

POLIMORFISMO E SIMILARIDADE DE PROTEÍNAS TOTAIS DE SEIS POPULAÇÕES DE *M. erythroloma*, PELO MÉTODO ELETROFORÉTICO SDS-PAGE¹

POLYMORPHISM AND SIMILARITY OF TOTAL PROTEINS OF SIX POPULATIONS OF *M. erythroloma*, FOR THE ELECTROPHORETIC METHOD SDS-PAGE

Andréia Guedes GARCIA²
Alice BATTISTIN³
Júlio VIÉGAS⁴
José Henrique Souza da Silva⁵

RESUMO

No Brasil ocorrem dez espécies do gênero Macroptilium, entre estas espécies, quatro são encontradas no estado do Rio Grande do Sul. O objetivo do trabalho foi verificar a ocorrência de variabilidade genética, através da presença de polimorfismo protéico e da similaridade das proteínas totais em seis populações de M. erythroloma (Benth.) Urban, de ocorrência natural no Rio Grande do Sul. As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Citogenética Vegetal e Biotecnologia do Departamento de Biologia pertencente ao Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O gel das proteínas totais foi analisado adotando-se sementes como indivíduos das populações de M. erythroloma, em gel de poliacrilamida — dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As interpretações dos géis de proteínas totais entre indivíduos e entre as populações foram realizadas através de zimograma eletroforético para a verificação do polimorfismo protéico. A similaridade foi observada através de dendrograma. Os indivíduos de todas as populações de M. erythroloma mostraram-se monomórficos no sexto loco e heteromórficos no primeiro, terceiro e quarto locus, e ausentes em algumas das populações. Os coeficientes de similaridade de proteínas totais da espécie M. erythroloma, apresentaram maior similaridade entre os indivíduos de uma mesma população e menor entre as populações.

Palavras-chave: Macroptilium, polimorfismo protéico, SDS-PAGE

⁽¹⁾ Extraído da dissertação de mestrado apresentada pelo primeiro autor, ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, CCR, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

⁽²⁾ Zootecnista, MSc. em Zootecnia pela UFSM, Santa Maria, RS. Autor para correspondência, endereço: João Brasil nº 119, 97590-000, Rosário do Sul - RS. E-mail: mazuttiag@bol.com.br

⁽³⁾ Bióloga, Dra. em Agronomia, Professora do Departamento de Biologia da UFSM, Santa Maria, RS.

⁽⁴⁾ Engenheiro Agrônomo, Dr. em Zootecnia, Professor do Departamento de Zootecnia da UFSM, Santa Maria, RS.

⁽⁵⁾ Engenheiro Agrônomo, PhD. em Zootecnia, Professor do Departamento de Zootecnia da UFSM, Santa Maria, RS.

ABSTRACT

In Brazil ten species of the genus Macroptilium, occur among which four are found in the state of Rio Grande do Sul. The objective of the work was to verify the occurrence of genetic variability through the presence of protein polymorphism and of the similarity of total proteins in six populations of M. erythroloma (Benth.) Urban, which occurs naturally in Rio Grande do Sul. The analyses were carried out in the Laboratory of Vegetable Cytogenetics and Biotechnology of the Department of Biology at the Center of Natural and Exact Sciences (CCNE) Federal University of Santa Maria (UFSM). The total protein gel was analyzed using as adopted seeds individuals of M. erythroloma populations in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE). The interpretations of the total protein gels among individuals and among the populations were carried out through electrophoretic zymograms for verification of the polymorphism protein. The similarity was observed through dendrograms. The individuals of all the M. erythroloma populations was monomorphic in the sixth loco and heteromorphic in the first, third and fourth locus, and absent in some of the populations. The coefficients of similarity of total proteins of the species M. erythroloma, presented a larger similarity between the individuals of the same population and a smaller one among the populations.

Key words: *Macroptilium, protein polymorphism, SDS-PAGE.*

INTRODUÇÃO

O gênero *Macroptilium* está distribuído exclusivamente na América, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. São considerados centros de dispersão do gênero, o Brasil e o Paraguai, na América do Sul e o México, na América do Norte. No Brasil, está representado por dez espécies, distribuídas da Amazônia ao Rio Grande do Sul (FEVEREIRO, 1987).

Foi sugerido, por GONÇALVES (1980), o desenvolvimento de trabalhos que visem preservar as melhores espécies forrageiras nativas, evitando a perda de germoplasma adaptado às condições ecológicas das regiões, visando a utilidade para futuros trabalhos de melhoramento genético e em programas de recuperação de áreas degradadas. Recursos genéticos naturais, tanto de origem vegetal como de origem animal, são ferramentas importantes na realização de estudos para aprimorar novos conhecimentos, considerando estes recursos como base para sustentabilidade futura (COLL & ZARZA, 1992).

A variabilidade genética é um dos pontos básicos para processos de seleção (NASCIMENTO JÚNIOR *et al.*, 1990). Todos os indivíduos que possuem níveis consideráveis de variações genéticas dentro de um grupo, são favoráveis, servindo como um mecanismo eficiente no melhoramento da espécie.

A presença de níveis genéticos definíveis entre os indivíduos de uma população da espécie é indicativo da evolução da população. Conforme GREGORY (1967), populações com vários mutantes de pequeno efeito individual estabelecem uma base perfeita para a seleção.

Trabalhos desenvolvidos com o intuito de identificar a presença de variação genética intra e inter populacionais são importantes para o embasamento em programas de melhoramento vegetal. Estudos relacionados à variação genética em populações de espécies naturais requerem a utilização de técnicas de quantificação da diversidade genética, bem como uma adequada amostragem de espécies e populações (KAGEYAMA & JACOB, 1980; KAGEYAMA *et al.*, 1999).

A análise eletroforética de proteínas totais é um dos métodos mais utilizados para o estabelecimento de relações genéticas entre espécies e entre diferentes genótipos de uma mesma espécie (MACIEL *et al.*, 1999).

O trabalho teve como objetivo, verificar a ocorrência de variabilidade genética em populações de *M. erythroloma*, adotando-se o método eletroforético (SDS-PAGE), descrito por PAYNE *et al.* (1980, 1982). Foram analisadas seis populações de *M. erythroloma*, de ocorrência natural no estado do Rio Grande do Sul, interpretados em zimograma a presença de polimorfismo protéico e em dendrograma

a similaridade das proteínas totais, comparando-se os resultados entre indivíduos e populações.

MATERIAL E MÉTODOS

A análise eletroforética das proteínas totais foi realizada em seis populações da espécie *M. erythroloma* (Tabela 1), em gel de poli(acrilamida — dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em cuba horizontal e sistema contínuo. O trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética Vegetal e Biotecnologia do Departamento de Biologia pertencente ao Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Para caracterizar e determinar o perfil eletroforético das proteínas foram realizados três tipos de testes de voltagem com seis migrações cada teste e três concentrações de gel, totalizando 54 géis.

A melhor definição das bandas foi observada no gel de concentração 5%, voltagem inicial de 160 V e a final de 110 V, utilizado nos demais géis a mesma concentração e voltagens.

Os tampões utilizados foram os descritos por SCANDALIOS (1969), para a obtenção dos eletroforogramas de proteína, modificados para: Tris-citrato 0,2 M (pH 8,3) constituído de 6,2 g de Tris, 1,6 g de ácido cítrico e água para completar 1000 mililitros (mL); Lítio-borato 0,2 M (pH 8,3) formado por 1,2 g de hidróxido de lítio (LiOH), 11,89 g ácido bórico e água. O tampão do gel era na proporção 9:1, constituído pelos tampões Tris-citrato e Lítio-borato, respectivamente.

A solução de extração das amostras era preparada na proporção 9:1 do tampão do gel, mais 0,15% de 2-mercaptoetanol e 2,0 g/L de SDS.

A composição do SDS—PAGE a 5% era a seguinte: 80 mL do tampão do gel, 3,8 g de acrilamida, 0,2 g de bis-acrilamida, 0,12 g de persulfato de amônia, 0,05 g de SDS e 120 µL de tetrametiletilenodiamina (TEMED). Foi acrescentado ao gel 0,07 g de sacarose. Pois segundo, HUSSAIN *et al.* (1988) e CAMPS *et al.* (1994), a presença de sacarose no gel melhora a qualidade dos padrões de bandas.

O eletrodo do tanque era formado por Tris-Glicina (pH 8,9).

O padrão utilizado foi o padrão de proteínas com peso molecular que variava de 10 kDa a 220 kDa, era preparado na proporção 2:1, sendo duas partes de água desionizada e uma do padrão de proteínas.

Na coloração do gel, era utilizado 0,1 g de coomassie blue e 100 mL de fixador. O fixador era constituído da proporção 5:5:1, sendo cinco partes de água destilada, cinco de metanol e uma de ácido acético.

No preparo das amostras para migração, foram utilizadas dez sementes, sendo estas consideradas os indivíduos de cada população. As sementes eram maceradas sem o tegumento, antes submetidas à imersão em água destilada, durante aproximadamente 12 horas.

Na maceração, era acrescentado às amostras 20% de gelatina em pó dos pesos das sementes para análise, com a finalidade de melhorar a resolução das bandas (CAMPS *et al.*, 1994), 20% de polivi-

Tabela 1. Localidades, populações, número de plantas analisadas, indivíduos e datas de coletas da espécie *M. erythroloma* (Benth.) Urban.

Localidade	População / planta	Indivíduos	Data de coleta
Cacequi	7658 / 14	1 / 2	09/01/01
São Gabriel	7657 / 8	3 / 4	10/01/01
Santa Maria	7149 / 10	5 / 6	02/02/01
Restinga Seca	7659 / 8	7 / 8	20/02/01
São Martinho da Serra	7662 / 12	9 / 10	21/01/01
Tupanciretã	7661 / 4	11 / 12	21/01/01

nilpirrolidona (PVP), com o intuito de evitar a oxidação das amostras (ALFENAS *et al.*, 1991) e 40 µL de extrator. As amostras eram maceradas com bastão de vidro em gral resfriados com gelo, temperatura em torno de 1°C. A solução sobrenadante era absorvida em pequenos pedaços de papel Whatman 3 MM, de 4,0 mm por 0,5 cm, para posterior aplicação no gel. Com os mesmos papéis, eram aplicados ao gel o marcador de azul de bromofenol e o padrão de proteínas. Após serem aplicados ao gel, as amostras, o marcador e o padrão de proteínas, iniciava a migração, que ocorria em resfriador com temperatura em torno de 4°C.

A eletroforese das amostras analisadas foi conduzida com voltagem inicial de 160 volts (V), quando percorrido os 30 minutos iniciais, era interrompida a corrida para remover os papéis contendo as soluções das amostras, o marcador e o padrão de proteínas. A voltagem inicial era mantida até o momento que o marcador de azul de bromofenol, colocado nos orifícios laterais do gel, atingisse a metade do gel. A partir deste momento, a voltagem era mantida em 110 V, até o final da corrida, por período médio de 4 horas. Quando o marcador atingia 9,0 cm do gel, a migração era interrompida e o gel era submetido à coloração, em estufa a 37°C, durante 12 horas. Após, o corante era removido e o gel, lavado em água corrente. O gel era colocado no fixador, permanecendo neste, até apresentar boa resolução das bandas.

As interpretações dos géis foram feitas entre indivíduos e populações, através da presença ou ausência de bandas protéicas representadas em zimograma, metodologia descrita por ALFENAS *et al.* (1991). Os coeficientes de similaridade do perfil eletroforético das proteínas foram representados em dendrograma

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à solubilidade potencial em sistemas de determinações protéicas como no método eletroforético, é importante conhecer o grau de desnaturação das proteínas. PASSOS (1996) chamou atenção para a importância do preparo da amostra, no que se refere à solubilização e desnaturação das proteínas. A composição da solução extratora, assim

como a concentração do gel pode variar conforme a espécie e ou o tipo de tecido (ALFENAS *et al.*, 1991).

Na metodologia utilizada para determinação eletroforética das proteínas da espécie *M. erythroloma*, foram testadas diferentes concentrações de SDS-PAGE, devido não se ter conhecimento do peso molecular das proteínas presentes nas amostras em estudo. Considerou-se melhores os padrões de bandas apresentados no SDS-PAGE com concentração de 5%, pois quanto menor a concentração maior é a porosidade presente no gel.

ALFENAS *et al.* (1991), PASSOS (1996), GONÇALVES & BATTISTIN (1999) relataram que, os componentes ionizados dos extratos protéicos, quando submetidos ao efeito da corrente elétrica, migrarão com velocidades individuais. Uma determinada proteína pode ser identificada, depois da corrida, tanto qualitativamente pela posição no gel, como quantitativamente pela intensidade de sua banda.

A velocidade de migração depende de muitos fatores, que incluem carga elétrica global da molécula, tamanho e forma da molécula, intensidade de campo elétrico, propriedades do meio de sustentação e temperatura de operação (KARCHER & EPSTEIN, 1996). Com o propósito de atingir melhores resoluções das bandas de proteínas, também foram testadas as voltagens, adotando-se a voltagem inicial de 160 V e final de 110 V.

A solubilidade em que se concentra uma proteína, pode ser usada como uma indicação geral de desnaturação das proteínas, que por sua vez podem concentrar-se e isolar-se (PILOSOF *et al.*, 1981). Para evitar a insolubilidade progressiva de proteínas nas amostras, foi controlada a temperatura de 4°C durante a corrida. CAMPS *et al.* (1994), na caracterização eletroforética de cultivares de soja, adotaram a migração em cubas mantidas em câmara fria a 4°C. PASSOS (1996) relatou a importância do controle da temperatura no momento da corrida, porque a resistência dos poros do gel à passagem dos fragmentos de proteína, gera calor.

No gel SDS-PAGE 5% (Figura 1), foram desenvolvidas as análises das bandas protéicas, mostrando a presença de seis bandas nos indivíduos das seis populações, distribuídas entre 30 kDa e 160 kDa.

No zimograma representado na Figura 2, verifica-se que as bandas das proteínas entre as seis populações analisadas, apresentaram-se monomórficas apenas para o sexto loco, sendo heteromórfica nos demais locos.

Em relação aos indivíduos da população de Cacequi, verificou-se monomorfismo no primeiro, segundo, quarto, quinto e sexto locus, não sendo observado heteromorfismo. A população de São Gabriel apresentou monomorfismo no segundo, quarto e sexto locus e o primeiro loco foi heteromórfico. A presença de monomorfismo para a população de Santa Maria foi verificada no segundo, quarto e no sexto locus, com ausência de heteromorfismo. Na população de Restinga Seca, foi verificado monomorfismo no primeiro, segundo, quarto, quinto e sexto locus, não sendo encontrado heteromorfismo. A população de São Martinho da Serra apresentou monomorfismo no primeiro, quarto e sexto locus, não apresentou locus heteromórficos. Monomorfismo foi verificado na população de Tupanciretã, verificou-se monomorfismo no primeiro, segundo e no sexto locus. Apresentando heteromorfismo no terceiro e quarto locus.

A representação dos coeficientes de similaridade das proteínas totais entre indivíduos das populações e entre populações está registrada na Figura 3.

A similaridade entre os indivíduos das populações se distribuiu numa amplitude de variação entre 50 e 100% (Tabela 2). Os indivíduos das populações de São Martinho da Serra, Restinga Seca,

Santa Maria e Cacequi apresentaram coeficientes de similaridade de 100%. Na população de São Gabriel os indivíduos mostraram 83% de similaridade e entre os indivíduos de Tupanciretã apresentaram 67% de similaridade.

Entre as populações formaram-se dois grupos. Em um deles o coeficiente de similaridade foi de 67%, encontrando-se as populações de São Martinho da Serra, Restinga Seca, Santa Maria, São Gabriel e Cacequi. Unindo a este grupo, a população de Tupanciretã a similaridade apresentada foi de 50%.

Segundo WRIGHT (1964), dentro de uma espécie com ampla área de distribuição natural, as diferenças genéticas entre as populações geograficamente distintas são maiores que as existentes entre progênies de uma determinada região.

Embora as populações estudadas pertençam à mesma espécie, apresentam uma significativa variabilidade de bandas entre elas. Isto indica serem populações com atividade gênica ativa e, talvez, grandemente influenciada por fatores ambientais, já que estas populações são provenientes de diferentes locais.

Conforme KIMURA & OHTA (1971), uma das objeções principais é que os mesmos alelos sejam achados com freqüências semelhantes entre sub-populações diferentes de uma espécie. Quando ocorrem diferenças, algum tipo de seleção balanceada deve estar envolvida. Variações genéticas causadas por mutações neutras, podem ser responsabilizadas pela presença de polimorfismos protéicos nas populações.

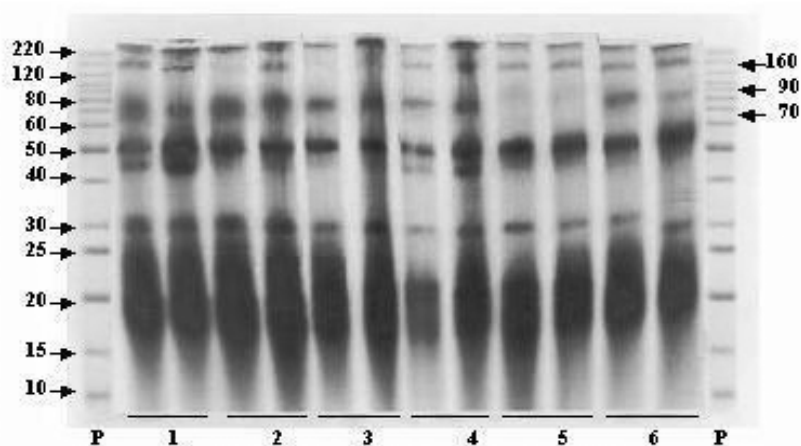


Figura 1. Bandas de proteínas totais de seis populações de *M. erythroloma*, gel de poliacrilamida a 5% (SDS—PAGE).

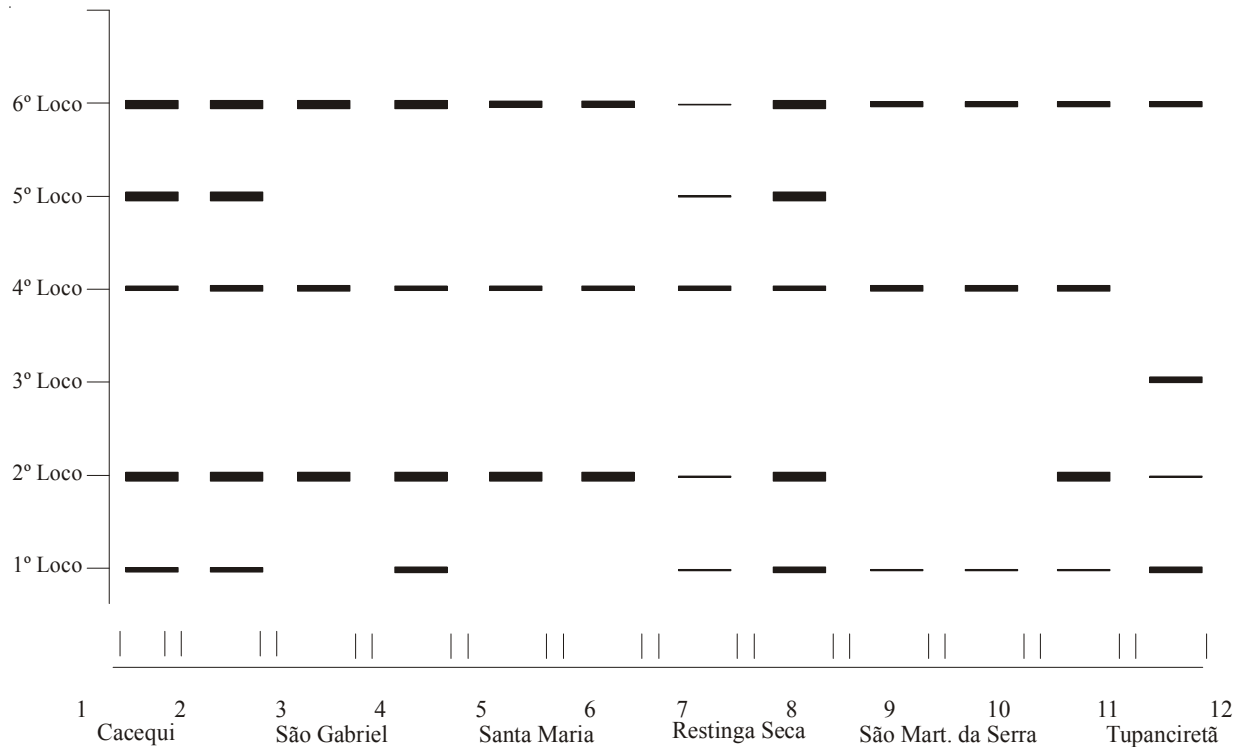


Figura 2. Zimograma de *M. erythroloma* em SDS—PAGE: seis populações, com dois indivíduos em cada uma das populações.

O heteromorfismo das proteínas totais de populações pode ser explicado admitindo que ocorra uma taxa de mutação relativamente alta por loco e uma baixa taxa de migração por geração. Segundo ALFENAS *et al.* (1991), um loco será considerado polimórfico a partir do momento em que a frequência de seu alelo mais comum não ultrapasse a 0,95.

Nas populações estudadas de *M. erythroloma*, apenas um dos locos (banda protéica) revelou-se em todos os indivíduos de todas as populações. Foi observada com frequência a presença de monomorfismo entre os indivíduos e o heteromorfismo foi observado em apenas duas populações, sendo a de São Gabriel e Tupanciretã.

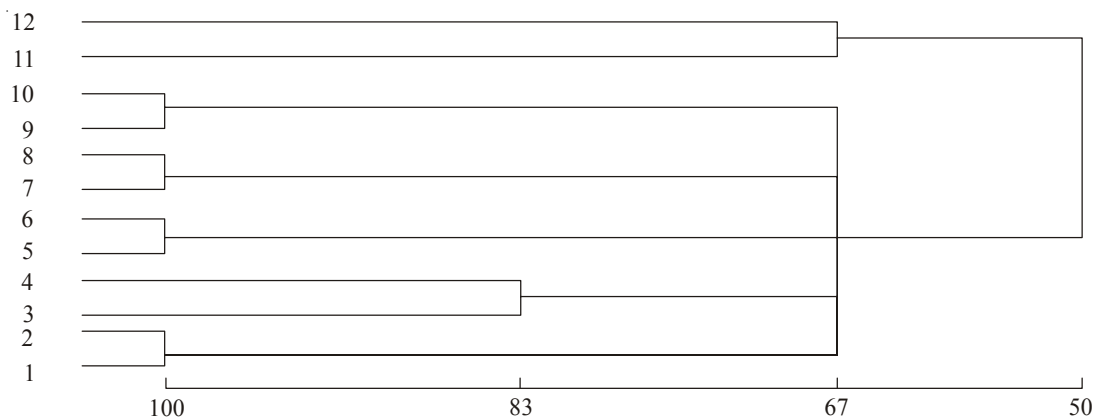


Figura 3. Dendrograma dos coeficientes de similaridade entre indivíduos e populações de *M. erythroloma*, em gel (SDS—PAGE).

Tabela 2. Coeficiente de similaridade (%) entre indivíduos de cada população de *M. erythroloma*, obtidos em gel de poliacrilamida a 5% (SDS-PAGE).

População	Indivíduos	Coeficiente de similaridade (%)
Cacequi	1 / 2	100
São Gabriel	3 / 4	83
Santa Maria	5 / 6	100
Restinga Seca	7 / 8	100
São Martinho da Serra	9 / 10	100
Tupanciretã	11 / 12	67

As variações observadas nos resultados das análises utilizadas para a interpretação eletroforética das proteínas totais nas seis populações investigadas, tendo em vista que foram utilizadas amostras de procedência natural, podem ser atribuídas às condições ambientais como: clima, potencial do solo e a características genéticas da própria espécie.

MARCON (1988), trabalhando com eletroforese em 25 populações de *Stylosanthes humiles*, coletadas à campo, verificou a relação da função e a variação ambiental, em condições ecogeográficas principalmente o clima, solo e tamanho das populações. Concluiu que as condições ambientais das regiões onde foram coletadas as populações da espécie influenciam na diversidade genética, mas não influenciam significativamente na produção de forragem da espécie.

CONCLUSÕES

Todos indivíduos das populações de *M. erythroloma* mostraram-se monomórficos para o loco seis, heteromórficos nos locus três e quatro de Tupanciretã e no loco um, de São Gabriel.

Os coeficientes de similaridade das proteínas totais de *M. erythroloma*, revelaram que existe maior similaridade entre indivíduos de mesma população e menor entre as populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF. 1991. 242p.

CAMPS, G.; VERNETTI, F. J.; AUGUSTIN, E. et al. Caracterização morfológica e eletroforética de 20 cultivares de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, n.11, p.1779-1787, 1994.

COLL, J.; ZARZA, A. Leguminosas nativas promisorias: trébol polimorfo y babosita. **Pasturas**, n. 22, p. 6-19, 1992.

FEVEREIRO, V. P. B. *Macroptilium* (BENTHAM) URBAN do Brasil (Leguminosae-Faboideae-Phaseoleae-Phaseolinae). **Arquivo do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v.28, p.109-180, 1987.

GONÇALVES, J. O. N. As principais forrageiras de ocorrência natural no RS. In: **SEMINÁRIO SOBRE PASTAGENS: DE QUE PASTAGEM NECESSITAMOS**, 1980, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 1980. p. 59-73.

GONÇALVES, R. S.; BATTISTIN, A. **Curso de introdução à eletroforese**. Santa Maria, RS., 1999. 21p.

GREGORY, W. C. Mutation breeding. **Plant Breeding**, v.2, n.5, p.189-217, 1967.

HUSSAIN, A.; RAMIREZ, H.; ROCA, W. M. et al. Identification of cultivars of pasture legumes (*Centrosema macrocarpum*, *C. pubescens* and *C. sp. n*) by acid polyacrylamide gel electrophoresis of cotyledons storage proteins. **Euphytica**, n.39, p.105-107, 1988.

KAGEYAMA, P. Y.; JACOB, W. S. Variação genética entre e dentro de populações de *Araucaria Augustifolia* (Bert) O. Ktze. **I Afro Meeting on Forestry Problems of the genus Araucária**, p.83-86, 1980.

KAGEYAMA, P., GANDARA, F.; VENCOSKY, R. Conservação "in situ" de espécies arbóreas tropicais. **ESALQ/ USP**, n.1, p.1-14, 1999.

KARCHER, R. E.; EPSTEIN, E. **Tietz fundamentals of clinical chemistry**. Dallas, Texas: Burtis and Ashwood, 1996. 836p.

KIMURA, M.; OHTA, T. Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. **Nature**, n.229, p.467-469, 1971.

MACIEL, F. L.; GERALD, L. T. C.; ECHEVERRIGARAY, S. Variabilidade em faseolinas e outras proteínas solúveis entre cultivares e landraces de feijão do Rio Grande do Sul. **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n.3, p.533-536, 1999.

MARCON, G. **Estrutura genética de populações de *Stylosanthes humiles* H.B.K. (Leguminosae) de três regiões ecogeográficas do estado de Pernambuco**. São Paulo, SP: USP, 1988. 191p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, 1988.

NASCIMENTO JÚNIOR, A.; CARVALHO, F. I. F.; BARBOSA NETO, J. F. et al. Agentes mutagênicos e a intensidade de variabilidade genética em caracteres adaptativos na cultura de aveia (*Avena sativa* L.). **Agronomia Sulriogradense**, v.26, n.2, p.199-216, 1990.

PAYNE, P. I.; LAW, C. N.; MUDD, E. E. Control by homoeologous group 1 chromosomes of high-molecular-weight subunits, a major protein of wheat endosperm.

Theoretical and Applied Genetics, v.58, p.113-120, 1980.

PAYNE, P. I.; HOLT, L. M.; LAWRENCE, G. et al. The genetics of gliadin and glutenin, the major storage protein of the wheat endosperm. **Qual. Plant. Foods Hum. Nutri.**, v.31, p.229-241, 1982.

PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL. 1996. 223p.

PILOSOF, A. M.; BARTHOLOMAI, G. B.; CHIRIFE, J. Kinetics of nitrogen solubility loss in heated flour and protein isolates from bean, *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Food Science**, n.47, p.4-7, 1981.

SCANDALIOS, J. G. Genetic control of molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical genetics**, n.3, p.37-79, 1969.

WRIGHT, J. W. **Mejoramiento genético de los arboles forestales**. Roma: FAO. 1964. 436p.