

CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE TRIGO (*Triticum aestivum*) ATRAVÉS DE PADRÕES ELETROFORÉTICOS ESTERÁDICOS

TÂNIA M. M. DE ARRUDA FALCÃO

Prof. Adjunto - 4, Área de Genética - Departamento
de Biologia - UFRPE.

MARIA IRENE B. DE MORAES FERNANDES

Pesquisadora do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo-
EMBRAPA.

Padrões eletroforéticos de esterases de coleóptilo e de radícula de cinco cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) foram estudadas (Frontana, IAS 20, IAS 54, IAS 59 e Maringá). Todas as cultivares apresentaram entre si zonas esterásicas comuns. Todavia, tomando o conjunto de zonas protéicas revelado, para cada cultivar foi observado um padrão eletroforético peculiar, o que tornou possível a identificação das mesmas.

INTRODUÇÃO

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos graças a utilização da técnica de eletroforese, mediante análise de padrões isoenzimáticos (Johnson e Hall, 1966; Peirce e Brewbaker, 1973; Costa, 1974; Fedak, 1974; Falcão, 1984; Santos, 1989; Paula, 1993, entre outros). Estudos filogenéticos e sistemáticos; identificação de espécies, populações e cultivares; estudos de ligação; investigações sobre doenças de plantas e polimorfismos genéticos são alguns dos problemas abordados.

Segundo Fedak (1974), diferenças genéticas identificáveis em zimogramas podem servir como marcadores moleculares e auxiliar na identificação de cultivares. Vários sistemas enzimáticos têm sido empregados em estudos desta natureza, tais como, esterase, aminopeptidase, peroxidase e fosfatase ácida (Fedak e Rajhathy, 1972; Singh, Jain e Qualset, 1973; Laberge, Kruger e Meredith, 1973; Quiros, 1980; Santos, 1989, entre outros).

As esterases, por pertencerem a um grupo heterogêneo e complexo de enzimas que apresentam baixa especificidade de substrato, dado que hidrolizam *in vitro* um grande número de ésteres, embora em diferentes taxas, são muito importantes em estudos de caracterização genética.

Bassiri (1976), utilizando padrões eletroforéticos para esterases, fosfatase e peroxidase para identificar cultivares de cevada, observou que o maior número de zonas era revelado para esterases e que o sistema esterásico podia ser usado como único referencial para a detecção de variantes na maioria das cultivares. Conclusão semelhante foi obtida por Pontikis, Loukas e Kousonis (1980) em estudo de caracterização de oliveiras. Schwennesen, Mielke e Wolfe (1982) detectaram diferenças qualitativas nos padrões esterásicos de sementes de videiras, úteis para a identificação de cultivares destas. Recentemente, Paula (1993), utilizando os sistemas esterase, superóxido dismutase, peroxidase e proteínas totais para a caracterização de cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) do Banco Germoplasmático da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), conclui que o sistema esterásico foi o mais relevante para tal definição.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinco cultivares de trigo (*T. aestivum*), Frontana, IAS 20, IAS 54, IAS 59 e Maringá, procedentes do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, foram utilizadas.

Vinte sementes de cada cultivar foram colocadas para germinar em placas de Petri, durante sete dias, a uma temperatura de 25°C. Previamente, as sementes ficaram imersas em 5ml de líquido de DAKIN, por quinze minutos, a fim de evitar contaminação por fungos.

Coleóptilo (com plúmula) e radícula foram os tecidos escolhidos para as análises. Os extratos do material foram preparados manual e individualmente utilizando-se 1ml de tampão para cada 1 cm de tecido. O tampão utilizado na maceração foi preparado na proporção de 9 partes do tampão B para 1 parte do Tampão A, segundo Scandalios (1969):

Tampão A - Borato de Lítio 0,2M pH 8,3

| | |
|---------------------------------|--------|
| Hidróxido de lítio. | 1,2g |
| Ácido bórico (anidro). | 11,89g |
| Para 1 litro de água destilada. | |

Tampão B - Tris-citrato 0,2M pH 8,3

| | |
|---------------------------------|------|
| Tris. | 6,2g |
| Ácido cítrico. | 1,6g |
| Para 1 litro de água destilada. | |

A técnica empregada foi a eletroforese em gel de amido, sistema horizontal. Na preparação de gel os tampões A e B foram empregados na proporção de 9 partes de B para 1 parte de A. Nas cubas foi utilizado o tampão A.

Os géis de amido eram preparados sob aquecimento, deaerados com auxílio de bomba de vácuo e colocados em placas de vidro de 16 x 10 cm até o resfriamento total, em câmara fria a 4°C. Posteriormente eram delimitados os orifícios para aplicação das amostras. Os extratos de tecidos eram aplicados em papel de filtro qualitativo Whatman 3M.

A eletroforese era processada a 4°C, com uma diferença de potencial mantida em torno de 12V/cm de gel, até que a linha de frente, delimitada pelo corante utilizado, atingisse 9cm do ponto de aplicação das amostras.

Para a revelação das esterases (alfa e beta) os géis eram mergulhados por uma hora, a 37°C, numa mistura de reação composta por 20ml de água destilada, 25ml de tampão fosfato (monobásico) 0,2M pH 8,3; 5ml de tampão fosfato (dibásico) 0,2M pH 8,3; 40mg do corante Fast Blue RR Salt; 2ml de alfa-nafil acetato e 2ml de beta-mafil acetato.

Após a revelação, os géis eram lavados em água destilada e fixados, por 15 minutos, a temperatura ambiente, numa solução de álcool metílico, água destilada e ácido acético na proporção de 5:5:1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme pode ser observado nos zimogramas mostrados nas figuras 1 e 2, as cinco cultivares de trigo estudadas foram diferenciadas entre si pelos padrões esterásicos apresentados.

Com o propósito de reduzir o erro experimental, as zonas fracamente coradas e não reveladas para todos os indivíduos amostrados de uma cultivar foram excluídas dos padrões.

As zonas esterásicas com mobilidades relativas (Mr) de 0,94; 0,46 e 0,40 (Figuras 1 e 2) foram observadas em indivíduos de todas as cinco cultivares, embora em alguns casos a intensidade de coloração das

mesmas tenha sido diferenciada. Estas regiões foram observadas tanto em tecido de coleóptilo quanto de radícula.

Todas as cinco cultivares foram definidas em função de seus padrões para esterases, o que significa dizer que para cada cultivar foram detectadas zonas características. Assim, por exemplo, para coleóptilo, a zona de $M_r=0,73$ só foi visualizada em amostras da cultivar Maringá, e a região de $M_r=0,55$ para a cultivar IAS 59.

Não foi possível distinguir entre as alfa-esterases e as beta-esterases.

Os diferentes padrões esterásicos observados entre as cultivares levam a inferência de que estas diferem quanto a suas composições gênicas ou, ainda, que possa haver ativação diferencial dos genes responsáveis por certas esterases nestas cultivares. Independentemente da causa, estas diferenças podem ser utilizadas na caracterização de cultivares, posto que representam diferenças genéticas.

As zonas esterásicas de mobilidades relativas iguais a 0,94; 0,46 e 0,40, constantes em todas as cinco cultivares estudadas, devem refletir a atividade de esterases indispensáveis ao metabolismo das mesmas, na fase do desenvolvimento e tecidos analisados.

As diferenças quantitativas observadas entre as cultivares, indicadas por diferenças quanto a intensidade de coloração das zonas reveladas, podem estar relacionadas com diferença no número de moléculas protéicas produzidas ou podem decorrer de diferença na ativação das moléculas no interior das células.

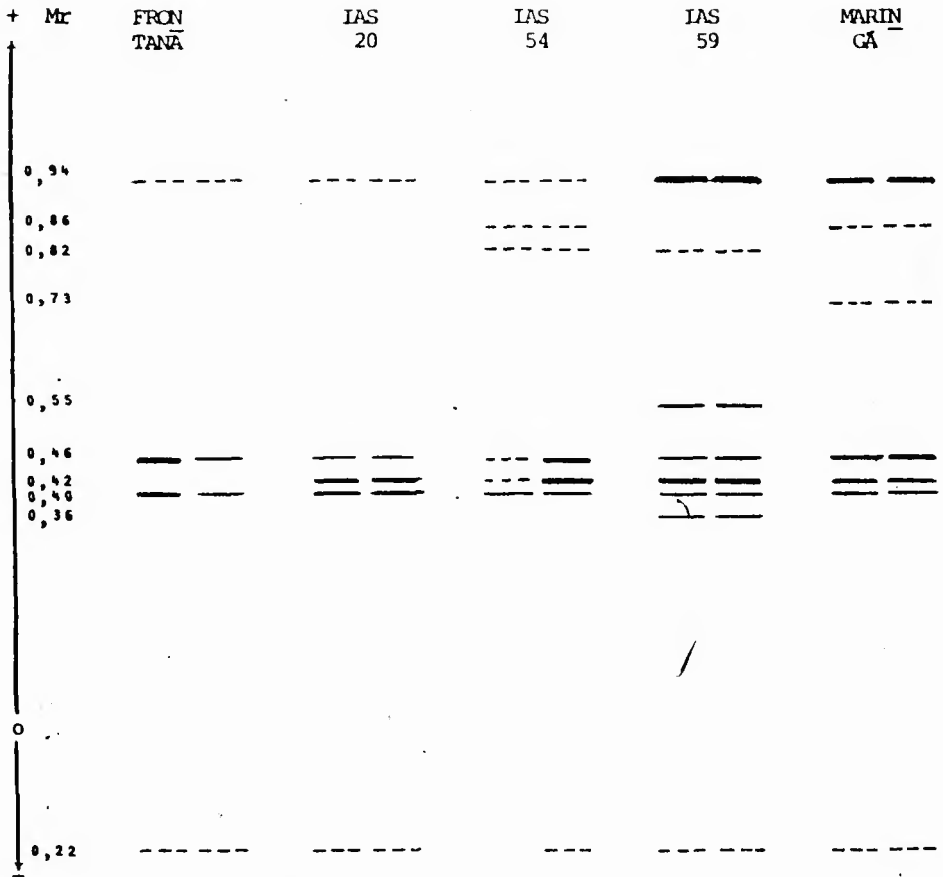


FIGURA 1. Padrões eletroforéticos de esterases de coleóptilo + plúmula de cinco cultivares de *T. aestivum*. A intensidade da representação indica diferenças quantitativas. As setas indicam o sentido da migração.

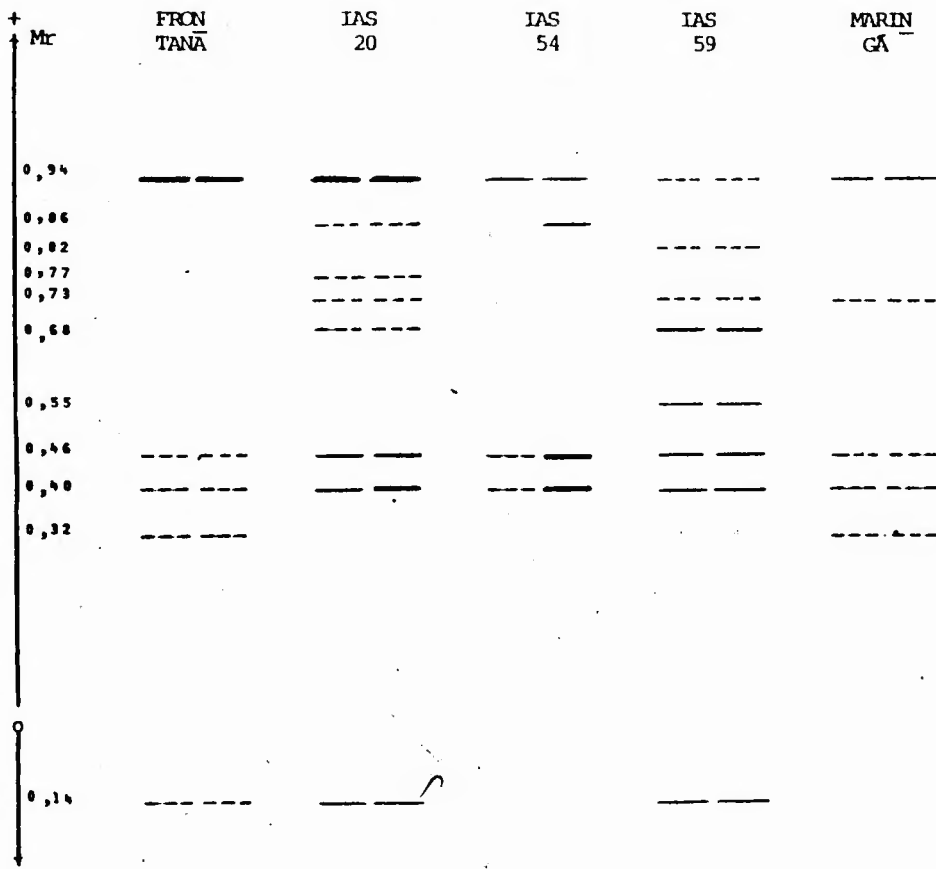


FIGURA 2. Padrões eletroforéticos de esterases de radícula de cinco cultivares de *T. aestivum*. A intensidade da representação indica diferenças quantitativas. As setas indicam o sentido da migração.

CONCLUSÕES

- Tecido de coleóptilo + plúmula, e de radícula podem ser utilizados para a caracterização de cultivares de trigo;
- Não só pela facilidade de execução do experimento como também pelo número de zonas protéicas reveladas, o sistema esterase representa uma ferramenta útil quando se deseja diferenciar eletroforéticamente cultivares de trigo.

ABSTRACT

Electrophoretic patterns for esterases of coleoptile and radicle of five *Triticum* cultivars (*Triticum aestivum*) were studied (FRONTANA, IAS 20, IAS 54, IAS 59 and MARINGÁ). All of the cultivars presented common esterase zones between them. Nevertheless, taking the whole of the zones revealed, for each cultivar it was observed a peculiar electrophoretic pattern, what made possible their characterization.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BASSIRI, A. Barley cultivar identification by use of isozyme electrophoretic patterns. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, v. 56, p. 1-6, 1976.
- 2 COSTA, J. G. C. Estudo de padrões enzimáticos de cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. Porto Alegre, 1974. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1974.
- 3 FALCÃO, T. M. M. de A. *Polimorfismo protéico em populações naturais de abelhas brasileiras*. Ribeirão Preto, 1984. 231. p. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1984.
- 4 FEDAK, G. Allozymes as aid to Canadian barley cultivar identification. *Euphytica*, v. 23, p. 166-173, 1974.
- 5 ____; : Rajhathy, T. Esterase isozymes in Canadian barley cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, v. 52, 507-516, 1972.
- 6 JOHNSON, B. L.; Hall, O. Electrophoretic studies of species relationships in *Triticum*. *Acta Agr. Sand.*, v. 16, p. 222-224, 1966.
- 7 LABERGE, D. E.; Kruger, J. E. e Meredith, W. O. S. Peroxidase isozymes in mature barley kernels. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, v. 53, p. 705-713, 1976.

- 8 PAULA, A. de P. de O. Caracterização genético-bioquímica de sete cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) do Banco de Germoplasma da UFRPE, Recife, 1993. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1993.
- 9 PEIRCE, L. C. e Brewbaker, J. L. Applications of isozyme analyses in horticultural science. *Hort. Science*, v. 8, p. 17-22, 1973.
- 10 PONTIKIS, C. A.; Loukas, M. ; Kousonis, S., The use of biochemical markers to distinguish olive cultivars. *Journal of Horticultural Science*, v. 55, p. 333-343,
- 11 QUIROS, C. F. Identification of alfafa plants by electrophoresis. *Crop Science* , v. 20, p. 262-264, 1980.
- 12 SANTOS, R. C. dos. Investigação genético-bioquímica de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes e suscetíveis ao fungo da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. Recife, 1989. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1989.
- 13 SCANDALIOS, J. G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochemical Genetics*, New York, v. 3, p. 37-79, 1969.
- 14 SCHWENNESEN, J.; Mielke, E. A.; Wolfe, W. H. Identifications of seedles tables grape cultivars and a bud sport with berry isozymes. *Hortscience*, v.17, p. 366-368, 1982.
- 15 SINGH, R. S.; Jain, S. K.; Qualset, C. O. Protein electrophoresis as an aid to oat variety identification. *Euphytica*, v. 22, p. 98-105, 1975.

Recebido para publicação em 26 de julho de 1995.