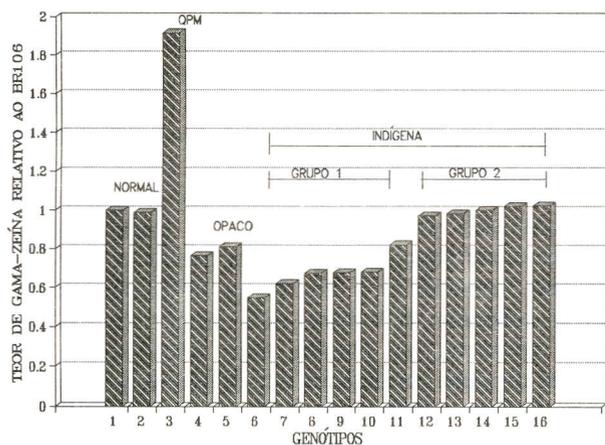


**TABELA 40.** Densidade dos grãos (em g/ml), qualidade protéica (em porcentagem de triptofano na proteína total), porcentagem de zeínas e não-zeínas, e teor de açúcares solúveis no endosperma dos milhos normais, opaco-2, indígenas e QPM. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1993.

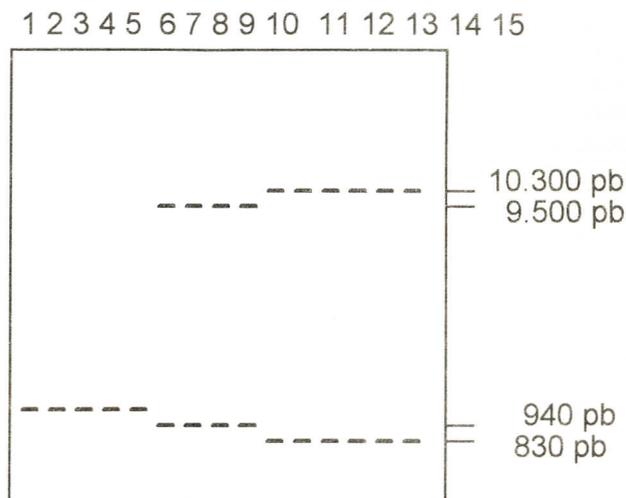
Genótipos	Densidade dos grãos	Qualidade protéica	Zeínas	Não Zeínas	Açúcares solúveis
BR 106 <sup>1</sup>	1,30 <sup>1</sup> a <sup>5</sup>	0,43 d	65,37 a	30,50 b	0,69
BR 201 <sup>1</sup>	1,28 a	0,52 cd	61,83 a	35,77 b	1,12
BR 451 <sup>4</sup>	1,27 a	0,79 b	41,30 b	52,40 a	0,72
IACo2-IV <sup>2</sup>	1,11 bc	1,21 a	36,13 b	56,30 a	0,94
UFVo2 <sup>2</sup>	1,14 bc	1,08 a	38,77 b	55,90 a	1,09
AC-81 <sup>3</sup>	1,09 bc	0,58 c	62,80 a	32,90 b	0,85
MT-1 <sup>3</sup>	1,10 b	0,56 cd	64,56 a	29,73 b	0,69
MT-10 <sup>3</sup>	1,09 bc	0,57 c	60,83 a	33,20 b	0,97
MT-24 <sup>3</sup>	1,08 bc	0,58 cd	65,37 a	33,53 b	1,13
BOL-I <sup>3</sup>	1,12 bc	0,55 cd	65,83 a	32,57 b	0,77
BOL-II <sup>3</sup>	1,11 bc	0,50 cd	63,63 a	29,30 b	0,81
MT-II <sup>3</sup>	1,12 bc	0,46 cd	62,23 a	30,53 b	0,71
MT-III <sup>3</sup>	1,15 b	0,43 d	65,90 a	28,73 b	0,85
N. U. <sup>3</sup>	1,07 c	0,51 cd	66,50 a	27,77 b	0,86
PR-1 <sup>3</sup>	1,15 bc	0,47 cd	63,70 a	29,93 b	0,81

<sup>1</sup>Normal; <sup>2</sup>Opaco-2; <sup>3</sup>Indígena; <sup>4</sup>QPM

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



**FIGURA 25.** Quantidade relativa da gama-zeína de 27 kD, obtida pela leitura de três géis de poliacrilamida no densitômetro a laser Ultrosan XL-2222 e padronizada em função da quantidade dessa proteína no BR 106, na seqüência dos genótipos analisados: 1: BR106, 2: BR201, 3: BR 451, 4: IACo2-IV, 5: UFVo2, 6: AC-81, 7: MT-10, 8: Preto Chileno, 9: MT-1, 10: Nodzob Udza, 11: MT-24, 12: MT-II, 13: BOL-II, 14: MT-III, 15: BOL-I, 16: PR-1. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1993.



**FIGURA 26.** Padrão de RFLP do gene da gama-zeína de 27 kD, obtido pela restrição do DNA dos genótipos descritos na Figura 1, com a enzima EcoR-I e hibridizado com o fragmento  $\delta$  ZM-5 marcado com digoxigenina via PCR. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1993.

## DETERMINAÇÃO PROTÉICA PARA O TESTE DE DIAGNÓSTICO DO DECLÍNIO DOS CITROS

O declínio dos citros, uma anormalidade de causa ainda desconhecida, é uma das doenças que mais causam prejuízo à citricultura brasileira, constituindo motivo de crescente preocupação de produtores e de pesquisadores. Os sintomas são, em geral, observados em pomares após cinco anos de idade. No entanto, isto não significa que somente plantas com mais de cinco anos sejam suscetíveis ao declínio dos citros.

Como é muito provável que essa doença seja causada por um agente infeccioso, visto que pode ser transmitida através da enxertia de raízes, o seu diagnóstico precoce poderá monitorar a erradicação de plantas infectadas no pomar, diminuindo a quantidade de inóculo na área e, conseqüentemente, o risco de disseminação da doença.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um teste sensível de diagnose que permita a detecção precoce de plantas com declínio dos citros, através de técnicas eletroforéticas, realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do CNPMS. As amostras de raízes do porta-enxerto limoeiro Cravo, de plantas sadias e doentes, foram obtidas de pomares comerciais, situados nos municípios de Bebedouro, SP, e Alfenas, MG.

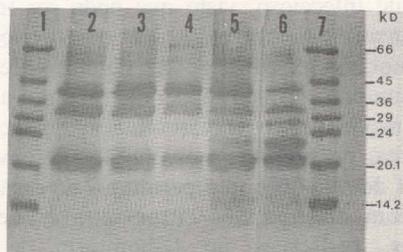
Para a extração das proteínas, as amostras foram cortadas com aproximadamente 10 cm de comprimento e a casca de suas extremidades removidas. As extrações se deram com o tampão de extração de proteínas PBS, pH 7,4, acrescido de 1% de betamercaptoetanol. Em um quitasato adaptado e através de uma bomba de vácuo, passaram-se 400  $\mu$ l 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".

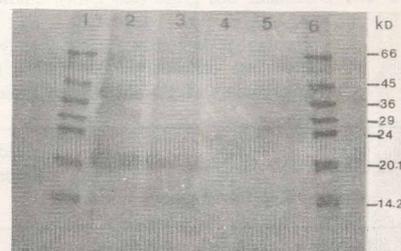
A diferenciação entre plantas saudas e com declínio dos citros através dos seus perfis protéicos pode ser observada na Figura 27. Pode-se visualizar três bandas protéicas bem características, presentes nos extratos dos vasos lenhosos de raízes de três plantas saudas (colunas 2 e 4) e cinco bandas protéicas 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 poliácridamida 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 poliácridamida 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 TOXIDEZ 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  $\mu$ mol 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