

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.

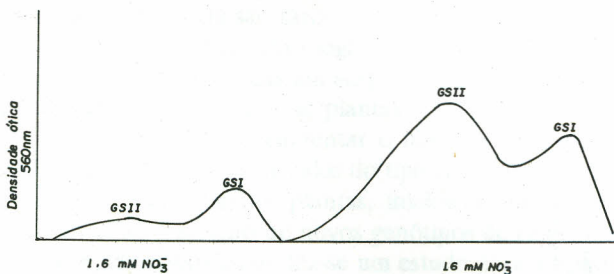


FIGURA 32. Densitometria das bandas de GSI e GSII, obtidas por SDS-PAGE/Western Blot, da cultivar SE-2, cultivada em dois níveis de NO_3^- . CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1991.

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

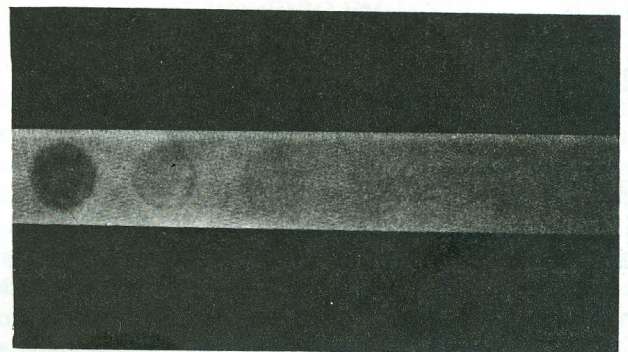


FIGURA 33. Dot-blot indicando a reação de uma sonda de DNA (correspondente ao fragmento do gene da gama-zeína) marcada com digoxigenin 11-dUTP contra diferentes concentrações do fragmento, imobilizado em membrana de nylon. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1992.