

Embrapa

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 211, fevereiro/99, p.1-2.

PROTOCOLO DE ELETROFORESE DE ISOENZIMAS DE CUPUAÇU EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Maria Rosa Costa de Oliveira¹
José Maria Demetrio Gaia²
Gerson Araújo dos Santos³

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd Spreng) (Schum) é uma espécie de grande importância no contexto sócio-econômico do Estado do Pará. Genótipos desta espécie vêm sendo mantidos na coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, com a finalidade de conservar a diversidade genética e disponibilizar genótipos para programas de melhoramento genético vegetal.

Uma das maneiras de se caracterizar coleções de germoplasma é através da eletroforese de isoenzimas. Esta técnica consiste na migração e separação de moléculas ionizadas de acordo com suas cargas líquidas, pesos e formas moleculares e a porosidade do meio suporte utilizado.

A utilização de isoenzimas como marcadores genéticos é vantajosa, devido alelos de muitos locos isoenzimáticos serem codominantes, o que permite identificar genótipos heterozigotos e homozigotos numa população.

As isoenzimas apresentam especificidade por espécie, cultivar, clone, tecido e estágio de desenvolvimento das plantas.

Este trabalho está sendo desenvolvido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia (seção de genética de plantas) da Embrapa Amazônia Oriental, com o objetivo de desenvolver o protocolo para eletroforese de isoenzimas de cupuaçu, identificando-se sistemas enzimáticos com boa resolução, que permitam visualizar locos e alelos que possam ser utilizados como marcadores na caracterização genética de clones de cupuaçu.

¹Eng^o- Agr^o, M.Sc., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66017-970, Belém, PA.

²Mestrando da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP), Caixa Postal 917, CEP 66 077-530, Belém, PA.

³Aluno da Universidade Federal do Pará, Caixa Postal 1611, CEP 66 075-900, Belém, PA.

ATENÇÃO: Resultados provisórios, sujeitos a confirmação



A extração das isoenzimas é feita de folhas jovens coletadas no campo, acondicionadas em sacos de plástico e colocadas em isopor com gelo. O extrato é obtido triturando-se manualmente 50 mg de tecido foliar, em almofariz e pistilo com 1 ml de tampão de extração, 70 mg de PVPP (polivinilpolipirrolidona), sob nitrogênio líquido. Após a extração, os tubos de Eppendorf (1,5 ml), contendo o extrato, são submetidos à centrifugação (40 minutos em rotação de 15.000 rpm a 4 °C), para separação do extrato enzimático do precipitado vegetal. As amostras são aplicadas no gel e o aparato (de duas placas) é submetido à eletroforese, sob condições de 16 mA e 250 V, a temperatura de 4 °C. Após a eletroforese, as isoenzimas são visualizadas através de corantes histoquímicos específicos.

Utilizam-se os mesmos tampões de gel - eletrodo e de coloração descritos por Tsumura et al. 1990.

Estão sendo testados 18 sistemas enzimáticos: Aldolase (ADH), Leucina Aminopeptidase (LAP), Sorbitol Desidrogenase (SoDH), Chiquimato Desidrogenase (SKDH), 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH), Glucose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PHD), Fosfoglucomutase (PGM), Fosfogluose Isomerase (PGI), Enzima Málica (ME), Malato Desidrogenase (MDH), Glutamato Oxaloacetato Transaminase (GOT), Aconitase (ACO), Fosfatase Ácida (ACP), Diaforase (DIA), Menadiona Redutase (MNR), Fumarase (FUM), Tetrazólio Oxidase (TZO) e Glutamato Desidrogenase (GDH).

Os resultados preliminares obtidos indicam que seis sistemas apresentaram boa resolução (ACP, GOT, 6PGDH, FUM, DIA e MNR) e podem ser utilizados como marcadores na caracterização molecular desta espécie. Os sistemas PGI, ME(A), ADH e GDH apresentam resolução regular e necessitam de ajustes no protocolo de extração e/ou coloração. Sistemas que apresentaram resolução ruim como LAP, SoDH, SKDH, G6PDH, PGM, ACO, MDH e TZO serão testados com outras soluções extratoras para otimizar este protocolo.

De maneira geral, tem-se detectado baixo polimorfismo nesta espécie para a maioria dos sistemas avaliados.