

mais importante para a eficiência de utilização. - Oliveira, Solange Rocha Monteiro de Andrade, Antônio Álvaro Corsetti Purcino, Antônio Carlos de Marlúcia Rocha e Silva.

TABELA 204. Componentes da eficiência de uso de nitrogênio em seis cultivares de milho; CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1994.

Componentes	Log	Nitrogênio hg/ha	SP XiY / SQ Y						
			BR 201	BR 201-F	BR 201-M	BR 201-R	BR 451	HS 20X22	
Eficiência no uso de N(Gw/Ns)	Y								
Eficiência na absorção (Gw/Nt)	X1	10	-0,087	0,847	0,702	0,368	1,313	0,981	
		60	0,978	1,190	0,655	2,588	1,323	0,882	
		180	1,260	1,725	0,299	1,129	-1,864	-0,105	
Eficiência na utilização (Gw/Nt)	X2	10	1,087	0,153	0,297	0,633	-0,312	0,019	
		60	0,022	-0,190	0,346	-1,587	-0,323	0,118	
		180	-0,259	-0,725	0,701	-0,129	2,860	1,104	
N grãos/N total na planta (Ng/Nt)	X3	10	0,613	0,213	0,326	0,108	-0,670	-0,107	
		60	-0,512	-0,533	0,342	-2,951	-1,092	0,089	
		180	-0,522	-1,637	-0,115	-0,474	3,109	0,378	
N absorvido após embonecamento (Ng/Nt)	X4	10	-1,020	0,492	7,959	0,788	3,738	6,949	
		60	0,346	0,242	-0,134	3,318	0,223	1,247	
		180	-3,989	8,291	0,136	1,356	-1,268	-5,838	
N grão/N absorvido após embonecamento (Ng/Na)	X5	10	1,631	-0,279	-7,638	-0,680	-4,407	-7,052	
		60	-0,858	-0,773	0,474	-6,267	-1,316	-1,157	
		180	-4,510	-9,922	-0,250	-1,830	4,377	6,224	
Peso grãos/ N grão (Gw/Na)	X6	10	0,474	-0,060	-0,029	0,525	0,358	0,127	
		60	0,534	0,343	0,004	1,365	0,769	0,028	
		180	0,262	0,911	0,816	0,346	-0,246	0,724	
Peso de grãos em g/planta		10	92,0	102,5	98,0	61,5	60,0	102,5	
		60	147,5	143,8	131,0	131,0	103,3	159,3	
		180	142,3	152,0	125,8	127,3	127,8	155,3	

Obs: (1): $Y=X1+X2$ (2): $X2=X3+X6$ (3): $X3=X4+X5$

ATIVIDADE DA PEP-CARBOXILASE E DA GLUTAMINA SINTETASE EM GENÓTIPOS DE MILHO E SORGO CONTRASTANTES EM EFICIÊNCIA DE USO DE NITROGÊNIO

O objetivo deste experimento foi verificar se a seleção no campo, para aumentar a eficiência de uso de nitrogênio (EUN), em genótipos de milho (Sintético Elite 1, eficiente e Sintético Elite 2, ineficiente) e sorgo (CMS 871.016, mais eficiente e CMS 9.109.065, menos eficiente) teve algum efeito na atividade da PEP- carboxilase (PEP-case) e da glutamina sintetase (GS), duas enzimas-chaves no processo de assimilação de carbono e nitrogênio em plantas tipo C4.

O experimento foi conduzido como um fatorial, com quatro genótipos e dois níveis de nitrato, cada tratamento repetido três vezes. As plantas (sete por vaso) foram cultivadas em vasos com vermiculita e regadas, em dias alternados, com 200 ml de uma solução nutritiva de Arnon & Hoagland, ajustada para fornecer 1,6 e 16 mM de nitrato. As quartas folhas do milho, aos 21 dias após a emergência

(DAE) e, do sorgo aos 35 DAE, foram colhidas retirando-se as nervuras centrais e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, transportadas para o laboratório, onde foram mantidas em um freezer a -80°C até a análise das atividades enzimáticas.

Para a obtenção dos extratos enzimáticos crus, pesou-se um grama de folha, a qual foi finalmente macerada em almofariz, na presença de nitrogênio líquido, adicionando-se 100 mg de PVPP. O descongelamento foi feito em quatro volumes de Tris-HCl pH 7,5, contendo 20 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 mM de Na_2-EDTA e 10 mM de BME. No caso do sorgo, a esta solução de extração acrescentou-se, ainda, 0,5 mM de PMSF. Após o descongelamento, cada amostra foi centrifugada a 16.464 g a 2°C, por quinze minutos, sendo o sobrenadante contendo as enzimas, recolhido em tubos de vidro e mantido abaixo de 4°C.

A determinação da atividade da PEP-case foi realizada após a redução do oxaloacetado a malato, em presença da MDH e de NADH. O meio de reação com um volume final de 1 ml continha 100 mM de Tris- HCl pH 7,2, 10mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 mM de $NaHCO_3$, 10 mM de BME, 5,5 UI de LDH, e 12 UI

de MDH, 5 mM de glicose-6-fosfato, 0,2 mM de NADH, 5 mM de PEP e 100 UI do extrato cru, diluído dez vezes para o milho e cinco vezes para o sorgo. A reação foi iniciada após incubação em banho-maria por três minutos, a 30°C, pela adição do PEP, e a oxidação do NADH foi monitorada a 340 mm.

A atividade biossintética da GS foi determinada após acoplamento com a PK e a LDH. O meio de reação, com volume final de 2 ml, continha 50 mM de Tris-HCl pH 7,8, 5 mM de ATP, 20 mM de MgSO₄, 1 mM de Na₂-EDTA, 50 mM de KCl, 0,2 mM de NADH, 1 mM de PEP, 50 mM de glutamato dissódico, 1 UI de LDH, 3,2 UI de PK, 10 mM de (NH₄)₂SO₄ e 100 UI de extrato cru diluído cinco vezes. As enzimas de acoplamento e o extrato cru foram previamente dessalinizados em uma coluna de 1x5 cm de Shephadex G-25, pré-equilibrada com o tampão de extração. O PEP, o ATP e o NADH foram preparados frescos, imediatamente antes do uso. A mistura de reação foi incubada em banho-maria, por três minutos, a 30°C, e a reação iniciada pela adição de NADH, sendo sua oxidação monitorada em 340 mm.

Os dados da Tabela 205 indicam que a atividade de GS permitiu a separação entre genótipos de milho e sorgo contrastantes em EUN somente quando esses materiais foram cultivados sob alta disponibilidade de nitrato no meio de crescimento. Por outro lado, a atividade da PEP-case permitiu a discriminação entre variedades de sorgo nos dois níveis de nitrogênio, enquanto que no milho a atividade da PEP-case separou os genótipos somente no nível mais alto. - *Antônio Álvaro Corsetti Purcino, Fredolino Giacomini dos Santos, Manoel Xavier dos Santos, Edilson Paiva, Marlúcia Rocha e Silva.*

TABELA 205. Atividade da PEP-case (umoles CO₂ g⁻¹ folha fresca min⁻¹) e da GS (umoles glutamina g⁻¹ folha fresca min⁻¹) em genótipos de milho e sorgo, contrastantes na eficiência de uso de nitrogênio. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1994.

Genótipos	PEP-case		GS	
	1,6 mM NO ₃ ⁻	16 mM NO ₃ ⁻	1,6 mM NO ₃ ⁻	16 mM NO ₃ ⁻
MILHO				
Sintético Elite I	42 Ba ¹	121 Aa	138 Ba	191 Aa
Sintético EliteII	54 Aa	72 Ab	129 Aa	133 Ab
SORGO				
8701016	98 Ba	266 Aa	38 Ba	58 Aa
9109065	67 Bb	164 Ab	31 Aa	39 Ab

¹Comparação de média por Duncan 5%. Letras maiúsculas para comparação dentro da mesma linha, letra minúsculas dentro da mesma coluna.

PRODUÇÃO DE ANTI-SORO CONTRA RUBISCO E PEP-CASE E DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA INDIRETO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS RESPECTIVOS ANTÍGENOS

O metabolismo de carbono em plantas como o milho está intimamente ligado ao do nitrogênio, já que a síntese das enzimas de fixação de carbono depende da disponibilidade de nitrogênio para síntese protéica, sendo que este mecanismo é controlado em nível de RNAm. Sabe-se, também, que estes dois processos, fixação de carbono e assimilação de nitrogênio, têm forte influência na produtividade das plantas.

Várias técnicas imunoquímicas - ELISA, Western blot, rocket immunoelectrophoresis, SRID - têm sido utilizadas para se estudar o efeito dos fatores ambientais e principalmente da adubação nitrogenada na quantidade das enzimas de fixação de carbono. Um dos objetivos desses trabalhos que visam conhecer a influência dos fatores ambientais na quantidade dessas enzimas, é determinar como elas influenciam a eficiência de uso do nitrogênio. Entretanto, o emprego desses procedimentos imunoquímicos requer a disponibilidade de antígenos puros e anti-soros específicos, os quais geralmente não estão disponíveis no mercado.

Por esta razão, o objetivo deste trabalho foi produzir anti-soros policlonais contra as duas enzimas de fixação de carbono em plantas tipo C4 - ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP-case) - e utilizá-los para desenvolver um ELISA indireto para quantificação dessas enzimas em folhas de milho.

A Rubisco parcialmente purificada de espinafre e a PEP-case extraída de milho foram adquiridas da Sigma Chemical Company e dializadas em tampão fosfato-salina (PBS) durante doze horas, antes de serem injetadas em coelhos com aproximadamente 1,5 kg de peso vivo. Antes da injeção dos antígenos, colheram-se 15 ml de sangue de cada coelho, para obtenção de um controle pré-imune. Cinco mg de Rubisco e 1 mg de PEP-case foram preparadas em adjuvante completo de Freund e injetados via intramuscular, em seis pontos, na perna traseira dos coelhos. Quinze dias mais tarde, foi feita uma nova injeção de reforço, preparada com adjuvante incompleto. Vinte e um dias após a primeira injeção, em intervalos de quatro dias, 30 ml de sangue de cada coelho foram colhidos em um becker e deixados a descansar por quatro horas. Após este intervalo, o sangue coagulado foi cuidadosamente separado das paredes do becker e centrifugado a 1.500 g por cinco minutos para obtenção do anti-soro, o qual foi