

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) NO MONITORAMENTO DA BACTÉRIA *Azospirillum brasilense* sp 245 EM TRIGO

A ocorrência da fixação biológica do nitrogênio atmosférico em quantidade significativa e economicamente vantajosa é de amplo conhecimento em leguminosas. No entanto, em gramíneas, a associação entre as bactérias diazotróficas (responsáveis pela fixação biológica) e as plantas não produz os mesmos efeitos. Provavelmente a principal causa seja a falta de uma estrutura na raiz capaz de abrigar o microorganismo. Objetivando testar a viabilidade da utilização da técnica de ELISA no diagnóstico e quantificação de bactérias no solo ou nas raízes, estudou-se o comportamento da bactéria *Azospirillum brasilense* sp 245 durante o ciclo vegetativo do trigo BR-10. Essa técnica tem como princípio uma reação imunológica entre bactéria e anticorpo, o qual é produzido a partir de antígenos presentes na própria bactéria. O experimento foi conduzido em vasos, em casa de vegetação, utilizando como substrato um solo típico de cerrado (Latossolo Vermelho-Escuro; pH= 4,9; m.o.= 3,87%; muito argiloso). Os tratamentos foram: adubação nitrogenada (0 e 20 kg N/ha) e inoculação com a bactéria *A. brasilense* sp 245 (0 e 1,10 células/ml, 50 ml/vaso), com 3 repetições. O anticorpo foi produzido no Laboratório de Biologia Molecular do CNPMS, através da imunização de coelhos. Foram realizadas 7 amostragens de raízes, em intervalos aproximados de 7 dias, sendo a primeira aos 14 dias após a semeadura e a última aos 73 dias (estádio de maturação fisiológica). As raízes foram maceradas, diluídas em tampão apropriado, filtradas e a solução resultante foi submetida ao teste de ELISA. A quantificação da bactéria através da aplicação do teste de ELISA em raízes de trigo, nos diferentes tratamentos, é apresentada na Figura 34. Como pode ser observado, o teste mostrou que, aos 28 dias após a semeadura, hou-

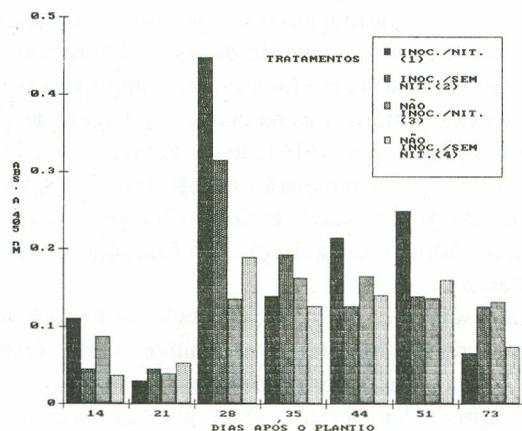


FIGURA 34. Quantificação da bactéria *Azospirillum brasilense* sp 245 em raízes de plantas de trigo através do teste de ELISA, cultivadas em solo de cerrado submetido a tratamentos de inoculação e adubação nitrogenada. Valores em absorvância a 405 nanômetros. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1992.

ve uma proliferação significativamente maior nos dois tratamentos inoculados. Após os 28 dias, houve uma diminuição do número de bactérias nesses tratamentos e um aumento nos demais, aos 35, 44 e 51 dias após o plantio, mesmo naqueles em que não houve inoculação com a bactéria. Esse aumento pode ser devido à reação não específica do anticorpo com outras estirpes de *A. brasilense* presentes no solo ou devido à contaminação com a estirpe sp 245 nesses tratamentos. A adubação nitrogenada, conforme indica a Figura 34, parece não ter exercido efeito na proliferação da bactéria. O teste de ELISA demonstrou ser eficaz no monitoramento da bactéria no solo, sendo que maiores estudos devem ser conduzidos, a fim de melhorar a precisão da reação bactéria-anticorpo. Quanto à presença da bactéria nas raízes de trigo durante o ciclo vegetativo, esta se mostrou bastante variável, indicando também a necessidade de conhecer melhor o processo de colonização e atividades dessas bactérias na rizosfera. - Cláudio Brondani, Edilson Paiva.

ANÁLISE DE RFLP EM CULTURA DE CALOS DE MILHO (*Zea mays* L.) E SUAS PLANTAS REGENERADAS.

RFLP é uma técnica de biologia molecular que já vem sendo usada na medicina como marcador molecular, tendo também um grande potencial na área de melhoramento vegetal e na produção de conhecimentos básicos sobre a transmissão do material genético. Na área vegetal, o uso de RFLP oferece uma alternativa para problemas específicos que antes não eram solucionados pelas técnicas genéticas convencionais.

A metodologia de RFLP baseia-se no fato de que diferenças genotípicas entre dois indivíduos podem ser visualizadas através de comparação do tamanho de fragmento de DNA, obtidos por digestão com enzimas de restrição. Os fragmentos produzidos são separados por eletroforese em géis de agarose, de acordo com os seus tamanhos. Em genomas complexos, cujo número de fragmentos é muito grande, forma-se então um rastro contínuo na gel, impossibilitando distinguir fragmentos individuais. Por isso, os fragmentos de DNA são transferidos para uma matriz sólida, como membranas de nylon ou nitrocelulose. Nessa matriz, os fragmentos são visualizados através de técnicas de hibridação, onde se utilizam como sonda seqüências de DNA, marcadas com elementos radioativos, como P32, ou a frio, por sistemas imunológicos (digoxigenina). As diferenças obtidas nos padrões de hibridação são resultado da diferença nas seqüências de DNA entre os indivíduos.

Uma aplicação de RFLP é a detecção de variações somaclonais, que podem ser definidas como desvios genotípicos que ocorrem em plantas que tenham, em algum estágio, passado por um período em cultura de tecidos. A variação

somaclonal pode ser utilizada como fonte de mutantes que possam ser de interesse na agricultura e em estudos genéticos. Essa fonte de variabilidade é alvo de grandes especulações; alguns acham que ela é reflexo dos processos próprios da cultura de tecido, enquanto outros acham que é o resultado da variação presente no explante, ou seja, variações genéticas existentes nas diferentes células que compõem o explante e que darão origem, posteriormente, aos calos e às plantas que regenerarão destes.

Em um estudo realizado por Brown e colaboradores, em 1991, com a linhagem de milho A188, usou-se RFLP para sondar o grau de polimorfismo existente entre calos, plantas regeneradas e plantas desenvolvidas através de sementes. Nesse trabalho, demonstraram que os calos apresentavam alto grau de polimorfismo e as plantas regeneradas, um grau moderado, quando comparadas com as plantas-controle, que eram originadas de sementes. Determinaram, ainda, que os desvios moleculares achados eram independentes das seqüências gênicas testadas (gene da sacarose sintase, ADP/ATP translocase, actina) e dos meios usados, sugerindo que as diferenças nos meios de cultura não são responsáveis pelo grau de variações encontradas.

Idealizou-se um estudo, no CNPMS, usando-se DNA genômico isolado de calos, plantas regeneradas e, como controle, DNA de plantas desenvolvidas a partir de semente do milho BR 451. O DNA foi digerido com as enzimas Eco RI e Hind III e corrido em gel de agarose 1,5% a 16 mA-25V por aproximadamente 15 horas. As amostras de DNA foram sondadas com o fragmento do gene de gama-zeína, uma proteína de reserva de grão de milho, marcado com digoxigenina.

A análise do Southern Blot (Figura 1) demonstra que,

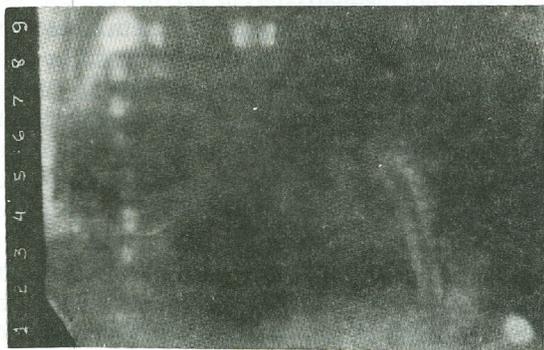


FIGURA 35. Análise de RFLP de calos novos (1 e 5), calos velhos (2 e 6), plantas regeneradas (3 e 7) e plantas-controle (4 e 8) da cultivar do milho BR 451. O DNA genômico foi digerido com Eco RI (1-4) e Hind III (5 - 8) e sondado com o fragmento de gama-zeína marcado com digoxigenina. No "slot" 9 é DNA de lambda digerido com Hind III e marcado com digoxigenina. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1992.

quando se digeriu com Eco RI, não se observou nenhuma diferença no padrão de hibridação; porém, quando se digeriu com Hind III, detectaram-se diferenças nos padrões de hibridação entre calos e plantas e que essa diferença era independente da "idade" do calo, já que as bandas vistas nos calos novo e velho têm um padrão semelhante.

Este resultado sugere que as diferenças entre os calos e as plantas podem ter-se originado durante os processos de regeneração e não durante o período de manutenção dos calos. Parece existir, portanto, uma pressão de seleção negativa, durante a regeneração sob as células dos calos, que têm um genótipo diferente do parental (planta-controle), e positiva sob as células que são semelhantes à planta-controle. Estes resultados sugerem que os calos são um mosaico de células. - *Marta Fonseca Martins, Maria José Vilaça de Vasconcelos, Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, Edilson Paiva.*

ENTOMOLOGIA

BIOLOGIA E MANEJO DE PRAGAS

LEVANTAMENTO DE PRAGAS SUBTERRÂNEAS DA CULTURA DO MILHO NO ESTADO DO PARANÁ

As pragas subterrâneas estão entre as causas que contribuem para a redução na população de plantas de milho no Brasil, resultando em baixas produtividades. Os insetos de hábitos subterrâneos são pouco estudados e o controle é de difícil execução, pois geralmente há ocorrência de vários grupos de insetos, constituindo o denominado "complexo de pragas de solo", cujos sintomas de danos se assemelham.

O objetivo do trabalho foi levantar a importância relativa das espécies subterrâneas na cultura do milho, nas principais regiões produtoras do Estado do Paraná e quantificar as perdas causadas na população de plantas. Este trabalho foi realizado conjuntamente pelo Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo e Organização das Cooperativas do Estado do Paraná.

Para desenvolver o projeto, o Estado do Paraná foi dividido em 3 regiões produtoras de milho: Norte, Oeste e Centro-Sul, todas elas abrangendo vários municípios. Na região Oeste, foram amostradas 12 propriedades rurais e 10 em cada uma das outras regiões.

Em todas as regiões estudadas, observou-se a predominância de coleópteros, como o bicho bolo (coró), larva arame e larvas de coleópteros em geral, destacando-se pela importância as de *Diabrotica* spp. O artrópode Chilopoda, que