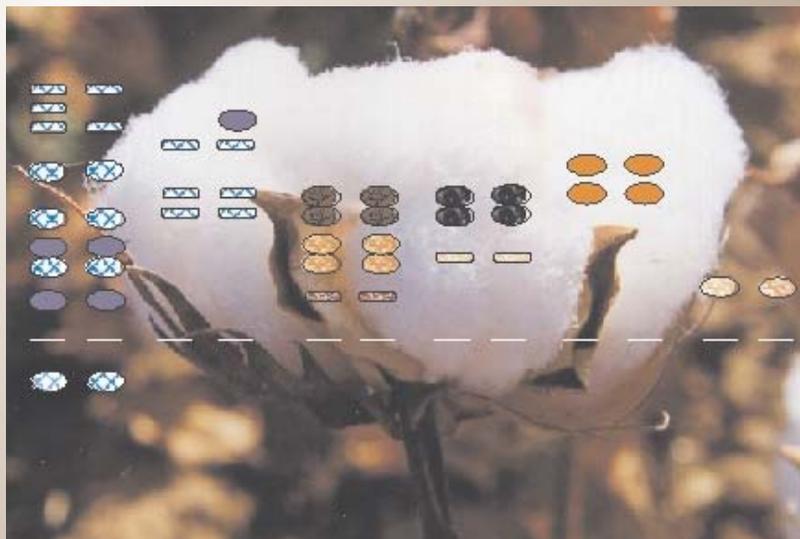


**AJUSTE METODOLÓGICO PARA  
CARACTERIZAÇÃO  
ISOENZIMÁTICA DE CULTIVARES  
DE ALGODÃO. I. GEL DE POLIACRILAMIDA**



**República Federativa do Brasil**

*Fernando Henrique Cardoso*  
**Presidente**

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Marcus Vinícius Pratini de Moraes*  
**Ministro**

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**

*Márcio Fortes de Almeida*  
**Presidente**

*Alberto Duque Portugal*  
**Vice-Presidente**

*Dietrich Gerhard Quast*  
*José Honório Accarini*  
*Sérgio Fausto*  
*Urbano Campos Ribeiral*

**Membros**

**Diretoria Executiva da Embrapa**

*Alberto Duque Portugal*  
**Diretor-Presidente**

*José Roberto Rodrigues Peres*  
*Dante Daniel Giacomelli Scolari*  
*Bonifácio Hideyuki Nakasu*  
**Diretores Executivos**

**Embrapa Algodão**

*Eleusio Curvelo Freire*  
**Chefe Geral**

*Alderí Emídio de Araújo*  
**Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento**

*José Gomes de Souza*  
**Chefe Adjunto de Administração**

*Odilon Reny Ribeiro Ferreira da Silva*  
**Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios**



ISSN 0103-0841  
Março, 2000

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 42***

### **Ajuste Metodológico para Caracterização Isoenzimática de Cultivares de Algodão. I. Gel de Poliacrilamina**

Roseane Cavalcanti dos Santos  
Julita Maria Chagas Frota Carvalho  
Márcia Barreto de Medeiros Nóbrega  
Rosa Maria Mendes Freire  
Edna Lopes Cabral  
Sérgio Eduardo Rodrigues

Campina Grande, PB.  
2000

4

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão  
Rua Osvaldo Cruz 1143, Centenário  
Caixa Postal 174  
Telefone (083) 321-3608  
Fax (083) 322-7751  
58107-720 - Campina Grande, PB  
E-mail: algodao@cnpa.embrapa.br  
http://www.cnpa.embrapa.br

Comitê de Publicações:

Presidente: Alderi Emídio de Araújo  
Secretária: Nívia Marta Soares Gomes  
Membros: Eleusio Curvelo Freire  
José da Cunha Medeiros  
Francisco de Souza Ramalho  
José Mendes de Araújo  
Lúcia Helena Avelino Araújo  
José Wellington dos Santos  
Malaquias da Silva Amorim Neto

Supervisor Editorial: Nívia Marta Soares Gomes  
Revisão de Texto: Roseane Cavalcanti dos Santos  
Tratamento das Ilustrações: Oriel Santana Barbosa  
Capa: Flávio Tôrres de Moura/Maurício José Rivero Wanderley  
Editoração Eletrônica: Oriel Santana Barbosa

**1ª Edição**

1ª Impressão (2000): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

---

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Algodão (Campina Grande, PB)

Ajuste metodológico para caracterização isoenzimática de cultivares de algodão. I. Gel de poli(acrilamida), por Roseane Cavalcanti dos Santos e outros. Campina Grande, 2000.

19p. (EMBRAPA-CNPA. Boletim de Pesquisa, 42).

1. Algodão- Cultivares - Caracterização Isoenzimática. I. Santos, R. C. dos II. Nóbrega, M. B. de M.; III. Freire, R.M.M.F.; IV. Carvalho, J. M. F.; V. Cabral, E.L.; VI. Rodrigues, S.E.; VII. Título. VIII. Série.

---

CDD 633.51

©Embrapa 2000

## Sumário

Resumo .....	6
Abstract .....	8
Introdução .....	9
Metodologia.....	10
Resultados e Discussão .....	13
Conclusões .....	17
Referências Bibliográficas .....	17

# **Ajuste Metodológico para Caracterização Isoenzimática de Cultivares de Algodão. I. Gel de Poliacrilamina**

---

Roseane Cavalcanti dos Santos<sup>1</sup>  
Márcia Barreto de Medeiros Nóbrega<sup>2</sup>  
Rosa Maria Mendes Freire<sup>3</sup>  
Julita Maria Chagas Frota Carvalho<sup>2</sup>  
Edna Lopes Cabral<sup>4</sup>  
Sérgio Eduardo Rodrigues<sup>5</sup>

## **Resumo**

A presença de compostos fenólicos liberados na maceração dos tecidos é um dos grandes problemas encontrados na extração de proteínas. As metodologias convencionais utilizadas para algumas espécies herbáceas, em geral, não se ajustam a esta malvácea. Visando-se estabelecer um protocolo eficiente e confiável para a aplicação da técnica eletroforética em estudos genéticos e evolutivos do algodão, ajustou-se uma metodologia de extração e coloração enzimática para a cultura através da eletroforese em gel de poliacrilamida. Utilizaram-se neste estudo, duas cultivares de algodão com composição genética diferente, para minimizar as dúvidas quanto à detecção ou ausência de determinada enzima. O experimento foi conduzido no Laboratório de Genética da UFRPE. Os tecidos estudados foram folhas e raízes coletadas aos 10 dias após a emergência, e as sementes, coletadas ao final do ciclo da cultura do algodão.

---

<sup>1</sup> Eng. agrôn., M.Sc., da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143 - Centenário - CEP 58107-720, Campina Grande, PB. E-mail: caval@cnpa.embrapa.br

<sup>2</sup> Eng. agrôn., D.Sc., da Embrapa algodão. E-mail: marcia@cnpa.embrapa.br; julita@cnpa.embrapa.br

<sup>3</sup> Química Industrial da Embrapa Algodão. E-mail: rosa@cnpa.embrapa.br

<sup>4</sup> Estagiária, estudante Ciências Biológicas, UFRPE, Recife, PE

<sup>5</sup> Bolsista, Assistente técnico, FACEPE-IPA, Recife, PE

Para o ajuste do método, fizeram-se os testes de escolha das melhores soluções de extração e de concentração do gel e o ajuste da metodologia de coloração enzimática e protéica. Os testes foram realizados com cinco repetições para cada sistema estudado (EST, POX, ACP, ALP, MDH, LAP e PT). A solução de extração NaCl 0,15 M pH 7,1 foi a indicada para sementes, raízes e folhas de algodão e a concentração do gel, 7 %, podendo ser usada para a maioria dos sistemas estudados. Todos os cinco sistemas estudados apresentaram atividade enzimática nos tecidos do algodoeiro. As variantes obtidas pelo sistema MDH são capazes de diferenciar as cultivares, tanto em número, quanto em atividade enzimática em sementes, raízes e folhas novas; no sistema PT, a diferenciação ocorreu apenas nas sementes.

# Establishment of Methodological Isoenzyme Characterization of Cultivars of Cotton. I. Polyacrylamide Gel

---

## Abstract

The presence of phenolic compounds released in tissue maceration is one of the major problems encountered in the extraction of proteins. The conventional methods used for some herbaceous species, in general, do not fit this malvacea. Aiming to establish an efficient and reliable protocol for the application of electrophoretic in genetic and evolutionary studies of cotton, it was established a method of extraction and colouring enzyme for culture through the polyacrylamide gel electrophoresis. It was used in this study, two varieties of cotton with different genetic background in order to minimize the doubts about the failure to detect the presence or absence of a specific enzyme. The experiment was conducted in the UFRPE's Genetic laboratory. The tissues studied were leaves and roots at 10 days after emergence, and seeds collected at the end of the cycle of the cotton crop. For the adjustment of the method, tests were done to choose the best solutions for extraction and concentration of the gel and adjustment of the methodology of colouring enzyme and protein. The tests were conducted with five repetitions for each system studied (EST, POX, ACP, ALP, MDH, LAP and PT). The solution of 0.15 M NaCl extraction pH 7.1 was indicated for the seeds, roots and leaves of cotton and the concentration of the gel, 7% can be used for most systems studied. All five systems studied showed enzyme activity in the tissues of cotton. The variants obtained by the MDH system are able to differentiate the varieties, both in number, as in enzyme activity in the seeds, roots and young leaves; in the PT system, the differentiation occurred only in seeds.

**Index terms:** *Gossypium hirsutum*, plant tissues, electrophoretic systems, enzyme activity

## Introdução

A técnica da eletroforese é um método bastante utilizado para determinação do número e da quantidade de proteínas presentes numa mistura, como para determinação de diferentes enzimas baseados nas diferenças de suas cargas elétricas, tamanho ou configurações, os quais afetam sua mobilidade em determinado campo elétrico (SANTOS, 1989). O padrão representado por bandas coloridas no gel dá indicação das áreas localizadas de proteínas não catalíticas ou de enzimas de uma reação particular. As diferenças na mobilidade eletroforética das proteínas podem resultar de alterações na seqüência de seus aminoácidos, determinados por modificações de seqüências nucleotídicas de genes estruturais; assim, as variações eletroforéticas são o resultado direto de diferenças genéticas (BURDON; MARSHALL, 1983).

O fracionamento protéico através da eletroforese fundamenta-se na passagem de corrente elétrica, através de um meio condutor, onde está aplicada uma mistura de proteínas, assim como na porosidade do meio suporte e no tamanho da molécula (FALCÃO, 1984). Quando a migração eletroforética é finalizada, o gel é submetido a uma mistura de reação que contém um corante e um substrato, no caso de coloração de enzimas. Como resultado da reação, forma-se um complexo colorido e insolúvel no gel, facilmente visualizado como bandas coloridas e que denotam os pontos de migração das proteínas estudadas. O padrão de bandas obtido é considerado fenótipo e analisado como teste genético com o qual se determinam as regiões codificadas por alelos de um único loco e as especificadas por genes de diferentes locos (HUBBY; LEWONTIN, 1966). A análise genética é altamente simplificada, devido ao fato de que as bandas quase sempre se revelam como fatores mendelianos simples.

No melhoramento de plantas, a caracterização de cultivares através de análises eletroforéticas tem-se constituído numa ferramenta de grande contribuição, uma vez que as variações detectadas funcionam como excelentes marcadores genéticos, capazes de diferenciá-las quanto à espécie do tipo de reprodução ou pureza varietal, utilizando-se tecidos de qualquer idade ou fase de desenvolvimento.

Com a cultura do algodão, vários são os trabalhos disponíveis na literatura, utilizando-se essa técnica tanto para identificação de cultivares quanto para esclarecimento de afinidades filogenéticas entre espécies. Entre os de relevância nesta área, citam-se os de Johnson e Thein (1970) que estimaram as afinidades evolutivas em 25 espécies de *Gossypium*, determinando bandas homólogas entre os acessos estudados; os de Khashimov et al. (1990) que estudaram 11 espécies selvagens de algodão e estabeleceram um padrão de banda referencial para as espécies estudadas, inclusive a extensão de variabilidade inter e intra espécie. Na área tecnológica, Dadabaev et al. (1995) demonstraram que as peroxidases das fibras do algodão têm várias formas moleculares, sendo as espécies de *G. Barbadense* diferentes das de *G. hirsutum*, considerando-se o padrão de intensidade e presença de bandas nos materiais estudados.

Embora essa técnica possa contribuir com várias linhas de estudos genético-bioquímicos com essa cultura, a presença de compostos fenólicos, liberados durante a maceração dos tecidos, é um dos grandes problemas encontrados na extração de proteínas, uma vez que eles reagem com as mesmas inativando as enzimas ou alterando sua mobilidade; a obtenção de variantes eletroforéticas com o algodão apresenta algumas dificuldades, de modo que as metodologias convencionais utilizadas para algumas espécies herbáceas geralmente não se ajustam a esta malvacea.

Desta forma e se levando em consideração a importância de se estabelecer um protocolo eficiente e confiável para aplicação dessa técnica nos estudos genéticos e evolutivos do algodão, o presente trabalho objetivou ajustar uma metodologia de extração e coloração enzimática para a cultura, através da eletroforese em gel de poliacrilamida.

## Metodologia

Para realização desse estudo, foram escolhidas previamente duas cultivares de algodão com composição genética diferente, visando minimizar as dúvidas quanto à detecção ou ausência de determinada enzima, no momento de sua revelação. As cultivares escolhidas foram CNPA 7H (*Gossypium hirsutum* var. latifolium) e CNPA 7MH (*Gossypium hirsutum* var. Marie Gallant) cultivadas em casa de vegetação, em potes de barro (10 kg) contendo solo de textura franco-

arenosa e previamente adubado em função das necessidades reveladas através dos resultados da análise de material do solo. Em cada vaso foram deixadas duas plantas, perfazendo o total de 5 vasos/cultivar, os quais foram distribuídos ao acaso nas bancadas; as plantas foram irrigadas com água destilada, diariamente, ao longo do experimento, mantendo-se na capacidade de campo, enquanto os dados médios de temperatura máxima e mínima e umidade relativa do ar, registrados durante o ciclo da cultura, dentro da casa de vegetação, foram de 30 °C, 23 °C e 70%, respectivamente; os tecidos estudados foram folhas e raízes, aos dez dias após o plantio, e sementes coletadas no final do ciclo da cultura.

Para ajustar a metodologia de separação de proteínas e enzimas em algodão, foram realizados os seguintes testes:

- a) escolha da melhor solução de extração: para verificar a melhor solução de extração, testaram-se, individualmente, 2 ml das seguintes soluções-tampão, acrescidos de 0,02 g de PVP + 0,02 g de sacarose: NaCl 0,15M pH 7,1, Tampão fosfato de potássio, 0,1M pH 6,0 e Tampão A + B (9:1) (Tabela 1) em 500 mg de endosperma da semente das cultivares 7H e 7MH, macerados durante 1 min em almofariz sobre gelo; a seguir, os extratos foram centrifugados a 7.000 rpm/15min;
- b) escolha da melhor concentração do gel de poliacrilamida: o gel foi testado em três concentrações: 6, 7 e 8%, seguindo-se a metodologia descrita por Santos (1989) e Schifino-Wittmann et al. (1996). As amostras foram colocadas no gel horizontal através de papel Whatman, n.º 3 (0,4 cm x 0,5 cm) e as migrações mantidas em refrigerador, a uma diferença de potencial de 8,8 volts/cm de gel, até que o marcador de azul de bromofenol se distava 8 cm do ponto de aplicação da amostra;
- c) ajuste nas metodologias de coloração enzimática e protéica: os sistemas estudados foram os seguintes: esterase (EST), peroxidase (POX), fosfatase ácida (ACP), fosfatase alcalina (ALP), malato desidrogenase (MDH), leucina aminopeptidase (LAP) e proteínas totais (PT). Os métodos de coloração tiveram, como base, as metodologias descritas por Alfenas et al. (1991) e Santos (1989); os ajustes foram procedidos a medida em que se analisava a resolução dos padrões de banda obtidos, através das cinco repetições para cada sistema estudado.

**Tabela 1.** Soluções tampão e composição do gel utilizados para eletroforese em algodão.

SOLUÇÃO TAMPÃO DO GEL E DE CORRIDA			
Tampão A		Tampão B	
Lítio-borato (pH 8,3 - 0,2M)	-	Tris-citrato (pH 8,3-0,2M)	-
Hidróxido de lítio	1,2 g	Tris	6,20 g
Ácido bórico	11,89 g	Ácido cítrico	1,60 g
Água destilada (q.s.p.)	1.000 ml	Água destilada (q.s.p.)	1000 ml
Composição do gel			
	6%	7%	8%
Acrilamida	4,56 g	5,32 g	5,70 g
Bis Acrilamida	0,24 g	0,28 g	0,30 g
Sol. Persulfato de amônia (10%)	0,8 ml	0,8 ml	0,8 ml
TEMED	0,08 ml	0,08 ml	0,08 ml
Tampão A	8,0 ml	8,0 ml	8,0 ml
Tampão B	72,0 ml	72,0 ml	72,0 ml
POX			
3-Amino-9-etil-carbazole			130 g
Dimetilformamida			5 g
CaCl <sub>2</sub> 1M			2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)			4 gotas
T.Acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0			85 ml
MDH		EST	
Ácido Málico	210 mg	Água destilada	40 ml
NAD <sup>+</sup>	2 ml	α naftil acetato	3 ml
MTT	2 ml	β naftil acetato	3 ml
PMS	2 ml	Fast blue RR salt	40 mg
Tris-HCl 0,1 M pH 8,5	15 ml	T.Fosfato monobásico pH 4,3; 0,2M	50 ml
Água destilada (q.s.p.)	100 ml	T. Fosfato dibásico pH 9,2; 0,2M	10 ml
ACP		PT	
α Naftil fosfato ácido de sódio	100 mg	Azul brilhante de Cromassie	1,25 g
Fast Garnet GBS salt	200 mg	Água destilada	227 ml
MgCl <sub>2</sub> (1%)	1 ml	Metanol	227 ml
T.Acetato de sódio 0,1M; pH 5,0	100 ml	Ácido acético	46 ml
COLORAÇÃO DE ENZIMAS PARA RAÍZES E FOLHAS			
POX		EST	
3 - Amino - 9 etil - carbazole	97 mg	Água destilada	40 ml
Dimetilformamida	5 mg	α Naftil acetato	3 ml
CaCl <sub>2</sub> 1M	2 ml	Fast blue RR salt	40 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	4 gotas	T.Fosfato monobásico pH 4,3; 0,2M	50 ml
T.Acetato de sódio 0,2M, pH 5,0	85 ml	T.Fosfato dibásico pH 9,2; 0,2M	10 ml
LAP		ACP	
L - Leucina - β naftilamida	20 mg	α Naftil fosfato ácido de sódio	100 mg
Dimetilformamida	5 ml	Fast Garnet GBS salt	75 mg
Fast Garnet GBS	75 mg	MgCl <sub>2</sub> (1%)	1 ml
T.Fosfato de potássio 0,1MpH	100 mg	-	-
MDH			
Ácido Málico			210 mg
NAD <sup>+</sup>			2 ml
MTT			2 ml
PMS			2 ml
Tris-HCl0,1MpH			15 ml
Água destilada			100 ml

A análise dos dados obtidos para cada sistema foi efetuada comparativamente entre as cultivares estudadas, utilizando-se zimogramas e obedecendo-se aos procedimentos descritos por Quiros (1980).

## **Resultados e Discussão**

### **a) Solução-Tampão**

As três soluções-tampão testadas ofereceram, praticamente, o mesmo resultado: assim, para o andamento da pesquisa, escolheu-se a solução NaCl 0,15M, pH 7,1, por se tratar de menor custo, mais fácil de preparar e, também, por ser habitualmente utilizada nas rotinas do laboratório. A composição do gel que permitiu melhor resolução foi a 7%; em dois sistemas, contudo, melhores resultados foram obtidos a 6% e 8%, ambos em extratos de sementes. As formulações utilizadas para soluções tampão e composição do gel encontram-se na Tabela 1.

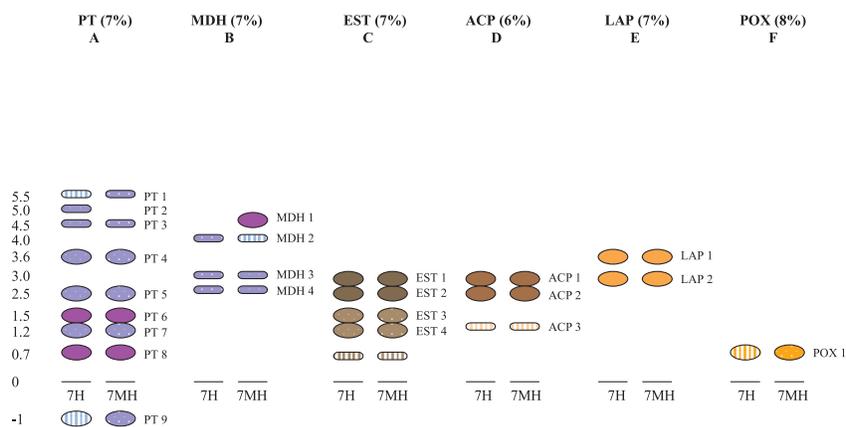
### **b) Resoluções do Gel**

A metodologia de coloração dos sistemas enzimáticos que proporcionam melhores resoluções para o algodão, encontra-se na Tabela 1. Após a realização de vários testes utilizando-se a metodologia básica descrita por Alfenas et al. (1981) e Santos (1989) estabeleceram-se pequenas modificações na quantidade de corante de algumas enzimas, como LAP, POX e ACP, o que possibilitou melhor visualização das mesmas.

### **c) Padrão eletroforético em tecidos de sementes**

Os melhores perfis obtidos nos seis sistemas enzimáticos em tecidos de sementes e suas respectivas concentrações do gel encontram-se na Figura 1; a coloração de cada sistema refere-se à atividade específica flagrada após a revelação.

- Proteínas Totais (PT): Nove bandas foram detectadas para a cultivar CNPA 7H e oito para a CNPA 7MH; ambas apresentaram banda de mobilidade negativa



**Fig. 1.** Padrões de PT, MDH, EST, ACP, LAP e POX em tecidos de sementes de algodão. Intensidade de coloração: Forte, ■ Regular, ▨ Fraca ▮▮▮▮

(Figura 1A); basicamente, as cultivares apresentaram padrão de coloração semelhante, em que a exceção foi a banda PT2, situada a 5 cm do ponto de aplicação, visualizada apenas na CNPA 7H sendo, portanto, diferenciadora entre as cultivares estudadas (Fig. 1A).

- Malato desidrogenase (MDH): Tal como no padrão anterior, esse sistema também revelou uma banda diferenciadora, nesse caso a mais rápida (MDH1) situada a 4,5 cm da origem, que apresentou alta atividade na cultivar CNPA 7MH; nas demais regiões visualizadas, observou-se grande similaridade entre as cultivares, com pequena exceção na fraca coloração da MDH2 da CNPA 7MH (Fig. 1B).
- Esterase (EST), Fosfatase ácida (ACP) e Leucina aminopeptidase (LAP): produziram, respectivamente, 5, 3 e 2 bandas sem, contudo, quaisquer distinção qualitativa ou quantitativa entre as duas cultivares (Fig. 1C, D e E). Os resultados obtidos com a ACP, em quaisquer concentrações do gel, geraram uma intensa atividade de coloração, em que, apenas do gel de 6% foi possível visualizar as regiões eletroforéticas dessa enzima.
- A falta de variabilidade nos padrões obtidos com a EST, ACP e LAP nos tecidos de sementes denota que, em estudo de caracterização isoenzimática em cultivares de algodão com lastro de diferenciação evolutiva a nível infra-

específico, a contribuição na diferenciação dos acessos através desses sistemas pode ser pequena; em linhagens segregantes, contudo, onde a carga de heterosigosidade é elevada, a possibilidade de se obter diferenciação entre as variantes quali e quantitativas torna-se bem maior, desde que exista variabilidade suficiente entre os parentais envolvidos no processo de hibridação. Com relação à LAP, alguns autores não a têm indicado para estudos de caracterização e classificação de germoplasma vegetal devido à pouca variação detectada nos genótipos; entretanto, afirmam que ela responde a mudanças ambientais e, neste caso, produzem variabilidade suficiente para serem utilizadas nas técnicas genético-bioquímicas (DUARTE, 1995; SANTOS et al., 1997).

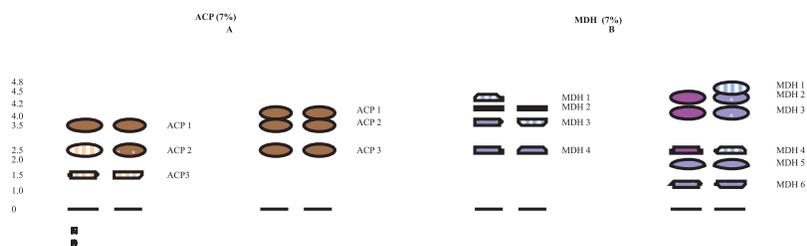
- Peroxidase (POX): a presença dessa enzima na semente da CNPA 7H e da CNPA 7MH foi detectada em apenas uma banda, situada a 1,0 cm da origem, sendo de fraca resolução na 7H e normal na 7MH (Fig. 1F). Entre as três concentrações de gel estudadas, apenas na de 8% é que foi possível melhor visualizar essa enzima.

#### d) Padrão eletroforético em tecido de raízes e folhas

Nas Figuras 2 e 3 encontram-se os perfis obtidos nos cinco sistemas enzimáticos em tecidos de raízes e folhas de algodão e suas respectivas concentrações do gel.

- Fosfatase ácida: Três bandas de ACP foram visualizadas para cada cultivar nos tecidos de raízes e folhas, sendo que as situadas a 2,5 e 3,5 cm da origem foram comuns a ambos os tecidos (Fig. 2A); a situada a 1,5 cm da origem, contudo, foi visualizada apenas nas raízes e a situada a 4,0 cm apenas nas folhas; esse sistema, tal como visto no padrão de sementes, revelou-se muito fortemente corado; é possível existir mais uma banda na faixa entre 2,5 e 3,5 cm no padrão de raízes das duas cultivares e acima de 4,2 cm nas folhas; a alta atividade da enzima na idade dos tecidos estudados não permitiu constatar com confiabilidade, nenhuma das cinco repetições procedidas nesse sistema.
- Malato desidrogenase: Esse sistema permitiu a separação das cultivares e dos tecidos, demonstrando ser de grande utilidade para estudos de caracterização

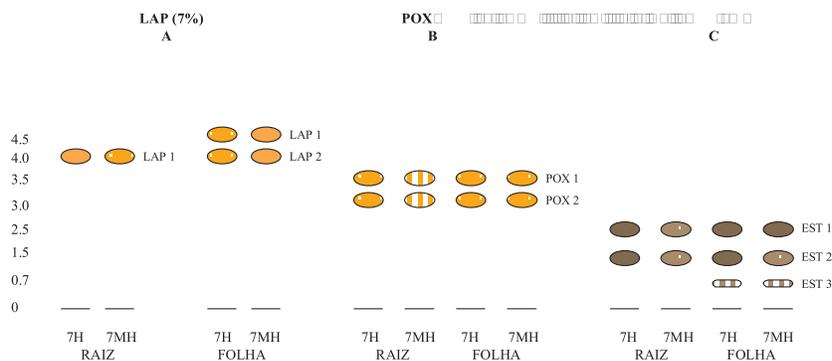
varietal no algodão. Em cada tecido, as cultivares apresentaram a banda diferenciadora situada a 4,5 cm da origem na CNPA 7H e a 4,8 cm na CNPA 7MH (Fig. 2B).



**Fig. 2.** Padrões de ACP e MDH em tecidos de raízes e folhas de algodão. Intensidade de coloração: Forte, ■ Regular, ▣ Fraca □

- Leucina aminopeptidase, Peroxidase e Esterase: os padrões obtidos com esses sistemas revelaram, em sua maioria, variações apenas na intensidade da atividade enzimática (Figs. 3A, 3B, e 3C). Esses resultados, contudo, não indicam que as mesmas apresentem limitada contribuição em trabalhos de caracterização e classificação de germoplasma de algodão. Pelo contrário, a POX e a EST têm sido largamente utilizadas por vários autores em estudos para esse fim. Cabe ser ressaltado, contudo, que as enzimas apresentam especificidade tissular, podendo ser encontradas em vários compartimentos da célula, variando não apenas com o tecido, mas principalmente com a fase ontogenética em que o mesmo é estudado.

O presente trabalho limitou-se ao estudo de três tecidos, sementes, raízes e folhas; nesses dois últimos, os padrões encontrados referem-se apenas a determinada fase de crescimento. Como o objetivo principal da referida pesquisa foi ajustar metodologia completa de eletroforese para o algodoeiro, os resultados aqui obtidos serviram para esse propósito; para posteriores trabalhos de caracterização, no entanto, faz-se necessário a análise de outros tecidos e até de outros tecidos sistemas, sincronizando com as várias fases de desenvolvimento ontogenético da cultura, o que tornará possível determinar-se, de modo prático e econômico, o sistema (enzima x tecido x fase) mais responsivo para a proposta de caracterização.



**Fig. 3.** Padrões de LAP, POX e EST em tecidos de raízes e folhas de algodão. Intensidade de coloração: Forte, ■ Regular, ■ Fraca □□□□

### Conclusões

- 1- A solução de extração NaCl 0,15M, pH 7,1 é indicada para sementes, raízes e folhas de algodão; a composição do gel a 7% pode ser usada para a maioria dos sistemas enzimáticos estudados em algodão;
- 2- todos os cinco sistemas estudados apresentaram atividade enzimática nos tecidos do algodoeiro;
- 3- as variantes obtidas através do sistema MDH são capazes de diferenciar as cultivares, tanto em número quanto em atividade enzimática, nos tecidos de sementes e raízes e folhas novas; no sistema PT, essa diferenciação ocorre apenas nos tecidos de sementes.

### Referências Bibliográficas

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Ed. Universitária da UFV, 1991. 242p.

BURDON, J.J.; MARSHALL, D. R. **The use of isoenzyme in plant genetics and breeding**. Amsterdã: Elsevier, 1983. p.401-411.

DADABAEV, B.N.; GOLUBENKO, Z.; AKHUNOV, A.A. Peroxidase isoenzymes in cotton fiber. **Chemistry of natural compounds**, v. 31, n.1, p. 127-128, 1995.

DUARTE, J.M. **Caracterização eletroforética de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) resistente à seca e cultivado em condições normais**. Areia: UFPB, 1995. 79p. Tese de Graduação.

FALCÃO, T.M.M. de A. **Polimorfismo protéico em populações naturais de abelhas brasileiras**. Ribeirão Preto: USP, 1984. 231p. Tese de Doutorado.

HUBBY, J.; LEWONTIN, R.C. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles of different loci in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v.14, p.577-594, 1966.

JOHNSON, B.L.; THEIN, M.M. Assessment of evolutionary affinities in *Gossypium* by protein electrophoresis. **American Journal of Botany**, v. 57, n.9, p.1081-1092, 1970.

KHSHIMOV, D.A.; DZHALILOV, B.D.; YULDASHEV, P. KH.; ALIKHODZHAEVA, S.S. EGAMBERDIEV, A.E.; SHOAKHMEDOVA, G.S.; SOZINOV, A.A. Comparative study of the seed proteins of wild cotton species. **Tsitologiya i Genetika**, v.24, n. 1, p. 56-61, 1990.

QUIROS, C.F. Identification of alfalfa plants by enzyme electrophoreses. **Crop Science**, v. 20, p. 262-264, 1980.

SANTOS, R.C. dos. **Investigação genético bioquímica de cultivares de feijão resistentes e suscetíveis à antracnose**. Recife:UFRPE,1989. 89p. Tese de Mestrado.

SANTOS, R.C. dos; MOREIRA, J. de A.N.; CABRAL, E.L. Estudo da peroxidase na fenologia do amendoim submetido do estresse hídrico. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v.1, n.1, p. 117-124, dez. 1997.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; FREITAS, L.H.C.; SIMIONI, C. Isoenzymeatic characterization of hybrids between *Leucaena leucocephala* and *Leucaena diversifolia* ssp. *diversifolia* grown in Rio Grande do Sul (Southern Brazil). **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, n.3, p. 475-478, 1996.

**Embrapa**

---

**Algodão**

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento