

Nº 107, dez./99 p. 1-5

**AJUSTE METODOLÓGICO DE ELETROFORESE DE ISOENZIMAS PARA O ALGODÃO  
(*Gossypium hirsutum* L.)**

Márcia Barreto de Medeiros Nóbrega<sup>1</sup>  
Vênia Carneiro de Souza<sup>2</sup>  
Rosa Maria Mendes Freire<sup>1</sup>  
Analice Fernandes Silva<sup>3</sup>  
Joaquim Nunes da Costa<sup>1</sup>  
Melchior Naelson Batista da Silva<sup>3</sup>

A técnica da eletroforese de isoenzimas tem sido utilizada em estudos genéticos, taxonômicos e fisiológicos (Payne & Koszykowasky, 1978; Cardy & Kannenberg, 1982), e também na determinação de marcadores e na caracterização de cultivares.

No melhoramento de plantas, além de marcadores morfológicos, variantes eletroforéticas funcionam como excelentes marcadores moleculares, uma vez que plantas podem ser identificadas quanto ao seu tipo de reprodução ou pureza varietal através de testes em tecidos de qualquer idade e fase de desenvolvimento (Medina Filho, 1983). A técnica de eletroforese de isoenzimas pode, portanto, servir de auxílio aos programas de melhoramento vegetal, permitindo que o programa de melhoramento seja desenvolvido com maior rapidez e seja menos dispendioso.

Baseado nestes aspectos, o objetivo deste trabalho foi o de ajustar a metodologia de eletroforese de isoenzimas para algodão, determinando as melhores combinações entre tecido vegetal, tampão de extração, sistema gel/eletrodo e enzima, visando seu uso como marcador molecular na caracterização do BAG-Algodão.

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Apoio Multidisciplinar (LAM) da Embrapa Algodão durante os meses de março a julho de 1999.

Preliminarmente foram testados os seguintes tecidos: sementes, folhas.

A extração nas sementes foi feita após 24, 48 e 72 horas de embebição em água destilada. A cultivar utilizada foi a Epamig 4. A maceração foi feita retirando-se o tegumento. As folhas consistiram de três estádios de maturação jovem, adulta e velha. Estas foram coletadas em casa-de-vegetação, acondicionadas em sacos de polietileno e colocadas em caixa de isopor com gelo, e, em seguida levados ao (LAM), onde se procedeu a extração de enzimas.

A extração manual das enzimas através de maceração foi realizada com o auxílio de almofariz e pistilo de porcelana previamente resfriados e mantidos sobre uma barra de

<sup>1</sup>Pesquisadores Embrapa Algodão, CP 174, CEP 58107-720, Campina Grande, PB

<sup>2</sup>Estagiária, aluna do curso de Biologia da UEPB, CEP 58100-001, Campina Grande, PB

<sup>3</sup>Estagiários, alunos do curso de Agronomia da UFPB, CEP 58109-970, Campina Grande, PB

CT/107, CNPA, dez./99, p.2

gelo (ALFENAS et al., 1991). Tanto para as sementes quanto para as folhas, foram usados sete soluções de extração, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Soluções empregadas na extração de enzimas de folhas e sementes de algodão

Solução	Componentes/concentração	pH	Referências
1	Cloreto de sódio - 0,9% peso/vol	--	Scandalios, 1967
2	Fosfato de sódio monobásico - 0,15 M/HCl para ajustar o pH	7,0	Wall, 1968
3	Fosfato de sódio monobásico	7,0	Cardy et al., 1981
4	Fosfato de sódio monobásico - 0,04 M Sacarose - 0,2 M EDTA - 1 mM Ditiotreitol (DTT) - 3 mM L-ácido ascórbico (Na <sup>+</sup> ) - 5 mM Bissulfito de sódio - 2,5 mM Ácido dietil ditiocarbâmico (DIECA) - 6 mM Polivinilpirrolidone 40 (PVP-40) - 0,05% β-mercaptoetanol - 0,1% Soro albumina bovina cristalizado (BSA) - 0,1% NaOH 1M - para ajustar o pH	7,3	Marty et al., 1984
5	Sacarose - 0,2 M PVP-40 - 2,56% DTT - 3 mM L-ácido ascórbico - 5,7 mM DIECA - 5,8 mM Borato de sódio - 2,5 mM Bissulfito de sódio - 2,6 mM β-mercaptoetanol - 0,2% Polietilenoglicol 6000 - 1% Polivinilpirrolidone - 1 pitada durante a trituração		Alfenas et al. 1991
6	Tris-ácido - 0,1 M Borato de sódio - 0,014 M Bissulfito de sódio - 4,2 M L-ácido ascórbico - 0,047 DIECA - 6 mM PVP-40 - 8% β-mercaptoetanol - 8 gotas	8,1	Bournival & Korban, 1987 Yamada & Guries, 1989
7	Tris-base/ HCl - 0,1 M Borato de sódio - 0,014 M Bissulfito de sódio - 4,2 mM L-ácido ascórbico - 0,057 M DIECA - 6 mM PVP-40 - 4g		Bournival & Korban, 1987 Yamada & Guries, 1989

OBS: Em todas as soluções é usada água destilada ou desionizada em quantidade suficiente para o volume final

CT/107, CNPA, dez./99, p.3

A quantidade de tampão de extração usada foi de 0,5 ml para as sementes e 3,0 ml para as folhas. Independentemente do tecido usado, o macerado foi filtrado em lenço de papel e absorvido com papel Whatman (12 x 5). Os Wicks foram colocados em sacos plásticos, identificados, fechados e armazenados em freezer a  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Cada plástico apresentava 10 compartimentos e para cada amostra foram obtidos 20 Wicks.

As corridas eletroforéticas foram feitas em gel de penetrose 30 a 13% contendo 5% de sacarose. Os sistemas-tampão gel/eletrodo usados, foram descritos por Alfenas et al. (1991) e estão discriminados na Tabela 2. Após resfriamento os géis foram cortados em 2 cm de uma das extremidades, e as amostras (Wicks) foram colocadas espaçadas de 2mm entre si. Para monitorar a corrida foram colocados dois Wicks embebidos em azul de bromofenol a 1%. Os demais procedimentos foram feitos de acordo com Alfenas et al. (1991). As seguintes enzimas foram reveladas: Fosfatase ácida (ACP) E.C. 3.1.3.2.; Malato desidrogenase (MDH) E.C. 1.1.1.37; E.C. 3.4.11.1.; Esterase (EST) E.C. 3.1.1.1.; Peroxidase (POX) E.C. 1.11.1.7.; e 6-Fosfogluconato desidrogenase (6PEDH) E.C. 1.11.44.

Dentre as cinco enzimas estudadas, apenas Peroxidase não apresentou atividade nos tecidos e sistemas-tampão gel/eletrodo estudados (Quadro 1). A resolução mostrou-se variável com os sistemas.

Para selecionar as melhores combinações entre tecido, tampão de extração, sistema-tampão gel/eletrodo e sistemas enzimáticos, foram atribuídas notas para o resultado traduzido em atividade (intensidade de colocação das enzimas) e resolução (definição de imagem com relação a bandas no gel). Essas notas são:

Atividade/resolução	
Nota	Significado
0	ausência
1	ótima
2	boa
3	regular
4	ruim

Essas notas foram atribuídas por comparação de todos os géis e separadamente avaliando-se primeiro a atividade e depois a resolução.

Para a identificação de locos foram usados os dados de mobilidade relativa (rf) calculados em função da distância percorrida pela banda no gel em relação (d) a distância percorrida pelo corante azul de bromofenol (D). A mobilidade relativa é dada por  $\frac{d}{D} \times 100$

Com relação ao tipo de tecido, observou-se que as enzimas extraídas das sementes apresentaram atividade maior que as extraídas de folhas, sendo também melhor a resolução para as sementes. Isto é explicado pela ausência de taninos e fenois nas sementes (Cheliak & Pitel, 1984). Não se observou diferenças na atividade e resolução das sementes embebidas em água por 24, 48 ou 72 horas.

O tampão de extração que permitiu maior estabilidade na atividade e resolução das enzimas foi o tampão 4 (Marty et al., 1984).

Usando-se então a semente embebida em água por 24 horas e o tampão de extração 4, procedeu-se a escolha dos melhores sistemas-tampão gel/eletrodo, entre as três testadas.

Para perfis eletroforéticos de MDH, no sistema 8, foram visualizadas duas regiões de atividade interpretadas como dois locos, ambos com atividade ótima. O loco 1, aquele de maior

CT/107, CNPA, dez./99, p.4

mobilidade em relação a origem, apresentou resolução regular e no loco 2 a resolução foi considerada boa. (Quadro 1). O loco 1 estava compreendido entre os rf's 29,2 e 21,3; no entanto não foi possível distinguir bandas. O loco 2 apresentou padrão de bandas típico de indivíduos heterozigotos de enzima dimérica (três bandas equidistantes, sendo a do centro de tonalidade mais escura que as duas da extremidade).

Os géis corados para esterase (EST) também apresentaram diferenças entre os locos, não havendo diferenças entre os sistemas 3 e 8 quanto a atividade e resolução nos dois locos visualizados (Quadro 1). Para a enzima 6PGDH o sistema escolhido foi o sistema 3 que embora tenha atividade menor do que no sistema 8 apresentou ótima resolução.

A atividade de ACP foi regular no sistema 6 e boa nos sistemas 3 e 8, sendo que a resolução foi ótima no sistema 3.

Considerando-se o conjunto de informações obtidas nos ensaios realizados conclui-se que para o uso da análise de eletroforese de isoenzimas em cultivares de algodão os sistemas-tampão gel/eletrodo de números 3 e 8, citados por Alfenas et al. (1991) são adequados para o uso em extratos de sementes, obtidos por maceração, na solução extratora (Marty et al., 1984) sendo que as enzimas Esterase, 6-fosfogluconato desidrogenase e fosfatase ácida, se aplicam ao sistema 3 e a enzima malato desidrogenase ao sistema 8.

**Tabela 2. Composição dos sistemas-tampão gel/eletrodo usados para a separação eletroforética de isoenzimas de algodão.**

Sistemas	Composição				
	Gel		pH	Eletrodo	
3	Tris - 0,008 M Ácido cítrico - 0,003 M		6,7	Tris - 0,223 M Ácido cítrico - 0,086 M	6,3
	Obs: pH ajustado com NaOH				
6	Tris - 0,446 M Ácido cítrico - 0,189 M		6,2	O mesmo do gel	
	Obs: Diluir 1:4 para uso				
8	Ácido cítrico - 0,04 M		7,1	O mesmo do gel (altera só o pH e não se dilui para uso)	6,1
	Obs: pH ajustado com N-(3-aminopropil) morfolina. Dilua 1:20 para uso.				

Fonte: Alfenas et al. 1991.

**Quadro 1. Avaliação de atividade (A) e resolução (R) de 5 enzimas em três sistemas-tampão gel/eletrodo, para o algodão (*Gossypium* spp.).**

Enzimas	Sistema 6		Sistema 3		Sistema 8	
	A	R	A	R	A	R
MDH	-	-	3	4	loco 1 1 loco 2 1	2 3
POX	0	-	0	-		
EST	3	-	loco 1 4 loco 2 1	loco 1 4 loco 2 3	Loco 1 4 loco 2 1	4 3
6PGDH	-	-	2	1	1	2
ACP	3	4	2	1	2	3

CT/107, CNPA, dez./99, p.5

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALFENAS, A.C.; PETERS, L.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Ed. Universitária da UFV, 1991. 242p.
- BOURNIVAL, B. L.; KORBAN, S.S. Electrophoretic analysis of genetic variability in the apple. **Sci. Hortic**, v.31, p.233-243, 1987.
- CARDY, B.J.; KANNENBEG, L. W. Allozymie variability among maize inbred lines hybrids. Applications for cultivar identification. **Crop Science**, v.22, p.1016-1020, 1982.
- CARDY, B. J.; STUBER, C. W.; AND GOODMAN, M. M. **Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.)**. Raleigh: North Carolina State University, 1981. 31p. (Institute of Statistics Mimeo Series nº 1317)
- CHELIAK, W. M.; PITEL, J.A. **Techniques for starch gel electrophoresis of enzyme from forest tree species**. [S.l.]: Patawawa National Forest Institute, 1984. 49p. (Canadian Forestry Service information.Report PI-X-42).
- MARTY, T. L.; O'MALLEY, D. M.; GURIES, R. P. **A manual for starch gel electrophoresis**. Madison: [s.n.],1984.24p. (Staff paper series, 20).
- MEDINA FILHO, H. P. **Eletroforese em gel de amido: Aplicação em genética e melhoramento de plantas**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1983. 15p. (IAC. Circular, 121).
- PAYNE, R. C.; KOSZYKOWASKY, T.J. Esterase isoenzyme differences in seed Extracts among soybean cultivares. **Crop Science**, Madison, v.8, n.18, p.557-559, 1978.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of alcohol dehydrogenase isozymes in maize. **Biochem. Genet**, v.1. p.1-8. 1967.
- YAMADA, M.M.; GURIES, R. P. A. **Manual for starch gel electrophoresis: New chocolate lovers edition**. Department of Forestry, Madison: University of Wisconsin, 1989. 22p. (Staff Paper Series, 39).
- WALL, J. R. Leucine aminopeptidase polymorphism in phaseolus and differential elimination of the donor parent genotype in interspecific backcrosses. **Biochem. Genet.**, v.2, p.109-118, 1968.