

**CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE *Amaranthus hybridus* L. E *Amaranthus viridis* L.
ATRAVÉS DE ISOENZIMAS**

ANGELA MARIA MALUF¹
PAULO SODERO MARTINS²

RESUMO: Através da técnica de eletroforese de gel de amido com migração horizontal, pode-se observar que para esterase, apenas o *Amaranthus hybridus* tipo verde apresentou variação, na forma de presença ou ausência da banda na posição 0.7. Por outro lado, para peroxidase, para todas as espécies e biótipos (*A.viridis* e *A.hybridus* tipo verde e tipo roxo) houve variação no padrão de bandas. Através da existência de bandas comuns às duas espécies, pode-se detectar evidências de hibridação e introgressão entre elas.

Termos para Indexação: eletroforese, isoenzima, esterase, peroxidase, *Amaranthus*, hibridação, introgressão

**PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF *Amaranthus hybridus* L. AND *Amaranthus viridis* L.
THROUGH ISOZYMES**

ABSTRACT - Through starch gel electrophoresis with horizontal migration, *Amaranthus hybridus* green biotype was the only accession to show variation in esterase patterns, with presence or absence of a band in position 0.7. On the other hand, all species and biotypes (*A.viridis*

¹ Instituto de Botânica, Caixa Postal, 4005, São Paulo-SP - CEP 01015

² Departamento de Genética, ESALQ/USP, Caixa Postal, 83 - PIRACICABA - SP - CEP 13400

and *A.hybridus* green and purple biotypes) showed variation in banding patterns for peroxidase. Through the existence of common bands to both species, one could detect evidence for hybridization and introgression between them.

Index Terms: electrophoresis, isozyme, esterase, peroxidase, *Amaranthus*, hybridization, introgression.

INTRODUÇÃO

A presença de variabilidade genética dentro da espécie é que torna possível sua adaptação às mudanças ambientais e permite sua evolução. Esta variabilidade, existente em populações naturais, vem sendo atualmente estudada através da extração e análise da mobilidade de proteínas solúveis, particularmente enzimas.

Além disso, tem-se dado ênfase à identificação de espécies, variedades e cultivares de plantas através da análise enzimática usando a técnica de eletroforese (DAMANIA et alii, 1983; COLLINS et alii, 1984; ATKINSON et alii, 1986; HUSSAIN et alii, 1986 e 1987). Tem-se também procurado relacionar padrões de variação eletroforética com variação morfológica da planta (MARTINS & JAIN, 1980; RITLAND & JAIN, 1984; SCHWAEGERLE et alii, 1986; MARCON, 1988).

Em *Amaranthus*, alguns trabalhos foram realizados usando a eletroforese para o estudo do polimorfismo em diversas populações e espécies. JAIN et alii (1980) observaram altos níveis de polimorfismo morfológico nos *Amaranthus* cultivados da Índia, tanto do tipo de folhas como de grãos, contrastando com locos alozimáticos monomórficos. Encontraram polimorfismo apenas para os locos de esterase, enquanto que os locos para álcool desidrogenase (ADH), leucina aminopeptidase (LAP), fosfatase ácida (ACPH) e glutamato oxaloacetato transami-

nase (GOT) mostraram-se monomórficos. No entanto, os alelos alozimáticos fixados distinguiram consistentemente os tipos de folhas dos de grãos.

Através da análise de nove sistemas enzimáticos, HAUPTLI & JAIN (1984) verificaram que três espécies domesticadas de *Amaranthus* (*A. caudatus*, *A. quitensis* e *A. retroflexus*) estão geneticamente mais próximos entre si do que com relação aos seus pretensos progenitores com hábito colonizador. Isto parece indicar um único evento de domesticação envolvendo *A. hybridus* como ancestral comum, e não três eventos separados envolvendo cada uma das espécies. Observaram também, algumas evidências de introgressão recente e/ou segregação de híbridos de espécies cultivadas e colonizadoras entre *A. caudatus* e *A. retroflexus*. As populações dos amarantos graníferos do centro de origem do Novo Mundo apresentaram padrões de variação isoenzimática que sugerem que, a maior parte das variedades locais é uma mistura de genótipos altamente homozigotos (HAUPTLI & JAIN, 1983).

ZANGERL & BAZZAZ (1984a), encontraram respostas diferenciais na germinação de sementes de genótipos de *A. retroflexus* homogêneos para o loco da fosfoglucoisomerase (PGI). Quando estes genótipos foram submetidos a quatro ciclos de seleção sob diversos tratamentos de estresse ambiental (densidade de plantas, densidade de competidores e umidade do solo) ZANGERL & BAZZAZ (1984a) verificaram que, apesar da divergência destas populações experimentais com o estoque original, em uma ou mais características fisiológicas, morfológicas ou eletroforéticas, foi encontrada pequena divergência no comportamento ecológico.

O presente trabalho teve por objetivo determinar os padrões de migração isoenzimática, para esterase e peroxidase, em *Amaranthus viridis* L. e em dois biótipos de *Amaranthus*

hybridus L. (tipo verde e tipo roxo), para detectar evidência de cruzamento entre as espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Ecológica do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em Piracicaba.

Foram utilizadas duas espécies de *Amaranthus* L., *A. viridis* L. e *A. hybridus* L., sendo que esta última espécie apresentava dois biótipos distintos (planta verde e planta roxa). As coletas foram realizadas em cinco locais, sendo que no local 1, duas espécies estavam associadas (*A. viridis* e *A. hybridus* tipo verde); no local 2, ocorria *A. viridis* e os dois biótipos de *A. hybridus* (tipo verde e tipo roxo) e nos locais 3, 4 e 5, ocorria apenas o biótipo verde de *A. hybridus*. As espécies, locais de coleta, época de coleta de sementes e número de indivíduos coletados e amostrados encontram-se na Tabela 1.

Para identificar os materiais no decorrer do trabalho, cada um deles recebeu uma sigla com duas letras (iniciais da espécie) e um número que se refere ao local da coleta. No caso da espécie de *A. hybridus*, a sigla contém ainda a letra v ou r, indicando o biótipo verde ou roxo, respectivamente.

O número de indivíduos amostrados foi inferior ao número de indivíduos coletados devido à ocorrência de dormência nas sementes, o que provocou uma baixa germinação das mesmas.

Foi utilizada a técnica de eletroforese de gel de amido com migração horizontal, para detectar o nível de variação isoenzímica existente entre os indivíduos das oito populações de *Amaranthus*, descritas na Tabela 1, para dois sistemas enzimáticos, esterase e peroxidase. Testes preliminares indicaram a

Tabela 1 - Características das populações de *Amaranthus* L. analisadas.

População (espécie ou biótipo)	Espécie	Local de Coleta		Época de colheita	Nº de Indiv. coletados	Nº de Indiv. Amostrados
		Nº	Discriminação			
Av-1	<i>A. viridis</i> L.	1	Estação Exper. de Anhembi-Piracicaba	03/87	48	12
Ahv-1	<i>A. hybridus</i> L. (verde)	1	Estação Exp. de Anhembi-Piracicaba	03/87	11	9
Ahv-2	<i>A. hybridus</i> L. (verde)	2	ESALQ, Piracicaba	12/87	15	10
Av-2	<i>A. viridis</i> L.	2	ESALQ, Piracicaba	12/87	11	8
Ahr-2	<i>A. hybridus</i> L. (roxo)	2	ESALQ, Piracicaba	12/87	14	14
Ahv-3	<i>A. hybridus</i> L. (verde)	3	ESALQ, Piracicaba	02/87	27	15
Ahr-4	<i>A. hybridus</i> L. (verde)	4	Fazenda Areão Piracicaba	01/87	10	10
Ahv-5	<i>A. hybridus</i> L. (verde)	5	ESALQ, Piracicaba	01/87	17	10

inexistência de atividade enzimática para catalase e malato desidrogenase nos materiais estudados.

Para a confecção do gel, de espessura de 2 mm e concentração de 12%, utilizaram-se as soluções tampões A e B de SCANDALIOS (1969), na proporção de 1A:9B e pH 8.3. Utilizaram-se dois tipos de amido: 2/3 de amido nacional das Refinações de Milho Brasil (Penetrose 30) e 1/3 de amido importado da marca Schiapparelli.

O gel foi feito com 125 ml da solução tampão, 10 g de amido nacional e 5 g de amido importado. Foi resfriado à temperatura ambiente, sendo posteriormente resfriado a 4°C, para receber os extratos das amostras homogeneizadas.

À semelhança do trabalho de HAUPTLI & JAIN (1984), utilizaram-se plântulas com as duas primeiras folhas verdadeiras abertas para extração. As sementes individuais de cada população (Tabela 1) foram colocadas para germinar em estufas incubadoras para BOD, a 30°C, na presença de luz, sobre o papel de filtro umidificado com água destilada.

Os extratos de cada uma destas plântulas foram obtidos por maceração em 10 ml de solução tampão do gel. Todas as etapas do processo, desde a homogeneização até a revelação das enzimas foram feitas em ambiente ou anteparo de contato frio (4°C a 8°C).

Cada extrato foi absorvido em dois papéis filtro com dimensões de 2 mm x 1,5 mm, um para ser usado para revelação da esterase e outro para peroxidase.

A aplicação das amostras no gel foi feita cortando-o com um pente de 25 dentes. Nos orifícios, eram inseridos os papéis embebidos das amostras.

Para as peroxidases, as amostras foram aplicadas a 5 cm da ponte do polo (-) e para as esterases, a 3 cm da ponte do polo (-),

pois as duas enzimas apresentaram bandas anódicas.

Nas extremidades das aplicações, no 1° e 25° dentes do pente, foi colocada uma gota de azul de bromofenol para marcar a linha de frente da migração, o que permitiu saber quando interromper a corrida eletroforética e calcular a migração relativa (Rm).

A migração (corrida eletroforética) foi realizada em geladeira, a 4°C, em cubas horizontais próprias. A solução tampão das cubas com os eletrodos foi a solução tampão A de SCANDALIOS (1969) com pH 8.3. Foi mantida uma distância uniforme de 12 cm entre as pontes catódica e anódica. A corrida eletroforética foi feita com uma diferença de potencial de 1mA/cm e 10v/cm em corrente contínua. A migração foi interrompida quando a linha de frente atingiu 7 cm para peroxidase e 9 cm para esterase; isto aconteceu cerca de 14 horas após o início da corrida.

Após a corrida eletroforética foi feita a revelação, ou seja, a coloração do gel, para possibilitar a análise através dos zimogramas.

O sistema das peroxidases foi revelado pela técnica de BREWBAKER et alii (1968), modificada: etanol 95% (35 ml), solução tampão fosfato (14 ml), O-dianisidina (100 g) e H₂O₂ 1% (1 ml). A solução tampão fosfato (pH 6 - 1 M) foi constituída por KH₂PO₄ (109,0 g), K₂HPO₄ (34,8 g) e H₂O (até 1000 ml). O pH 6 era ajustado com NaOH.

No sistema das esterases a revelação foi feita pela técnica da SCANDALIOS (1969) modificada: H₂O (20 ml), solução tampão C (25 ml), solução tampão D (5 ml), Fast Blue RR (sal) (40 mg) e α -naftil acetato (1 ml).

A solução tampão C: fosfato (pH 4.3 - 0,2 M) era constituída por NaH₂PO₄ (27,8 g) e H₂O (até 1000 ml). A solução tampão D: fosfato

(pH 9,2 - 0,2 M) era constituído por Na_2PO_4 (53,63 g) e H_2O (até 1000 ml).

O α -naftil acetato foi dissolvido em etanol e água na proporção de 1 g de sal, 50 ml de etanol e 50 ml de água.

Os géis foram deixados em solução reveladora por uma hora, em temperatura ambiente, no escuro.

Após a revelação, os géis foram lavados e fixados em solução de água, álcool metílico e ácido acético na proporção de 5:5:1, por cerca de 15 minutos. Em seguida, foram lavados em água destilada, envoltos em plásticos, identificados e guardados em geladeira por 24 horas antes de serem analisados.

A leitura do gel foi esquematizada em papel milimetrado, anotando as bandas pela sua migração relativa (R_m). O R_m de cada banda foi obtido pela divisão da distância migrada por ela, pela distância migrada pela linha de frente (azul de bromofenol).

O R_m permite determinar a homologia das bandas presentes em indivíduos diferentes ou diferentes tecidos de um mesmo organismo, ou em diferentes condições ambientais, populações ou períodos em que é feita a análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os padrões de migração relativa (R_m) para as enzimas esterase (E_1 , E_2 , E_3 e E_4) e peroxidase (P_1 , P_2 , P_3 , P_4 , P_5 , P_6 , P_7 , P_8 , e P_9) para *Amaranthus hybridus* tipo verde e tipo roxo e *A. viridis* podem ser vistos nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

A Tabela 2 mostra a frequência, em porcentagem de ocorrência, dos padrões de migração relativa entre os indivíduos de todas as populações utilizadas, para a enzima esterase. A Tabela 3 apresenta esta mesma frequência para a enzima peroxidase.

Tabela 2 - Frequência dos padrões de migração relativa (R_m) para esterase (E_1 , E_2 , E_3 e E_4) para diversos indivíduos de oito populações de *Amaranthus*.

População	Nº de Indiv. Amostrados	Frequência (%)			
		E_1	E_2	E_3	E_4
Ahv - 1	9	100	-	-	-
Ahv - 2	10	100	-	-	-
Ahv - 3	15	100	-	-	-
Ahv - 4	10	90	10	-	-
Ahv - 5	10	80	20	-	-
Av - 1	12	-	-	-	100
Av - 2	8	-	-	-	100
Ahr - 2	14	-	-	100	-

Tabela 3 - Frequência dos padrões de migração relativa (Rm) para peroxidase (P₁, P₂, P₃, P₄, P₅, P₆, P₇, P₈ e P₉) para diversos indivíduos de oito populações de *Amaranthus*.

Popu- lação	Nº Ind. Amostr.	Frequência (%)								
		P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈	P ₉
Ahv-1	9	100	-	-	-	-	-	-	-	-
Ahv-2	10	50	10	10	30	-	-	-	-	-
Ahv-3	15	80	-	-	20	-	-	-	-	-
Ahv-4	10	50	10	10	30	-	-	-	-	-
Ahv-5	10	50	10	30	10	-	-	-	-	-
Av- 1	12	-	-	-	-	-	-	-	58	42
Av- 2	8	-	-	-	-	-	-	-	50	50
Ahr-2	14	-	-	-	-	50	36	14	-	-

Observa-se pelas Figuras 1 e 2 que as espécies *A.hybridus* e *A.viridis* apresentaram padrões izoenzimáticos distintos para esterase e peroxidase, dentro de cada espécie e biótipo.

Para esterase (Figura 1) o único material que apresentou variação foi o *A.hybridus* tipo verde e em apenas uma banda, ou seja, presença ou ausência da banda na posição 0.7. Por outro lado, para peroxidase, para todas as espécies e biótipos houve variação no padrão de bandas (Figura 2).

Esta resposta foi um pouco diferente da observada por JAIN et alii (1980), onde os autores trabalhando com diversos sistemas enzimáticos, encontraram polimorfismo apenas para os locos da esterase.

Pela Tabela 2, pode-se observar que a variação no padrão de bandas para esterase só ocorreu nas populações Ahv-4 e Ahv-5, de áreas diferentes, porém relativamente próximas. As populações Ahv-1, 2 e 3, provenientes de regiões diferentes mostraram-se monomórficas, com o mesmo padrão de bandas. O *A.hybridus* tipo roxo, coletado na ESALQ na mesma área de *A.viridis*, embora apresente padrão diferente para esterase em relação a esta última, tem duas bandas comuns entre si nas posições 0.17 e 0.65, sendo que em *A.viridis* a banda na posição 0.65 tem bem maior intensidade (Figura 1).

Com relação à peroxidase (Tabela 3), a única população monomórfica é a de *A.hybridus* tipo verde coletada na Estação Experimental de Anhembi, Piracicaba. Uniformidade genética em populações de plantas colonizadoras é fato relativamente comum como resultado de efeito de fundação, principalmente no início do processo de colonização e reflete a ocorrência de deriva genética. As outras populações mostraram-se polimórficas.

Para peroxidase, as populações de *A.hybridus* tipo roxo e *A.viridis*, ambas coletadas na mesma área, na ESALQ, compartilham as

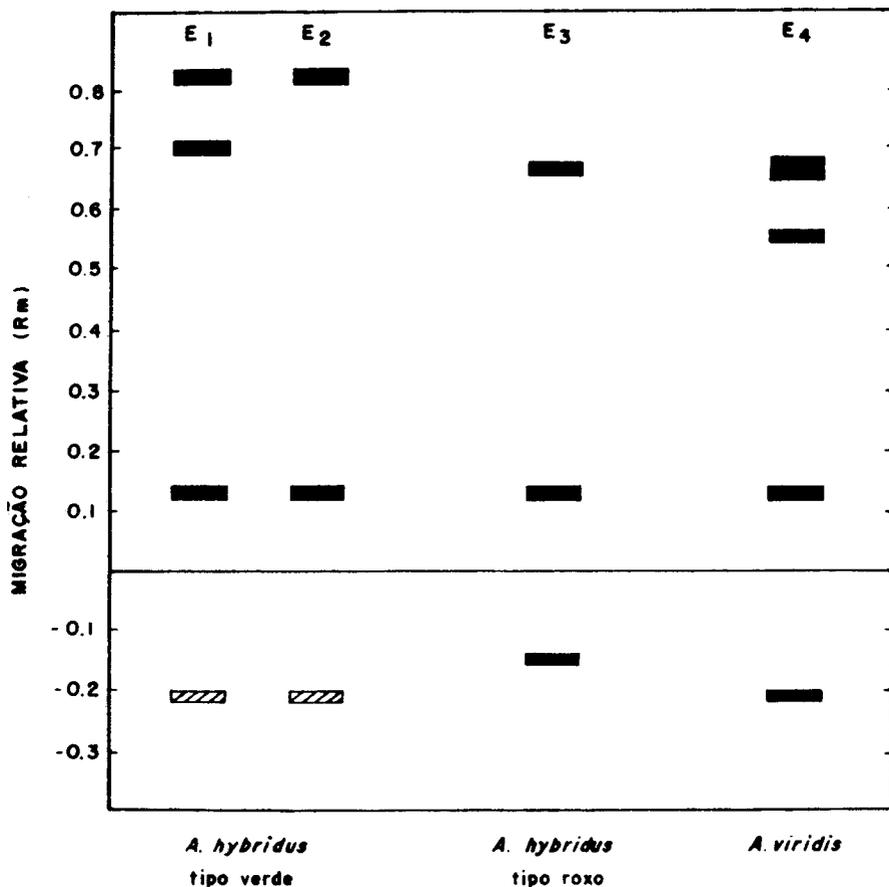


Figura 1 - Padrões de migração (R_m) e intensidades relativas observados para o sistema de esterase catódica e anódica (E_1 , E_2 , E_3 e E_4) em *A. hybridus* tipo verde e *A. hybridus* tipo roxo e *A. viridis*.

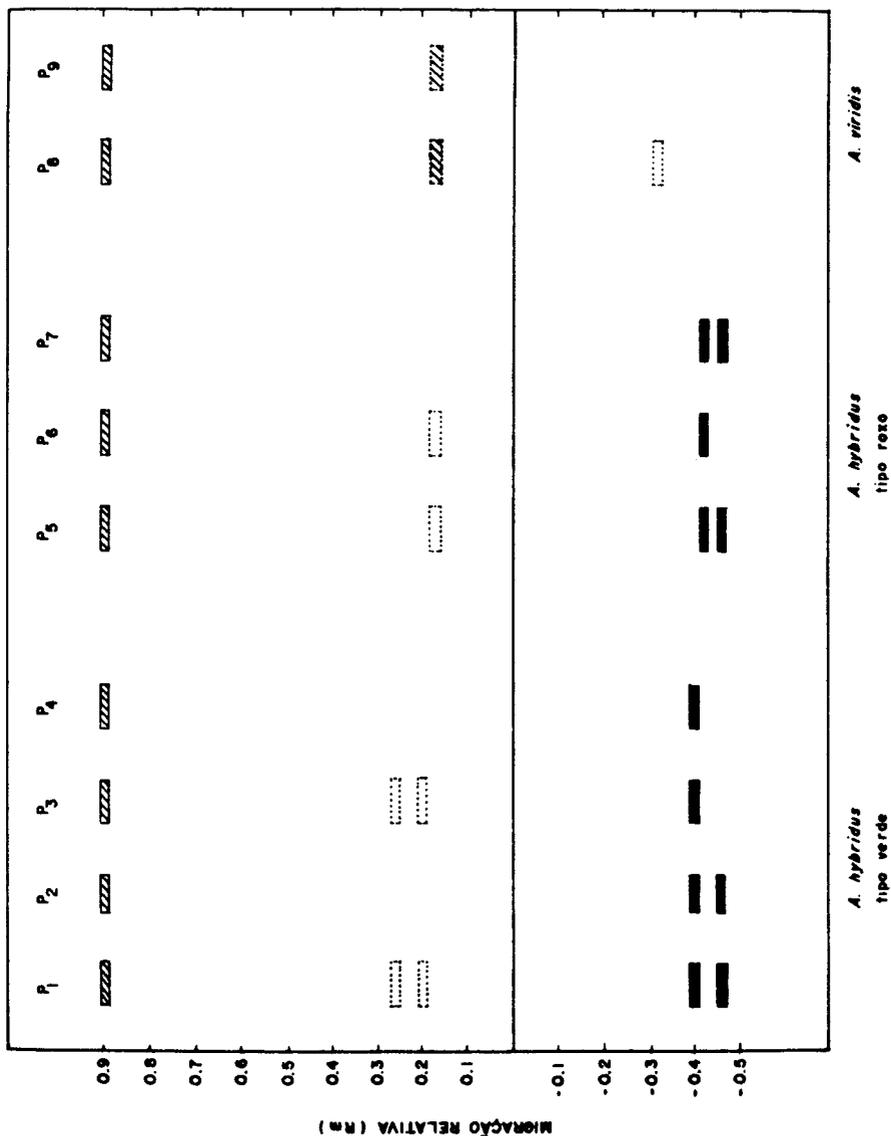


Figura 2 - Padrões de migração (Rm) e intensidades relativas observados para o sistema de peroxidase catódica e anódica (P₁, P₂, P₃, P₄, P₅, P₆, P₇, P₈ e P₉) em *A. hybridus* tipo verde e *A. hybridus* tipo roxo e *A. viridis*.

bandas nas posições 0.9 e 0.17, sendo que para esta última banda as intensidades são diferentes (Figura 2).

É também interessante notar pela Figura 2 que os padrões para peroxidase P_2 e *A.hybridus* tipo verde e P_2 de *A.hybridus* tipo roxo, são semelhantes, pois a pequena diferença de R_m observada nas bandas anódicas não é suficiente para indicar locos gênicos diferentes.

As respostas obtidas nas análises por eletroforese, apesar de serem restritas devido ao pequeno número de amostras utilizadas e pequeno número de sistemas enzimáticos testados, mostram a existência de variação genética nas espécies e biótipos estudados.

Além disso, apesar das condições experimentais terem sido restritas, o fato das bandas nas posições 0.17 e -0.21 para esterase, serem comuns à *A.hybridus* tipo verde e *A.viridis*, além das bandas 0.17 e 0.65 entre *A.hybridus* tipo roxo e *A.viridis*, e a banda na posição 0.17, para peroxidase, ser semelhante em *A.hybridus* tipo roxo e *A.viridis*, pode indicar um certo grau de hibridação e consequente introgressão entre as espécies. A ocorrência de introgressão em *Amaranthus* foi observada por COONS (1981) em diversas populações de *A.viridis* e *A.blitum*. através da análise de vários caracteres morfológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATKINSON, M.D.; WITHERS, L.A.; SIMPSON, M.J.
A. Characterization of cacao germplasm using isozyme markers; 1. A preliminary survey of diversity using starch gel electrophoresis and standardisation of the procedure. *Euphytica*, Wageningen, 35:741-50, 1986.

- BREWBAKER, J.L.; UPADHYA, M.D.; MAKINEN, J.; MAC DONALD, T. Isoenzyme polymorphism in flowering plants; III. Gel electrophoretic methods and applications. Physiologia Plantarum, Lund, 21:930-40, 1968.
- COLLINS, W.J.; ROSSITER, R.C.; HAYNES, Y.; BROWN, A.H.D; MARSHALL, D.R. Identification of subterranean clover cultivars and their genetic relationship by isozyme analysis. Australian Journal of Agricultural Research, Melbourne, 35:399-411, 1984.
- COONS, M.P. O gênero *Amaranthus* em Minas Gerais. Experientiae. Viçosa, 27:1-158, 1981.
- DAMANIA, A.B.; PORCEDUU, E.; JACKSON, M.T. A rapid method for the evaluation of variation in germplasm collections of cereals using polyacrilamye gel electrophoresis. Euphytica, Wageningen, 32:877-83, 1983.
- HAUPTLI, H. & JAIN, S. Genetic structure of landrace populations of the New World grain amaranths. Euphytica, Wageningen, 33: 875-84, 1983.
- HAUPTLI, H. & JAIN, S. Allozyme variation and evolutionary relationship of grain amaranths (*Amaranthus* spp). Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 69:153-65, 1984.
- HUSSAIN, A.; RAMIREZ, H.; BUSHUK, W.; ROCA, W. Field bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar indentification by electrophoregrams of cotyledon storage proteins. Euphytica, Wagening, 35: 729-32, 1986.

HUSSAIN, A.; RAMIREZ, H.; BUSHUK, W.; ROCA, W. Identification of cultivars of forage legume (*Desmodium ovalifolium* Guill. et Perr.) by their electrophoretic patterns. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, 67:713-7, 1987.

JAIN, S.K.; WU, L.; VAIDYA, K.R. Levels of morphological and allozyme variation in Indian amaranths: a striking contrast. Journal of Heredity, Washington, 71:283-5, 1980.

MARCON, G. Estrutura genética de populações de *Stylosanthes humilis* H. B. K. (Leguminosae) de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Piracicaba, 1988. 179p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

MARTINS, P.S. & JAIN, S.K. Interpopulation variation in rose clover: a recently introduced species in California rangelands. Journal of Heredity, Washington, 71:29-32, 1980.

RITLAND, K. & JAIN, S. A comparative study on floral and electrophoretic variation with life history variation in *Limnanthes alba* (Limnanthaceae). Oecologia, Berlin, 64:243-51, 1984.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. Biochemical Genetic, New York, 3:37-39, 1969.

SCHWAEGERLE, K.E.; GARBUTT, K.; BAZZAZ, F.A. Differentiation among nine populations of *Phlox*. 1. Electrophoretic and quantitative variation. Evolution, Lancaster, 40:506-17, 1986.

ZANGERL, A.R. & BAZZAZ, F.A. Effects of short-term selection along environmental gradients on variation on population of *Amaranthus retroflexus* and *Abulilon theophrasti*. Ecology, Brookling, 65:207-17, 1984a.

ZANGERL, A.R. & BAZZAZ, F.A. Niche partitioning between two phosphoglucoisomerase genotypes in *Amaranthus retroflexus*. Ecology, Brookling, 65:218-22, 1984b.