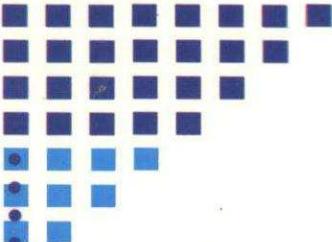




MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA - MAARA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA
Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental - CPATU



JAPAN INTERNATIONAL COOPERATION AGENCY



GERAÇÃO DE TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRÓPICO ÚMIDO

Convênio EMBRAPA-CPATU/JICA
1990 - 1995



00326

Geração de tecnologia

1996

LV-2005.00326

Belém, PA

1996



30936-1

ISSN 0101-2835



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA - MAARA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA
Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental - CPATU



JAPAN INTERNATIONAL COOPERATION AGENCY

GERAÇÃO DE TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRÓPICO ÚMIDO

Convênio EMBRAPA-CPATU/JICA
1990-1995

Belém, PA
1996

EMBRAPA - CPATU. Documentos, 85

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

EMBRAPA - CPATU

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n

Telefones: (091) 226 - 6612, 226 - 6622

Telex: (91) 1210

Fax: (091) 226 - 9845

Caixa Postal, 48

66095 - 100 - Belém, PA

Tiragem: 200 exemplares

| |
|-----------------------------|
| Unidade: <u>AI - Sede</u> |
| Valor aquisição: _____ |
| Data aquisição: _____ |
| N.º N. Fiscal/Fatura: _____ |
| Fornecedor: _____ |
| N.º OCS: _____ |
| Origem: <u>Doce</u> |
| N.º Registro: <u>326/05</u> |

Comissão Editorial

Coordenação: Célio Francisco Marques de Melo

Dilson Augusto Capucho Frazão

Francisco José Câmara Figueirêdo

Revisão Gramatical: Maria de Nazaré Magalhães dos Santos

Composição: Ana Mirtes Maciel Fouró

Paulo Sérgio Oliveira

Silvia Helena Carneiro Matos

Vitor Guilherme de Sousa

Capa: Euclides Pereira dos Santos Filho

EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém, PA). **Geração de tecnologia agroindustrial para o desenvolvimento do trópico úmido.** Belém: EMBRAPA - CPATU / JICA, 1996. p. 305 (EMBRAPA - CPATU. Documentos, 85).

Convênio EMBRAPA - CPATU / JICA

1. Agroindústria - Tecnologia - Brasil - Amazônia.

I. Título. II. Série

CDD: 630.720811

© EMBRAPA - 1996

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE GERMOPLASMA DE FRUTEIRAS

Carlos da Silva Martins¹
Marli Costa Poltronieri¹
Milton Kanashiro²
Rafael Moysés Alves¹
José Maria Gaia³
Hyroyuri Iketani⁴
Tadashi Kajita⁴

Resumo: A caracterização e avaliação convencional das coleções de germoplasma, geralmente fornecem poucas informações, que além de demoradas estão sujeitas à influência de variações ambientais. A utilização de marcadores moleculares permite maior eficiência na utilização dos recursos genéticos regionais. Este projeto busca a definição de métodos de análises de eletroforese de isoenzimas para culturas de interesse regional, como efetuar a caracterização das coleções destas culturas através de marcadores isoenzimáticos. Foram realizados cinco experimentos com espécies regionais, visando definir protocolos. Os resultados permitiram definir alguns protocolos para análise de eletroforese de isoenzimas em pimenta-do-reino, utilizando-se gel de amido.

¹ Eng. Agr. M.Sc., EMBRAPA - CPATU. Caixa Postal 48, CEP 66.017-970. Belém, PA.

² Eng. Agr., Ph.D., EMBRAPA - CPATU.

³ Bolsista de Pós-graduação da UFPa.

⁴ Consultor da Japan International Cooperation Agency - JICA. Av. Nazaré 272, Sala 105. Ed. Clube de Engenharia, CEP 66.035-170. Belém, PA.

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF GERMOPLOSM IN FRUIT TREE SPECIES

Abstract: The objective of the project is to define methodologies for isozyme electrophoresis analyses for crops with regional interest (black pepper, jaborandi, ipecacuanha, guarana and brazilnut), and to characterize the germoplasm collections of these cultures through markers from isozyme. The conventional characterization and evaluation of germoplasm collections provide little information, besides being slow and subject to the influence of environmental conditions. The utilization of molecular markers provides greater efficiency in the utilization of regional genetic resources. Thus, the objective of this project has been to define methods of isozyme electrophoresis analyses for species of regional interest, characterize the collections in these cultures through markers from isozyme. Five experiments were conducted using regional species, seeking to define protocols. The results have enabled us to define protocols for isozyme electrophoresis analyses in black pepper, utilizing starch gel. The phosphoglucose isomerase (PGI) isozyme was polymorphic for black pepper showing genetic variability among germoplasm collection accessions.

Objetivo

O projeto tem como objetivo definir metodologias de análises de eletroforese de isoenzimas para as principais culturas de interesse regional (pimenta-do-reino, jaborandi, ipeca, cupuaçu, guaraná e castanha-do-brasil), e caracterizar, através de marcadores isoenzimáticos, as coleções de germoplasma dessas culturas.

Justificativa

O uso das técnicas de marcadores moleculares proporciona maior eficiência na conservação, caracterização e uso dos recursos genéticos, além de possibilitar a eliminação de duplicações de acessos e formação de Bancos de Germoplasma mais compactos (maior diversidade, com menor número de acessos). Outro aspecto, é que a identificação imediata de indivíduos por marcadores genéticos poderá servir de grande auxílio na caracterização de genótipos resistentes a doenças e estudos da relação patógeno-hospedeiro, aspecto importante, levando em conta os problemas de doenças na região (ex: pimenta-do-reino, dendê, seringueira, etc.), onde as técnicas convencionais de fitopatologia e melhoramento genético até o momento não têm sido efetivas.

Resultados parciais

Experimento 1 - Eletroforese em gel de amido utilizando pimenta-do-reino, cupuaçu e urucu

Este experimento teve como objetivo verificar as respostas de tecidos (folhas jovens) de pimenta-do-reino, cupuaçu e urucu, em relação à análise de eletroforese de isoenzimas, utilizando gel de amido. Os resultados mostraram que dos cinco sistemas de enzimas utilizados (Menadrona Pedutase - MNR; Enzima Málica - ME; Álcool Desidrogenase - ADH; Glutamato Desidrogenase - GDH e Glutamato Oxaloacetato Transmitase - GOT), somente as enzimas MNR e ME apresentaram bons resultados. Em pimenta-do-reino, ocorreu bandejamento nas dez amostras estudadas, em ambas as enzimas; no urucu somente ocorreu bandejamento para duas amostras (em ME); enquanto que o cupuaçu não apresentou bandas.

Experimento 2 - Análise de eletroforese de isoenzimas utilizando espécies tropicais

O objetivo deste experimento foi verificar a resposta de um grande número de espécies tropicais em relação à análise de eletroforese de isoenzimas, utilizando gel de amido. As espécies utilizadas foram: maracujá, goiaba, mamão, batata-doce, milho, quebra-pedra, boldo, jaborandi, cupuaçu, pimenta-do-reino e urucu; para os seguintes sistemas enzimáticos: MNR, ME, ADH, GDH e GOT. Foram utilizadas folhas jovens de dois indivíduos por espécie. Os resultados mostraram que somente ocorreu bandeamento em MNR (maracujá, batata-doce, milho, indigófera, ipeca, jaborandi, pimenta-do-reino e urucu), ME (milho) e GDH (pimenta-do-reino).

Experimento 3 - Caracterização genética de acessos do Banco de Germoplasma de pimenta-do-reino, utilizando eletroforese de isoenzimas.

O objetivo foi verificar diferenças genéticas entre 26 acessos do Banco de Germoplasma de pimenta-do-reino. As etapas do processo de coleta de material no campo e o preparo das amostras (maceração) no laboratório estão apresentados nas Figs. 67, 68 e 69.



FIG. 67 - Coleta de tecidos vegetais jovens (sementes, caules e folhas) de pimenta-do-reino, EMBRAPA - CPATU, Belém, PA, 1995.



FIG. 68 - Armazenagem de tecidos vegetais de pimenta-do-reino em isopor com gelo, EMBRAPA - CPATU, Belém, PA, 1995.

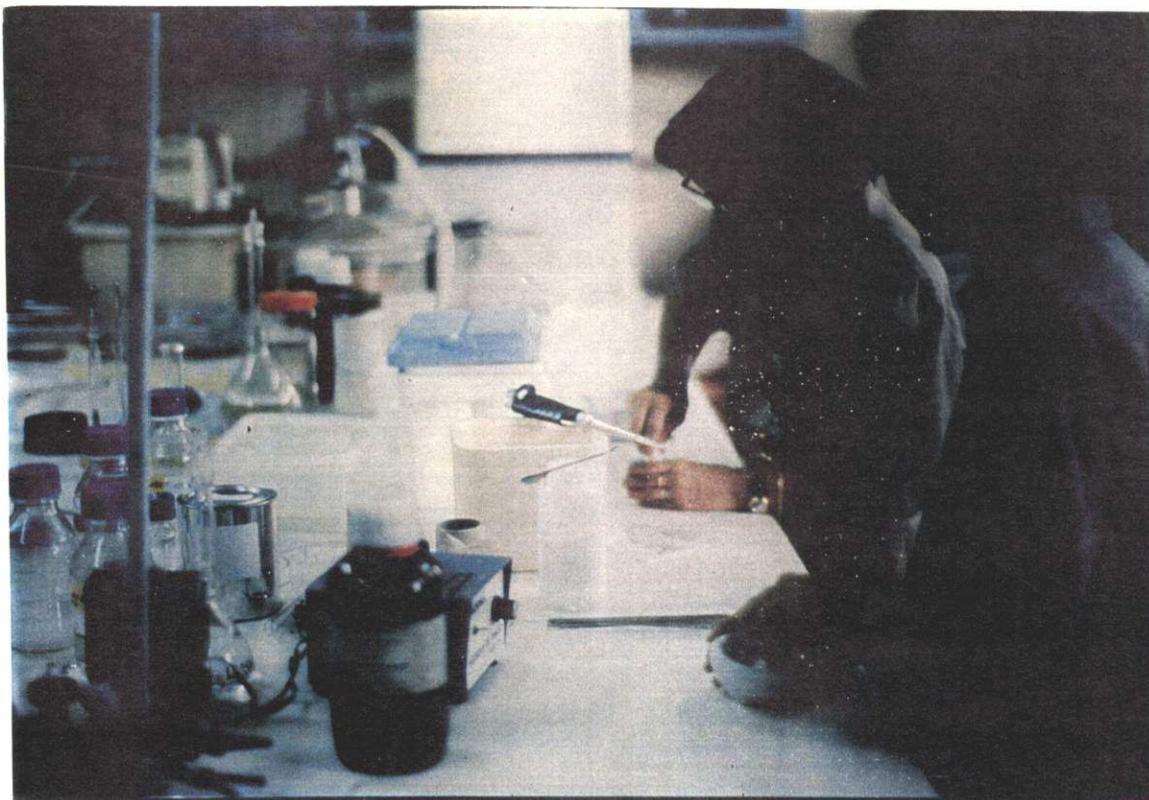


FIG. 69 - Etapa de maceração e centrifugação das amostras coletadas (extração das enzimas), EMBRAPA - CPATU, Belém, PA, 1995.

Foram testados dois tipos de tampões gel-eletrodo e dez sistemas de enzimas: Sistema tampão nº 1 (GDH, MNR, ME, MDH e PGM) e Sistema tampão nº 2 (Malato Desidrogenase - MDH, Fosfoglucomutase - PGM, Fosfogluconato Desidrogenase - 6GP, Isocitrato Desidrogenase - IDH, Isocitrato Desidrogenase - SDH, Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase - G3P e Fosfoglucose Isomerasi - PGI).

Apresentaram bandas as seguintes enzimas: MDH, SDH, 6PG, IDH, PGI e ME. Em PGI verificou-se a existência de dois loci: Pgi-1 e Pgi-2 (Fig. 70). O locus Pgi-1 apresentou o mesmo tipo de genótipo (homozigoto) nas 26 amostras (locus monomórfico); o locus Pgi-2 apresentou pelo menos dois genótipos bem visíveis: ab e bb (locus polimórfico). Em ME observou-se um locus monomórfico e homozigoto (Fig. 71). Em IDH verificou-se um locus monomórfico e heterozigoto. Em SDH identificou-se um locus polimórfico, provavelmente com três alelos. Para a enzima 6PG verificou-se um locus, talvez polimórfico e heterozigoto; enquanto que em MDH observou-se três loci, as bandas saíram pouco visíveis, porém pôde-se observar diferenças genéticas entre as amostras.

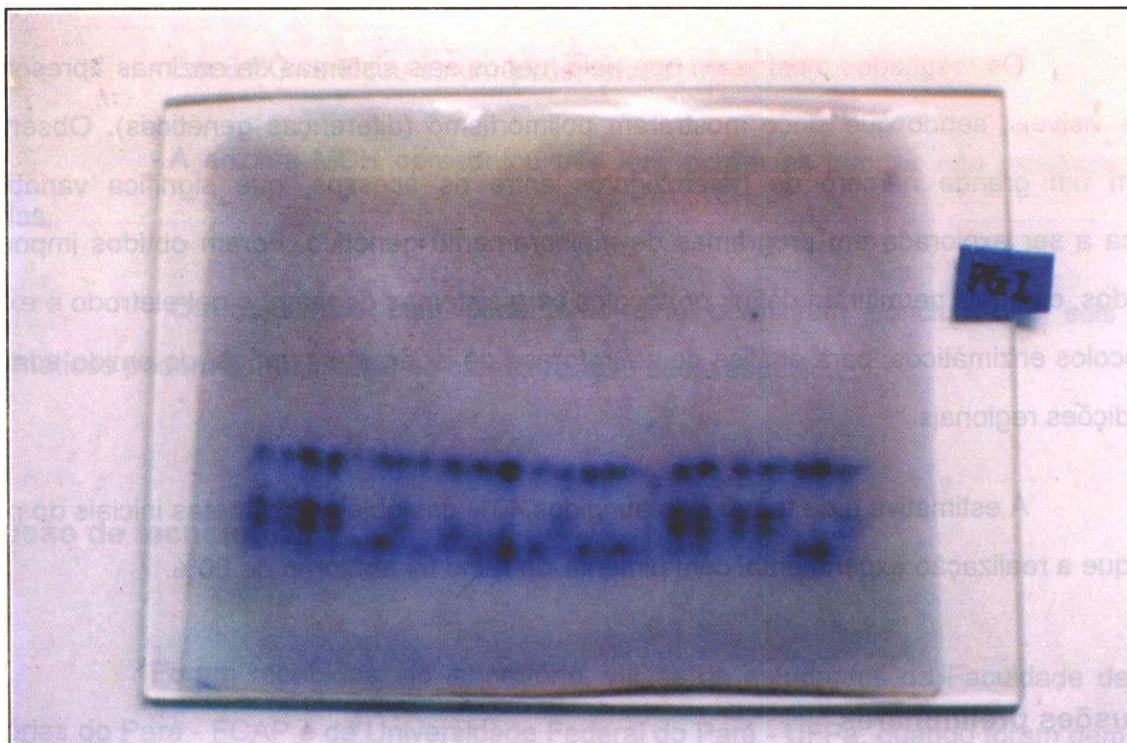


FIG. 70 - Gel da isoenzima Fosfoglucose Isomerase (PGI), a partir de tecidos de folhas jovens de pimenta-do-reino, EMBRAPA - CPATU, Belém, PA, 1995.

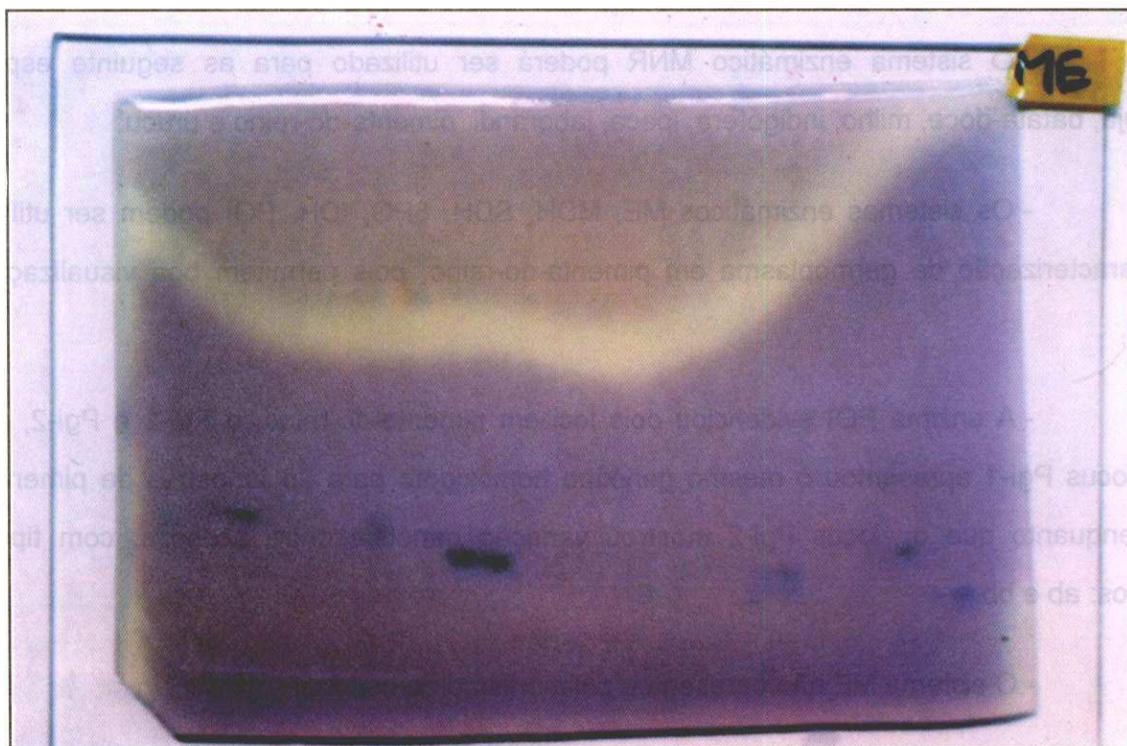


FIG. 71 - Gel da isoenzima Enzima Málica (ME), utilizando-se tecidos de folhas jovens de pimenta-do-reino, EMBRAPA - CPATU, Belém, PA, 1995.

Os resultados mostraram que pelo menos seis sistemas de enzimas apresentaram bandas visíveis, sendo que cinco mostraram polimorfismo (diferenças genéticas). Observou-se também um grande número de heterozigotos entre os acessos, que significa variabilidade genética a ser explorada em programas de melhoramento genético. Foram obtidos importantes resultados, os quais permitiram definir protocolos para sistemas de tampão gel-eletrodo e extração e protocolos enzimáticos, para análise de eletroforese de isoenzimas em gel de amido adaptados às condições regionais.

A estimativa é de terem sido atingidos 40% dos objetivos e metas iniciais do projeto, sendo que a realização experimental com pimenta-do-reino foi em torno de 80%.

Conclusões preliminares

Os resultados, com relação à análise de eletroforese de isoenzimas em gel de amido permitem concluir que:

- O sistema enzimático MNR poderá ser utilizado para as seguintes espécies: maracujá, batata-doce, milho, indigófera, ipeca, jaborandi, pimenta-do-reino e urucu.

- Os sistemas enzimáticos ME, MDH, SDH, 6PG, IDH, PGI podem ser utilizados para caracterização de germoplasma em pimenta-do-reino, pois permitem boa visualização de bandas.

- A enzima PGI evidenciou dois loci em pimenta-do-reino, o Pgi-1 e Pgi-2, sendo que o locus Pgi-1 apresentou o mesmo genótipo homozigoto para 26 amostras de pimenta-do-reino, enquanto que o locus Pgi-2 mostrou variação genética entre acessos, com tipos de genótipos: ab e bb.

- O sistema ME não apresentou polimorfismo de bandas.

- A enzima IDH apresentou um locus monomórfico, heterozigoto.

- A enzima SDH mostrou um locus polimórfico, provavelmente com três alelos.

- Em 6 PG verificou-se um locus, talvez polimórfico, heterozigoto.

- A enzima MDH apresentou três loci, porém as bandas não mostraram-se bem nítidas.

- Os resultados com pimenta-do-reino permitiram concluir que seis sistemas enzimáticos podem ser utilizados na caracterização desta espécie.

Difusão de tecnologia

Foram recebidas, no laboratório, visitas de estudantes da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará - FCAP e da Universidade Federal do Pará - UFPa, quando foram demonstrados os métodos de preparo do gel, de eletroforese, de coloração de enzimas e estabelecimento de protocolos para pimenta-do-reino.