos de raízes de uma planta sadia (coluna 2) e uma doente (coluna 3); colunas 4 e 5 com proteínas purificadas, exclusivas de plantas com declínio dos citros e com pesos moleculares (kD) mostrados nas colunas 1 e 6. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1994.

UTILIZAÇÃO DA ANÁLISE DE RFLP NO ESTUDO DA TOLERÂNCIA À TOXIDEX DO ALUMÍNIO EM MILHO

Este trabalho objetivou viabilizar a utilização da técnica de RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism - na análise do mecanismo genético envolvido na tolerância à toxidez do alumínio em milho. Foram utilizadas quatro linhagens de milho tolerantes (15, 16, 699 e 1327) e três suscetíveis ao Al tóxico (19, 52 e 57); todas com, no mínimo, dez gerações de autofecundação. Efetuaram-se cruzamentos do tipo tolerante x suscetíveis, obtendo-se os seguintes híbridos F1: 57 x 1327; 57 x 699; 53 x 16; 53 x 15 e 19 x 1327. Cerca de 100 sementes F1 de cada cruzamento foram plantadas e autofecundadas, obtendo-se cinco populações F2. Para avaliar a tolerância ao Al dos parentais F1 e F2, foram utilizadas soluções nutritivas contendo 222 µmol Al/l. Após sete dias nas soluções nutritivas, as plantas mais tolerantes e mais suscetíveis de cada cruzamento foram selecionadas através do comprimento relativo da raiz seminal (CRRS). As plantas selecionadas foram identificadas e armazenadas a -70°C, para posterior extração do DNA. Utilizaram-se nas análises as enzimas de restrição EcoR I e EcoR V, em combinação com cinco sondas de DNA de diferentes regiões do cromossomo 2 (UMC 34, UMC 6, UMC 122, UMC 49 e UMC 36). Também foi implementada a metodologia não-radiativa de marcação e detecção de sondas de DNA com o sistema digoxigenina.

A Tabela 41 fornece a comparação dos valores do CRRS dos parentais F1 e F2, obtidos pela análise conjunta

dos experimentos. Os resultados de análise das bandas de RFLP que discriminaram indivíduos tolerantes e suscetíveis ao Al quando utilizaram-se as enzimas EcoR I e EcoR V são apresentados nas Tabelas 42 e 43, respectivamente.

Os resultados obtidos com o CRRS indicaram que o caráter tolerância à toxidez de alumínio é de natureza quantitativa e que há ocorrência de interação alélica de dominância. O sistema de marcação e detecção não-radiativa das sondas com digoxigenina mostrou-se uma metodologia perfeitamente viável para ser utilizada na análise de RFLP e, por sua vez, mostrou que na análise de RFLP pode haver regiões no cromossomo 2 relacionadas com locos do caráter tolerância à toxidez de Al. - *Cláudio Brondani, Edilson Paiva.*

TABELA 41. Média do comprimento relativo da raiz seminal (CRRS) das linhagens e híbridos F1 crescidos em solução nutritiva com Al tóxico. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1993.

Materiais Genéticos	CRRS ¹
19 x 1327	1,01 a
57 x 1327	0,86 ab
1327	0,75 bc
57 x 699	0,66 cd
53 x 15	0,60 cd
57	0,55 de
15	0,50 def
699	0,49 def
53 x 16	0,40 ef
19	0,33 fg
16	0,33 fg
53	0,20 g

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 42. Bandas que discriminaram indivíduos tolerantes e suscetíveis ao Al quando utilizou-se a enzima EcoR I. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1993.

Sonda	57x1327	57x699	53x16	53x15	19x1327
UMC 6	6(1:5)T ¹	9(1:6)T 10(4:5)S	1(2:5)S 5(4:5)S	2(1:3)T 3(4:4)S ²	9(3:4)T
UMC 36	1(1:2)S	2(2:6)T 10(1:6)T	2(1:5)S 5(2:5)S 6(1:5)S 7(5:5)S ¹	2(1:3)T	1(1:4)T
UMC 49	4(2:5)S 11(1:2)S 12(1:3)T	4(2:6)T 10(3:6)T	1(4:5)T 3(5:5)S ¹ 6(3:5)S 8(2:5)S	2(1:3)T 9(1:3)T	2(2:6)S 4(2:6)S
UMC 122	-	3(1:6)T 4(1:6)T 9(4:5)S	3(3:5)S 5(5:5)S ¹ 7(2:5)S 9(3:5)S	1(4:4)S ² 2(1:4)S	1(1:5)S 3(2:4)T 10(4:4)T ²

¹Corresponde ao número da banda. Número de vezes que a banda está presente: número de indivíduos testados, e a letra T ou S, se a banda representa plantas F2 tolerantes ou suscetíveis.

²Bandas que estiveram presentes em todos os indivíduos testados do grupo.

TABELA 43. Bandas que discriminaram indivíduos tolerantes e suscetíveis ao Al quando utilizou-se a enzima EcoR V. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1993.

Sonda	57x1327	57x699	53x16	53x15	19x1327
UMC 6	5(2:2)S ¹ 7(2:2)S	1(1:6)T 2(2:6)T 4(1:6)T 8(1:6)T 10(4:5)S	9(1:4)S	4(2:2)T 5(1:4)S 8(2:2)T	3(3:4)S 5(2:4)S 6(1:4)T 8(4:4)S ² 10(3:4)T
UMC 34	1(2:2)S 8(1:2)S	3(5:6)T 4(2:6)T	-	2(1:2)T	6(1:4)T 10(3:4)T
UMC 36	1(1:2)S	2(4:6)T 3(1:6)T	4(3:4)S	5(1:2)T	6(1:4)T 6(3:4)T
UMC 49	1(2:2)S 2(1:2)S 12(1:2)S	6(3:6)T	4(1:2)S 10(1:4)S 13(3:4)S	4(1:2)S 5(2:2)T 6(1:4)S	3(1:4)T 16(2:4)T 7(4:4)S ² 13(2:2)T 14(1:2)T 16(1:2)T
UMC 122	1(1:2)S 3(2:2)S 6(1:2)S 7(2:2)S 8(1:2)T 9(1:2)S	1(2:6)T 3(2:6)T 4(3:6)T	-	2(1:2)T 3(1:3)S	3(1:4)T 7(1:4)T 9(2:5)S

¹O primeiro valor corresponde ao número da banda. O segundo, o número de vezes em que a banda está presente, número de indivíduos testados, a letra T ou S, se a banda representa indivíduos tolerantes ou suscetíveis.

²Bandas que estiveram presentes em todos os indivíduos testados do grupo (grupos com mais de quatro indivíduos).

VIABILIDADE DA PRODUÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO VIA CULTURA DE ANTERAS

No melhoramento de milho, a obtenção de linhagens mediante autofecundações no campo normalmente consome de dois a três anos. Alternativamente a esse processo, a cultura de anteras in vitro possibilita a obtenção de haplóides em apenas alguns meses, que, após diploidizados, se desenvolvem em linhagens homozigotas, proporcionando substancial economia de tempo e espaço.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de selecionar genótipos tropicais de milho mais responsivos à cultura de anteras in vitro, visando a produção de linhagens, e de avaliar a possibilidade da incorporação dessa técnica ao programa de melhoramento de milho do CNPMS.

Foram testados 47 genótipos de milho. A metodologia utilizada incluiu a determinação do estágio de desenvolvimento dos micrósporos, através de coloração com carmim propiônico; o teste de viabilidade dos micrósporos, pela reação da fluorescência enzimaticamente induzida; o pré-tratamento dos pendões a $\pm 8,0$ °C, com duração de 6 a 25 dias; o plaqueamento das anteras em