

Julho e Agosto de 1984

VOL. XXXI

N.º 176

Viçosa — Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**PADRÕES ELETROFORÉTICOS EM
PROGENITORES E LINHAGENS
DE FEIJÃO-DE-VAGEM
(*Phaseolus vulgaris* L.)^{1/}**

Márcia Marques Gomes ^{2/}Nilton Rocha Leal ^{3/}Antônio Rodrigues Cordeiro ^{4/}

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de uma descrição precisa de novos cultivares foi acentuada pela criação de órgãos responsáveis pelo registro e patente desse material, principalmente em países da América do Norte e Europa (U.S. Plant Variety Protection Act, Swedisch Official Committee of Cultivars).

Um dos critérios de identificação amplamente aceito pelos órgãos de registro citados, que nos últimos anos vem sendo cada vez mais utilizado, juntamente com os critérios morfológicos e agronômicos, é a caracterização de cultivares com base em padrões eletroforéticos de proteínas, entre as quais algumas enzimas.

Pela eletroforese, evidencia-se a composição protéica e enzimática do homogenado de um tecido animal ou vegetal. Tendo, geralmente, como suporte um gel de amido ou poliacrilamida, as moléculas contidas no homogenado são submetidas a

^{1/} Recebido para publicação em 29.9.1983. Trabalho apresentado no XXI Congresso Internacional de Horticultura, 29 de agosto a 4 de setembro de 1982, Hamburgo, República Federal da Alemanha.

^{2/} PESAGRO-RIO, Estação Experimental de Itaguaí, Estrada Rio-São Paulo, km 47 — 23460 Seropédica — Itaguaí — RJ. Ex-bolsista de pós-graduação do CNPq.

^{3/} EMBRAPA/PESAGRO-RIO, Estação Experimental de Itaguaí, RJ.

^{4/} Departamento de Genética da UFRJ — Pesquisador do CNPq, UFRJ — Ilha do Fundão, C.P. 68011, 20000 — RJ.

um campo elétrico e migram diferentemente, de acordo com o ponto isoeletroico, peso e conformação. As formas moleculares múltiplas de uma enzima (isozimas), bem como as proteínas não-enzimáticas, codificadas por diferentes genes, revelam-se então por técnicas bioquímicas de coloração. As proteínas são produtos quase direto da ação genética. Embora muitas sofram modificações pós-síntese, tais modificações, por via de regra, podem ser reconhecidas. Portanto, através das proteínas pode-se estimar o grau de variabilidade genética que há entre os indivíduos analisados, utilizando-as como marcadores na identificação deles.

Dessa forma, têm sido caracterizados cultivares de abacaxi, batata, cravo, cana-de-açúcar, banana (14), erva-lilás (13), rosas (7), aveia (1), cevada (4), arroz (6) e feijão (12, 3, 5), somente para citar alguns.

Das amplas aplicações da eletroforese salientam-se:

- garantia da condição híbrida;
- detecção da variabilidade genética nos cultivares, assim como misturas mecânicas;
- utilização de marcadores correlacionados com características agronômicas importantes no direcionamento mais eficiente dos cruzamentos;
- utilização de marcadores no cálculo do Índice de Diversidade Genética entre linhagens, visando à condução dos cruzamentos, em busca de heterose;
- indicação do potencial de adaptação das espécies e cultivares às variadas condições ambientais, considerando a relação entre variabilidade protéica e variabilidade genética.

Este trabalho visou à determinação dos padrões eletroforéticos para quatro sistemas enzimáticos e proteínas solúveis em três cultivares progenitores e quatro linhagens de feijão-de-vagem. Com isso, pretendia-se estimar o grau de variabilidade entre os cultivares e contribuir com marcadores adicionais para identificação mais precisa das linhagens.

2. MATERIAL E MÉTODOS

De um estudo dialélico em feijão-de-vagem de porte determinado, envolvendo cinco progenitores, LEAL (8) e LEAL *et alii* (9) obtiveram diversas linhagens.

Para o presente estudo, foram selecionados, desse material, os três progenitores mais destacados, bem como as quatro melhores linhagens (F10), no que se refere à arquitetura da planta, produtividade (número e peso de vagens/planta), peso médio, comprimento das vagens, secção transversal das vagens e freqüência de cavidades interloculares.

Progenitores estudados: 'Bush Blue Lake 274' (BBL 274), 'Green Isle' (GI) e 'Cascade' (CAS).

Linhagens estudadas: 6204 (BBL 274 x CAS), 6163 (GI x BBL 274), 6185-C (GI x BBL 274) e 6185-CA (GI x BBL 274).

Amostras de eixo embrionário e cotilédone foram obtidas de sementes colocadas para germinar em placas de Petri com algodão embebido em água, mantidas no laboratório. Amostras de plântula e hipocôtilo foram obtidas de plantas crescidas em vasos de barro com terra adubada, em casa de vegetação. De cada cultivar ou linhagem foram analisados, no mínimo, 10 indivíduos para cada sistema enzimático.

Sistemas enzimáticos estudados: PER (Peroxidase E.C. 1.11.1.7.), FAC (Fosfatase Ácida E.C. 3.1.3.2.), EST (Esterase E.C. 3.1.1.1), LAP (Leucina Aminopeptidase E.C. 3.4.1.1) e, também, padrões de PTN (proteínas solúveis não-enzimáticas). Foi utilizada eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida preparado em placas de vidro com dimensões de 17,0 cm x 15,0 cm x 0,2 cm. As soluções tampão, assim como as técnicas

de revelação, estão descritas na literatura (Quadro 1). A revelação de EST seguiu a técnica descrita por SCANDALIOS (15), com a adição do substrato β Naftil Acetato, juntamente com α Naftil Acetato, nas mesmas concentrações.

Homogeneização: Em solução tampão semelhante à utilizada na preparação do gel (Quadro 1): a) eixo embrionário e cotilédone: tubos de plástico da Microfuge Beckman n.º 152, com o auxílio de um bastão de teflon, acionado por um homogeneizador FANEM. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 8000 xg por 10 minutos; b) plúmula e hipocótilo: placa de acrílico escavada com o auxílio de um bastão de vidro acionado pelo homogeneizador FANEM. O processo de homogeneização de todas as amostras foi realizado a aproximadamente 4°C.

Após a homogeneização, papéis de filtro Whatman n.º 3 (0,2 cm x 0,4 cm) foram embebidos no homogenado e colocados em fendas feitas com o auxílio de um pente de alumínio. A voltagem no gel, durante a separação eletroforética, foi mantida ao redor de 10 V/cm e a temperatura em torno de 4°C. A frente de migração era formada pelo corante azul de bromofenol.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os padrões eletroforéticos (Quadros 1 e 2), os cultivares e linhagens foram divididos em quatro grupos. Nem todos apresentaram um conjunto próprio de padrões eletroforéticos que pudesse distingui-los dos demais, o que pode ser atribuído: a) ao sistema de cruzamento da espécie; b) à base genética restrita dos programas de melhoramento; c) à convergência seletiva devida ao processo de escolha, que propiciou uniformidade genética.

Não foi observada variação intracultivar.

Dos três cultivares parentais, somente o BBL 274 apresentou padrão único em PTN e LAP. Os demais (GI e GAS) apresentaram os mesmos padrões para todos os sistemas enzimáticos e protéicos não-enzimáticos estudados (Figura 1 e Quadro 2). Nesse sentido, deve-se observar a pouca variabilidade encontrada entre esses progenitores, no que se refere a peso por planta, número de vagens por planta, comprimento das vagens, peso das vagens, número de óvulos e cavidade interlocular (9).

Num trabalho que envolveu a caracterização de 27 cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) amplamente utilizados em programas de melhoramento no Brasil, foi também observada pouca variabilidade, com base nos marcadores enzimáticos estudados (5). Entretanto, sabe-se que, se o número de marcadores é ampliado pela análise de sistemas enzimáticos adicionais, possíveis diferenças genéticas podem ser detectadas.

A análise densitométrica, para detecção de variações quantitativas entre dois cultivares (verificada pela maior ou menor intensidade de coloração de uma mesma banda presente em mais de um cultivar), pode também auxiliar na distinção de um número maior de cultivares. Entretanto, para isso, tornam-se necessárias a determinação e a padronização do conteúdo protéico presente nas amostras, antes da separação eletroforética.

Sabe-se que a introdução de alterações no pH e na concentração dos géis pode evidenciar variabilidade adicional (11). De qualquer forma, o critério de caracterização por eletroforese, quando adicionado aos morfológicos e agronômicos, torna possível, mesmo nos casos de pouca variabilidade, a distinção de um número maior de cultivares e linhagens.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Por meio de eletroforese horizontal, em gel de poliacrilamida a 6 e 7%, três

QUADRO 1 - Métodos utilizados na revelação dos padrões protéicos e isoizomáticos em homogenados de diferentes tecidos de feijão-de-vagem (eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida). Soluções tampão utilizadas na preparação dos géis e nos eletródios: A - borato de lítio (0,19 M) pH 8,3. B - citrato de tris (0,05 M) pH 8,3. C - citrato de tris (0,076 M) pH 8,65. D - borato de sódio (0,03 M) pH 8,1)

Enzima	Conc. do gel	Sistema tampão	Amostra	Idade do tecido	Conc. da amostra	Frente de migração	Revelação e fixação
PER	6%	gel 1A:9B eletródios: A	plúmula	15 dias	8 mg/5µl	9 cm	Liu e Gibson (10)
FAC	6%	gel C eletródios: D	eixo embrionário	16h/germinação	10 mg/5µl	10 cm	Scandalios (15)
EST	7%	gel 1A:9B eletródios: A	hipocôtilo	10 dias	14 mg/5µl	9 cm	Scandalios (15)
LAP	7%	gel 1A:9B eletródios: A	cotilédone	16h/germinação	4 mg/5µl	10 cm	Scandalios (15)
PTN	7%	gel 1A:9B eletródios: A	cotilédone	16h/germinação	4 mg/5µl	10 cm	Ames e Nikaido (2)

QUADRO 2 - Padrões eletroforéticos dos cultivares progenitores e linhagens de feijão-de-vagem

Cultivares e linhagens	Padrões eletroforéticos				
	PER	FAC	EST	LAP	PTN
BBL 274	1	2	3	6	9
GI	1	2	3	5	7
CAS	1	2	3	5	7
6204 (BBL x CAS)	1	2	3	5	7
6163 (GI x BBL)	1	2	4	5	8
6185 (GI x BBL)	1	2	3	5	8
6185 CA (GI x BBL)	1	2	3	5	8

cultivares parentais e quatro linhagens de feijão-de-vagem foram analisados quanto aos padrões de Peroxidase (PER), Esterase (EST), Fosfatase Ácida (FAC), Leucino Aminopeptidase (LAP) e Proteínas Solúveis (PTN) encontrados nos diferentes tecidos.

Para PER e FAC, todos os cultivares e linhagens apresentaram os mesmos padrões. Com base nas variantes eletroforéticas encontradas em PTN e LAP, os cultivares parentais foram divididos em dois grupos: 1) BBL 274 e 2) GI e CAS. Quanto às linhagens, com base nos padrões de PTN, LAP e EST, verificou-se a classificação de três grupos: 1) 6204; 2) 6163 e 3) 6185C e 6185CA.

O fato de nem todos os cultivares e linhagens terem apresentado um conjunto de padrões distinto dos demais deve estar relacionado: a) com o sistema de reprodução da espécie; b) com a base genética restrita dos programas de melhoramento e c) com a convergência seletiva.

5. SUMMARY

(ELECTROPHORETIC PATTERNS IN PARENT CULTIVARS AND DERIVED BREEDING LINES OF SNAP BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.)

Three cultivars and four derived breeding lines of bush type snap beans were analysed by acrylamide gel eletrophoresis for peroxidase (PER), esterase (EST), acid phosphatase (APH), leucine aminopeptidase (LAP) isozymes and protein (PTN) content in several tissues.

For PER and APH, all cultivars and breeding lines showed the same pattern. For PTN and LAP, the parental cultivars were divided as two groups: 1) BBL 274; and, 2) GI and CAS. For PTN, LAP and EST, the breeding lines were separated as three groups: 1) 6204; 2) 6163; and, 3) 6185-C and 6185-CA.

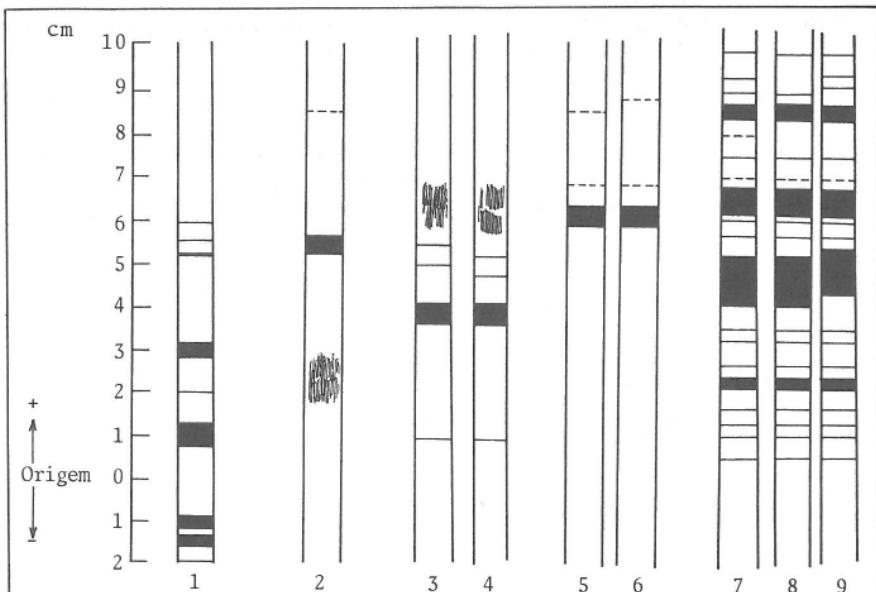


FIGURA 1 - Padrões eletroforéticos de progenitores e linhagens de feijão-de-vagem (*P. vulgaris* L.).

A mobilidade das bandas no gel é indicada pela escala à esquerda do diagrama. A espessura das bandas no diagrama indica a intensidade de coloração no gel.

1. Padrão de Peroxidase
2. Padrão de Fosfatase Ácida
- 3-4. Padrões de Esterase
- 5-6. Padrões de Leucino Aminopeptidase
- 7-8. Padrões de Proteínas Solúveis

The reasons for the small difference patterns observed between parent and breeding lines are probably due to: a) pollination system; b) narrow genetic base; and, c) selection pressure.

6. LITERATURA CITADA

1. ALMGARD, G. & CLAPHAM, D. Isozyme variation distinguishing 18 *avena* cultivars grown in Sweden. *Swedish J. Agric. Res.* 5: 61-67, 1975.
2. AMES, G.F.L. & NIKAIKO, K. Two dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Biochem.* 15: 616-623, 1976.
3. COSTA, J.C. *Estudo de padrões enzimáticos em cultivares de Phaseolus vulgaris L.*, Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1976. 76 p. (Tese de Mestrado).

4. FEDAK, G. Allozymes as aids to Canadian barley cultivar identification. *Euphytica* 23: 166-173, 1974.
5. GOMES, M.M. *Isozimas de catalase, leucino aminopeptidase e fosfatase ácida em cultivares de Phaseolus vulgaris L.* Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1980. 104 p. (Tese de Mestrado).
6. INOUYE, J. & HAGIWARA, T. Classification of floating rice varieties by acid phosphatase and peroxidase zymograms. *Jap. Jour. Agric.* 24: 159-164, 1980.
7. KUHNS, L.J. & FRETZ, T.A. Distinguishing rose cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis. II. Isozyme variation among cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103: 509-516, 1978.
8. LEAL, N.R. *Combining ability analysis and evaluation of near-homozygous lines of snap beans* (Phaseolus vulgaris L.). University of Wisconsin, 1978. 77 p. (Tese de Ph.D.).
9. LEAL, N.R. & HAMED, I.A. & BLISS, F. Avaliação dos progenitores e linhas avançadas de melhoramento de feijão-de-vagem (*P. vulgaris* L.) de crescimento determinado. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 20, Brasília, 1980. Resumos, p. 25.
10. LIU, E.H. & GIBSON, D.M. Visualization of peroxidase isozymes with eugenol, a noncarcinogenic substrate. *Anal. Bioch.* 19:597-601, 1977.
11. McDOWELL, R.E. & PRAKASH, S. Allelic heterogeneity within allozymes separated by electrophoresis in *Drosophila pseudobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 4150-4153, 1976.
12. OLIVEIRA, E.A. *Controle genético de isozimas de peroxidase e catecol oxidase em Phaseolus vulgaris L. e suas relações com Uromyces phaseoli (Reb) Wint. typica Arth.* Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1978. 151 p. (Tese de Doutorado).
13. OLIVEIRA, H.A. *Padrões eletroforéticos e genética de isozimas na identificação de cultivares e linhagens de Pisum sativum L. e sua utilização no melhoramento genético.* Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1976. 137 p. (Tese de Doutorado).
14. PEIRCE, L.C. & BREWBAKER, J.L. Applications of isozyme analysis in horticultural science. *HortScience* 8: 17-22, 1973.
15. SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plant: A review. *Bioch. Genet.* 3:37-79, 1969.