

desses tratamentos resolveu completamente o problema. Vários outros tratamentos estão sendo testados, incluindo-se o uso de outros agentes esterilizantes e de antibióticos. Estão também sendo feitas observações sobre o efeito da esterilização na viabilidade dos micrósoros, usando-se a técnica de fluorescência descrita por Heslop-Harrison & Heslop-Harrison (1970).

Apesar dos problemas de contaminação, foi possível a obtenção de alguns calos no meio de Genovesi & Collins (1982) e a regeneração de uma planta no meio de regeneração descrito por Petolino & Jones (1986). Essa linhagem, identificada como responsiva à cultura de anteras, está sendo utilizada em alguns ensaios, visando a otimização da produção de calos e a regeneração de plantas e na identificação de fatores ou processos envolvidos na capacidade androgenética do milho. - *Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, Paula Cristina Ângelo, Manoel Xavier dos Santos, Ricardo Magnavaca, Elto Eugenio Gomes e Gama, Álvaro Elcutério da Silva.*

### EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE GENÓTIPOS TROPICAIS DE MILHO

O estabelecimento de sistemas para a produção de calos embriogênicos friáveis e regeneração de plantas a partir de células somáticas constituiu um pré-requisito de fundamental importância para os programas de melhoramento de milho que visam a obtenção de plantas transgênicas.

No entanto, apesar de ser grande o número de genótipos de milho capazes de formar calos e regenerar plantas, a maioria dos genótipos produz apenas calos duros e compactos do tipo I. Ainda são raros os genótipos que produzem calos friáveis e altamente embriogênicos do tipo II, mais adequados a culturas de células em suspensão e de protoplastos utilizados na transformação de plantas.

Com o objetivo de aumentar o número de genótipos de milho capazes de formar calos do tipo II e com alta capacidade de regeneração de plantas, iniciou-se um trabalho de identificação e seleção de novos genótipos de origem tropical. Complementarmente, fez-se um estudo para a otimização dos meios de cultura.

O trabalho teve início em julho/90 e, até o momento, já foram testados 115 genótipos, sendo 110 linhagens, três variedades e dois híbridos, usados no programa de melhoramento do CNPMS/EMBRAPA. Usaram-se como explantes embriões imaturos com 12 a 15 dias de idade e meio de manutenção contendo sais N6, sacarose, aminoácidos, vitaminas, mio-inositol e as doses de 8,8  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 15, 30 e 60  $\mu\text{M}$  de dicamba. Testou-se também o uso de nitrato de prata a 5mg/l, objetivando aumentar a formação de calos friáveis. Para a regeneração, colocaram-se os calos em um meio com sais MS, sacarose, mio-inositol, vitaminas e 13,3  $\mu\text{M}$  de benzilaminopurina (BAP) por três dias. Em alguns genótipos, para acelerar o enraizamento, os calos eram transferidos pa-

ra outro meio contendo carvão ativado a 5g/l, durante cinco dias. Durante a manutenção, os calos permaneciam a 26°C, em condição de penumbra. Após a regeneração, as plântulas com 10 a 15 cm de altura eram transferidas para vasos em casa de vegetação, com nebulização intermitente durante os dez primeiros dias.

Foram selecionados cinco genótipos superiores aos demais, capazes de serem mantidos por longo tempo em cultura (os genótipos mais antigos têm 21 meses de cultivo) e com alta capacidade de regeneração de plantas. A maioria dos genótipos formou calos predominantemente compactos, cinco apresentaram calos mucilaginosos e apenas três genótipos apresentaram calos com setores friáveis. Observou-se, no entanto, que a formação de setores friáveis, além de depender do genótipo utilizado, dependia também do tempo em que os calos permaneciam no mesmo meio. O subcultivo por períodos inferiores a 15 dias aumentava a formação de setores do tipo II, o inverso acontecia quando os calos eram mantidos no mesmo meio por períodos superiores a 21 dias. Verificou-se, também, que, embora o 2,4-D tenha promovido bons resultados, o dicamba a 30  $\mu\text{M}$  foi menos específico e proporcionou melhor desenvolvimento para um maior número de genótipos. Não se observou indução de calos do tipo II pela adição de nitrato de prata ao meio. O uso do nitrato de prata, além de reduzir o crescimento de 17 dos 27 genótipos testados, não apresentou efeito aparente em nove genótipos e em apenas um houve aumento na velocidade de crescimento dos calos. - *Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, Manoel Xavier dos Santos, Ricardo Magnavaca, Elto Eugenio Gomes e Gama, Maria José Vilaça de Vasconcelos.*

### ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBONO E NITROGÊNIO EM MILHO

É geralmente aceito que a assimilação de amônia pelas plantas acontece pela rota enzimática glutamina sintetase (GS)/ glutamato sintase (GOGAT) e que a enzima glutamato desidrogenase (GDH) tem importância secundária nesse processo. Por outro lado, em plantas C4, como o milho, a assimilação fotossintética de carbono acontece com a participação das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), piruvato-ortofosfato dikinase (PPDK) e ribulose-1, 5-bifosfato carboxilase (Rubisco). Como essas enzimas aparentemente controlam mecanismos chaves no processo de produção de biomassa, tem sido sugerido que suas atividades e/ou conteúdos possam ser utilizados como critérios bioquímicos para a seleção de plantas mais produtivas ou mais eficientes no uso desses dois nutrientes.

O objetivo principal deste experimento foi, portanto, averiguar a existência de possíveis correlações entre essas enzimas e a produção de biomassa em sete cultivares de milho. Na seleção desses materiais, procurou-se utilizar genó-

tipos que, em ensaios de campo, mostraram respostas diferenciadas para a adubação com nitrogênio. As enzimas do metabolismo do carbono foram quantificadas pela técnica de Single Radial Immunodiffusion -SRID e as do metabolismo de nitrogênio por SDS-PAGE e Western Blot, utilizando-se anticorpos policlonais específicos. As plantas desenvolveram-se em vasos com vermiculita e foram fertilizadas a cada 48 horas com uma solução completa de Arnon & Hoagland, menos nitrogênio. Para este nutriente, as plantas foram divididas em dois grupos, sendo que um recebeu 1,6 mM (insuficiência) e o outro 16 mM de nitrogênio como nitrato (suficiência).

As quantificações enzimáticas foram realizadas quando as plantas estavam com 21 dias após a germinação e os dados obtidos para as enzimas do metabolismo do carbono aparecem na Tabela 49. Observa-se que os níveis enzimáticos aumentaram consideravelmente em função do aumento no

**TABELA 49.** Quantificação das enzimas Rubisco, PEPC e PPK em relação à técnica de Single Radial Immunodiffusion - mg/g de peso fresco. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1992

Cultivar	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		% de aumento
	1,6 mM	16mM	
	Rubisco		
MG-2	7,50	11,67	56
BR 201-M	7,50	10,93	46
BR 201-F	6,72	11,86	77
GCB	5,34	15,25	185
BR 451	6,67	9,36	40
SE-1	8,63	9,22	6
SE-2	3,87	8,82	128
	PEPC		
MG-2	1,02	2,70	165
BR 201-M	0,89	3,16	255
BR 201-F	0,13	2,65	1900
GCB	0,52	3,53	578
BR 451	1,14	2,33	104
SE-1	0,94	1,57	67
SE-2	0,52	1,74	235
	PPDK		
MG-2	0,60	0,88	47
BR 201-M	0,52	0,98	88
BR 201-F	0,38	1,05	176
GCB	0,41	1,62	295
BR 451	0,50	1,03	106
SE-1	0,63	1,25	98
SE-2	0,28	0,83	196

nível de nitrogênio, com exceção da Rubisco para a cultivar SE-1. Estudos de correlações mostraram que esses níveis enzimáticos estavam associados entre si e também com as produtividades de biomassa. Os dados da Tabela 50 mostram a percentagem dessas enzimas em relação à quantidade de proteína solúvel nas folhas. Observa-se que geralmente houve uma diluição nos níveis de Rubisco (exceção para SE-2)

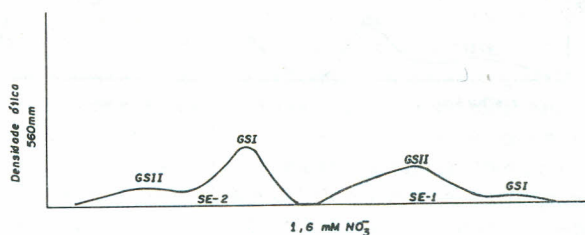
e de PPK (exceção para o 451 e SE-2) quando as plantas cresceram no nível mais alto de nitrogênio, indicando que, quando havia mais nitrogênio para a síntese de novas proteínas, esses materiais investiram menos que proporcionalmente na síntese dessas enzimas. Por outro lado, observa-se que quatro cultivares (201-F, GCB, 451 e SE-2) investiram preferencialmente na síntese de PEPC quando havia suficiência de N no meio de crescimento. Esse fato é interessante, pois essas cultivares, em condições de campo, são consideradas como responsivas à adubação com nitrogênio.

**TABELA 50.** Percentagem de Rubisco, PEPC e PPK em relação à proteína Lowry. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1991.

Cultivar	Rubisco mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		PEPC mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		PPDK mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	1,6	16,0	1,6	16,0	1,6	16,0
MG-2	32,3	15,4	4,4	3,6	2,6	1,2
BR 201-M	40,3	15,0	4,7	3,6	2,6	1,2
BR 201-F	52,3	11,2	1,0	2,6	3,0	0,9
GCB	36,6	22,9	3,6	5,3	2,8	2,4
BR 451	29,9	25,5	5,1	6,3	2,2	2,8
SE-1	31,2	18,0	3,4	3,0	2,3	2,4
SE-2	14,5	17,3	1,9	3,9	1,0	1,9

Dados encontrados na literatura mostram que a quantidade de nitrogênio disponível para síntese protéica regula o conteúdo de PEPC em folhas fotossinteticamente ativas e que esse controle acontece em nível de mRNA.

A Figura 31 mostra que, no nível de 1,6 mM de nitrato, a linhagem SE-2 tinha um pico para GSI maior que GSII, sendo que uma situação inversa foi observada para a linha-

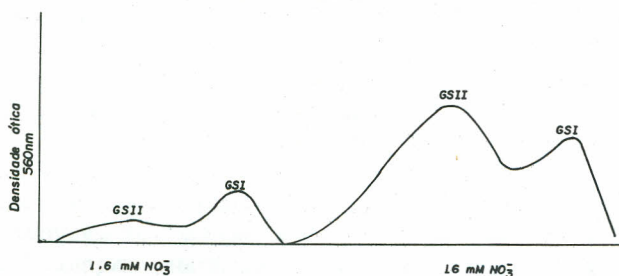


**FIGURA 31.** Densitometria das bandas de GSI e GSII, obtidas por SDS-PAGE/Western Blot, das cultivares SE-2 e SE-1, cultivadas em presença de 1,6 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1991.

gem SE-1. Por outro lado, a Figura 32 mostra que, quando a linhagem SE-2 desenvolveu-se em presença de 16 mM de nitrato, o pico para GSII foi maior que para GSI.

Essas observações são interessantes, pois a literatura tem reportado que esse aumento nos níveis de GSI geralmente acontece quando a planta entra em processo de senescência e esses dados estariam, então, indicando que a linhagem SE-2, em comparação com a SE-1, seria menos capaz de crescer adequadamente em presença de baixos níveis de nitrato. Note-se, entretanto, quando a linhagem SE-2 desenvolveu-se no maior nível de nitrato, que o pico de GSII ficou maior que o de GSI, indicando, nesse caso, que essas plantas não estavam entrando em processo de senescência por estresse de nitrato.

Coletivamente, esses dados sugerem que as cultivares que aparentemente são mais responsivas à adubação com nitrogênio, no nível de suficiência desse nutriente, investem de maneira preferencial na síntese de PEPC e mostram maiores quantidades de GSII que GSI, enquanto que, no nível mais baixo desse nutriente, apresentam altas proporções de Rubisco. A cultivar SE-2 que, no campo, mostra sintomas visuais de deficiência de nitrogênio, quando cultivada em presença de 16 Kg/ha de N, mostrou teores de GSI maiores que GSII, no nível de insuficiência de N, o que, provavelmente, indica que essas plantas já estavam em processo de senescência. - Antonio Álvaro Corcete Purcino, Hideo Sasakawa, Tatsuo Sugiyama.



**FIGURA 32.** Densitometria das bandas de GSI e GSII, obtidas por SDS-PAGE/Western Blot, da cultivar SE-2, cultivada em dois níveis de  $\text{NO}_3^-$ . CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1991.

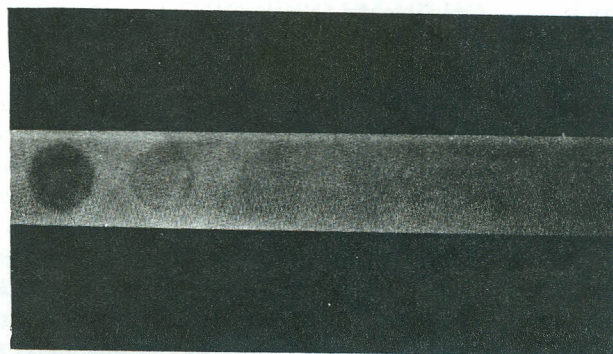
### MARCAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA COM DIGOXIGENIN

Visando a utilização de sondas não radiativas de DNA na técnica de Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), testou-se uma metodologia de marcação de frag-

mentos de DNA com digoxigenin, um esteróide que pode ser unido quimicamente à uridina nucleosídeo trifosfato. Para a marcação, utilizou-se o plasmídeo pUC 8, que possui 2.655 pares de base (pb), contendo um fragmento de DNA de 900 pb, correspondente à região codificadora do gene da gama-zeína, uma proteína de reserva encontrada no endosperma de grãos de milho. Esse fragmento foi extraído do plasmídeo pUC 8 pela ação das enzimas de restrição Eco RI e Sal I, sendo que a marcação foi efetuada com digoxigenin 11-dUTP, pelo processo de nick-translation. O funcionamento do sistema de marcação com digoxigenin consiste na utilização de anticorpos produzidos contra digoxigenin, conjugados com a enzima fosfatase alcalina, a qual reage com a substância quimioluminescente AMPPD (AMPPD: 3-(2'-espiroadamantano) - 4-methoxi-4-(3"-fosforiloxi) fenil- 1,2-dioxetano dissódico), causando emissão de luz que é capaz de impressionar filmes de raio-x. A sonda marcada foi testada hibridando-a contra diferentes concentrações (80 a 2,5 nanogramas) do fragmento de gama-zeína imobilizado em membrana de nylon. O resultado apresentado na Figura 33 mostra que o processo é bastante sensível, uma vez que a sonda detectou até 2,5 nanogramas do fragmento-alvo, possibilitando com isto a substituição do uso de sondas marcadas com nucleotídeos radiativos em técnicas de biologia molecular. - Cláudio Brondani, Edilson Paiva.

### CONCENTRAÇÕES DO FRAGMENTO (nanogramas)

80      40      20      10      5      2,5



**FIGURA 33.** Dot-blot indicando a reação de uma sonda de DNA (correspondente ao fragmento com o gene da gama-zeína) marcada com digoxigenin 11-dUTP contra diferentes concentrações do fragmento, imobilizado em membrana de nylon. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1992.