

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 Alvaro 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

¹ Comparação 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 imunológicas - 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 imunológicos 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

armazenado em presença de azida sódica a 1%, em tubos de Eppendorff de 200 μ l e mantidos à temperatura de -80°C . Para cada sangria, foram realizados testes de imunodifusão e western blot, para determinação da qualidade do anti-soro obtido. O anti-soro que não demonstrou boa capacidade de reconhecer o seu antígeno foi descartado.

A Figura 51a mostra que, a partir da sexta sangria, o anti-soro contra Rubisco mostrou capacidade de reconhecer a enzima extraída de folhas de milho, sorgo, espinafre e a proteína purificada. Esses anti-soros foram utilizados para o desenvolvimento de um ELISA indireto que pudesse ser utilizado na quantificação dessas enzimas, em extratos crus (EC) obtidos de folhas. Extratos crus, obtidos em tampão de carbonato pH 9,6, foram incubados por quatro horas a 37°C (ou por doze horas a 4°C) em placas de ELISA Immulon 2, fabricadas pela Dynatch. Após esse período de incubação, cada cisterna foi lavada três vezes com PBS-Tween 20 e, a seguir, incubada com o anti-soro específico contra cada enzima diluída em PBS-Tween 20, contendo PVPP, novamente lavada e, a seguir, incubada com IgG de cabra contra coelho, previamente conjugada com fosfatase alcalina (goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase, adquirida da Sigma), e diluída em PBS-Tween 20 contendo PVPP e BSA. O desenvolvimento de cor foi feito com p-nitrofenil fosfato e a absorbância lida em 405 nm. As concentrações do EC e anti-soros utilizados durante o desenvolvimento deste protocolo variaram entre 1:100 e 1:10.000. Verificou-se que a combinação ótima de EC e anti-soro geralmente acontecia quando o EC foi diluído 1:1.000 e o anti-soro a 1:1.5000.

Todos os tratamentos experimentais foram conduzidos com duas repetições e as curvas-padrão foram desenvolvidas para permitir interpolação de resultados para análises quantitativas. Este protocolo tem sido utilizado rotineiramente para quantificação dessas enzimas em folhas de milho, sorgo e soja. Comparado com o método de SRID, este protocolo permite a quantificação de um maior número de amostras por placa e consome menor quantidade dos anti-soros. - Antônio Álvaro Corsetti Purcino, Edilson Paiva, Marlúcia Rocha e Silva.

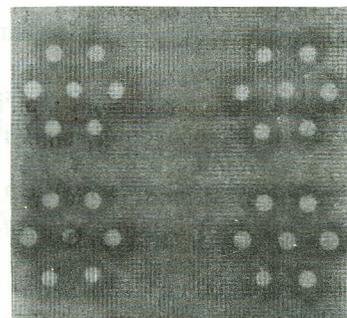


FIGURA 51a. Teste de imunodifusão da sexta sangria, o anti-soro obtido contra Rubisco mostrou reação contra extratos foliares de milho, sorgo, espinafre e a proteína pura. O teste de Western blot mostrou uma única banda.

COMPONENTES DA EFICIÊNCIA DE USO DE NITROGÊNIO NAS CULTIVARES BR 201-F E BR 451, CULTIVADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO

O objetivo deste trabalho foi determinar a eficiência do uso de nitrogênio no híbrido simples BR 201-F e na cultivar de alta qualidade protéica BR 451, de acordo com a metodologia proposta por Moll et al. (1982). O detalhamento desta metodologia foi apresentado no Relatório Técnico Anual do CNPMS 1988-1991.

O experimento foi conduzido em vasos de 20 litros, contendo um Latossolo Vermelho-Escuro, fase cerrado, onde cada cultivar foi submetida às condições: 1) controle; 2) adubação nitrogenada (correspondente a 130 kg/ha de N, dividida em cinco aplicações); 3) inoculação no plantio com uma mistura de três estirpes de *Azospirillum* sp. - Sp 82, Sp 242 e Sp Eng-501; 4) combinações da adubação nitrogenada com a inoculação. Antes do plantio, cada vaso recebeu uma adubação basal com P, K e micronutrientes e o delineamento experimental foi completamente ao acaso, com tratamentos em fatorial 2×4 (duas cultivares, quatro fontes de N), repetidos dez vezes.

Para a análise dos componentes da eficiência, considerou-se que o solo tinha capacidade de fornecer 40 kg/ha de N para as plantas. As equações básicas utilizadas nessa análise foram: Efic. uso de N = (Efic. de absorção) x (Efic. de Utilização), ou seja: $Gw/Ns = (Nt/Ns) \cdot (Gw/Nt)$ onde $Gw/Nt = (Gw/Na)$, (Ng/Nt) e $Ng/Nt = (Na/Nt) \cdot (Ng/Na)$. Na forma