

## Caracterização de acessos de pimenta-do-reino com base em sistemas enzimáticos

José MD Gaia<sup>1</sup>; Milton GC Mota<sup>1</sup>; Maria Tereza VC Derbyshire<sup>2</sup>; Viseldo R Oliveira<sup>2</sup>; Maria R Costa<sup>3</sup>; Carlos da S Martins<sup>3</sup>; Marli C Poltronieri<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural da Amazônia, C. Postal 917, 66077-530 Belém-PA; <sup>2</sup>Centro de Energia Nuclear na Agricultura, C. Postal 96, 13400-970 Piracicaba-SP; <sup>3</sup>Embrapa Amazônia Oriental, C. Postal 48, 66095-100 Belém-PA; josegaia@globocom

### RESUMO

Setenta e oito acessos de pimenta-do-reino, incluindo algumas espécies silvestres foram submetidos à análise eletroforética de isoenzimas em gel de poliacrilamida, visando distinguir diferenças fenotípicas que auxiliem na discriminação e seleção dos acessos. Foram utilizados os sistemas enzimáticos SKDH, GOT, ACP, ACO, PGI, FUM, 6PGDH e G6PDH. O polimorfismo de isoenzimas foi avaliado pelo número de alozimas com diferentes mobilidades por sistema enzimático, pelas frequências de alozimas dentro de cada sistema enzimático em relação ao total de bandas do sistema e pela análise da similaridade genética, com base na ausência e presença de bandas. Todos os sistemas enzimáticos utilizados tiveram boa resolução e definição de bandas, com ênfase para SKDH, 6PGDH, PGI e ACP. Em sua totalidade, os sistemas apresentaram polimorfismo capaz de caracterizar e identificar acessos ou grupos de pequeno número de acessos, sendo que o sistema GOT foi o que apresentou maior variabilidade de alozimas e de perfis; e o que apresentou menor variabilidade foi o sistema FUM, com três alozimas e quatro perfis. Cinquenta e sete por cento das alozimas podem ser usadas para caracterizar e identificar clones ou grupos de clones. Cerca de 64% dos acessos analisados podem ser identificados por um a seis fenótipos individuais de sistemas enzimáticos. A análise da similaridade indicou os grupos G1, G2 e G3 como os mais divergentes da coleção, os quais são indicados para cruzamentos intraespecíficos e interespecíficos visando a obtenção de clones superiores.

**Palavras-chave:** *Piper nigrum* L., eletroforese, isoenzimas, polimorfismo, germoplasma.

### ABSTRACT

#### Characterization of black pepper accessions using isozymes

Seventy and eight accessions of black pepper, including some wild species, were analyzed through isozyme electrophoresis in polyacrylamide gel, aiming to distinguish phenotypic differences to discriminate and select accessions. The enzymatic systems SKDH, GOT, ACO, ACP, PGI, FUM, 6PGDH and G6PDH were studied. The polymorphism of isozymes was evaluated based on number of alozymes with different mobility for each enzymatic system, the frequencies of alozymes within each enzymatic system in relation to the total of bands of the system and, the analysis of the genetic similarity, based on the absence or presence of bands. All the enzymatic systems presented good resolution and definition of bands, with emphasis on SKDH, 6PGDH, PGI and the ACP. All the systems presented sufficient polymorphism to characterize and to identify accessions or groups with little number of accessions, where the GOT system presented better variability of alozymes. On the other hand, FUM system revealed only three alozymes and four profiles. Fifty seven percent of alozymes are efficient to characterize and to identify clones or groups of clones. About sixty four percent of the analyzed accessions can be identified per one to six individual phenotypes of enzymatic systems. The analysis of similarity indicated the G1, G2 and G3 groups as the most divergent, being appropriate for intra or interspecific crossings aiming to obtain superior clones.

**Keywords:** *Piper nigrum* L., electrophoresis, isozymes, polymorphism, germplasm.

(Recebido para publicação em 10 de janeiro de 2006; aceito em 12 de julho de 2007)

A pimenta-do-reino é uma espécie perene da família das piperáceas, introduzida no estado do Pará por imigrantes japoneses. Originária da Índia, sua importância maior está no fato de possuir elevados teores de alcalóides em seus frutos, que lhe conferem a pungência característica, sendo por isso, quando secos, utilizados como condimento alimentar.

Um dos principais problemas da cultura da pimenta-do-reino é a homogeneidade dos clones cultivados associada à suscetibilidade a doenças e a dificuldade de se encontrar variedades resistentes devido à reduzida base genética da espécie (Pillay, 1995).

Os clones cultivados são afetados por diversas doenças causadas por fungos, nematóides e vírus. As maiores perdas são causadas pela podridão das raízes e murchamento dos ramos, causado pelo fungo *Nectria haematococca* Berck & Br. f. sp. *piperis* Albuquerque (1999). Este fungo tem causado sérios prejuízos à pipericultura no estado do Pará, pois todos os clones cultivados são suscetíveis. O controle é possível com a utilização de porta-enxertos de outras piperáceas resistentes à fusariose, tais como *P. aduncum* L., *P. hispidinervium* C. DC., *P. colubrinum* Link. (Duarte &

Albuquerque, 1999; Duarte *et al.*, 1999). Some-se a isto o fato de que, um novo agente etiológico foi observado em alguns municípios do estado do Pará, causando murchamento dos ramos, identificado como *Fusarium oxysporum* Schlecht. (Duarte *et al.*, 1999).

Uma opção viável para evitar maior erosão genética na espécie é a quantificação da variabilidade genética do germoplasma visando identificar genótipos que permitam obter recombinantes por meio de intercruzamentos. Para tanto, a análise do polimorfismo de isoenzimas é uma ferramenta que possibilita verificar a

**Tabela 1.** Relação nominal e procedências dos acessos de pimenta-do-reino da coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental (Nominal register and origins of the black pepper accessions of the Embrapa Amazônia Oriental's germplasm collection). Belém, CPATU/UFRA, 2004.

Código <sup>1</sup>	Acesso	Origem	Código	Acesso	Origem	Código	Acesso	Origem
C01	0697	Mutante	C27	Piper Colubrinum Link2	Brasil	C53	X18	Cruzamento
C02	Cingapura	Malásia	C28	Kottanadan-2	Índia	C54	X32	Cruzamento
C03	Diemberg (Acesso 1)	Índia	C29	Karimunda-3	Índia	C55	45	Mutante
C04	Djambi (Acesso 1)	Indonésia	C30	Piper Attenuatum-F2	Índia	C56	132	Mutante
C05	Balankotta (Acesso 1)	Índia	C31	Diemberg (Ac. 3, ind-2)	Índia	C57	Cz-5X10	Derivado*
C06	Q.D.S. PL.-F6	Derivado*	C32	Iaçará-2	Índia	C58	P3	Derivado*
C07	Perunkoide-S	Índia	C33	Q.B. 5x10-S	Derivado*	C59	Mangueira	Derivado*
C08	Piper Attenuatum-M1	Índia	C34	Papari	Índia	C60	Kovt (kottavally)	Índia
C09	Piper Attenuatum-M2	Índia	C35	Diemberg (Acesso 2)	Índia	C61	239	Derivado*
C10	Piper Attenuatum-M3	Índia	C36	Cz-4X11 (Acesso 1)	Derivado*	C62	U.T. (Uthirankotta)	Índia
C11	Guajarina (karimunda)	Índia	C37	Chumala-S	Índia	C63	1558	Derivado*
C12	Karimunda	Índia	C38	Bragantina (Acesso 1)	Índia	C64	Trang	Tailândia
C13	Chumala	Índia	C39	Iaçará-1	Índia	C65	Diemberg (Acesso 3)	Índia
C14	Belantung	Indonésia	C40	Kuching	Malásia	C66	Uthirankotta (progênie)	Índia
C15	Djambi (Acesso 2)	Indonésia	C41	Piper Attenuatum-X2	Índia	C67	Uthirankotta (mãe)	Índia
C16	Balankotta (Acesso 2)	Índia	C42	Kudaravalli	Índia	C68	Guajarina (acesso 2)	Índia
C17	Espírito Santo	Índia	C43	Pimenta-da-terra2	Índia	C69	Karimunda-S	Índia
C18	Bragantina 6.3.92	Índia	C44	Diemberg (Ac. 2, ind-2)	Índia	C70	Uthirankotta-S (Apra)	Índia
C19	Cingapura 6.3.92	Malásia	C45	F1-PL8	Derivado*	C71	Iaçará-S	Índia
C20	Iaçará-1 (ind-2)	Índia	C46	Bragantina (Acesso 2)	Índia	C72	S-2	Índia
C21	F6-PL1	Derivado*	C47	Cz-4x11 (Acesso 2)	Derivado*	C73	Balankotta Jones	Índia
C22	S-1	Índia	C48	Kaluvalli (Acesso 2)	Índia	C74	Guajarina-INATAM	Índia
C23	G-1	Índia	C49	X1	Cruzamento	C75	Pan-1-CEN (Pannyiur-1)	Índia
C24	Piper betle2	Índia	C50	X26	Cruzamento	C76	BAG 16x13	Derivado*
C25	Karimunda-2	Índia	C51	X3	Cruzamento	C77	Kaluvalli (Ac 2, ind-2)	Índia
C26	Kottanadan-1	Índia	C52	B	Derivado*	C78	Kudaravalli (ind-2)	Índia

<sup>1</sup>Notação adotada para as análises no Fitopac; <sup>2</sup> Espécies silvestres; \* Derivados de programas do CPATU (Notation used in the analysis into Fitopac software; <sup>2</sup> Wild species; \*Originated of the breeding programs of Embrapa Amazonia Oriental).

variação genética em nível de proteínas, com a vantagem de possuir herança codominante, permitindo, assim, a identificação de heterozigotos, além de ser uma técnica molecular de baixo custo. Os caracteres morfoagronômicos, ao contrário, possuem a expressão condicionada por alelos recessivos, os quais podem ser deletérios em homozigose, além do que a quantidade de marcadores pode ser reduzida consideravelmente em função da existência de efeitos epistáticos, pleiotrópicos ou ambos (Barros, 1991).

Martins *et al.* (1996) detectaram, inicialmente, pelo método de eletroforese em gel de amido diferenças genéticas (polimorfismo) entre acessos de pimenta-do-reino do banco de

germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental por meio de análise de isoenzimas dos sistemas MDH, SKDH, 6PGDH, IDH, PGI e ME. Gaia (1999), posteriormente, pelo método de eletroforese em gel de poliácridamida, observou polimorfismo em SKDH, GOT, ACP, ACO, PGI, 6PGDH, G6PDH e FUM, sendo que o método em gel de poliácridamida mostrou-se mais eficiente na análise de isoenzimas em pimenta-do-reino.

Gaia *et al.* (2005), em estudos sobre a genética de pimenta-do-reino envolvendo parâmetros de diversidade e similaridade baseados em locos de isoenzimas, encontraram variabilidade correlata com a estreita base genética da espécie.

O atual programa de melhoramento da Embrapa Amazônia Oriental prevê, para 15 anos, obter novas cultivares de pimenta-do-reino com métodos de hibridação intraespecífica e interespecífica para resistência ou tolerância à fusariose associada a caracteres que contribuam para aumentar a produtividade e para maior facilidade no manejo em campo (Poltronieri *et al.*, 1999).

O objetivo deste trabalho foi gerar conhecimentos sobre a variabilidade genética intraespecífica e interespecífica da pimenta-do-reino e caracterizar acessos por meio de polimorfismo de isoenzimas, para melhor identificação e seleção dos acessos para uso em programas de melhoramento que visem a obtenção de cultivares produtivas e re-

sistentes às principais doenças da pimenta-do-reino.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 78 acessos de pimenta-do-reino, incluindo algumas espécies silvestres, da coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental (CPATU), em Belém, sob condições de sombreamento. Cerca de 63% dos acessos são originários da Índia, 27% foram obtidos em programas de melhoramento do CPATU e os 10% restantes são originários da Malásia, Indonésia, Tailândia e Brasil (Tabela 1).

Utilizou-se eletroforese em gel de poli(acrilamida com 30% (p/v) de acrilamida e 0,8% (p/v) de bis-acrilamida no gel separador; e 7,5% (p/v) de acrilamida e 1,25% (p/v) de bis-acrilamida no gel concentrador. Os procedimentos utilizados para coleta de tecido vegetal, extração de proteínas, eletroforese e revelação das enzimas foram os adotados por Tsumura *et al.* (1990), com as seguintes adaptações para pimenta-do-reino: (1) utilizou-se 50 mg de tecido foliar jovem para a maceração sob nitrogênio líquido e cerca de 75 mg de polivinilpirrolidona (PVPP) foram adicionados a 1 mL do tampão de extração; (2) a eletroforese foi realizada sob condições de 16 mA durante cerca de cinco horas; (3) as soluções corantes fosfoglucoisomerase (PGI) e fosfatase ácida (ACP) foram modificadas para 50 mL de Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0; 1 mL de D-frutose-6-fosfato (20 mg/mL); 1 mL de NADP (6,6 mg/mL) 2 mL de MTT (5 mg/mL); 1 mL de PMS (5mg/mL), 1 mL de cloreto de magnésio (10,17 g/100 mL) e 10 unidades de G6PDH (PGI); 50 mL de "ACP buffer" (1,6 g de acetato de sódio trihidratado, 4,83 mL de ácido glacial acético e 500 mL de água destilada); 100 mg de a-naftil fosfato, sal dissódico e 12 mg de "Fast garnet GBC salt" (ACP).

Foram avaliados oito sistemas enzimáticos: fosfoglucoisomerase (PGI, 5.3.1.9), fosfatase ácida (ACP, 3.1.3.2), aconitase (ACO, 4.2.1.3), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH, 1.1.1.44), fumarase (FUM, 4.2.1.2), glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH, 1.1.1.49), glutamato

oxaloacetato transminase (GOT, 2.6.1.1) e xiquimato desidrogenase (SKDH, 1.1.1.25). Os padrões das alozimas (bandas) foram expressos em zimogramas, convertidos em um esquema simplificado alfa-numérico. O sentido de migração e denominação das alozimas foram baseados no método de Neale *et al.* (1984), pelo qual as alozimas de maior migração recebem os menores números. O grau de polimorfismo da coleção foi avaliado pelo número de alozimas com diferentes mobilidades relativas por sistema enzimático, pelas frequências das alozimas com a mesma mobilidade relativa em relação ao total de bandas por sistema enzimático, pelo número de fenótipos eletroforéticos por sistema e pelos níveis de similaridade genética estimados pela média de grupo utilizando o coeficiente de semelhança simples ("simple matching") como índice de similaridade. A análise de agrupamento foi realizada pela utilização do programa Fitopac (Shepherd, 2001). A análise da similaridade foi baseada num sistema binário de ausência (0) e presença (1) de bandas, considerando-se somente as bandas bem definidas após a revelação do gel.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo geral, os oito sistemas enzimáticos utilizados mostraram boa resolução e definição dos perfis bioquímicos e elevado polimorfismo. No sistema GOT foram observadas 18 alozimas com diferentes migrações, sendo o sistema que apresentou maior variabilidade de bandas, seguido pelos sistemas ACP e PGI, ambos com 13 alozimas diferentes; e ACO, com 12. O sistema 6PGDH teve 11 alozimas diferentes. Os sistemas que apresentaram menor grau de polimorfismo foram G6PDH, com seis, SKDH, com quatro e FUM, com três. Considerando todos os sistemas, totalizaram 80 alozimas diferentes. Todos os sistemas podem ser, portanto, utilizados para caracterização de pimenta-do-reino (Tabela 2).

Lopes *et al.* (2003) caracterizaram oito acessos de erva-de-bicho, também conhecida como pimenta-d'água (*Polygonum punctatum* Ell.) por meio dos padrões de variação de bandas ob-

servados em oito sistemas enzimáticos, verificando elevado nível de polimorfismo. Apesar disto, a análise de agrupamento revelou alto grau de proximidade genética entre os acessos, sendo que o autor atribuiu o polimorfismo observado à pressão de seleção em favor de determinados produtos gênicos.

Onus & Pickersgill (2000), analisando isoenzimas de acessos de *Capsicum baccatum*, *C. eximium*, *C. cardenasii* e dois híbridos interespecíficos (*C. baccatum* X *C. eximium* e *C. baccatum* X *C. cardenasii*), observaram que *C. baccatum* pode ser identificado por padrões de isoenzimas dos sistemas ACO, GOT, PGI e SKDH, embora não tenha sido possível distinguir *C. eximium* de *C. cardenasii*, podendo ser discriminados por meio de descritores morfológicos.

No sistema SKDH foi observada uma zona de atividade enzimática com estrutura monomérica correspondendo, provavelmente, a um loco controlado por quatro alelos. No sistema ACP foi detectada uma zona de atividade enzimática, que se referem, possivelmente, a um loco controlado por três alelos, localizado entre as alozimas ACP2 e ACP7. No sistema GOT foram visualizadas duas zonas de atividade enzimática correspondendo, provavelmente, a dois locos gênicos. A primeira zona, da alozima GOT2 à GOT7, é provavelmente condicionada por quatro alelos e a segunda zona, da alozima GOT8 à GOT13, possivelmente por três, sendo que ambos os locos codificaram alozimas com estrutura dimérica.

O sistema Fumarase evidenciou uma zona de atividade constituída por três alozimas com estrutura quaternária monomérica, codificada, provavelmente, por três alelos. No sistema ACO foi observada uma zona de atividade enzimática localizada entre as alozimas ACO4 e ACO7, com perspectiva de controle por quatro alelos codificando alozimas com estrutura monomérica. Em 6PGDH, houve a possibilidade de apresentar-se constituído por um loco com dois alelos e estrutura dimérica e dois locos com três alelos e estrutura monomérica.

No sistema G6PDH possivelmente houve a expressão de dois locos gênicos,

**Tabela 2.** Representação esquemática de perfis eletroforéticos dos sistemas enzimáticos GOT, ACO, PGI, 6PGDH, G6PDH, ACP, SKDH e FUM com os respectivos códigos dos acessos de pimenta-do-reino (Schematic presentation of the electrophoretic profiles of the GOT, ACO, PGI, 6PGDH, G6PDH, ACP, SKDH and FUM enzymatic systems with the respective codes of the assessments of black pepper). Belém, CPATU/UFRA, 2004.

Siste- mas	Perfis eletroforéticos (*)/Acessos																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
GOT	B-2	B-5	B-2	B-5	B-2	B-2	B-5	B-2	B-2	B-2	B-15	B-4	B-5	B-5	B-2	AP	B-2	(B-2)	B-2	B-2	B-2	
	B-8	B-11	B-4	B-6	B-11	B-13	B-8	B-3	B-4	B-3		B-15	B-9	B-14	B-4		B-4	(B-4)	B-4	B-4	B-8	
	B-11	(B-17)	B-5	B-7	(B-17)	(B-17)	B-11	B-4	B-5	B-4		B-17	B-11	(B-17)	B-5		B-5	(B-5)	B-5	B-5	(B-17)	
	B-14		B-12	B-11			(B-17)	B-8	B-11	B-8			(B-17)		B-13		B-8	B-13	B-13	B-11		
				(B-17)				B10		B-10					(B-16)		B-11	(B-16)	(B-17)	(B-17)		
								B11		B-11							B-13			(B-18)		
								(B-17)		(B-17)							(B-17)					
										(B-18)												
		C01	C32	C33	C12	C02	C03	C36	C40	C05	C19	C22	C23	C18	C25	C45	C21	C47	C50	C57	C60	C49
		C07	C41			C04	C17	C38	C42	C16				C20						C58		C52
		C11	C59			C13	C34	C39	C78					C46						C61		C62
						C14	C35	C51														
						C15	C43	C53														
						C48	C44															
						C54	C65															
						C55																
						C56																
						C64																
		22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
		(B-5)	B-	B-2	B-2	B-5	B-5	B-2	B-2	B-2	B-2	B-5	B-2	B-2	B-2	B-2	B-2	B-5	B-2	B-2	B-2	B-1
		(B-6)	12	B-4	B-8	B-6	B-8	B-3	B-4	B-4	B-6	B-6	B-13	B-8	B-12	B-15	B-9	B-8	B-4	B-4	B-4	
	(B-7)	B-16	B-5	B-11	B-7	B-11	B-4	B-5	B-5	B-12	B-7	B-17	B-11	B-14	(B-	B-11	B-11	B-5	B-5	B-5		
	B-11	B-17	B-8	B-13	(B-8)	(B-17)	B-8	B-8	B11	(B-17)	B-11				18)		(B-17)	B-8	B-8	B-8		
	(B-17)		(B-17)	(B-17)	B-11		B-10	B-10	(B-17)		(B-17)					B-13		B-11	B-11	(B-17)		
					(B-17)		B-11	B-11												B-17		
							(B-17)									B-18						
	C63	C26	C66	C68	C69	C71	C77	C67	C28	C72	C29	C31	C08	C10	C24	C30	C75	C06	C37	C76	C27	
									C70				C09									
									C73													
									C74													
ACO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
	B-5	B-6	B-5	B-2	(B-2)	(B-1)	(B-1)	B-6	(B-1)	B-9	B-9	B-4	B-2	B-5	B-2	B-1	B-2	(B-2)	(B-2)	B-4	B-9	
			B-6	B-4	(B-4)	(B-2)	B-4	B-9	B-4	B-12	B-10	B-6	B-5	B-7	B-5	B-4	B-5	(B-4)	(B-5)	B-5		
				B-6	B-5	B-4	B-5		B-6		B-12				B-7	B-6	B-6	(B-6)	B-6	B-6		
				B-9	B-6	B-5	B-9		B-9						B-8		B-9	B-9	B-9	B-9		
					B-9	B-9									B-9							
															B-11							
															B-12							
	C03	C01	C06	C22	C23	C19	C42	C43	C17	C45	C26	C68	C48	C30	C55	C60	C74	C77	C08	C25	C64	
	C11	C07	C21			C40								C54	C56			C78	C09			
	C16	C12																				
	C33	C18														C63						
	C34	C20														C73						
	C35	C25																				
	C38	C32																				
	C38	C36																				
	C39																					
	C41																					
	C44																					
	C46																					

AP: Ausência de perfil eletroforético (Absence of electrophoretic profile); RI: Revelação indefinida (Uncertain revelation); (\*): Bandas entre parêntesis referem-se àquelas não consistentemente definidas após revelação no gel (Bands between parenthesis refer to bands of no consistent definition after revelation in the gel).

Tabela 2. Continuação

Sistemas	Perfis eletroforeticos (*)/Acessos																				
	22	23	24	25	25	26	27														
B-1	B-1	B-1	B-5		AP	(B-5)	B-2														
B-5	B-5	B-5	B-8				B-5														
B-7	B-8	B-8	B-11				B-6	B-7													
	(B-9)	(B-12)					(B-7)	B-9													
	(B-11)						(B-9)														
C02	C37	C05	C29	C61	C27	C28	C10														
C04			C31	C62																	
C13			C47	C65																	
C14			C49	C66																	
C15			C50	C67																	
			C51	C69																	
			C52	C70																	
			C53	C71																	
			C57	C72																	
			C58	C75																	
			C59	C76																	
6PGDH	1	1	1	1	1	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	B-3							B-1	B-1	B-3	B-3	B-1	B-3	B-1	B-1	B-8	B-5	B-5	(B-5)	AP	B-3
	<b>B-7</b>							<b>B-2</b>	<b>B-2</b>	<b>B-5</b>	<b>B-5</b>	<b>B-2</b>	<b>B-5</b>	<b>B-2</b>	<b>B-2</b>		<b>B-7</b>	<b>B-7</b>	<b>(B-7)</b>		<b>B-7</b>
	B-11							B-3	(B-3)	B-7	B-7	B-3	B-8	B-3	B-3		B-8	B-8	(B-8)		B-10
								B-4	B-5	B-9	B-8	B-4		B-4	B-5		B-9	(B-9)			
								B-6	B-7	B-11	(B-9)	B-6		B-6	B-7		B-11				
								B-9	B-11		B-11	B-8		B-8	B-9						
															B-11						
	C01	C18	C29	C38	C49	C59	C69	C21	C13	C02	C64	C26	C54	C60	C74	C30	C09	C10	C08	C27	C37
	C05	C20	C31	C39	C50	C61	C70	C28	C48	C04											
	C07	C22	C32	C41	C51	C62	C71	C45		C06											
	C11	C23	C33	C43	C52	C65	C72			C14											
	C12	C24	C34	C44	C53	C66	C75			C15											
	C16	C25	C35	C46	C57	C67	C76			C19											
	<b>C17</b>	<b>C03</b>	<b>C36</b>	<b>C47</b>	<b>C58</b>	<b>C68</b>				<b>C40</b>											
											C42										
											C55										
											C56										
											C63										
											C73										
											C77										
											C78										
G6PDH	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
	B-1										B-1	B-2	(B-6)	B-3	B-2	AP	B-1	B-1	B-3	RI	
	B-4										B-4	B-4		B-6			B-4	B-4	B-4		
	B-5										(B-5)				B-5			(B-5)	B-6		
	B-6										(B-6)				(B-6)			(B-6)			
	C01	C09	C18	C33	C39	C45	C52	C58	C64	C70	C77	C05	C08	C22	C23	C30	C27	C31	C20	C24	C11
	C02	C12	C19	C34	C40	C46	C53	C59	C65	C71	C78	C15	C10								
	C03	C13	C25	C35	C41	C47	C54	C60	C66	C72		C21									
	C04	C14	C26	C36	C42	C48	C55	C61	C67	C74		C28									
	C06	C16	C29	C37	C43	C49	C56	C62	C68	C75		C51									
	C07	C17	C32	C38	C44	C50	C57	C63	C69	C76		C73									
ACP	1	2	2	3	3	4	4	5	6	7	8	9	10	11							
	B-2	B-2		B-5		B-5		B-8	B-2	B-4	B-8	B-1	AP	RI							
		B-3				B-6		B-9	B-5		B-9										
		B-5				B-7		B-10	B-7		B-11										
								B-11			B-12										
								B-13			B-13										

AP: Ausência de perfil eletroforético (Absence of electrophoretic profile); RI: Revelação indefinida (Uncertain revelation); (\*): Bandas entre parêntesis referem-se àquelas não consistentemente definidas após revelação no gel (Bands between parenthesis refer to bands of no consistent definition after revelation in the gel).

Tabela 2. Continuação

Sistemas	Perfis eletroforeticos (*)/Acessos													
	1	2	2	3	3	4	4	5	6	7	8	9	10	11
ACP	C01	C02	C44	C03	C32	C10	C42	C22	C47	C50	C07	C27	C12	C09
	C52	C13	C48	C04	C38	C18	C45	C23	C51		C08		C35	C11
	C54	C16	C55	C05	C49	C21	C46		C57		C24			
	C67	C17	C56	C06	C59	C25	C53		C76		C30			
	C68	C31	C64	C14	C60	C26	C58				C36			
	C72	C33	C65	C15	C62	C28	C61							
		C34	C66	C19	C63	C29	C70							
		C37	C73	C20	C69	C30	C75							
		C43	C74		C71	C40	C77							
						C41	C78							
SKDH	1	2	3	4	4	5	6	6	7	8				
SKDH	B-1	B-1	B-1	B-2		B-2	B-3		B-3	RI				
		B-2	B-3	B-3					B-4					
	C59	C20	C18	C04	C40	C52	C01	C45	C22	C03				
		C32	C33	C05	C41	C60	C02	C48	C23					
		C39	C37	C10	C42	C67	C06	C49	C24					
			C38	C11	C43	C71	C08	C50	C27					
			<b>C46</b>	<b>C12</b>	<b>C44</b>		<b>C09</b>	<b>C54</b>						
			C53	C14	C47		C07	C55						
			C57	C15	C51		C13	C56						
			C75	C16	C62		C21	C58						
				C17	C63		C26	C61						
				C19	C65		C28	C64						
				C25	C68		C30	C66						
				C29	C69		C36	C74						
				C31	C70			C76						
				C34	C72			C77						
				C35	C73									
					C78									
FUM	1	2	3	4										
AP	B-1	B-3	B-1											
		B-2												
C09	C01	C23	Os											
C22	C08	C24	demais											
	C10	C27												
	C12	C30												
	C25	C41												
	C35													

AP: Ausência de perfil eletroforético (Absence of electrophoretic profile); RI: Revelação indefinida (Uncertain revelation); (\*): Bandas entre parêntesis referem-se àquelas não consistentemente definidas após revelação no gel (Bands between parenthesis refer to bands of no consistent definition after revelation in the gel).

sendo que o primeiro pode estar evidenciando duas formas alélicas em indivíduos homocigotos. A primeira, ocorreu em cerca de 90% dos acessos, e a segunda, em cerca de 3% dos acessos. Os sete por cento restantes podem estar apresentando alelos nulos para este loco. Acredita-se que o segundo loco tenha revelado duas formas alélicas codificando alozimas com estrutura dimérica. No sistema PGI foi observada uma zona localizada entre as alozimas PGI1 e PGI3, na qual não foi detectado bandamento em 38 acessos, o que pode ser devido à

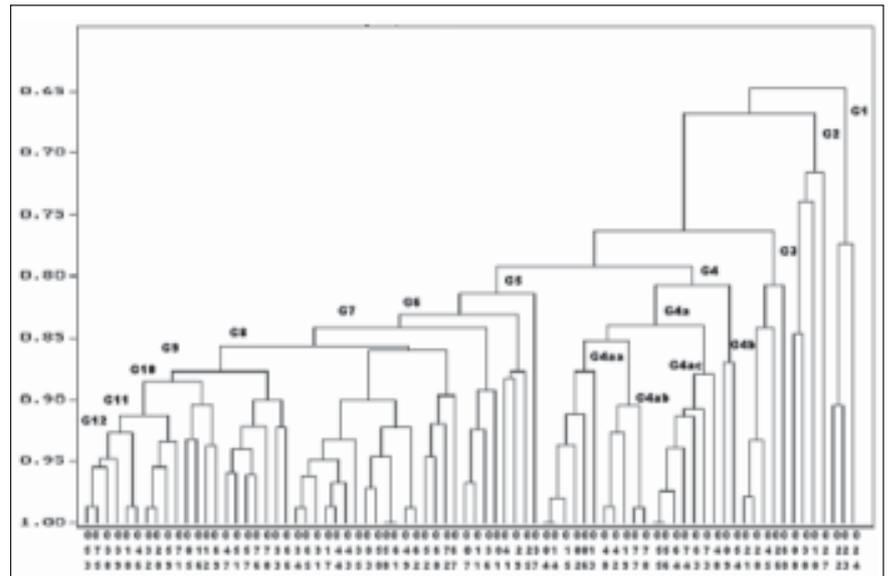
ocorrência de alelos nulos. Uma outra zona, localizada entre as alozimas PGI4 e PGI13, é pretensamente constituída por três locos e seis alelos, denotando herança monomérica. Gaia *et al.* (2005) relataram que, embora comumente se observe estrutura dimérica em plantas no sistema PGI, modificações na herança de isoenzimas podem ser atribuídas à perda da banda heterodimérica no transcórre do processo evolutivo ou às características específicas relacionadas à diploidização de poliplóides, como é o caso de pimenta-do-reino.

Schuelter *et al.* (1999), analisando o polimorfismo da malato desidrogenase (MDH) em pimenta-silvestre (*capsicum flexuosum* Sendt.), descreveram a ocorrência de sete perfis eletroforéticos, sendo que cinco locos gênicos foram possíveis detectar, dos quais um monomórfico e quatro polimórficos. Dentre os locos polimórficos, um revelou estrutura quaternária monomérica, outro com estrutura dimérica; porém para um quarto loco, não foi possível definir a estrutura quaternária, sendo provável que mais de um gene estejam controlando a expressão deste loco.

Quatorze alozimas (GOT1, GOT16, GOT18, PGI6, PGI12, PGI13, ACP1, ACP4, ACO1, ACO3, ACO8, ACO10, ACO11 e 6PGDH10) expressaram em apenas um genótipo. Nove destas ocorreram em acessos das outras espécies de *Piper* incluídas na análise e cinco, em acessos de pimenta-do-reino. As alozimas GOT1, ACP1 e ACO3 ocorreram somente no acesso de *P. columbrinum* Link (C27); de forma análoga, PGI12, PGI13, ACO8 e ACO11 foram evidenciadas somente no acesso de *P. betle* (C24); a alozima GOT18 foi observada no acesso de *P. attenuatum*-F (C30); e PGI6 foi percebida somente no acesso *P. attenuatum*-M3 (C10).

As alozimas detectadas somente em acessos de pimenta-do-reino foram: GOT16, no acesso Kottanadan-1 (C26); 6PGDH10, no acesso Chumala-S (C37); ACO1, em Balankotta Jones (C73); ACO10 em Karimunda-2 (C25); e ACP4 em X26 (C50). O clone X26 é resultante de cruzamentos intraespecíficos, sendo que a banda ACP4 pode ter sido resultante de uma mutação de ponto do alelo codificante da alozima ACP5, pois houve uma pequena diferença na sua mobilidade no gel. George *et al.* (2005) relataram que bandas não parentais presentes em algumas progênies de pimenta-do-reino podem ser resultado de mutação ou perda de segmentos cromossômicos durante a meiose (crossing-over), por isso são observados em indivíduos mutantes ou recombinantes, mas não nos genitores.

Quarenta e seis tipos de alozimas representaram 57,5% de um total de 80 tipos e foram observados em acessos que variaram de um a oito, sendo 12 no sistema GOT (GOT1, GOT3, GOT6, GOT7, GOT9, GOT10, GOT12, GOT14, GOT15 a GOT18); oito nos sistemas ACP (ACP1, ACP4 e as alozimas de ACP8 a ACP13) e ACO (ACO1, ACO2, ACO3, ACO7, ACO8, ACO10, ACO11 e ACO12); sete no sistema PGI (PGI2, PGI3, PGI4, PGI6, PGI9, PGI12 e PGI13); duas nos sistemas G6PDH (G6PDH2 e G6PDH3) e FUM (FUM2 e FUM3); cinco no sistema 6PGDH (6PGDH1, 6PGDH2, 6PGDH4, 6PGDH8 e 6PGDH10); e uma no sistema SKDH (SKDH4). Estas alozimas, por possuírem baixa fre-



**Figura 1.** Fenograma de agrupamento de 78 acessos de pimenta-do-reino da coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental gerado pelo método UPGMA, com similaridades calculadas pelo coeficiente de semelhança simples ("simple matching"). O fenograma foi dividido em 12 grupos: G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, e G12. (Phenogram of cluster analysis of 78 black pepper accessions of the germplasm collection generated into UPGMA method, with similarities calculated by coefficient of simple resemblance ("simple matching"). The phenogram was divided in 12 clusters: G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, and G12). Belém, CPATU/UFRA, 2004.

quência de variação, podem ser utilizadas para identificar acessos ou grupos com pequeno número de genótipos.

As frequências das alozimas observadas variaram de 0,004 (6PGDH10) a 0,855 (FUM1). Yamada & Guries (1994) observaram menor frequência (0,17) para uma alozima de diaforase (DIA) e maior frequência de 0,85 em uma alozima de IDH em clones de cacau. Volis *et al.* (2002), examinando frequências de alozimas em populações de aveia silvestre (*Hordeum spontaneum* Koch.), verificaram a menor frequência de variação para EST3, no valor de 0,49 e a maior frequência para PGI1 e PGI2, no valor de 0,99.

A Figura 1 revelou que os 78 acessos de pimenta-do-reino puderam ser divididos em 12 grupos, com uma faixa de similaridade genética variando de 65% a 100%, sendo que os grupos mais divergentes foram G1, G2 e G3, constituídos por acessos de pimenta-do-reino e de outras piperáceas. Tais acessos são os mais recomendados para hibridação intraespecífica e interespecífica para o programa de melhoramento da espécie, visando à obtenção de cultivares superiores.

A partir do grupo G4, os grupos se tornam mais próximos, apresentando, entre si, diferenças de similaridade menores que aquelas observadas nos três primeiros grupos, constituindo 84% dos acessos presentes numa faixa de similaridade variando de 80% a 100%, reforçando a proposição de que a base genética da espécie é reduzida e a de que os clones cultivados possuem elevada homogeneidade. Os clones mais cultivados no estado do Pará (Cingapura:C02, Guajarina:C11 e Bragantina:C38) detiveram níveis de similaridade acima de 90%; estes resultados também foram encontrados por Gaia *et al.* (2003), em estudo preliminar sobre a diversidade genética do germoplasma de pimenta-do-reino do CPATU e também confirmados pela análise da diversidade genética da espécie por meio de parâmetros genéticos de polimorfismo (Gaia *et al.*, 2005). Gaia *et al.* (2004) realizaram um estudo comparativo de agrupamentos gerados pelo coeficiente de semelhança simples e pelo índice de Jaccard e observaram que bandas ausentes em um par de unidades taxonômicas (não consideradas no índice de Jaccard, mas consideradas no

coeficiente de semelhança simples) não tiveram muita influência sobre os agrupamentos formados, havendo pouca diferença entre eles, podendo-se considerar os grupos estáveis, sendo que um ou outro pode ser utilizado para seleção dos acessos visando a obtenção de clones superiores.

No sistema SKDH foram identificadas quatro alozimas constituindo oito perfis eletroforéticos. Algumas alozimas destacaram-se por serem de maior intensidade do que as outras, mas não pareceu tratar-se de sobreposição de alozimas (bandas muito próximas). O perfil um, apresentando somente a alozima SKDH1, foi constatado apenas no acesso Mangueira (C59). A forma alozimática SKDH4 foi observada somente nos acessos de *P. columbrinum* Link (C27), *P. betle* (C24) e nos acessos S-1 (C22) e G-1 (C23) (perfil sete). O perfil quatro e o perfil seis, detectados, respectivamente, nos acessos *P. atenuatum*-M3 (C10) e *P. atenuatum*-F (C30) (uma espécie silvestre de *Piper*), apresentaram pequena diferença na mobilidade das bandas que os compõem, em relação às bandas dos acessos de pimenta-do-reino, o que poderia ser atribuído ao fato de constituírem acessos de espécies diferentes; no entanto a alozima SKDH3 foi observada nos acessos de pimenta-do-reino (*P. nigrum* L.) e no acesso de *P. colubrinum* Link. que, apesar de constituírem espécies distintas, apresentaram a mesma mobilidade no gel. Alozimas de SKDH também foram utilizadas para discriminar acessos de diferentes espécies do gênero *Capsicum* por Onus & Pickersgill (2000).

No sistema ACP detectaram-se 13 alozimas constituindo 11 perfis eletroforéticos, que evidenciaram uma zona principal de atividade enzimática localizada entre as alozimas ACP2 e ACP7. Outras duas zonas de atividade (uma anterior e outra posterior à zona principal) foram detectadas, sendo que a anterior, correspondente à alozima ACP1, pertencente à espécie *P. columbrinum* Link. (perfil nove) e à posterior, localizada entre as alozimas ACP8 e ACP13 foi observada nos acessos S-1 (C22) e G-1 (C23) (perfil cinco) e nos acessos Perunkóide-S (C07), Cz-4x11 (C36), *P. atenuatum*-M1 (C08), *P. atenuatum*-F (C30) e *P. betle* (C24) (perfil oito). O perfil sete, onde se observou a alozima ACP4 no acesso

X26 (C50) apresentou, como já referido, uma pequena diferença de mobilidade em relação à ACP5, sendo possivelmente resultante de uma mutação de ponto. Anti (2000), estudando herança de isoenzimas em germoplasma de soja (*Glycine Max* L. Merrill) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) observou que houve diferença acentuada nos perfis eletroforéticos das duas cultivares de soja, apesar destas possuírem progenitores comuns, evidenciando a possibilidade de haver também polimorfismo em outros sistemas enzimáticos. Entretanto, as linhagens de feijão não diferiram entre si, podendo uma ter sido originada de outra por mutação de ponto, uma vez que apresentaram pequenas diferenças em suas mobilidades no gel para os sistemas ACP, MDH e LAP. O perfil 11 (*P. atenuatum*-M2: C09, Guajarina: C11) não possibilitou definição de bandas.

No sistema GOT foram observadas 18 alozimas e 42 fenótipos bioquímicos. Duas zonas principais de atividade enzimática e duas zonas secundárias de atividade enzimática, uma anterior e outra posterior às zonas principais foram observadas. A primeira zona principal variou da alozima GOT2 a GOT7. A segunda zona principal variou da alozima GOT8 a GOT13. A zona secundária anterior foi representada por uma única alozima (GOT1) pertencente ao acesso de *P. columbrinum* Link (perfil 42). Na zona posterior (da alozima GOT15 a GOT18) destaca-se GOT15, que foi observada somente nos acessos de *P. betle* (perfil 35), S-1 (perfil 11) e G-1 (perfil 12). O perfil 16 (F6-PL1: C21) não evidenciou formação de bandas.

A alozima GOT17 evidenciou fraca resolução em 57,1% dos perfis eletroforéticos de GOT e possivelmente está constituindo um loco de estrutura quaternária monomérica com GOT15 e GOT18. Gaia *et al.* (2005) relataram que bandas de resolução discreta estão relacionadas com a macho-esterilidade, que é um caráter muito útil para a produção de híbridos.

A alozima GOT16 só foi evidenciada em dois acessos (F1-PL8: C45 e X26: C50) e, conseqüentemente, pode tratar-se de uma mutação de ponto em relação a GOT17. A alozima GOT18, observada no perfil bioquímico 37 (*P. atenuatum*-

F: C30), destacou-se por apresentar-se bem definida. A sucessão de bandas proveniente de espécies silvestre apresentou a mesma mobilidade relativa quando comparada àquela observada na sucessão de bandas correspondentes nos acessos de pimenta-do-reino, com exceção da alozima GOT11, que apresentou pequena diferença de mobilidade.

As alozimas GOT9, GOT12 e GOT14 podem também ser resultantes de mutação de ponto, pois apresentaram diferença na mobilidade em relação a GOT8, GOT11 e GOT15, respectivamente. Onus & Pickersgill (2000), estudando híbridos interespecíficos F<sub>1</sub> do gênero *Capsicum* verificaram diferentes formas homozigóticas nos parentais e heterozigotos tri-bandeados nos híbridos F<sub>1</sub>, inferindo-se a estrutura quaternária dimérica para a herança.

No sistema ACO detectaram-se 12 alozimas e 29 fenótipos eletroforéticos evidenciando uma zona principal de atividade enzimática (localizada entre as alozimas ACO4 e ACO7) e duas zonas secundárias, uma anterior (entre ACO1 e ACO3) e outra posterior (entre ACO8 e ACO12) à zona principal. A zona principal conteve alozimas com maior intensidade na coloração e no tamanho quando comparada às zonas secundárias anterior e posterior, além de que esteve presente na maioria dos acessos, ao passo que as zonas secundárias apresentaram menor presença nos acessos. A expressão de ACO3 foi observada somente na espécie *P. columbrinum* Link (C27) (perfil 29). A espécie *P. betle* (C24) (perfil 15) apresentou o maior número de alozimas. Nos perfis 10 (G-1: C23), 11 (Karimunda-2: C25) e 21 (Djambi: C15, Karimunda-3: C29 e *P. atenuatum*-F: C30) não foram visualizadas bandas na zona principal, porém apresentaram alozimas visualmente perceptíveis na zona secundárias posterior. O perfil 29 (Kottanandan-2: C28 e Diemberg: C31), igualmente, não apresentou nenhum sinal histoquímico de formação de bandas. Bi *et al.* (1999) detectaram polimorfismo em aconitase, controlado por dois locos gênicos em feijão-lima, relatando que similar resultado tem sido encontrado em outras espécies.

O sistema fumarase evidenciou três alozimas e quatro fenótipos

eletroforéticos com somente uma zona de atividade. O perfil dois foi observado em alguns acessos de pimenta-do-reino (0697: C01, Diemberg-2: C35, Karimunda: C12 e Karimunda-2: C25) e *P. atenuatum*-M: C08 e C10) formando uma banda de maior intensidade, o que pareceu tratar-se de sobreposição de bandas. Rodrigues (1995) observou sobreposição de bandas em urucum (*Bixa orellana* L.) evidenciada pela intensidade relativa das bandas em perfis de 6PGDH. Tal fato deve ser considerado, pois há a possibilidade de haver dois alelos relacionados com uma banda, causando variabilidade genética. Schuelter *et al.* (1999), estudando herança de MDH em pimenta-silvestre por meio de eletroforese em gel de amido, observou a possibilidade de haver sobreposição de bandas baseado na distribuição dos locos entre as progênies.

A alozima FUM1 (perfil quatro) não foi observada em nenhum acesso de espécies silvestres e esteve ausente em somente alguns acessos de pimenta-do-reino. A alozima FUM3, ocorreu com menor frequência (acessos G-1: C23, *P. atenuatum*-F: C30 e *P. columbinum* Link: C27). O perfil um (acesso S-1: C22) não apresentou formação de bandas. Com exceção dos possíveis casos de sobreposição de bandas, todos os acessos analisados apresentaram genótipos homozigóticos. Bi *et al.* (1999), examinando germoplasma de feijão-lima, não obtiveram sucesso na utilização do sistema fumarase para análise de acessos, porém observaram 74% de polimorfismo por meio de outros 17 sistemas, dentre os quais SKDH, PGI e ACO.

No sistema PGI foram observadas 13 alozimas constituindo 28 fenótipos eletroforéticos evidenciando uma zona principal de atividade enzimática localizada entre as alozimas PGI4 e PGI13 e presente em todos os acessos, com possível exceção do perfil 28 (*P. columbinum* Link: C27), que não apresentou resolução em bandas (apenas um arraste no gel); e uma zona secundária anterior à zona principal localizada entre as alozimas PGI1 e PGI3, na qual não foi detectado bandeamento em 38 acessos, o que pode ser devido à ocorrência de alelos nulos codificando alozimas nesta zona de atividade. Segundo Robinson (1998) tais alelos con-

trolam alozimas que não expressam atividade durante o processo de coloração e podem representar enzimas defeituosas ou instáveis durante os procedimentos de extração, conservação e eletroforese das amostras. A ausência de bandas em alguns perfis também foi observada nos sistemas GOT, ACO e FUM. Em estudos realizados por Onus & Pickersgill (2000), o sistema PGI, assim como GOT e ACO, foram úteis para identificar acessos de *C. baccatum*, de *C. eximium* e de *C. cardenazii*.

Quanto ao padrão eletroforético 6PGDH, foram evidenciadas 11 alozimas constituindo 15 fenótipos bioquímicos. O perfil 10 apresentou somente uma alozima (6PGDH8) presente no acesso *P. atenuatum*-F (C30) e apresentou migração equivalente à constatada nos acessos Kotavally (C60) (perfil oito), X32 (C54) (perfil sete), Kottanadan-1 (C26) (perfil seis). Nestes acessos, a banda 6PGDH8 mostrou-se de maior tamanho do que em outros acessos na qual ela aparece, a saber: *P. atenuatum*-M (C09) (perfil 11) e Trang (C64) (perfil cinco). Este tipo de polimorfismo no tamanho da banda pode ser resultado de mutação de ponto, o que não implica em mudança no padrão de migração, mas sim na conformação da alozima. Ferreira (2003) relata que mudanças em bases aminadas do DNA de um gene podem resultar na formação de um polipeptídeo de carga ou configuração diferente. É possível, também, admitir a hipótese de que uma mudança na configuração da alozima não implica, necessariamente, em aumento de peso ou em alteração da carga líquida, pois há implicação também do balanço de perdas e ganhos dos aminoácidos envolvidos.

Os perfis dois (F6-PL1: C21, F1-PL8: C45, Kottanadan-2: C28); seis (Kottanadan-1: C26) e oito (Kotavally: C60) revelaram pequena variação na mobilidade das alozimas 6PGDH4 e 6PGDH6 em relação às alozimas 6PGDH5 e 6PGDH7, respectivamente, podendo tratar-se de mutação de ponto. Este sistema foi também útil para descrever variação genética em populações juvenis e adultas de pinheiro (*Pinus cembra*), que com base também em outros sistemas, dentre os quais ACO, PGI

e SKDH, observou-se uma média de 25% de polimorfismo nas populações estudadas (Klump & Stefsky, 2004).

Em relação a G6PDH, foram observados seis padrões de banda constituindo 11 fenótipos bioquímicos. Duas zonas de atividade enzimática foram observadas, sendo que a mais anódica apresentou melhor definição e separação. A primeira zona evidenciou três alozimas (G6PDH1, G6PDH2 e G6PDH3), o mesmo ocorrendo com a segunda zona, de migração mais lenta, que também apresentou três alozimas (G6PDH4, G6PDH5 e G6PDH6), que formaram um perfil tri-bandeado presente em cerca de 83% dos acessos, constituindo provavelmente genótipos heterozigóticos, vez que este sistema apresenta comumente estrutura quaternária dimérica; isto pode estar em função de que espécies com propagação assexuada, como é o caso da pimenta-do-reino, apresentam elevado grau de heterozigose.

A alozima G6PDH1 foi observada em quase todos os acessos de pimenta-do-reino, com exceção de S-1 (C22) e de G-1 (C23). A alozima G6PDH2 foi observada nos perfis três (*P. atenuatum*-M: C08 e C10) e seis (*P. atenuatum*-F: C30), denotando uma mutação de ponto de G6PDH3, pois apresentou uma pequena diferença na mobilidade relativa. A alozima G6PDH3 foi observada no perfil 10 (*P. betle*: C24) e no perfil cinco (G-1: C23). O perfil 10 (*P. betle*: C24) evidenciou uma banda de G6PDH4 de menor tamanho que as demais com a mesma mobilidade relativa de G6PDH4 observadas em outros acessos. O perfil 11 (Guajarina: C11) não possibilitou definição de bandas. Neste sistema, Bi *et al.* (1999) observaram, em germoplasma de feijão-lima (*Phaseolus lunatus* Linn.), polimorfismo de alozimas em duas zonas de atividade no gel, com estrutura quaternária monomérica, mas isto pode ter sido influenciado pelo estágio e comportamento fisiológico das sementes donde foram extraídas as isoenzimas, o que gerou incerteza com relação à herança da estrutura da proteína.

Cinquenta acessos, representando 64,1% dos genótipos analisados, puderam ser caracterizados por 91 fenótipos

eletroforéticos, sendo que (Tabela 2) houve casos em que um só acesso pôde ser identificado por apenas um perfil eletroforético; em outros casos, puderam ser caracterizados em grupos, igualmente por um só perfil, com constituição variando de dois a seis acessos, sendo que metade dos acessos (25) pôde ser identificada no primeiro caso e a outra metade pelos demais casos.

Os acessos que puderam ser identificados por apenas um perfil eletroforético foram C03, C05, C06, C11, C12, C14, C16, C18, C19, C20, C28, C29, C33, C42, C43, C46, C47, C48, C59, C63, C66, C69, C73, C76 e C77.

A contribuição de perfis individuais por sistema enzimático foi de 30 (GOT), 20 (ACO), 18 (PGI), 11 (6PGDH) e dois (ACP e SKDH). De modo geral, em caso de necessidade de uma rápida identificação, o sistema GOT, como apresentou maior número de perfis individuais, poderá ser utilizado para identificar 60% dos acessos que apresentaram tais perfis (os 30 acessos constantes na Tabela 2, abaixo dos perfis de GOT). Para os 40% restantes, GOT pode ser complementado pelos demais sistemas. O sistema ACO poderá identificar nove acessos (C14, C16, C17, C18, C28, C46, C54, C73 e C74); PGI, cinco (C05, C42, C43, C48 e C64) e os sistemas 6PGDH, 6GPDH e SKDH, poderão identificar, cada um, dois acessos, respectivamente, C08 e C09, C11 e C20, e C03 e C59.

Pode-se concluir que todos os sistemas apresentaram boa resolução, com ênfase para xiquimato desidrogenase (SKDH), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH), fosfoglucoisomerase (PGI), e fosfatase ácida (ACP). Todos os sistemas apresentaram polimorfismo de isoenzimas e, mesmo nos sistemas menos polimórficos, observaram-se isoenzimas capazes de identificar acessos, sendo que GOT foi o que apresentou a maior variabilidade de perfis eletroforéticos e FUM, a menor. Cinquenta e sete por cento das alozimas podem ser utilizadas para caracterizar e identificar clones individuais ou grupos de até oito clones desta coleção. Cerca de 64% dos acessos avaliados podem ser identificados por um a seis fenótipos individuais dos sistemas enzimáticos analisados. A análise da similaridade indicou G1, G2 e G3 como os grupos que detiveram os clones mais diver-

gentes para serem usados em cruzamentos intraespecíficos e interespecíficos visando aumentar a variabilidade genética da coleção dos acessos.

## AGRADECIMENTOS

À JICA pelos materiais, equipamentos e reagentes cedidos durante o convênio de cooperação científica e tecnológica com a Embrapa Amazônia Oriental e ao FUNTEC, que complementou este estudo.

## REFERÊNCIAS

- ANTI AB. 2000. Caracterização de germoplasma de soja e de feijão através de eletroforese de isoenzimas de sementes. *Bragantia* 59: 139-142.
- BARROS LM. 1991. *Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (Anacardium occidentale L.), tipos comum e anão-precoce, por meio de técnicas multivariadas*. Piracicaba: USP-ESALQ. 256p (Tese doutorado).
- BI IZ; MAQUET A; WATHELET B; BAUDOIN JP. 1999. Genetic control of isozymes in the primary gene pool *Phaseolus lunatus* L. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 3: 10-27.
- BRUNE W; ALFENAS AC. 1998. Identificações específicas de proteínas em géis. In: ALFENAS AC. (ed). *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa: UFV, 574p. p.201-311.
- DUARTE MLR; ALBUQUERQUE FC; HAMADA M; COSTA AP. 1999. Murcha causada por *Fusarium oxysporum*, uma nova doença da pimenta-do-reino no Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira* 24: 178-181.
- DUARTE MLR; ALBUQUERQUE FC. 1999. Doenças da pimenta-do-reino. In: DUARTE MLR. (ed). *Doenças de plantas no tropico úmido*. Belém: Embrapa-Cpatu. p. 159-208.
- FERREIRA MAJF. 2003. *Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento genético de plantas*. Boa Vista: Embrapa Roraima. 63p.
- GAIA JMD. 1999. *Análise da similaridade genética de pimenta-do-reino através de eletroforese de isoenzimas*. Belém: FCAP. 97p. (Tese mestrado).
- GAIA JMD; MOTA MGC; COSTA MR; MARTINS CS; POLTRONIERI MC. 2003. Análise da diversidade genética em germoplasma de *Piper* spp com ênfase para pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.): estudo preliminar por marcadores isoenzimáticos. *Revista de Ciências Agrárias* 40: 9-19.
- GAIA JMD; MOTA MGC; COSTA MR; MARTINS CS; POLTRONIERI MC. 2004. Análise comparativa de fenogramas gerados por dois coeficientes de similaridade baseados em isoenzimas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). *Revista de Ciências Agrárias* 42: 9-23.
- GAIA JMD; MOTA MGC; DERBYSHIRE MTVC; OLIVEIRA VR; COSTA MR; MARTINS CS; POLTRONIERI MC. 2005. Diversidade e similaridade genéticas em clones de pimenta-do-reino. *Horticultura Brasileira* 23: 221-227.
- GEORGE KJ; GANGA G; VARMA RS; SASIKUMAR B; SAJI KV. 2005. Identification of hybrids in black pepper (*Piper nigrum* L.) using male parent-specific RAPD markers. *Current Science* 88: 216-218.
- KLUMPP RT; STEFSKY M. 2004. Genetic variation of *Pinus cembra* along an elevational transect in Austria. In: SNIEZKO RA; SAMMANS S; SCHLARBAUM SE; KRIEBEL HB (eds). *Breeding and genetic resources resources of five-needle pines: growth, adaptability and pest resistance*. IUFRO Working Party 2.02.15. USDA Forest Service Proceedings RMRS-P-32. p. 136-140.
- LOPES RC; CASALI VWD; BARBOSA LCA; CECON PR. 2003. Caracterização isoenzimática de oito acessos de erva-de-bicho. *Horticultura Brasileira* 21: 433-437.
- MARTINS CS; POLTRONIERI MC; KANASHIRO M; ALVES RM; GAIA JMD; IKETANI H; KAJITA T. 1996. Caracterização bioquímica de germoplasma de fruteiras. In: *Geração de tecnologia agroindustrial para o desenvolvimento do trópico úmido*. EMBRAPA-CPATU/JICA (eds). Belém: EMBRAPA-CPATU. p.161-172.
- NEALE DB; WEBER JC; ADAMS WT. 1984. Inheritance of needle tissue isozymes in Douglas-fir. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 26: 459-468.
- ONUS AN; PICKERSGILL B. 2000. A study of selected isozymes in *Capsicum baccatum*, *Capsicum eximium*, *Capsicum cardenasii* and two interespecific F<sub>1</sub> hybrids in *Capsicum* species. *Turkei Journal of Botany* 24: 311-318.
- PILLAY VS. 1995. *Project report on research and development of black pepper (Piper nigrum L.) in the humid tropics of Brazil*. Belém: EMBRAPA-CPATU. 27p.
- POLTRONIERI MC; LEMOS OF; ALBUQUERQUE FC. 1999. Pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental. *O programa de melhoramento genético e adaptação de espécies vegetais para a Amazônia Oriental*. Belém: EMBRAPA-CPATU. p.127-137.
- ROBINSON IP. 1998. Isoenzimas na genética de população de plantas. In: ALFENAS AC. (ed) *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins, fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa: UFV. p.329-380.
- RODRIGUES JPF. 1994. *Análise de isoenzimas em progênies de meio-irmãos de urucum (Bixa orellana L.)*. Viçosa: UFV. 76p (Tese mestrado).
- SCHUELTER AR; CASALI VWD; FINGER FL. 1999. Inheritance of malate dehydrogenase in wild pepper. *Bragantia* 58: 1-6.
- SHEPHERD GJ. 2001. *Fitopac 1. Manual do usuário*. Campinas: UNICAMP. 93p.
- TSUMURA Y; TOMARU N; SUYAMA Y; NA'EIM M; OHBA K. 1990. Laboratory manual of isozyme analysis. *Bull. Tsukuba Univ. Forest* 6: 63-95.
- VOLIS S; MENDLINGER S; TURUSPEKOV Y; ESNAZAROV J. 2002. Phenotypic and allozyme variation in Mediterranean and desert populations of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch. *Evolution* 56: 1403-1415.
- YAMADA MM, GURIES RP. 1994. Variação genética de três sistemas isoenzimáticos em clones de cacau (*Theobroma cacao*) da série Parinari. *Agrotrópica* 6: 27-29.