

# PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE PADRÕES ENZIMÁTICOS EM *Phaseolus lunatus* L.

Pâmela Ponce Martins (Bolsista do PIBIC/CNPq), Prof. Dr. Sérgio Emílio dos Santos Valente (Orientador, Departamento de Biologia, CCN-UFPI), João Paulo Gomes Viana (Colaborador, UFPI), Profa. Dra. Gleice Ribeiro Orasmo (Colaboradora, CCN-UFPI), Profa. Dra. Ângela Celis de Almeida Lopes (Departamento de Biologia, CCN-UFPI)

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Phaseolus lunatus* L., conhecida como fava, feijão-fava ou feijão-lima, é uma das quatro espécies do gênero *Phaseolus* exploradas comercialmente (SANTOS et al., 2002). No Brasil, é plantada especialmente nos estados da região Nordeste (com exceção da Bahia), Minas Gerais e Rio Grande do Sul (AZEVEDO et al., 2003).

Marcadores moleculares e bioquímicos têm-se mostrado de grande utilidade para a análise da variabilidade e relações genéticas em espécies vegetais (MAQUET et al., 1997). Dentre estes, são denominadas isoenzimas as formas múltiplas de uma enzima com similar ou idêntica especificidade de substrato ocorrendo em um mesmo organismo (MARKERT E MOLLER, 1959).

Dos vários marcadores genéticos disponíveis na atualidade, as isoenzimas pela relativa simplicidade, rapidez e baixo custo das análises em comparação a outros marcadores, têm gerado uma gama enorme de informações protéicas na identificação de espécies, híbridos, populações naturais e cultivadas de diversos organismos vivos (TEIXEIRA et al., 2004).

Em caracterização isoenzimática, a eletroforese tem sido largamente utilizada para fins de avaliação e identificação da diversidade genética. Esta técnica possibilita a análise indireta do DNA, visto que as isoenzimas são produtos primários da expressão gênica. Trata-se de um marcador capaz de informar a estrutura genética de populações (REIS, 2006).

Embora seja de fácil condução, a técnica eletroforética requer adaptações de acordo com a espécie vegetal em estudado. Geralmente, algumas modificações devem ser introduzidas, visando à obtenção de zimogramas com resolução que permita a clara identificação dos fenótipos obtidos (AMARAL, 1994).

O presente trabalho teve como objetivo testar e padronizar os métodos do sistema PAGE para obtenção de padrões enzimáticos através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Foi escolhido o gel de poliacrilamida pois este tem um caráter mais refinado, de melhor visualização e apresenta melhor separação das bandas isoenzimáticas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Coletou-se tecido foliar fresco e macerou-se cerca de 200 mg do material do tecido com 30 µL de solução de extração descrita por Orasmo et al. (2007) em gelo e após o maceramento as amostras mantiveram-se em gelo. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C.

Conduziu-se a eletroforese em gel de poliacrilamida na concentração de 12%. Na corrida eletroforética foi usado o sistema gel/eletrodo tris/glicina e o gel correu em geladeira a 4 °C durante

seis horas com 200 volts na fonte. O gel foi encubado em solução de tampão fosfato e depois foi seco através do método descrito por Ceron et al. (1992) e Lapenta et al. (1995).

Tabela 01 – identificação das amostras

Referência (amostras)	Espécie
1, 2, 3, 8, 9 e 10	Feija-de-lima
4, 5, 6 e 7	Fava rajado

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se aplicar 6 horas de eletroforese, as amostras apresentaram bandas individualizadas (Figura 1), o que facilita a caracterização, possibilitando que haja o agrupamento das subamostras, estudos populacionais e representação da diversidade genética.

A eletroforese em gel de poliacrilamida no sistema PAGE permitiu a visualização de, pelo menos, nove *loci* com bandas  $\alpha$ - e  $\beta$ -esterases bem definidas para as variedades de feijão-fava analisadas (Figura 1). Os *loci* Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, Est-5, Est-6, Est-7, Est-8 e Est-9 revelaram 14 alelos que codificam formas monoméricas  $\alpha$ - e  $\beta$ -esterases.

Os *loci* Est-2, Est-3 e Est-5 foram considerados como sendo  $\alpha$ -esterases. O *loci* Est-4 foi considerada como sendo  $\beta$ -esterases. E os *loci* Est-1, Est-6, Est-7, Est-8 e Est-9 foram considerados com sendo  $\alpha$ -/ $\beta$ -esterases (Figura 1)..

No presente estudo os padrões eletroforéticos revelados foram diferentes entre os genótipos analisados. Isto indica que a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida no sistema PAGE, pode ser utilizada na distinção de variedades em *Phaseolus lunatus*. Por se tratar de um experimento de padronização de protocolo, o número de amostras foi reduzido para se evitar o desperdício de amostras de um banco de germoplasma, uma vez que as amostras de um banco são de difícil obtenção ou precisam ser regeneradas para o uso.

### 4. CONCLUSÃO

Foi possível a padronização do protocolo para detecção de isoenzimas  $\alpha$ - e  $\beta$ -esterases em gel de poliacrilamida para fava.

Os padrões de  $\alpha$ - e  $\beta$ -esterases no sistema PAGE foram capazes de distinguir entre os genótipos de *P. lunatus* L.

Os padrões eletroforéticos podem ser usados para fins de identificação do gênero e/ou auxiliar os programas de melhoramento genético da espécie.

As isoenzimas  $\alpha$ - e  $\beta$ -esterases revelaram-se polimórficas entre os genótipos analisados, no entanto, estudos mais aprofundados podem revelar polimorfismos dentro de variedades da espécie.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL JÚNIOR, A. T. do.; CASALI, V.W.D.; MORAES C.F.de.; SEDIYAMA, M.A.N. **Ajuste de metodologia da eletroforese de proteínas para obtenção de fenótipos isoenzimáticos de moranga**. *Bragantia*, Campinas, v. 53, p. 19-24, 1994
- AZEVEDO, J. N.; FRANCO, L. J. D.; Araújo, R. O. C. Composição química de sete variedades de feijão-fava. **Comunicado Técnico 152**. Teresina. Embrapa Meio Norte, 2003.
- CERON, C.R., SANTOS, J.R., BICUDO, C.R. The use of gelatin to dry cellofane wound slab gels in a embroidering hoop. **Rev. Brasil. Genet.** 15:201-203, 1992.
- LAPENTA, A.S.; CAMPOS-BICUDO, H.E.M.; CERON, C.R.; CORDEIRO, J.A. Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios.** 84: 13-29, 1995.
- MAQUET, A.; BI ZORO, I.; DELVAUX, M.; WATHELET, B.; BAUDOIN, J.P. Genetic structure of a Lima bean base collection using allozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p. 980-991, 1997.
- MARKERT, C. L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue ontogenetic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 45:753-763, 1959.
- ORASMO, G.R., OLIVEIRA-COLLET, S.A., LAPENTA, A.S., MACHADO, M.F.P.S. **Biochemical and Genetic Polymorphisms for Carboxylesterase and cetylesterase in Grape Clones of Vitis vinifera L. (Vitaceae) Cultivars**. *Biochem. Genet.* **45**: 663–670. 2007.
- REIS, F.A.C. **Diversidade genética de plântulas, árvores jovens e adultas de Calophyllum brasiliense camb. em uma floresta paludosa**. 39 p. Monografia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- SANTOS, D.; CORLETT, F. M. F.; MENDES, J. E. M. F.; WANDERLEY JUNIOR, J. S. A. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no Estado da Paraíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v. 37, n. 10, 2002.
- TEIXEIRA, A. S.; CHAVES, L.da S.; YUYAMA, K. Esterases no exame da estrutura populacional de camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh- Myrtaceae). **Acta Amazônica**, v.34, p. 89-96, 2004.
- Palavras-chave: Isoenzimas. Eletroforese. *Phaseolus lunatus* L.