

Caracterização de variedades de *Gladiolus* sp. por meio de izoenzimas.

Ferreira, Clarissa Alves¹; Von Pinho, Édila Vilela de Resende²; Salgado, Kalinka Carla Padovani de Carvalho³; Paiva, Patrícia Duarte de Oliveira⁴; Pereira, Gabriela Santos⁵

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia) (UFLA/DAG), Caixa Postal 03037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, fone (35) 3829-1842, email: clarissaaf04@yahoo.com.br, ² Professora da Universidade Federal de Lavras (UFLA/DAG) Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, fone (35) 3829-1319, email: edila@ufla.br, ³ Pesquisadora da FAPEMIG (UFLA/DAG), Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, fone (35) 3829-1842, email: kaka@ufla.br. ⁴ Professora da Universidade Federal de Lavras (UFLA/DAG), Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, fone (35) 3829-1786, email: pdolivei@ufla.br, ⁵ Graduanda em Agronomia (UFLA/DAG), Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, fone (35) 3829-1842, email: gabipereira87@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

A demanda pelos bulbos de gladiólos (*Gladiolus* sp.), pertencente à família Iridaceae, no mercado externo vem contribuindo para o investimento de empresas nacionais nessa espécie. No entanto, há uma grande exigência dos países importadores quanto à pureza genética das cultivares comercializadas dessa espécie, principalmente em relação à cor da flor. Sabe-se que o uso de marcadores morfológicos para a caracterização de cultivares pode demandar grande tempo e espaço além de muitos desses serem influenciados pelo ambiente de produção.

Os marcadores moleculares de proteínas, produtos de expressão gênica, podem ser utilizados como descritores para a caracterização de cultivares (Vieira, 2004). Esses marcadores apresentam na maioria dos casos, polimorfismo, permitindo distinguir, em várias espécies um grande número de cultivares, sendo rápido e de fácil execução. Porém esses marcadores podem variar em função da parte e do estágio de desenvolvimento da planta analisada (Bonow, 2004).

O número de trabalhos visando à certificação da pureza genética em flores é bastante reduzido. Dessa forma, nesse trabalho foram avaliados marcadores moleculares de proteína visando à caracterização de variedades de gladiólos.

MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida na área experimental e no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Para a avaliação de polimorfismo entre as variedades de gladiólos foram utilizadas onze variedades (Withe Friendship, White Goddess, Priscilla, Rose Friendship, San Martin, Gold Field, Yester, T-704, Traderhorn, Red Beauty, Peter Pears) provenientes da Empresa Terra Viva, localizada na cidade de Holambra, SP.

Para a extração de enzimas foram coletadas, para cada variedade, a terceira folha definitiva de dezesseis plantas, escolhidas ao acaso e cinco bulbos de cada variedade. As folhas e os bulbos foram macerados em N₂ líquido até a obtenção de um pó bem fino. Em seguida, foram adicionados a 100 mg do tecido verde 250µL do tampão de extração, o qual se constitui de Tris HCl 0,2M pH 8 e 0,1% de β-mercaptoetanol que foi adicionado no momento do uso. Os tubos contendo as amostras das folhas e dos bulbos de cada variedade e tampão de extração foram deixados a 4°C por uma noite e centrifugados a 14.000xg por 30 minutos, a 4°C. Foram aplicados 60µL do sobrenadante da cada amostra em gel de poliácridamida 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). No tampão de corrida foram utilizados Tris-glicina pH 8,9 e a corrida eletroforética a 4°C, por duas horas, a uma voltagem constante de 150V. Após os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos α-amilase, álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), peroxidase (PO), malato desidrogenase (MDH), catalase (CAT) (Alfenas, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os sistemas enzimáticos que foram testados, foi detectada baixa atividade para a enzima peroxidase (PO) nos bulbos sem ocorrência de polimorfismo entre as variedades testadas (Figura 1). Já em folhas, seis padrões eletroforéticos diferentes foram gerados, o que possibilitou a distinção das variedades Priscilla, Gold Field, Traderhorn, Red Beauty. Para as variedades San Martin e Yester não foi detectada atividade para essa enzima. A atividade da peroxidase pode estar relacionada com a intensa atividade celular dessa enzima na eliminação dos peróxidos formados nas folhas.

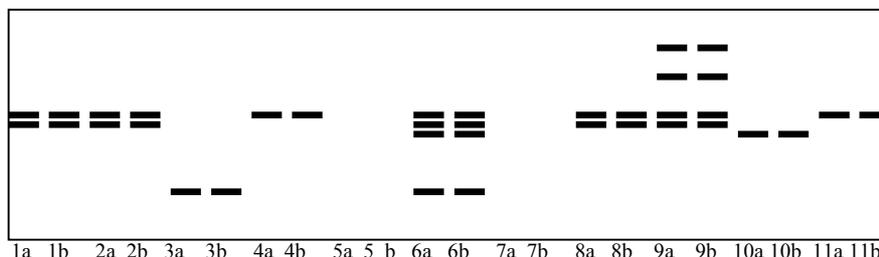
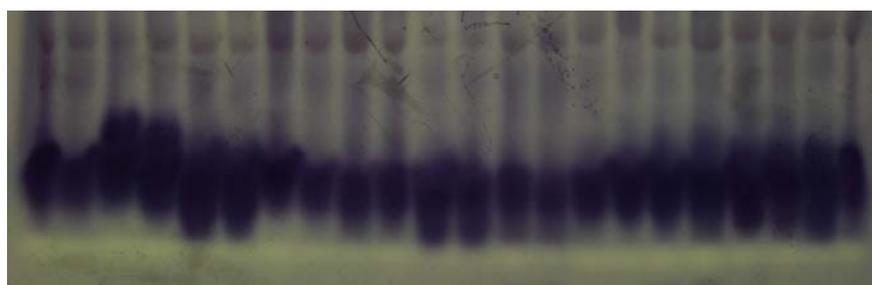


FIGURA 1. Padrões eletroforéticos, da enzima peroxidase extraída de tecidos de folhas de gladiolos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Quanto ao sistema enzimático malato desidrogenase (MDH) nos tecidos dos bulbos (Padrões não apresentados), foram obtidos cinco padrões eletroforéticos diferentes, sendo as variedades separadas em cinco grupos: 1) Priscilla, San Martin, T 704 e Red Beauty; 2) Rose Friendship e Gold Field; 3) Yester e Traderhorn; 4) White Goddess e Peter Pears e 5) White Friendship. Nos tecidos das folhas (Figura 2) também foram obtidos cinco padrões, mas o agrupamento dos padrões das variedades foram diferentes em relação aos bulbos, sendo separadas nos seguintes grupos: 1) Gold Field; 2) San Martin e Yester; 3) Priscilla, Traderhorn, Red Beauty e Peter Pears; 4) White Friendship, Rose Friendship e T 704 e 5) White Goddess. A enzima malato desidrogenase catalisa a conversão de malato a oxalacetato, tendo uma importante função dentro do ciclo de Krebs, além de participar do movimento de malato através da membrana mitocondrial e da fixação de CO₂ nas plantas.



1a 1b 2a 2b 3a 3b 4a 4b 5a 5b 6a 6b 7a 7b 8a 8b 9a 9b 10a 10b 11a 11b

FIGURA 2. Padrões eletroforéticos da izoenzima malato desidrogenase, extraídos de folhas de gladiolos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Para a álcool desidrogenase (ADH), nos tecidos dos bulbos, (Padrões não apresentados) todos os padrões obtidos foram monomórficos, exceto para a variedade Traderhorn. Nos tecidos das folhas, (Figura 3), foram observados quatro padrões eletroforéticos diferentes para as variedades San Martin, Traderhorn, Red Beauty em relação às demais variedades.

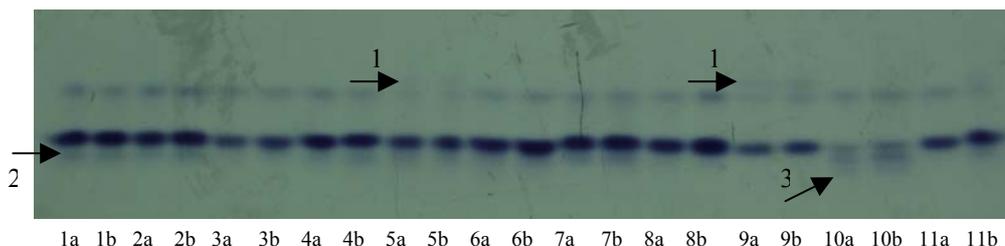


FIGURA 3. Padrões eletroforéticos da isoenzima álcool desidrogenase, extraídos de tecidos de folhas de gladiólos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Tanto nos tecidos de bulbos quanto nos tecidos de folhas houve atividade da α -amilase. Em bulbos (Figura 4), foi observado polimorfismo entre todas as variedades. Já em folhas, foram observados somente dois padrões eletroforéticos (Padrões não apresentados).

As enzimas α e β -amilases estão envolvidas no principal sistema de degradação de amido dos materiais de reserva (Ferreira, 2006).

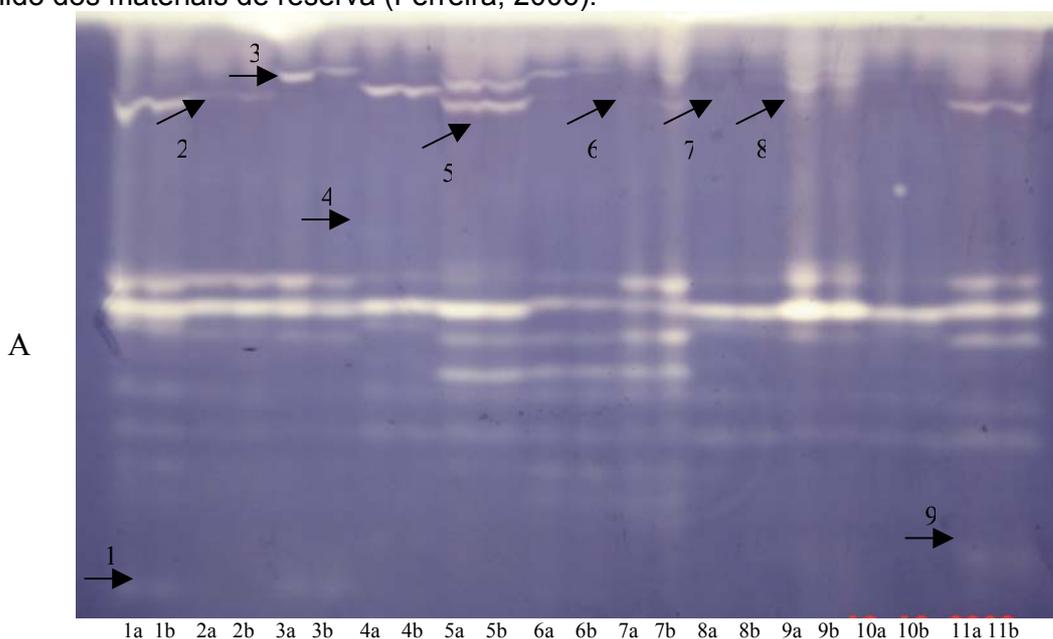


FIGURA 4. Padrões eletroforéticos da isoenzima α -amilase, extraídos de bulbos de gladiólos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Para a catalase foram observados sete padrões nos bulbos, (Padrões não apresentados), sendo possível a distinção das variedades White Friendship, Yester, Traderhorn, Peter Pears. Em folhas não foi observado polimorfismo entre as variedades analisadas por essa enzima. Essas enzimas são importantes catalisadores que atuam como reguladoras dos níveis de H_2O_2 e sua atividade consiste na conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 .

Os padrões observados para a isoenzima esterase (Figura 5), em folhas, foram polimórficos, permitindo a separação de todas as variedades. Para os padrões observados dos tecidos dos bulbos foi possível distinguir cinco padrões diferentes (Dados não apresentados). A esterase é uma enzima que participa da hidrólise de ésteres de membrana.

Em várias espécies como feijão (Vieira, 2000), arroz (Bonow, 2004) e trigo (Cardoso e Nedel, 2002) foi possível a distinção de cultivares por meio da enzima esterase. Vale ressaltar que certas enzimas podem ser controladas por diferentes locos nos diferentes

estádios de desenvolvimento e tecidos, o que deve ser considerado ao se utilizar enzimas como marcadores (Alfenas, 1998).

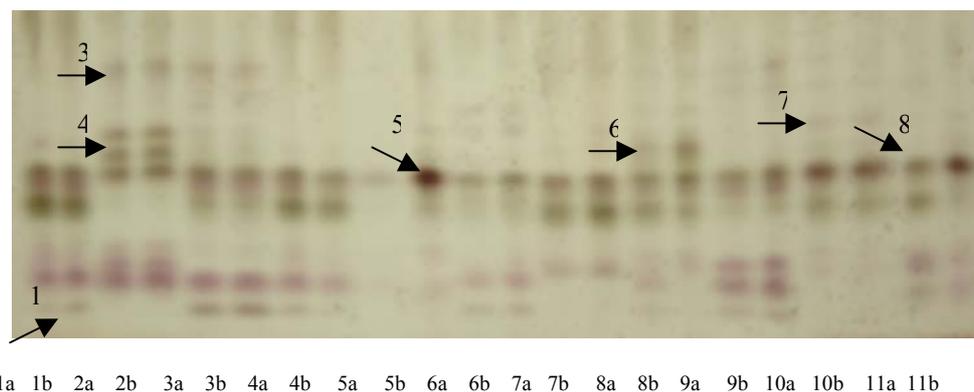


FIGURA 5. Padrões eletroforéticos da isoenzima esterase, extraídos de tecidos e de folhas de gladiólos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

CONCLUSÃO

Dentre os sistemas enzimáticos testados, por meio da α -amilase extraída dos bulbos e da esterase extraída das folhas foi possível separar as onze variedades de gladiólos avaliadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações** em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

BONOW, S. **Caracterização morfológica, isoenzimática e molecular de cultivares de arroz**. 2004. 125p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CARDOSO, E. T.; NEDEL, J. L. Padrões eletroforéticos de cultivares de trigo indicadas para região sul do Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 203-209, mar./abr. 2002.

FERREIRA, L. A. **Bioestimulante e fertilizantes associados ao tratamento de sementes de milho e soja**. 2006. 56p. Dissertação (Mestrado Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIEIRA, E. S.N. **Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização de cultivares de soja e café**. 2004. 137 p. Dissertação (Mestrado Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIEIRA, E. S. N. **Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando à certificação da pureza genética**. 2000. 84p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PALAVRAS-CHAVES

Gladiólo; marcador molecular de proteínas; enzimas.