

ANÁLISE ELETROFORÉTICA DA PEROXIDASE DO TEGUMENTO DA SEMENTE COMO COMPLEMENTO NA IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA¹

Antonio Carlos Baião de Oliveira²
Carlos Sigueyuki Sedyama²
Tuneo Sedyama²
Carlos Floriano de Moraes²

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente expansão da cultura da soja no Brasil, novos cultivares adaptados a essas áreas têm sido desenvolvidos. Por essa razão, a caracterização precisa dos cultivares torna-se cada vez mais necessária (15). A identificação de muitos cultivares de soja é difícil, em razão do grande número de características morfológicas em comum, resultantes da estreita base genética dos programas de melhoramento dessa espécie (2, 6, 14). Portanto, a caracterização de cultivares de soja baseada apenas nos aspectos externos da planta e sobretudo da semente é insuficiente, havendo necessidade da utilização de procedimentos complementares, os quais permitem a pronta separação dos cultivares.

A enzima peroxidase, embora amplamente distribuída no reino vegetal e ocorrendo na maioria dos tecidos vivos, ainda não teve o seu papel fisiológico totalmente elucidado (11). Pode estar envolvida na oxidação da auxina (10), nos mecanismos de resistência a doenças (12, 16), na formação

¹ Parte da tese apresentada, pelo primeiro autor, à Universidade Federal de Viçosa para obtenção do título de *Magister Scientiae* em Genética e Melhoramento.

Aceito para publicação em 02.10.1995.

² Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa. 36571-000 Viçosa, MG. O primeiro autor é bolsista do CNPq.

da parede celular (8), na regulação da permeabilidade das membranas (7) e na dormência de sementes, por meio do controle da entrada de oxigênio através do tegumento da semente (9).

BUTTERY e BUZZELL (3) separaram diversos cultivares de soja em dois grupos, com base na atividade alta ou baixa da peroxidase no tegumento da semente. Para isso, utilizaram dois métodos: um teste rápido baseado na utilização do reagente guaiacol e um teste envolvendo eletroforese em gel de poliacrilamida. Posteriormente, BUZZELL e BUTTERY (4) demonstraram, por meio de análises genéticas, que as atividades alta e baixa da peroxidase no tegumento da semente de soja são controladas por um gene maior, *Ep*. Este, com dominância completa, produz a atividade alta, e o seu alelo recessivo, *ep*, a atividade baixa. Os autores constataram, ainda, que o controle da atividade está no tecido maternal e não no endosperma ou no embrião.

COSTA *et alii* (6) utilizaram a atividade da peroxidase do tegumento da semente para separar cultivares comerciais de soja plantados no Brasil. Entre os 47 cultivares analisados, constataram a existência de dois grupos: um de 33 cultivares apresentando reações positivas e outro de 13, negativas. Apenas um cultivar apresentou reação positiva e negativa, provavelmente em consequência de mistura varietal.

O presente trabalho teve como objetivo utilizar a atividade das isoperoxidasas no tegumento da semente, para caracterizar 14 cultivares comerciais de soja cultivados no Brasil e para detectar a presença ou não de hibridação em um cruzamento envolvendo cultivares contrastantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os cultivares Bossier, Cristalina, Doko, Garimpo, IAC-8, IAC-12, Paraná, Paranagoiana, Paranaíba, Primavera, Santa Rosa, Uberaba, UFV-1 e UFV-4.

Foram realizados cruzamentos entre os cultivares Bossier e Uberaba, dos quais obtiveram-se 47 sementes supostamente F_1 , que, por autofecundação, produziram 47 lotes de sementes tidas como F_2 . Retirou-se amostra de 10 sementes de cada um desses lotes para verificar a ocorrência ou não de hibridação. O restante das sementes de cada lote foi armazenado. As 47 amostras foram subdivididas em três conjuntos de 12 e um de 11 amostras. Cada conjunto foi analisado, juntamente com os progenitores, no mesmo gel.

Inicialmente, procedeu-se à análise eletroforética da enzima peroxidase (PO; E.C. 1.11.1.7) de extratos de tegumentos dos 14 cultivares. Foram analisadas 10 repetições, cada uma formada pelo conjunto dos 14 cultivares, avaliados em um único gel. Desenvolveu-se a eletroforese a,

aproximadamente, 4°C, em géis de amido de milho (maisena), a 12%. No preparo dos géis, empregaram-se 42 g de amido em 350 ml de solução-tampão, conforme descrito por CONKLE *et alii* (5).

As sementes foram pré-embebidas por 24 horas em papel germiteste, umedecido com água desmineralizada, em germinador a 27°C. Essa operação facilitou a retirada do tegumento, do qual tomou-se 1/3, que foi macerado em 0,5 ml do tampão do gel.

O sistema-tampão empregado no preparo do gel foi uma diluição de 1:15 do sistema-tampão Tris 0,135 M e ácido cítrico 0,043 M, pH 7,0, utilizado nos eletrodos (13). Os géis foram preparados com antecedência e resfriados à temperatura ambiente. Em seguida, foram levados ao refrigerador por, aproximadamente, uma hora antes da aplicação das amostras e execução da eletroforese.

As amostras, após maceradas a frio, produziram, após filtração em lenço de papel, extrato que foi absorvido em tiras de papel cromatográfico Whatman 3 MM (10 x 4 mm), as quais foram aplicadas seqüencialmente no gel, a 4 cm de uma das extremidades, no corte transversal previamente realizado (1).

Fez-se, inicialmente, uma pré-corrida eletroforética de 30 minutos a 150 V, para liberar as enzimas das tiras de papel, contendo o extrato, para o gel. Após esse tempo, as tiras de papel foram retiradas e a voltagem ajustada para 300 V, a qual permaneceu constante até o final da corrida, o que se deu quando a frente de migração atingiu a distância de 8 cm a partir da origem.

Após a eletroforese, o gel foi cortado horizontalmente em quatro lâminas de, aproximadamente, 2 mm de espessura. Descartaram-se as duas externas e coraram-se as outras duas. O protocolo para revelação da atividade da peroxidase foi o proposto por SHAW e PRASAD (13), que utiliza solução composta de 50 mg de 3-amino-9-etil carbazole, 5 ml de dimetilformamida (DMF), 0,5 ml de H₂O₂ 3% (v/v), 92,5 ml de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 e 2,0 ml de CaCl₂ 0,1 M. A revelação da peroxidase foi a 8°C por uma hora e a fixação dos géis foi feita em glicerina, a 50%. Os géis, após corados e fixados, foram secos entre folhas de papel celofane em estufa a, aproximadamente, 38°C por 24 horas, etiquetados e arquivados para análise dos resultados (1).

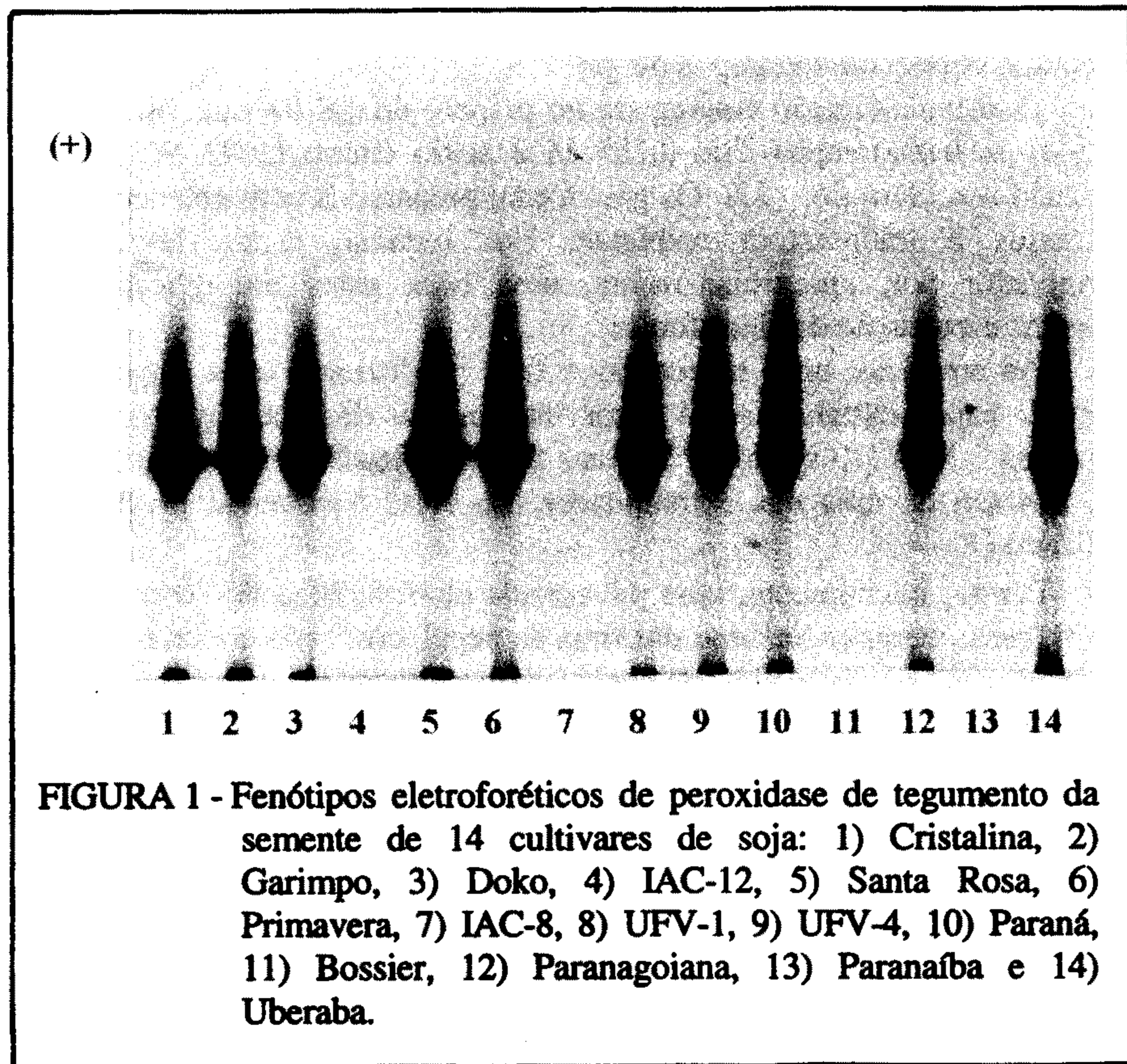
Terminada a análise dos cultivares, procedeu-se às análises das 47 sementes tidas como F₁ e, posteriormente, das respectivas sementes F₂, adotando-se os mesmos procedimentos empregados no estudo dos cultivares.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A melhor lâmina para revelação da atividade da peroxidase foi a

segunda do topo para a base do gel.

A peroxidase do tegumento da semente foi ativa em determinados cultivares e ausente em outros (Figura 1), possibilitando a separação dos 14 cultivares em dois grupos distintos, com base na presença ou na ausência de bandas no gel (Quadro 1).



QUADRO 1 - Classificação de 14 cultivares de soja segundo os fenótipos eletroforéticos de peroxidase extraída de tegumento da semente

| Fenótipo | Cultivares |
|---------------------------|---|
| Ausência de Bandas no Gel | Bossier, IAC-8, IAC-12, Paranaíba |
| Presença de Bandas no Gel | Cristalina, Doko, Garimpo, Paraná, Paranagoiana, Primavera, Santa Rosa, Uberaba, UFV-1, UFV-4 |

Os cultivares que mostraram atividade de peroxidase no tegumento da semente, detectada pela presença de bandas no gel, foram designados como do grupo de reação positiva e os que não apresentaram atividade, ausência de bandas no gel, como do grupo de reação negativa. BUTTERY e BUZZELL (3) fizeram determinações quantitativas do nível de peroxidase em extratos do tegumento da semente de cultivares dos dois grupos e verificaram que aqueles do grupo de reação positiva exibiram mais de 78 vezes a atividade dos cultivares do grupo de reação negativa.

Dentro do grupo de cultivares de reação positiva da peroxidase não houve diferenças qualitativas entre as bandas, apenas variações na intensidade das mesmas (Figura 1).

Todas as 47 sementes supostamente F₁ exibiram o mesmo fenótipo eletroforético do progenitor feminino (Bossier), ou seja, ausência total de bandas no gel.

Na análise das 47 amostras de sementes tidas como F₂, provenientes do cruzamento entre Bossier (reação negativa) e Uberaba (reação positiva), 38 apresentaram reação positiva à peroxidase, a qual foi derivada do progenitor masculino (Uberaba), confirmando a ocorrência de hibridação nessas amostras, enquanto nove amostras de sementes exibiram reação negativa à peroxidase como resultado de autofecundação (Figura 2). A atividade da peroxidase do tegumento da semente mostrou ser de origem maternal, em razão da ausência de bandas nas amostras de sementes F₁, e foi eficaz na identificação de híbridos F₁, pela análise das sementes da geração F₂, ratificando os resultados obtidos por BUZZELL e BUTTERY (4).

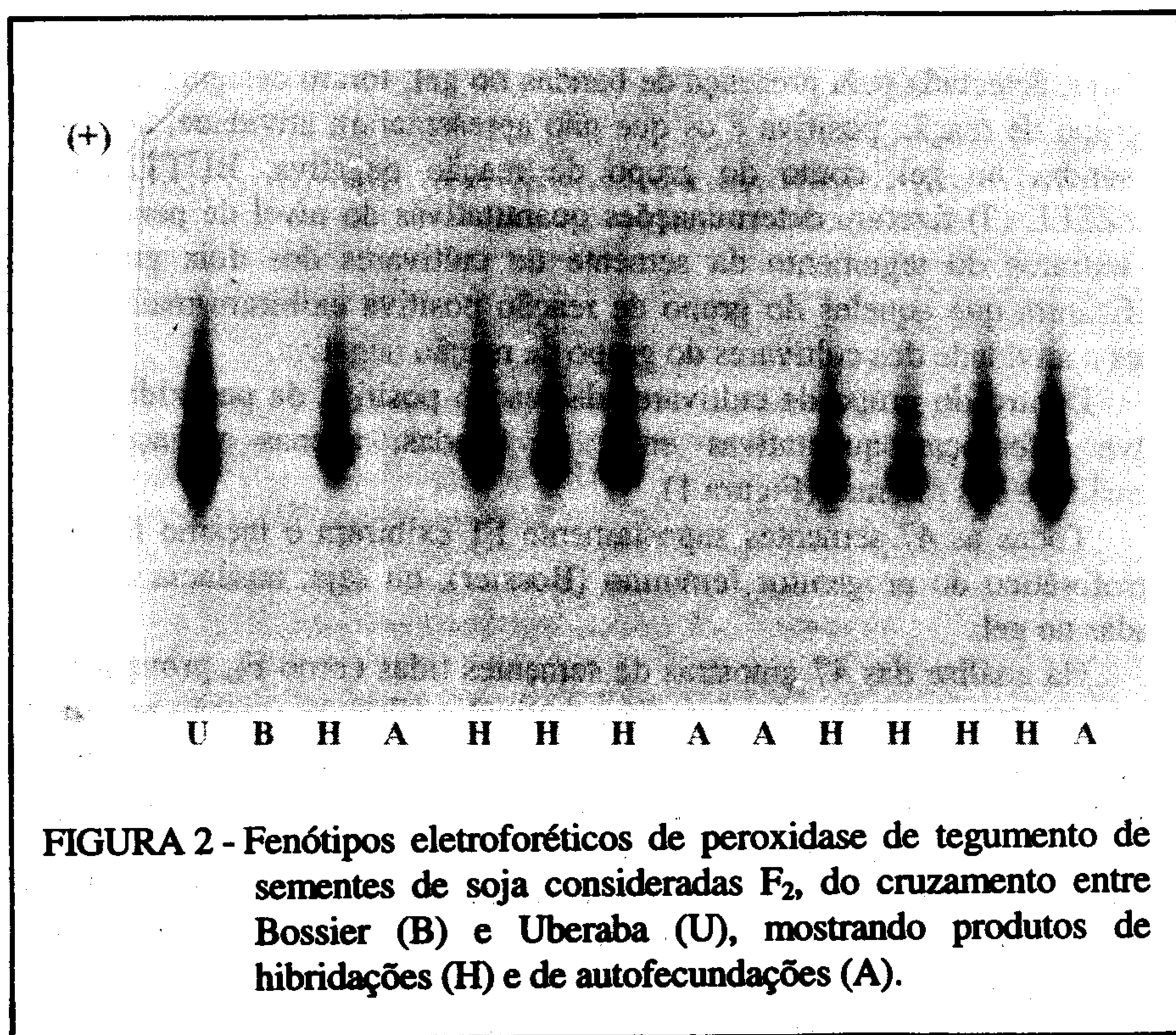
4. RESUMO E CONCLUSÕES

Quatorze cultivares de soja foram separados em dois grupos principais, baseados nas atividades alta ou baixa da enzima peroxidase da semente, detectadas eletroforeticamente pela presença ou ausência de bandas no gel, respectivamente, viabilizando o uso dessa técnica como complemento na identificação de cultivares de soja. A mesma técnica foi empregada, com sucesso, para detectar a ocorrência ou não de hibridação em um cruzamento envolvendo dois cultivares de soja contrastantes em relação à atividade de isoperoxidasas no tegumento, possibilitando separar os híbridos das autofecundações na ausência de marcadores morfológicos.

5. SUMMARY

(ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF PEROXIDASE OF SEED COAT AS A COMPLEMENT OF IDENTIFICATION OF SOYBEAN CULTIVARS)

The electrophoretic analysis of peroxidase enzyme in the seed coat of



soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] enabled the discrimination of 14 Brazilian commercially cultivated soybean cultivars into two groups: one with high peroxidase activity in the seed coat, detected by the presence of bands on starch gel, and another with low peroxidase activity, inferred from the absence of bands. The procedure was also used, with success, for detecting hybridization through the analysis of the F₂ seeds, from a cross involving one cultivar of each group, in the absence of morphological traits.

6. LITERATURA CITADA

1. ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W. & PASSADOR, G.C. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa, MG, Sociedade de Investigações Florestais, 1991. 242p.
2. ANDRADE, R.N.B. & H. SOBRINHO, E. Caracterização de cultivares de soja através da técnica eletroforética. *R. Bras. Sem.*, 2(3): 97-104, 1980.
3. BUTTERY, B.R. & BUZZELL, R.I. Peroxidase activity in seeds of soybean varieties. *Crop Sci.*, 8: 722-5, 1968.
4. BUZZELL, R.I. & BUTTERY, B.R. Inheritance of peroxidase activity in soybean seed coats. *Crop Sci.*, 9: 387-388, 1969.
5. CONKLE, M.T.; HODGSKISS, P.D.; NUNNA, L.B. & HUNTER, S.C. *Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual*. Berkeley, CA, USDA, Forest

- Service, 1982. 18p. (Gen. Tech. Rep., PSW-64).
6. COSTA, N.P.; PEREIRA, L.A.G. & FRANÇA NETO, J.B. Método da peroxidase para identificação de cultivares de soja. *R. Bras. Sem.*, 1(1): 89-93, 1979.
 7. DE JONG, D.W. Speculation on the mechanisms of ion transport in roots, based upon indirect evidence from histochemical studies. *Bot. Gaz.*, 127: 17-26, 1966.
 8. DE JONG, D.W. An investigation of the role of plant peroxidase in cell wall development by the histochemical method. *J. Histochem. Cytochem.*, 15: 336-346, 1967.
 9. MAJOR, W. & ROBERTS, E.H. Dormancy in cereal seeds, II. The nature of the gaseous exchange in imbibed barley and rice seeds. *J. Exp. Bot.*, 19: 90-101, 1967.
 10. OCKERSE, R.; SIEGEL, B. & GALSTON, A. Hormone-induced repression of a peroxidase isozyme in plant tissue. *Science*, 151: 452, 1966.
 11. SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plant: a review. *Bioch. Genet.*, 3: 37-79, 1969.
 12. SEEVERS, P.M.; DALY, J.M. & CATEDRAL, F.F. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. *Plant Physiol.*, 48: 353-360, 1971.
 13. SHAW, C.R. & PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes - A compilation of recipes. *Bioch. Genet.*, 4: 297-320, 1970.
 14. SEDIYAMA, T. *Genética e Melhoramento da Soja*. Viçosa, UFV, 1986. 90p.
 15. SEDIYAMA, T.; DESTRO, D.; SEDIYAMA, C.S.; TRAGNAGO, J.L.; CARRARO, T.M. & COSTA, A.V. *Caracterização de cultivares de soja*. Viçosa, UFV, 1981. 81p. (Boletim Técnico, 120).
 16. TOMIYAMA, K. & STAHAMAN, M.A. Alteration of oxidative enzyme in potato tuber tissue by infection with *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.*, 39: 483-490, 1964.