

CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) ATRAVÉS DA SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS DE RAÍZES TUBEROSAS.

TÂNIA M. MUNIZ DE ARRUDA FALCÃO

Prof. Adjunto-4, Área de Genética (Laboratório de Genética
Bioquímica) - Departamento de Biologia - UFRPE.

ANTÔNIO DE PÁDUA DE OLIVEIRA PAULA

Mestre em Botânica (Área de Genética) pela Universidade
Federal Rural de Pernambuco.

Foram estudados os padrões eletroforéticos de Esterases, Proteínas Totais (Proteínas não específicas), Superóxido dismutase e Peroxidase em polpa de raízes tuberosas de sete cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) do Banco de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco, coletadas aos 70, 120 e 150 dias após o plantio (dap). Foram utilizados géis de poliacrilamida a 7%, em sistema horizontal. A caracterização das cultivares foi possível apenas através dos dados de esterases obtidos em material coletado aos 150 dap.

INTRODUÇÃO

Como produto de grande importância social, a batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) representa uma das principais culturas de subsistência para a população de baixa renda. Cultivada na maioria dos Estados da Região Nordeste, a batata-doce representa uma fonte expressiva de carboidratos, pela quantidade de amido e açúcares que contém (sacarose, maltose, glicose, etc.), além de sais minerais e vitaminas (Mafra, 1978; Carvalho e Oliveira, 1982; Cereda, Wosiacki e Conceição, 1984).

A classificação das cultivares desta espécie é baseada em características morfológicas, como coloração e formato dos tubérculos; formato e coloração das folhas e das ramas. Contudo, a utilização de caracteres morfológicos é muitas vezes precária, dado que estes caracteres são muito influenciados pelas condições ambientais.

Por outro lado, entre diferentes técnicas para identificação de cultivares, a caracterização genético-bioquímica através da análise de padrões eletroforéticos de proteínas (enzimáticas ou não) se constitui em uma das melhores metodologias para classificar e selecionar indivíduos (genótipos) para o melhoramento, posto que as proteínas são produtos elaborados a partir de informações genéticas.

Várias técnicas têm sido utilizadas para o estudo de proteínas, entre estas a de eletroforese em gel (Smithies, 1955) a qual consiste na separação de componentes protéicos mediante a aplicação de corrente elétrica através de um meio condutor. Esta técnica tem sido amplamente empregada para o estudo de diferentes organismos e, entre outras abordagens, tem sido muito utilizada na detecção de variantes genéticas e marcadores genético-bioquímicos, e na caracterização de espécies, cultivares, populações, etc. (Zwartz, 1966; Desborough e Peloquin, 1967, 1968; Oliver e Martinez-Zapater, 1985; Gomes e Leal, 1985).

MATERIAL E MÉTODOS

Polpa de raízes tuberosas de sete cultivares de batata-doce (*I. batatas* (L.) Lam), pertencentes ao Banco de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco, foram coletadas, em três estágios do desenvolvimento ontogenético : 70, 120 e 150 (dap), para análise eletroforética. Foram estudadas as cultivares Carpinteira, Arroba, Centenial-7, Dahomey, Talo Roxo, A. A. UFRPE 1-88 e UFRPE 2-88.

Foram analisados os padrões de proteínas totais (PT), esterases (EST), superóxido-dismutase (SOD) e peroxidase (PO). Para a extração das proteínas foi utilizada água destilada e deionizada na proporção de 1:2 em volume,, amostra do material: água. Após a homogeneização, o material era centrifugado por 15 minutos, a 3000 rpm, em temperatura ambiente, para a obtenção de sobrenadantes límpidos.

Foram utilizados, para todos os quatro sistemas protéicos, géis de poliacrilamida a 7%.

Na preparação de géis para o sistema esterásico foi utilizado tampão Tris-citrato 0,0193 M (0,017M em Tris e 0,0023M em ácido cítrico), pH 8,0, conforme Falcão (1984). Na preparação dos géis acrescentava-se 1% de Polivinil pirrolidona (PVP) e 0,025% de Etileno-Diamino-Tetracetato-Dissódico (EDTA). Nas cubas era empregado o tampão Borato 0,3M pH 8,0 (Lima, 1978).

Para a análise das proteínas totais (ou proteínas não específicas

coradas com Coomassie ou Amido Negro 10B) foram utilizados os tampões empregados para o sistema esterásico porém, no caso das proteínas totais, PVP e EDTA não foram acrescentados aos géis.

Na preparação dos géis para o estudo das peroxidases foi utilizado tampão fosfato 0,025M pH 6,85, contendo 1% de PVP e 0,025% de EDTA. Nas cubas foi empregado o tampão fosfato 0,1M pH 6,85 (Kokubo, 1978a, com modificações).

Para o estudo de superóxido dismutase foram preparados géis com tampão Tris-HCl 0,02M pH 8,6 contendo 1% de EDTA. Tampão Tris HCl 0,3M pH 8,6 nas cubas (Contel, 1975).

A migração eletroforética durava 6 horas, a 4°C, com diferença de potencial de 2,5 V/cm de gel, para esterases, peroxidases e proteínas totais. Para o sistema superóxido dismutase a migração era processada em 8 horas, a 4°C, com uma diferença de potencial de 1,6 V/cm de gel.

Para todas as análises foi empregado o sistema horizontal.

A revelação das proteínas foi promovida segundo os protocolos descritos em Falcão (1984), para os sistemas de esterase e de superóxido dismutase, pelo protocolo descrito por Santos (1989), para proteínas totais, e por Kokubo (1978a) para peroxidases.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as cultivares estudadas foi observado um máximo de 6 regiões esterásicas para tecido de polpa de raiz tuberosa coletado a 70 e a 120 dap, e um máximo de 9 regiões para o mesmo tecido a 150 dap (Figuras 1, 2 e 3). A partir dos dados obtidos aos 70 dap e 120 dap foi possível identificar as cultivares Carpinteira, Arroba, Dahomey, Talo Roxo e A.A. UFRPE 1-88. As cultivares Centenial-7 e UFRPE 2-88, por outro lado, só foram caracterizadas a partir dos dados obtidos para polpa de raiz tuberosa aos 150 dap. Consequentemente, há de ser registrado que as sete cultivares foram individualizadas a partir dos padrões esterásicos obtidos para tecido de raízes tuberosas coletado aos 150 dap.

Sabe-se que ao longo do desenvolvimento dos organismos ocorre a diferenciação e podem ser observadas variações na síntese e/ou degradação de proteínas. Desta forma, quando são traçados padrões eletroforéticos para um tecido, sendo as coletas deste tecido processadas em estágios diferentes do desenvolvimento do organismo, podem ser observadas variações nesses perfis. Estas variações são refletidas pelo aparecimento de novas zonas no gel e/ou desaparecimento de regiões já

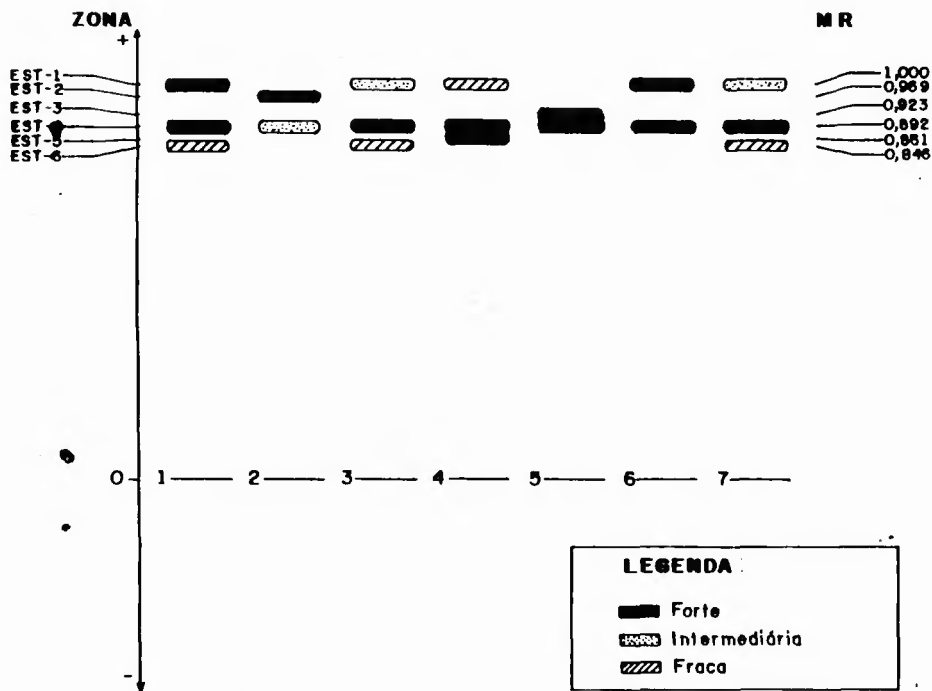


FIGURA 1. Padrão eletroforético de esterases em polpa de raízes tuberosas em desenvolvimento aos 70 dias após o plantio de *Ipomoea batatas* (L.) Lam., em gel de poliacrilamida 7%. Cultivares: 1 - Carpinteira; 2 - Arroba; 3 - Centenial -7; 4 - Dahomey; 5 - Talo Roxo; 6 - A.A. UFRPE 1-88 7 - UFRPE 2-88.

detectadas ou, também, através de variações na intensidade de coloração das zonas protéicas.

Através dos resultados obtidos para o sistema esterásico em tecido de polpa de raízes tuberosas, para as 7 cultivares estudadas de batata-doce, observou-se um aumento no número de isoenzimas, a saber, de 6 (para tecido coletado aos 70 e aos 120 dap) para 9 (para tecido coletado aos 150 dap). Oliveira (1977), analisando 25 cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), observou, em alguns tecidos, que bandas não detectadas no início do desenvolvimento, eram observadas em estágios posteriores.

Estas variações podem ser úteis para a identificação de cultivares, visto que podem refletir uma diferenciação fisiológica das mesmas. Quando

não se dispõe de um grande número de protocolos para análise de diferentes sistemas protéicos, os parâmetros genéticos obtidos ao longo do desenvolvimento passam a desempenhar um papel de destaque (Ferguson, 1980).

Como pode ser observado pela análise dos dados apresentados, o melhor sistema para a diferenciação das cultivares estudadas neste trabalho foi o esterásico. Cada cultivar apresentou um número específico de zonas esterásicas, para as quais foram observadas diferenciações em

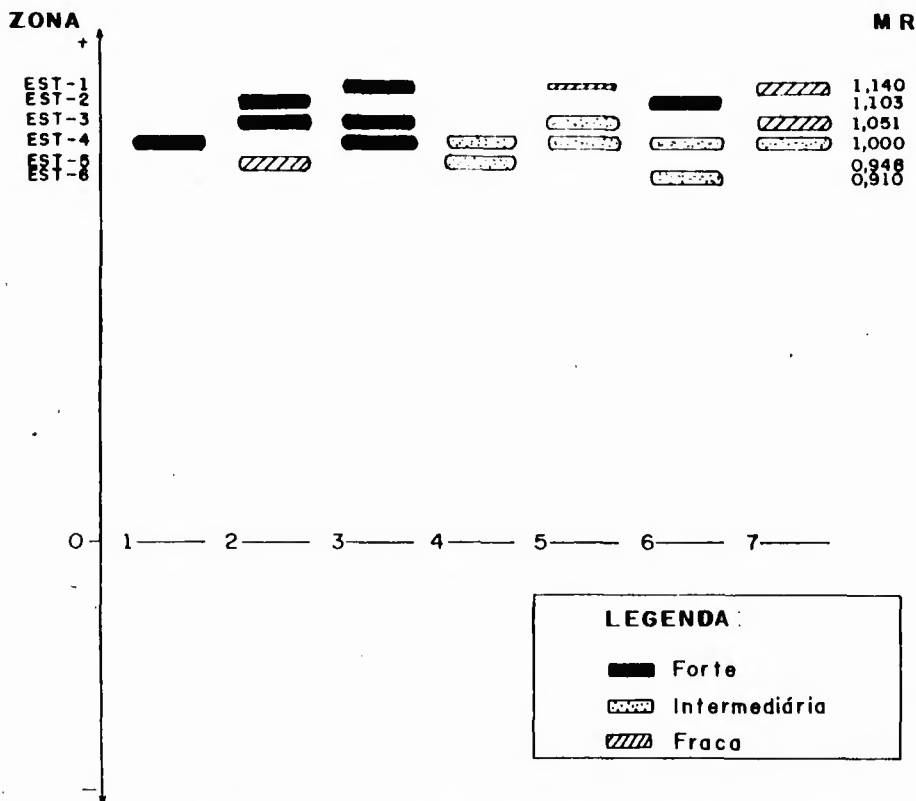


FIGURA 2. Padrão eletroforético de esterases em polpa de raízes tuberosas aos 120 dias após o plantio de *Ipomoea batatas* (L.) Lam., em gel de poliacrilamida 7%. Cultivares: 1 - Carpinteira; 2 - Arroba; 3 - Centenial - 7; 4 - Dahomey; 5 - Talo Roxo; 6 - A. A. UFRPE 1-88 e 7 - UFRPE 2-88.

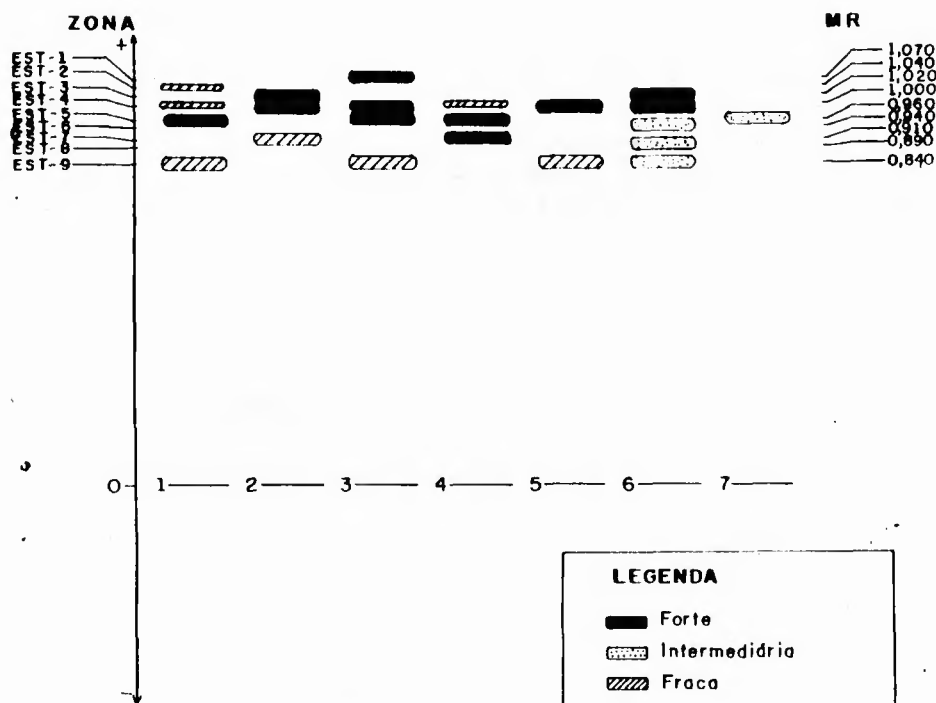


FIGURA 3. Padrão eletroforético de esterases em polpa de raízes tuberosas aos 150 dias após o plantio de *Ipomoea batatas* (L.) Lam., em gel de poliácridamida 7%. Cultivares: 1 - Carpiniteira; 2 - Arroba; 3 - Centenial-7; 4 - Dahomey; 5 - Talo Roxo; 6 - A. A. UFRPE 1-88 e 7 - UFRPE 2-88.

mobilidades relativas e/ou intensidade de coloração. Estes resultados estão em concordância com os dados obtidos por Desborough e Peloquin (1967, 1968) para 53 espécies do gênero *Solanum* e para 45 variedades de *S. tuberosum* (L.), respectivamente. Estes autores assinalam que os dados para esterases em tecido de raiz tuberosa, foram de grande importância na caracterização do material. Foram úteis também no estabelecimento de marcadores moleculares, a saber, por uma ou mais regiões protéicas detectadas peculiarmente em uma cultivar.

No presente trabalho, foram considerados como marcadores moleculares as regiões EST2, EST3 e EST5 para as cultivares Arroba, Talo Roxo e Dahomey, respectivamente, em material analisado aos 70 dap;

EST6 para a cultivar A. A. UFRPE 1-88, em material analisado aos 120 dap, e EST1, EST2, EST6 e EST8 para as cultivares Centenial-7, Carpinteira e A. A. UFRPE 1-88, respectivamente, em material analisado aos 150 dap.

Os padrões determinados para Proteínas Totais, para as três idades estudadas, não foram suficientes para a identificação das 7 cultivares. Para análises de tecido de raízes tuberosas aos 70 dap, foi possível classificar as cultivares, considerando apenas o número de regiões eletroforéticas detectadas, em três distintos fenótipos, a saber, fenótipo com uma, três ou

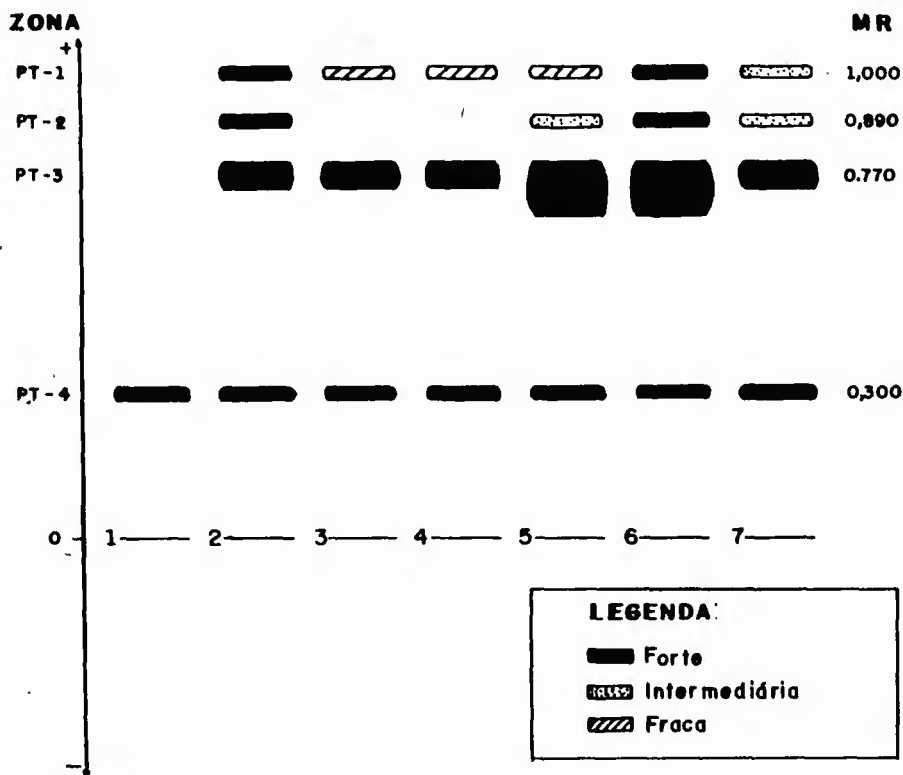


FIGURA 4. Padrão eletroforético de proteínas totais em polpa de raízes tuberosas em desenvolvimento aos 70 dias após o plantio de *Ipomoea batatas* (L.) Lam., em gel de poliacrilamida 7%. Cultivares: 1- Carpinteira; 2 - Arroba; 3 - Centenial-7; 4 - Dahomey; 5 - Talo Roxo; 6 - A. A. UFRPE 1-88 e 7 - UFRPE 2-88.

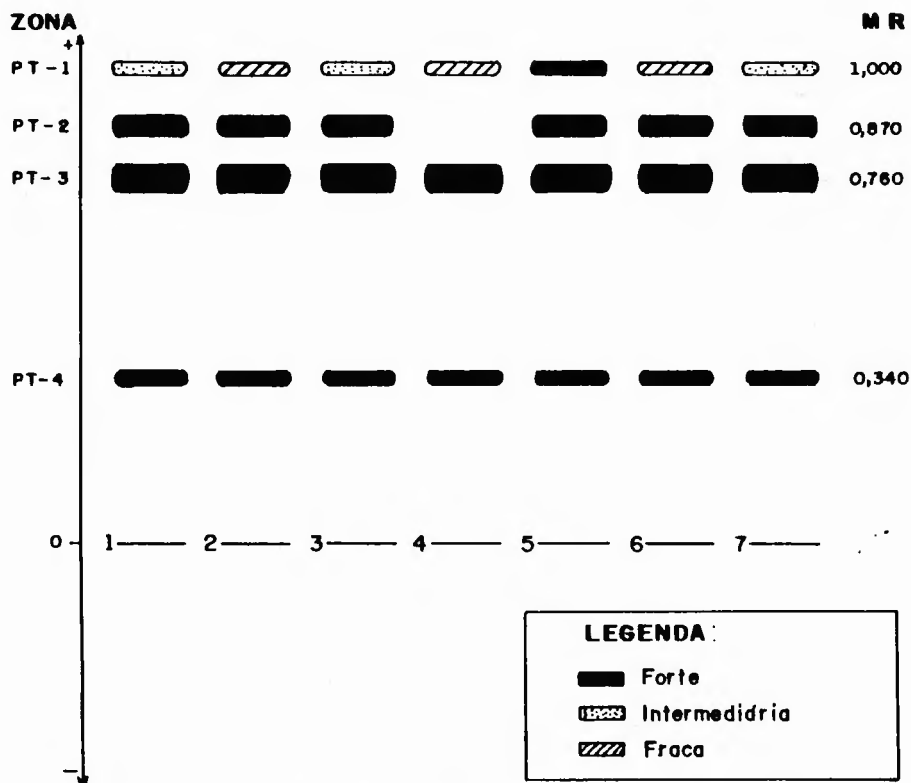


FIGURA 5. Padrão eletroforético de proteínas totais em polpa de raízes tuberosas aos 120 dias após o plantio de *Ipomoea batatas* (L.) Lam., em gel de poliacrilamida 7%. Cultivares: 1 - Carpinteira; 2 - Arroba; 3 - Centenial-7; 4 - Dahomey; 5 - Talo Roxo; 6 - A. UFRPE 1-88 e 7 - UFRPE 2-88.

quatro regiões PT (Figura 4). Foi tomada também como marcador molecular a região PT4 para a cultivar Dahomey, em material coletado aos 150 dap. É válido salientar que apenas para tecido de polpa de raiz da cultivar Dahomey, coletado aos 120 dap, a região PT2 não foi detectada (Figura 5).

Foram detectadas duas regiões peroxidásicas para tecidos coletados a 120 e 150 dap (Figuras 7 e 8). O melhor resultado foi obtido para material de 150 dap (Figura 8) tendo sido possível, neste caso, agrupar as 7 cultivares em três fenótipos eletroforéticos.

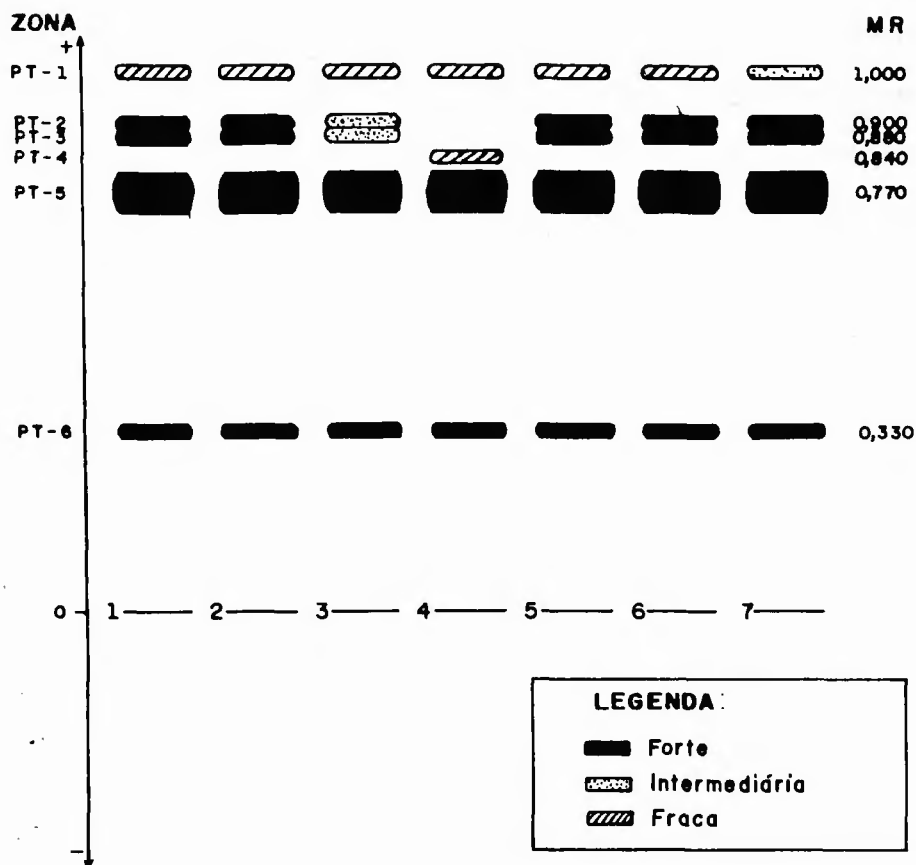


FIGURA 6. Padrão eletroforético de proteínas totais em polpa de raízes tuberosas aos 150 dias após o plantio de *Ipomoea batatas* (L.) Lam., em gel de pliacrilamida 7%. Cultivares: 1 - Carpinteira; 2 - Arroba; 3 - Centenial-7; 4 - Dahomey; 5 - Talo Roxo; 6 - A. A. UFRPE 1-88 e 7 - UFRPE 2-88.

Para o sistema Superóxido dismutase foi observada a ocorrência de duas regiões proteicas para todas as cultivares, independentemente da época de coleta (70, 120 ou 150 dap). Como as 7 cultivares mostraram um único fenótipo eletroforético, não foi possível identificá-las ou agrupá-las.

Tomando como referência o fato do sistema esterásico ter sido importante para a caracterização das 7 cultivares estudadas, vale enfatizar

a importância da utilização de diferentes sistemas protéicos em estudos de identificação de cultivares. Neste sentido, Quiros (1980) salienta a importância do emprego de dois ou mais sistemas protéicos para estudos desta natureza, enfatizando que indivíduos que apresentam um único fenótipo eletroforético para um dado sistema protéico podem ser diferenciados através de seus zimogramas para outras proteínas. De fato, dados de literatura apontam para a importância do estudo de dois ou mais sistemas protéicos para a caracterização de cultivares (Bassiri, 1976; Gomes e Leal, 1985; Wilkinson, Mulchi e Aycocok, Jr., 1985).

Trabalhos nos quais apenas um sistema protéico é utilizado, dificilmente, levam a identificação de cultivares. Todavia, vale salientar o trabalho de Fedak e Rajhathy (1972) no qual os autores, utilizando apenas o sistema esterásico, classificaram 55 cultivares de cevada em 9 grupos, e o trabalho de Laberge, Kruger e Meredith (1973) os quais, utilizando dados eletroforéticos para peroxidases, classificaram 12 cultivares de cevada em 3 grupos e 11 sub-grupos.

ZONA

Mr

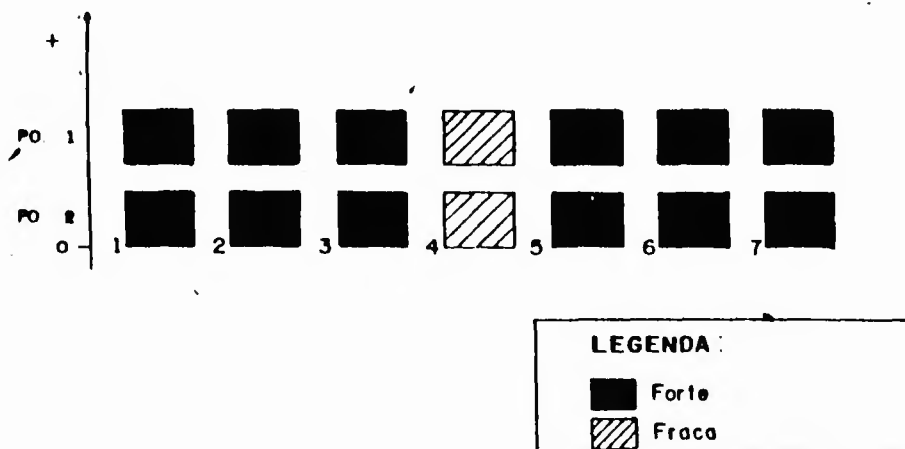


FIGURA 7. Padrão eletroforético de peroxidases em polpa de raízes tuberosas aos 120 dias após o plantio de *Ipomoea batatas* (L.) Lam., em gel de poliácrilamida 7%. Cultivares: 1 - Carpinteira; 2 - Arroba; 3 - Centenial-7; 4 - Dahomey; 5 - Talo Roxo; 6 - A. A. UFRPE 1-88 e 7 - UFRPE 2-88.

ZONA

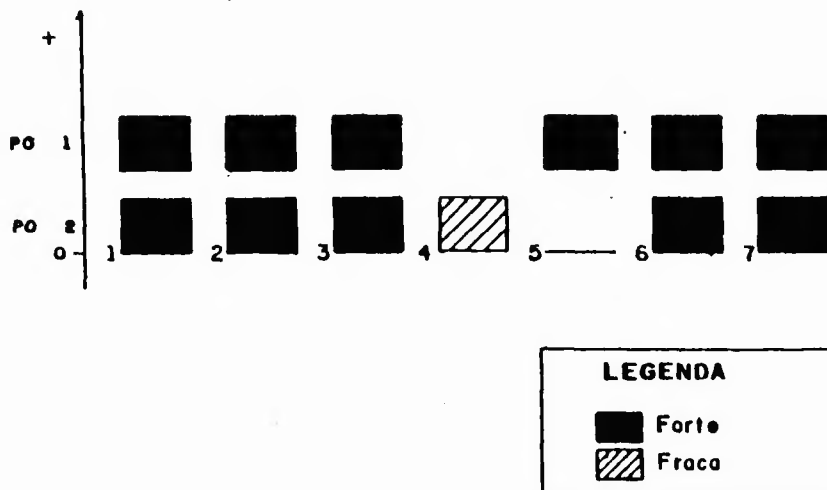


FIGURA 8 - Padrão eletroforético de peroxidases em polpa de raízes tuberosas aos 150 dias após o plantio de *Ipomoea batatas* (L.) Lam., em gel de poliácridamida 7%. Cultivares: 1 - Carpinteira; 2 - Arroba; 3 - Centenial-7; 4 - Dahomey; 5 - Talo Roxo; 6 - A. A. UFRPE 1-88 e 7 - UFRPE 2-88.

Neste trabalho, como já foi salientado, dos quatro sistemas protéicos estudados, apenas o esterásico foi de real importância para a identificação das cultivares. Ferguson (1980) salienta que, um único loco, desde que altamente polimórfico, pode fornecer indicações muito úteis em estudos sistemáticos e evolutivos. Neste contexto, conforme salienta Falcão (1984), os altos percentuais de locos polimórficos para hidrolases, descritos na literatura para uma grande diversidade de espécies, animais e vegetais, são devidos justamente a locos esterásicos incluídos nas amostragens. Logo, o grau de polimorfismo nas populações, para diversos sistemas protéicos, deve ser considerado quando da escolha de proteínas a serem estudadas para a caracterização de cultivares.

CONCLUSÕES

a) - A análise de padrões eletroforéticos esterásicos, para tecido de polpa de raiz tuberosa coletado aos 150 dias após o plantio, se constitui em um meio útil e fácil para a caracterização de cultivares de batata-doce;

b) - A variabilidade esterásica observada entre as 7 cultivares de batata-doce estudadas é expressa, principalmente, quanto ao número de regiões de atividade e, secundariamente, quanto à intensidade de coloração das regiões;

c) - Os dados obtidos para proteínas totais e peroxidases são úteis para a separação das cultivares em grupos, mas, impróprios para a identificação de cada cultivar;

d) - Os dados para superóxido dismutase, pelo menos para as condições técnicas empregadas neste trabalho, não são importantes sequer para o estabelecimento de grupos de cultivares;

e) - Marcadores moleculares podem ser estabelecidos a partir dos padrões eletroforéticos obtidos para um dado sistema protéico, independentemente do fato de ter sido este sistema importante ou não para a identificação de todas as cultivares amostradas.

ABSTRACT

It was studied the electrophoretic patterns of Esterases, Total Proteins, Superoxide dismutase and Peroxidase of tuber roots of seven sweet potato cultivars (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) of UFRPE Germoplasm Bank harvested at 70, 120 and 150 days after the planting (dap). Acrylamide gels at 7% in a horizontal system were utilized. The cultivars characterization was only possible through the esterase data obtained in the material gathered at the 150 dap.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BASSIRI, A. Barley cultivar identification by use of isozyme electrophoretic patterns. *Can.J. Plant Science*, v. 56, p. 1-6, 1976.
- 2 CARVALHO, M. P. M. ; Oliveira, S. **Características físicas e químicas de 53 cultivares de batata-doce:** indicação para uso de alimentos e para aproveitamento industrial. EMBRAPA, Rio de Janeiro, Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças, 14 p. 1982.
- 3 CEREDA, M. P.; Wosiacki, G. e Conceição, F. A. D. Avaliação físico-química e ecológica de vinte e seis cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Horticultura Brasileira*, v. 2, p. 6-12, 1984.

- 4 CONTEL, E. P. B. *Isoenzimas da malato desidrogenase (EC. 1.1.3.37) em organismos haplodiplóides*, Ribeirão Preto, 1975. 143 p. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- 5 DESBOROUGH, S. ; Peloquin, S. J. Esterase isozymes from *Solanum tubers*. *Phytochemistry*, v. 6, p. 989-994, 1967.
- 6 DESBOROUGH, S. ; Peloquin, S. J. Potato variety identification by use of electrophoretic patterns of tuber proteins and enzymes. *American Potato Journal*, v. 45, p. 220-229.
- 7 FALCÃO, T. M. M. de A. 1984. Polimorfismo protéico em populações naturais de abelhas brasileiras. (Tese de Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 231p. 1968.
- 8 FEDAK, G. ; Rajhathy, T. Esterase isozymes in Canadian barley cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 52, p. 507-516, 1972.
- 9 FERGUSON, A. *Biochemical Systematics and evolution*, London : Blackie, 194p. 1980.
- 10 GOMES, M. M. ; Leal, N. R. Caracterização de germoplasma de batata-doce por meio de padrões eletroforéticos de enzimas e proteínas solúveis. *Horticultura Brasileira*, v. 3, p. 72. 1985.
- 11 KOKUBO, T. ; Maeda, K. Variation of peroxidase isozymes in sweet potato varieties. *Memoirs of the Faculty of Agriculture*, v. 14, p. 77-84, 1978.
- 12 LABERGE, D. E. Kruger, J. E. ; Meredith, W. O. S. Peroxidase isozymes in mature barley kernels. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 53, p. 705-713, 1973.
- 13 LIMA, L. M. K. S. *Investigação de esterases e proteínas não catalíticas em várias espécies de abelhas*, Ribeirão Preto, 1978. 146 p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1978.
- 14 MAFRA, R. C. Cultura da batata-doce. Recife:UFRPE/CEPA, 27p. (mimeografado). 1978.
- 15 OLIVEIRA, E. A. Controle genético de isozimas de peroxidase e de catecol oxidase em *Phaseolus vulgaris* L. e suas relações com *Uromuces phaseoli* (Reb) Wint *typica* Arth. Porto Alegre, 1977. 151 p. tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1977.
- 16 OLIVER, J. L. ; Martinez-Zapater, J. M. A genetic classification of potato cultivars bases on allozyme patterns. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 69, p. 305-311, 1985.
- 17 QUIROS, C. F. Identification of alfalfa plants by enzyme electrophoresis. *Crop Science*, v. 20, p. 262-264, 1980.
- 18 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, 285 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1989.

- 19 SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochemical Journal*, v. 61, p. 629-641, 1955.
- 20 WILKINSON, C. A. , Mulchi, C. L. ; Aycok, Jr., M. K. Polyacrylamide gel electrophoresis for cultivar identification in tobacco. *Crop Science*, v. 25, p. 715-720, 1985.
- 21 ZWARTZ, J. A. Potato varieties and their protein electropherogram characteristics. *European Potato Journal*, v. 9, p. 111-128, 1966.

Recebido para publicação em 26/07/95