

# CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA PIMENTA-DO-REINO E DO CUPUAÇU ATRAVÉS DE ISOENZIMAS<sup>1</sup>

Maria Rosa COSTA<sup>2</sup>

Marli Costa POLTRONIERI<sup>3</sup>

**RESUMO:** O objetivo da pesquisa foi analisar a variação isoenzimática presente em híbridos e cultivares de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e acessos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). O material utilizado foi proveniente dos bancos de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. As metodologias para a extração das enzimas, formulação de tampões do gel e da cuba e para os procedimentos de coloração foram os descritos por Tsumura, 1990, modificado. Foram testados dezoito sistemas enzimáticos: FUM, ACP; PGI; SKDH; ACO; GOT; G6PD; 6PGD; DIA; MNR; ME; MDH; GDH; PGM; TZO; ADH; LAP e SoDH. As interpretações genéticas foram feitas de acordo com o método descrito por Alfenas et al., 1991. Concluiu-se, através dos padrões eletroforéticos encontrados, que seis sistemas empregados apresentaram polimorfismo enzimático para a pimenta-do-reino e quatro para o cupuaçu. A presença de heterozigossidade nos materiais estudados significa variabilidade a ser explorada no programa de melhoramento genético destas espécies. A resolução obtida nestes sistemas com bandas bem nítidas indica a presença de atividade enzimática em folhas jovens de pimenta-do-reino e cupuaçu.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** *Piper nigrum*, *Theobroma grandiflorum*, Marcadores Moleculares, Melhoramento Genético.

## ISOZYMES ANALYSIS OF HYBRIDS AND CULTIVARS OF BLACK PEPPER AND ACCESSION OF CUPUAÇU

**ABSTRACT:** This research was made with the objective to determine the isoenzymatic variation in hybrids and cultivars of black pepper (*Piper nigrum* L.) and accessions of cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). The material was collected from the germoplasma Bank of Embrapa Amazônia Oriental. A modified Tsumura 1990 technique for extraction of enzymes, preparation of buffer solutions from gel and tank and staining procedures was used. Eighteen enzymatic systems were tested: FUM; ACP; PGI; SKDH; ACO; GOT; G6PD; 6PGD; DIA; MNR; ME; MDH; GDH; PGM; TZO; ADH; LAP and SoDH. The genetic analysis was done in agreement with the method described by Alfenas et al., 1991. The electrophoretic patterns showed six polymorphic systems for black pepper and four to cupuaçu. The heterozygosity observed in the material is a variability to be explored in

<sup>1</sup> Aprovado para publicação em 20.11.2001

<sup>2</sup> Engenheira Agrônoma, M.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Amazônia Oriental. Cx. Postal 48. CEP 66.017-970-Belém, Pa

<sup>3</sup> Engenheira Agrônoma, M.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Amazônia Oriental. Cx. Postal 48. CEP 66.017-970-Belém, Pa

the genetic improvement programs of these species. The clear band resolution of the system indicated enzymatic activity in young leaves of black pepper and cupuaçu.

**INDEX TERMS:** *Piper nigrum*, *Theobroma ganadiflorum*, Molecular Markers, Genetic Improvement.

## 1 INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L) e o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) (Wild Spreng) (Schum) são espécies de grande importância no contexto socio-econômico do Estado do Pará. Estas espécies são mantidas em bancos de germoplasma pela Embrapa Amazônia Oriental, com a finalidade de conservar a diversidade genética e disponibilizar genótipos para uso imediato ou para programas de melhoramento.

No programa de melhoramento genético destas espécies, uma das primeiras etapas tem sido a introdução e avaliação de genótipos. As fases seguintes do melhoramento genético, bem como a conservação desses recursos genéticos, dependem fundamentalmente do conhecimento e da quantificação da variabilidade genética que ocorre nas mesmas.

Uma das técnicas utilizadas para identificar os materiais e evitar a duplicidade no processo de melhoramento de plantas é o uso de marcadores moleculares, notadamente as isoenzimas (WENDEL; WEEDEN, 1989).

Marcadores bioquímicos, como as isoenzimas examinadas por eletroforese, são mais sensíveis para estimar variabilidade genética do que as características

morfológicas, visto que sofrem menor influência ambiental (PIMENTEL, 1988). Neste contexto, as isoenzimas apresentam diversas vantagens em relação aos marcadores morfológicos convencionais, 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; COOLINS, 1983).

O objetivo deste trabalho foi analisar o padrão eletroforético de dezoito sistemas enzimáticos, visando utilizá-los, posteriormente, na caracterização genética destas espécies.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Genética-LABGEN da Embrapa Amazônia Oriental. O material genético utilizado constou de dezoito híbridos e cultivares de *Piper nigrum* e dez acessos de *Theobroma grandiflorum* provenientes dos bancos de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, localizados em Belém (PA). De ambas as espécies foram utilizadas folhas jovens, saudáveis, na fase ativa de crescimento, a fim de fornecer 50 a 100 mg de tecido foliar fresco.

O protocolo empregado para a resolução da atividade enzimática dos sistemas foi o descrito por Tsumura et al. (1990), modificado. Foram avaliados dezoito sistemas enzimáticos: Fumarase (FUM); Fosfatase Ácida (ACP); Fosfogluose Isomerase (PGI); Aconitase (ACO); Chiquimato Desidrogenase (SKDH); Glutamato Oxaloacetato Transaminase (GOT); Glucose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PD); 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGD); Diaforase (DIA); Menadiona Redutase (MNR); Enzima Málica (ME); Malato Desidrogenase (MDH); Glutamato Desidrogenase (GDH); Fosfoglucomutase (PGM); Tetrazólio Oxidase (TZO); Aldolase (ADH); Leucina Aminopeptidase (LAP) e Sorbitol Desidrogenase (SoDH). As corridas eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida em condições de 16mA, 250V e a temperatura de 4 °C.

As interpretações genéticas foram feitas de acordo com o método descrito por Alfenas et al. (1991).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos dezoito sistemas enzimáticos testados, somente oito apresentaram atividade enzimática (FUM, ACP, PGI, SKDH, 6PGD, ACO, GOT e G6PD) na pimenta-do-reino, sendo que, dentre estes, dois não apresentaram variação nos zimogramas, em todos os indivíduos analisados (FUM e G6PD).

A representação esquemática dos padrões de bandeamento obtidos nesses sistemas encontra-se na Figura 1.

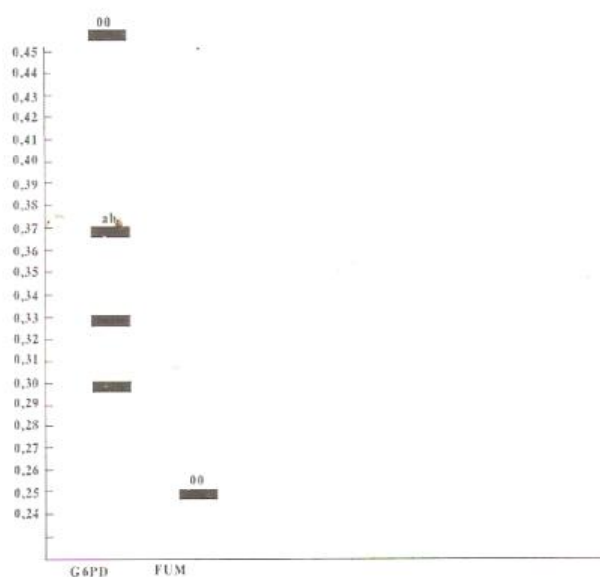


Figura 1 – Representação esquemática dos padrões de bandeamento observados para os dois sistemas enzimáticos monomórficos, em pimenta - do - reino; fenótipos observados.

Foram observadas duas zonas de mobilidade eletroforética nos géis corados para Glucose 6-Fosfato Desidrogenase. Na zona de maior migração observa-se uma única banda constante. A outra zona, mais próxima da origem (mais catódica), apresentou três bandas próximas nítidas em todos os géis.

A enzima Fumarase apresentou uma zona de mobilidade eletroforética com uma única banda nítida com mobilidade relativa (Rf) igual a 0,25, sem variação em todos os indivíduos analisados.

Géis corados para 6-Fosfogluconato Desidrogenase na pimenta-do-reino (Figura 2) apresentaram três bandas nítidas e constantes na maioria dos indivíduos analisados, entretanto, três indivíduos apresentaram alteração na mobilidade das três bandas presentes.

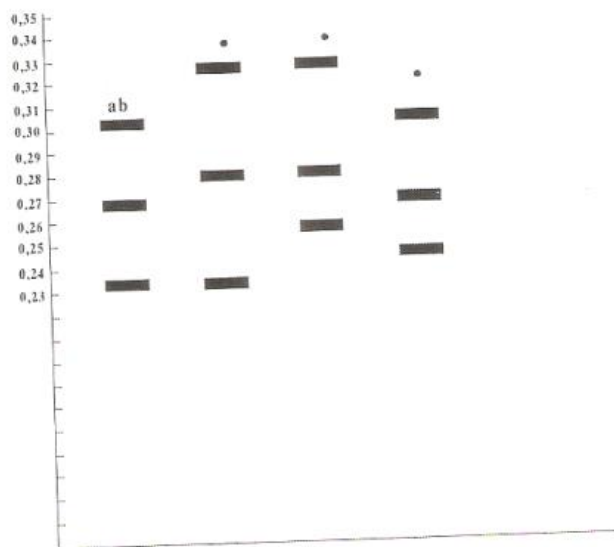


Figura 2 - Representação esquemática dos padrões de bandas formadas pelas isoenzimas de 6-Fosfogluconato Desidrogenase em pimenta-do-reino; fenótipos observados.

Certos fatores que afetam o metabolismo da planta, tais como nutrição mineral, altas ou baixas temperaturas, fotoperíodo, injúria mecânica, enfermidades podem influenciar a atividade enzimática e causar, ocasionalmente, o aparecimento de diferentes formas moleculares (PEIRCE; BREWBAKER, 1973).

Nos géis revelados para Glutamato Oxaloacetato Transaminase na pimenta-do-reino (Figura 3), foram constatadas duas zonas de mobilidade eletroforética correspondentes a dois locos gênicos (Got-1 e Got-2). Foram encontrados três fenótipos distintos na zona de migração mais rápida correspondente ao loco Got-1 e quatro fenótipos na zona mais catódica correspondente ao loco Got-2. Os zimogramas foram característicos de enzimas diméricas, ou seja, com bandas formadas por homodímeros e heterodímeros.

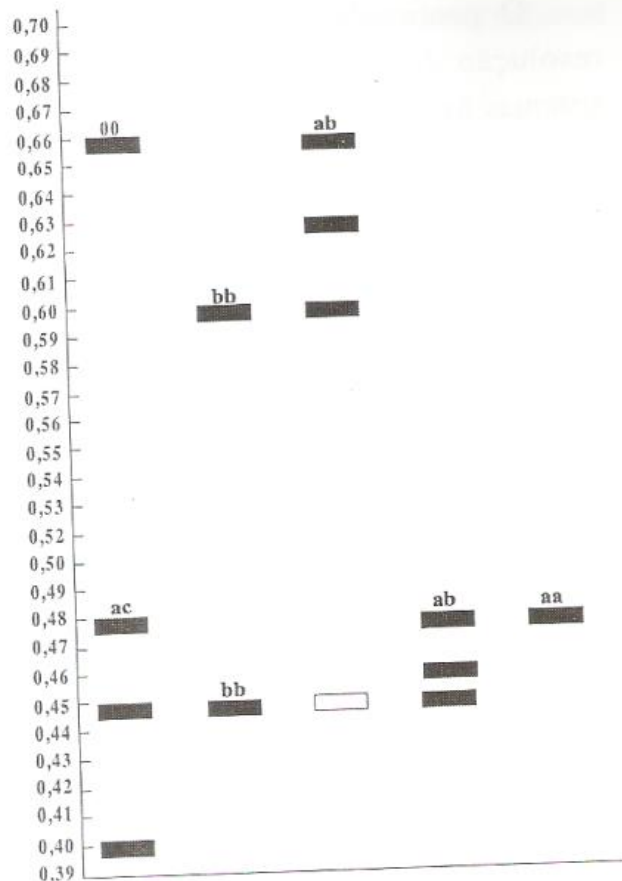


Figura 3 - Representação esquemática dos padrões de bandas formadas pelas isoenzimas de Glutamato Oxaloacetato Transaminase em pimenta-do-reino; fenótipos observados.

Seis fenótipos distintos foram encontrados nos géis corados para Chiquimato Desidrogenase na pimenta-do-reino (Figura 4). Foi constatada uma zona de mobilidade eletroforética com três alelos.

Os zimogramas revelados para Fosfatase Ácida na pimenta-do-reino apresentaram uma zona de migração com quatro fenótipos distintos e três alelos. As bandas foram nítidas e estáveis em todos os indivíduos analisados (Figura 5).

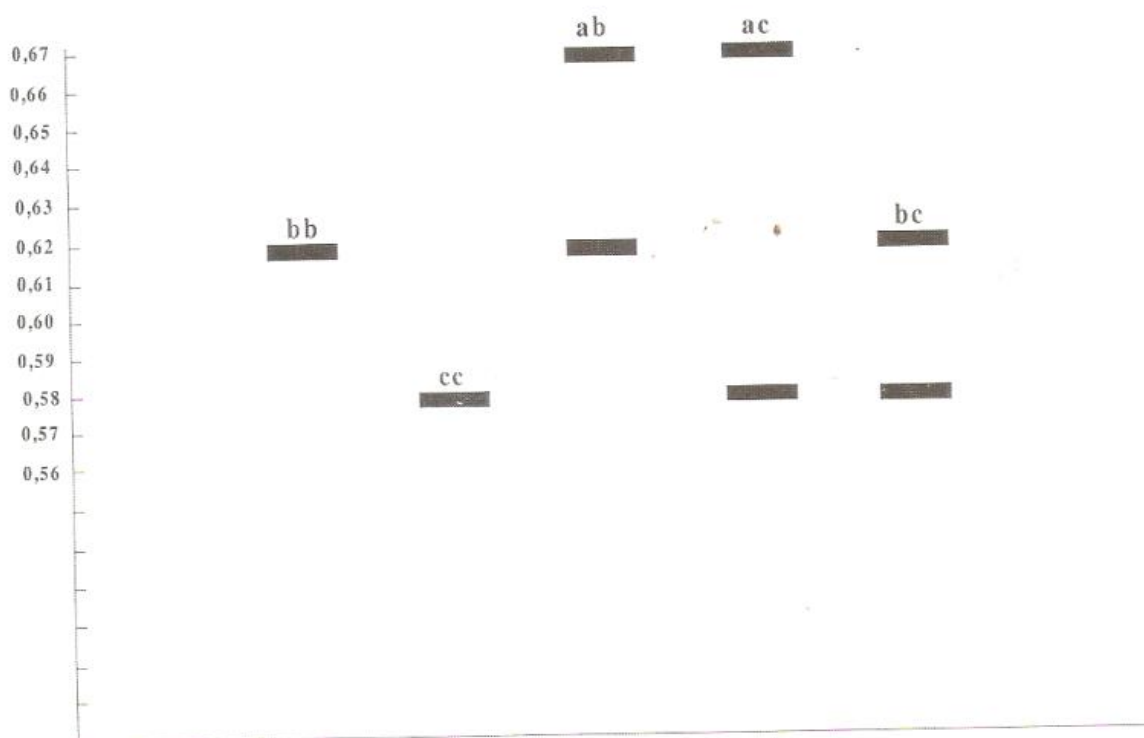


Figura 4- Representação esquemática dos padrões de bandas formadas pelas isoenzimas de Chiquimato Desidrogenase em pimenta-do-reino; fenótipos observados.

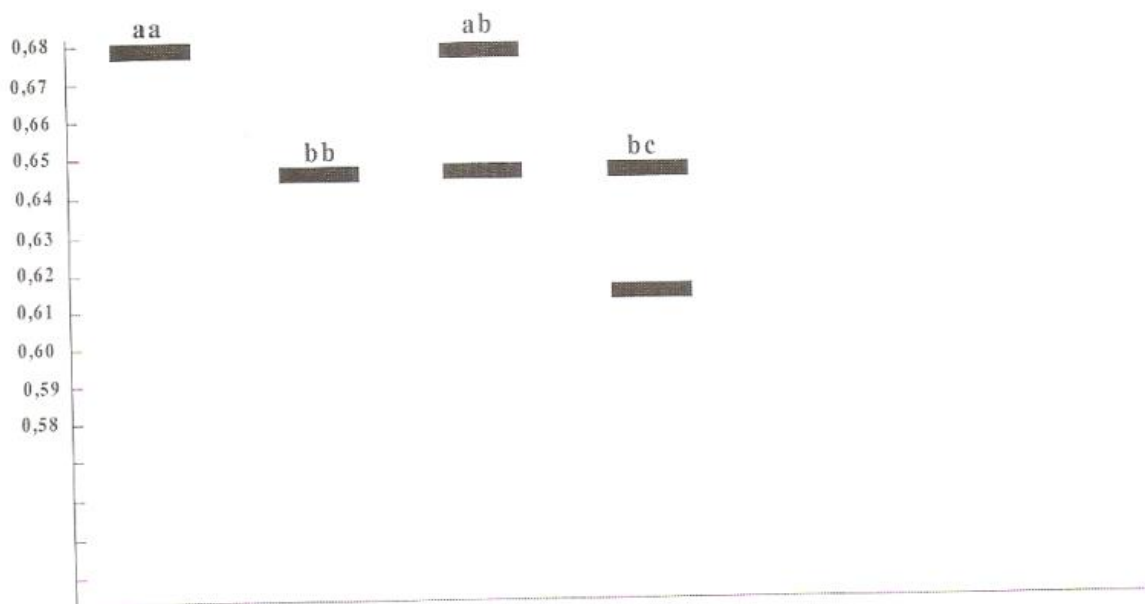


Figura 5 - Representação esquemática dos padrões de bandas formadas pelas isoenzimas de Fosfatase Ácida em pimenta-do-reino; fenótipos observados.

Os padrões isoenzimáticos de Aconitase em pimenta-do-reino são mostrados na Figura 6. Duas zonas de atividade enzimática podem ser claramente identificadas e atribuídas aos locos Aco-1 e Aco-2. Os dois locos apresentaram os mesmos fenótipos com dois alelos (a e b).

Três bandas puderam ser distintas nos géis corados para Fosfoglucoase Isomerase, na pimenta-do-reino (Figura 7). Foram observados três indivíduos com padrão eletroforético variável apresentando bandas com mobilidade diferente em relação ao fenótipo mais comum.

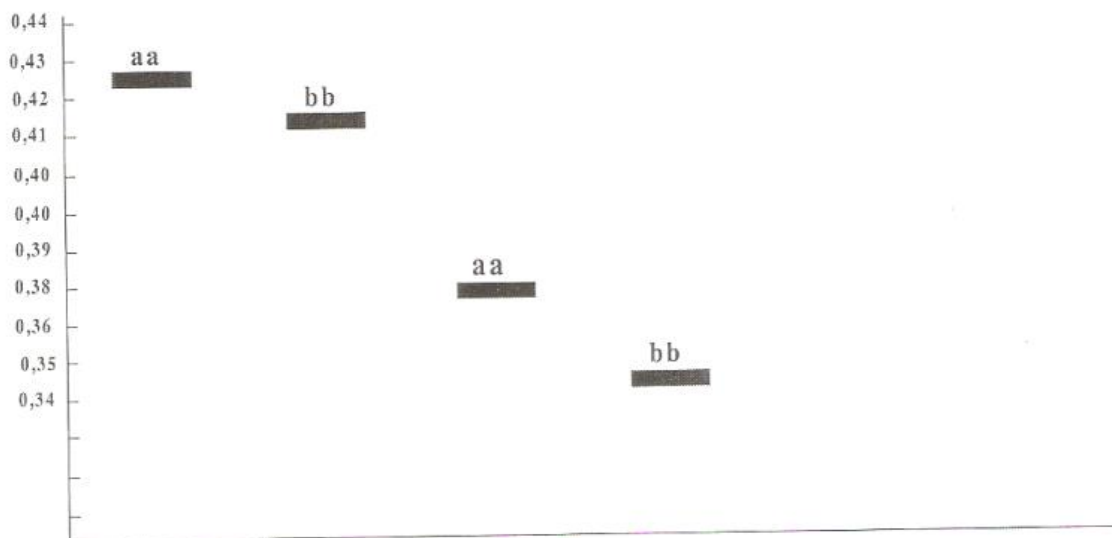


Figura 6 - Representação esquemática dos padrões de bandas formadas pelas isoenzimas de Aconitase em pimenta-do-reino; fenótipos observados.

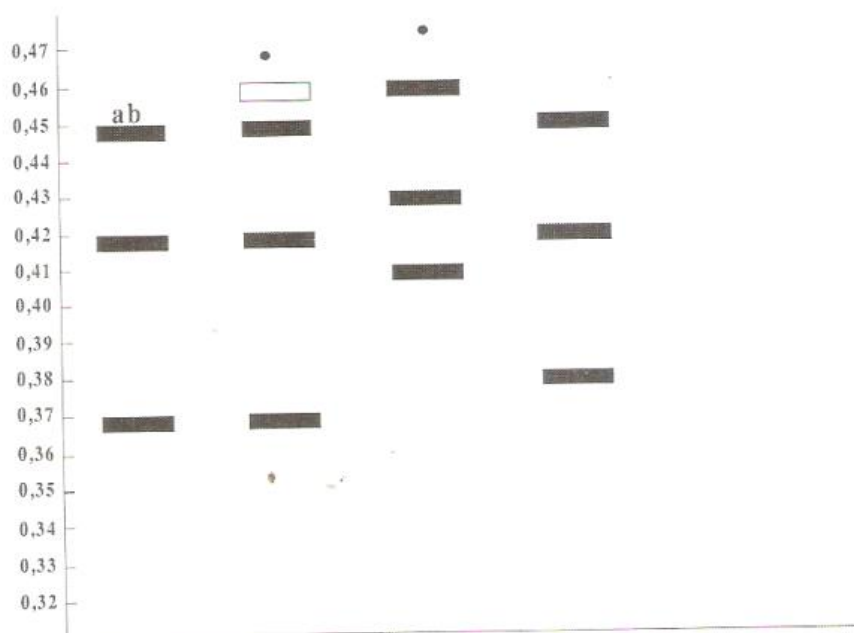


Figura 7 - Representação esquemática dos padrões de bandas formadas pelas isoenzimas de Fosfoglucoase Isomerase em pimenta-do-reino; fenótipos observados.

A atividade isoenzimática dos sistemas GOT, ACP, G6PD, FUM, GDH e ADH para o cupuaçu foi concordante tanto em relação à intensidade das bandas quanto em relação ao padrão isoenzimático característico de cada sistema. Os sistemas DIA, MNR, 6PGD e SkDH apresentaram resolução satisfatória, mas sem variação no padrão de bandas entre as amostras. A baixa resolução dos sistemas ACO, PGM, TZO, LAP e MDH impossibilitou a interpretação genética dos fenótipos isoenzimáticos. Dos sistemas isoenzimáticos interpretáveis, sete não apresentaram polimorfismo isoenzimático, impossibilitando o seu uso para detecção de variabilidade genética entre genótipos de cupuaçu (PGI, DIA, MNR, ME, 6PGD, SkDH e SoDH).

Os zimogramas dos quatro sistemas polimórficos interpretáveis para o cupuaçu são apresentáveis nas Figuras 8, 9, 10 e 11.

Nos géis revelados para Glutamato Oxaloacetato Transaminase (Figura 8) observou-se uma zona de mobilidade eletroforética correspondente a um loco gênico com dois alelos e dois fenótipos. Os zimogramas foram característicos de enzimas monoméricas.

Os padrões isoenzimáticos de Fumarase, em cupuaçu, são mostrados na Figura 9. Uma zona de atividade enzimática pode ser claramente identificada, correspondente a um loco gênico com três alelos e quatro fenótipos. Os zimogramas

foram característicos de enzimas monoméricas.

Os zimogramas revelados para Glutamato Desidrogenase ( GDH ) apresentaram uma zona de migração com dois alelos e dois fenótipos, com padrão de enzima monomérica (Figura10).

Três fenótipos distintos foram encontrados nos géis corados para Fosfatase Ácida, sendo constatada uma zona de mobilidade eletroforética com dois alelos e padrão de enzima monomérica (Figura 11).

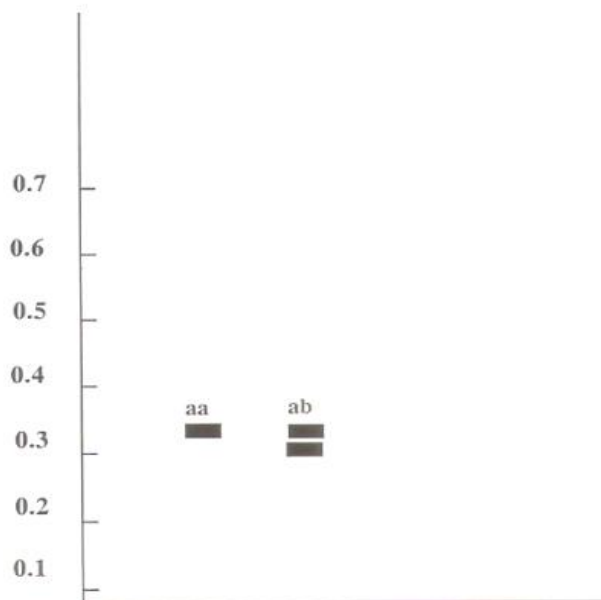


Figura 8 - Padrão isoenzimático de Glutamato Oxaloacetato Transaminase (GOT) em folhas de cupuaçu; fenótipos observados.

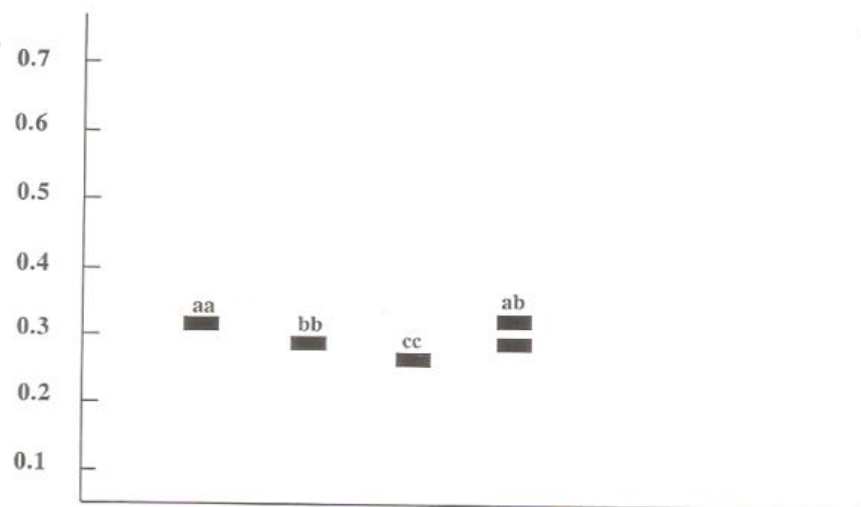


Figura 9 - Padrão isoenzimático de Fumarase (FUM) em folhas de cupuaçu; fenótipos observados.

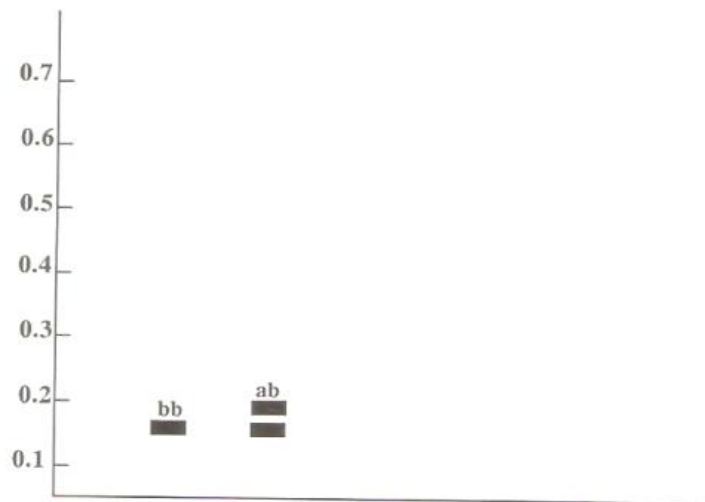


Figura 10 - Padrão isoenzimático de Glutamato Desidrogenase ( GDH ), em folhas de cupuaçu; fenótipos observados.

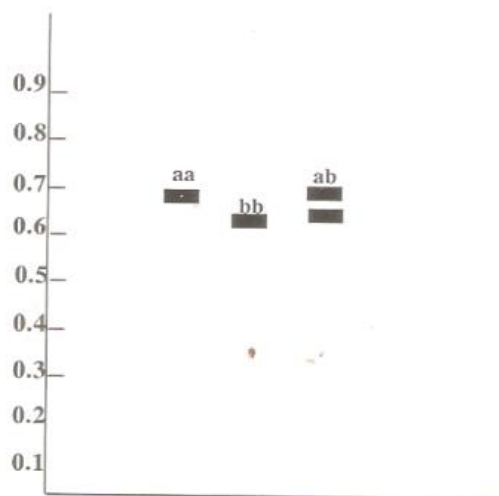


Figura 11 - Padrão isoenzimático de Fosfatase Ácida (ACP) em folhas de cupuaçu; fenótipos observados.



#### 4 CONCLUSÃO

Conclui-se, através dos padrões eletroforéticos encontrados, que os seis sistemas que se mostraram polimórficos podem ser utilizados para o estudo de variabilidade genética na pimenta-do-reino. A resolução obtida nestes sistemas com bandas bem nítidas indica a presença de atividade enzimática em folhas jovens de pimenta-do-reino.

A diferença no padrão eletroforético encontrada para o mesmo alelo em três sistemas (PGI, GOT e 6PGD) supõe a presença de um gene modificado alterando a mobilidade da enzima. A existência de heterozigossidade no material estudado significa variabilidade genética a ser explorada no programa de melhoramento genético da pimenta-do-reino.

Os padrões eletroforéticos encontrados nos sistemas polimórficos, com a existência de heterozigossidade no material estudado, significa variabilidade genética a ser explorada no programa de melhoramento genético do cupuaçu.

A resolução obtida nestes sistemas, com bandas bem nítidas, indica a presença de atividade enzimática em folhas jovens de cupuaçu e a viabilidade da técnica de eletroforese de isoenzimas para detecção de

variabilidade genética entre genótipos de cupuaçu.

Os sistemas enzimáticos selecionados para a pimenta-do-reino foram o ACP, PGI, SKDH, 6PGD, GOT e ACO. Para o cupuaçu foram selecionados o GOT, FUM, GDH e o ACP.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 1991.
- MOORE, G.A.; COOLINS, 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.
- PIMENTEL, A.M. *Utilização da técnica da eletroforese em genética florestal*. Piracicaba: IPEF, 1998. 27 p. (Série Técnica, v.5, n.15).
- PEIRCE, L.C.; BREWBAKER, J.L. Application of isozyme analysis in horticultural science. *Hortscience*, v. 8, n.1, p. 17-22, 1973.
- TSUMURA, Y.; TOMARU, N.; SUYAMA, Y.; NAIM, M.; OHBA, K. Método de análise de isoenzimas. In: VI RELATÓRIO sobre treinamento de estudos florestais da Universidade de Tsukuba. Tsukuba: Universidade de Tsukuba, 1990. p. 63-95 (Texto em japonês).
- WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: SOLTIS, D. E. ; SOLTIS, P.S. *Isozymes in plant biology*. Portland: Oregon Dioscorides Press, 1989. p. 5-45.