



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental
Trav. Dr. Enéas Pinheiro s/n, Caixa Postal 48,
Telex (091) 1210, Fax: (091) 226.9845 - CEP 66.095-100
e-mail: cpatu@cpatu.embrapa.br

PESQUISA EM ANDAMENTO

Nº 193, outubro, p.1-3 -1998

DEFINIÇÃO DE PROTOCOLOS DE ELETROFORESE PARA ANÁLISE DE ISOENZIMAS EM PIMENTA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.)

Maria Rosa Costa de Oliveira¹
Marli Costa Poltronieri¹
Carlos da Silva Martins¹
José Maria Demetrio Gaia²

A eletroforese consiste na migração de moléculas ionizadas em um meio tido como suporte e empregando-se tampões adequados. Diferentes proteínas de um organismo podem ser separadas conforme a porosidade do meio-suporte, sob influência de um campo elétrico, submetendo-se, em seguida, a métodos histoquímicos, que evidenciam as zonas de atividade enzimática diretamente no meio.

As isoenzimas são definidas como um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas (Moss, 1982).

Antes da introdução da técnica de eletroforese, o estudo da variação genética era um tanto insatisfatório porque dependia da identificação de mutantes recessivos raros, que produziam mudanças morfológicas reconhecíveis, quando em homozigose. Apesar do controle genético de muitos destes caracteres serem simples e facilmente demonstrável, marcadores morfológicos sofrem influências ambientais, tornando-se impossível comparar diretamente fenótipos com genótipos (Gottlieb, 1977).

O uso de isoenzimas como marcadores genéticos apresenta diversas vantagens em relação aos marcadores morfológicos convencionais. Isso porque alelos de muitos locos isoenzimáticos são codominantes, o que permite identificar genótipos heterozigotos e homozigotos numa população, sendo esta uma vantagem partilhada por poucos marcadores morfológicos (Moore & Collins, 1983). As isoenzimas, como marcadores, são pouco influenciadas por variações ambientais e permitem a análise de vários locos simultaneamente (Alfenas et al., 1991).

Uma vantagem de se usar isoenzimas como marcadores bioquímicos está no fato de que, sendo constituídas por polipeptídeos, são produtos gênicos diretos, ou seja, não são produtos de uma série de reações biossintéticas, tais como aquelas que levam à produção de pigmentos, óleos e várias outras classes de compostos (Torres et al., 1978).

¹Eng.- Agr., M.Sc., Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal, 48, CEP 66017-970, Belém, PA.
²da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará - FCAP. Caixa Postal, 917.

ATENÇÃO: Resultados provisórios, sujeitos a confirmação



Assim sendo, com o objetivo de se otimizar a metodologia de eletroforese de isoenzimas em gel de amido e poliacrilamida e identificar sistemas isoenzimáticos que permitam visualizar locos e alelos polienzimáticos que possam ser utilizados como marcadores bioquímicos vêm se desenvolvendo este trabalho.

Duas metodologias estão sendo utilizadas, uma que utiliza gel de amido como meio-suporte e outra, gel de poliacrilamida.

A metodologia para a extração de isoenzimas em pimenta-do-reino já foi definida tanto para gel de amido como para poliacrilamida e baseia-se na utilização de folhas jovens com no máximo dois centímetros de comprimento. As folhas são coletadas e colocadas em pequenos sacos de plástico, que são acondicionados em caixas de isopor com gelo. Para a extração das enzimas, no caso do gel de amido, são utilizados 50 mg de folhas, as quais são submetidas à maceração utilizando 0,8 ml de tampão de extração; 70 mg de PVPP (polivinilpolipirrolidona) e 120 μ l de 2-mercaptoetanol. Após a extração, o sobrenadante é impregnado em tiras de papel cromatográfico de 3,5 mm de largura, as quais são inseridas no gel de amido e submetidas à pré-corrida (15 minutos) e à eletroforese (12 horas).

Os sistemas: enzimáticos ADH (Álcool Desidrogenase); GOT (Glutamato Oxaloacetato Transaminase); ME (Enzima Málica); MNR (Menadiona Redutase); GDH (Glutamato Desidrogenase); FDH (Formiato Desidrogenase); PGI (Fosfoglucoose Isomerase); IDH (Isocitrato Desidrogenase); MDH (Malato Desidrogenase); G3PDH (Gliceraldeido 3-Fosfato Desidrogenase); SKDH (Chikimato Desidrogenase); PGM (Fosfoglucomutase); ALD (Aldolase) e 6PGDH (6-Fosfogluconato Desidrogenase) estão sendo testados no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Seção Genética de Plantas), da Embrapa Amazônia Oriental.

A extração das enzimas, no método de gel de poliacrilamida, é feita, a partir de 50 mg de folhas, que são submetidas à maceração com 1 ml de tampão de extração, 70 mg de PVPP e nitrogênio líquido. As amostras são aplicadas no gel e estes na cuba (de duas placas) e submetidas à eletroforese.

Os seguintes sistemas estão sendo testados: AAP (Alanina Aminopeptidase); ACO (Aconitase); ACP (Fosfatase Ácida); ADH (Álcool Desidrogenase); AMY (Amilase); DIA (Diaforase); EST (Esterase não específica); FUM (Fumarase); GDH (Glutamato Desidrogenase); G2DH (Glicerato Desidrogenase); GK (Glucoquinase); GOT (Glutamato Oxaloacetato Transaminase); GR (Glutaciona Redutase); LAP (Leucina Aminopeptidase); MDH (Malato Desidrogenase); ME (Enzima Málica); MNR (Menadiona Redutase); PGI (Fosfoglucoose Isomerase); PGM (Fosfoglucomutase); POD (Peroxidase); SKDH (Chikimato Desidrogenase); SoDH (Sorbitol Desidrogenase); TZO (Tetrazólio Oxidase).

Resultados preliminares indicam que alguns sistemas apresentaram boa resolução de bandas para gel de amido e poliacrilamida: SKDH; 6PGDH; G6PDH; PGI; DIA; MNR; GOT; ACO; FUM; ACP e ME.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C; PETERS, I; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa, U.F.V, Imprensa Universitária, 1991. 242p.
- GOTTLIEB, L.D. *Electrophoretic evidence and plant systematic*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, V.64, p.161-180, 1997.
- MOORE, G.A.; COLLINS, G.B. *New challenges confronting plant breeders*. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. eds. *Isozymes in plant genetics and breeding, Part. A*. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.25-58.
- MOSS, D.W. *Isoenzymes*. London: Chapman & Hall, 1982.
- TORRES, A.M.; DIEDENHOFEN, V.; BERGH, B.O; KNIGHT, R.J. *Enzyme polymorphisms as genetic markers in the avocado*. *Amer. Y. Bot.*, 65 (2): 134-9, 1978.