

# ISOENZIMAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DE FAVA DA VARIEDADE “BOCA-DE-MOÇA” DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE FEIJÃO-FAVA DA UFPI

*Kássia Andreia Meireles de Sales<sup>1</sup> (Bolsista do ICV), Camila Silva Alexandre Veronez<sup>2</sup> (Bolsista do ICV), Gleice Ribeiro Orasmo (Orientadora, Depto. de Biologia-UFPI).*

## INTRODUÇÃO

A fava (*Phaseolus lunatus* L.), também conhecida como feijão-fava, feijão-de-lima ou fava-de-lima, é uma das cinco espécies do gênero *Phaseolus* explorada comercialmente, atingindo relativa importância econômica em alguns estados brasileiros (SANTOS et al., 2002). Pode ser consumida pelo homem sob a forma de grãos verdes e secos ou vagens verdes e folhas (VIEIRA, 1992). Esta espécie também pode ser utilizada para a alimentação animal e apresenta potencial para fornecer proteína vegetal à população humana, funcionando como uma fonte alternativa de alimento em vários municípios do Nordeste, juntamente com o feijão-caupi, o que, conseqüentemente, diminui a dependência dos feijões do grupo carioca (VIEIRA, 1992).

Os marcadores isoenzimáticos podem ser usados para caracterizar a variabilidade genética existente em plantas e detectar, através do perfil eletroforético, diferenças entre genótipos. Objetivou-se, desta forma, caracterizar subamostras da variedade “Boca-de-moça”, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-fava da Universidade Federal do Piauí, usando os padrões das isoenzimas  $\alpha$ - e  $\beta$ -esterases.

## METODOLOGIA

Plântulas de seis subamostras de fava: UFPI 650 e 699 (Boca-de-moça), UFPI 230 (Fava vermelha), UFPI 622 (Orelha-de-vó), UFPI 704 (Fava Branca) e UFPI 463 (Fava preta), pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-Fava da UFPI, foram utilizadas para eletroforese em gel de poli-acrilamida, no sistema PAGE, a qual foi conduzida no Laboratório de Biologia Molecular e Recursos Genéticos da Universidade Federal do Piauí.

Folhas jovens foram individualmente homogeneizadas em microtubos com 15-20  $\mu$ L de solução de extração, a qual foi composta por tampão fosfato 1,0 M em pH 7,0 contendo 5% de PVP-40, 1,0 mM de EDTA, 0,5% de  $\beta$ -mercaptoetanol e glicerol 10%. As amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm durante 30 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados como amostras.

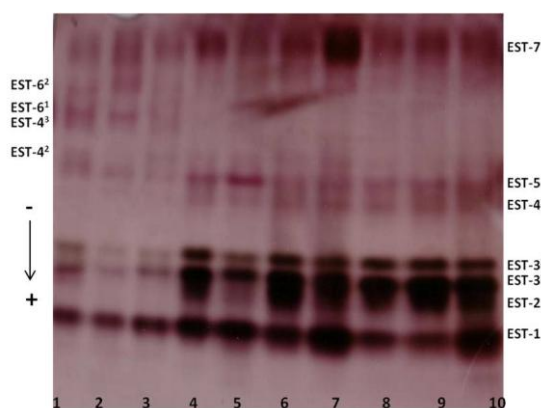
O gel a 12% foi preparado com de 9,3 mL de solução de acrilamida/bis-acrilamida, 6,0 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 8,55 mL de água bidestilada, 480 $\mu$ L de Persulfato de amônio 2% e 24 $\mu$ L de Tetramethylethylenediamine (TEMED). O gel de empilhamento foi preparado com 4,5 mL da solução acrilamida/bis-acrilamida, 4,5 mL de Tris-HCl 0,24 M pH 6,8, 45 $\mu$ L de água bidestilada, 375  $\mu$ L de Persulfato de amônio 2% e 4,5  $\mu$ L de TEMED.

A eletroforese durou 6-7 horas, a 200 v, usando o tampão o tris-glicina 0,1 m em pH 8,3. Para coloração o gel foi incubado em tampão Fosfato de Sódio 0,1 M pH 6,2, contendo 30 mg de  $\alpha$ -naftil acetato, 30 mg de  $\beta$ -naftil acetato e 50 mg de Fast blue RR salt, por cerca de 60 min.

Para a análise da diversidade genética foi utilizado o programa POPGENE-32, no cálculo do número médio de alelos por *loci*, da porcentagem de *loci* polimórficos, das taxas de heteroziguidade média (observadas e esperadas) e para o cálculo da Estatística-F.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras apresentaram bandas que permitiram a visualização de oito *loci* identificados como Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, Est-5, Est-6, Est-7 e Est-8. Pela da coloração das bancas, os *loci* Est-1 e Est-5 foram considerados como sendo  $\beta$ -esterases, e os *loci* Est-3, Est-4 e Est-8 como  $\alpha$ -esterases e as isoesterases Est-2, Est-6 e Est-7, como sendo  $\alpha/\beta$ -esterases (Figura 1).



**Figura 01:** Padrões de isoenzimas  $\alpha$ - e  $\beta$ -esterases em gel de poliacrilamida das subamostras UFPI 230 (amostra 01), UFPI 699 (02, 03, 09 e 10), UFPI 650 (04 e 06), UFPI 622 (05), UFPI 463 (07) e UFPI 704 (08) do BAGF da UFPI.

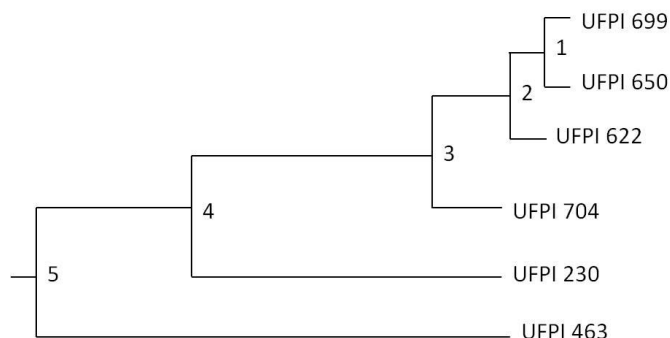
Pelo padrão das isoesterases, nas seis subamostras de fava, o número de *loci* polimórficos foi 5 e a porcentagem de *loci* polimórfico foi de 71,43%. Em contraste, Zoro Bi e seus colaboradores (2003) encontraram 10,32% de *loci* polimórficos. O número médio de alelos por *loci* foi 1.8571 e o número efetivo de alelos por *loci* 1, 6134. Os valores indicam uma base genética estreita para a espécie. Valores ainda menores foram encontrado por Zoro Bi e companheiros (2003), onde o número de alelos por *loci* foi de 1,10 e o número efetivo de alelos por *loci* de 1,05.

A heteroziguidade média esperada foi de 33,37% e a observada foi de 33,94% para todos os *loci*, indicando, assim, uma diversidade genética moderada. Para Maquet e colaboradores (1997) o valor encontrado foi semelhante,  $H_e = 0,26$ , em estudo utilizando 235 subamostras de *P. lunatus* L.

O coeficiente de endogamia (Fis) apresentou valor negativo de 31,54% (-0.3154), sugerindo que há um excesso de heterozigotos para todos os *loci* analisados, porém pequeno como indica o valor do Fit, de 8% (0.0846). O Fst foi de 30% (0.3041), valor considerado altíssimo, indicando que os genótipos analisados apresentaram grande diferenciação entre si.

A similaridade e distância genética observada nas subamostras, mostrou 100% (1, 0001) de similaridade entre as subamostras UFPI 699 e UFPI 650, as quais pertencem a variedade "Boca-de-moça". Uma vez que a menor similaridade foi de 72%, o intervalo (0.7209 a 1, 0001) de similaridade genética mostra que há bastante semelhança entre as subamostras analisadas, entretanto, a maior distância genética foi moderada de 32% (0.3273), detectada entre as subamostras UFPI 230 (fava vermelha) e UFPI704 (fava branca).

O dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA confirma os índices de  $F_{st}$ , no qual aponta haver diferenças entre todas as subamostras de fava analisadas, de forma que as subamostras foram localizadas separadas em grupos distintos, exceto as subamostras da variedade “Boca-de-moça” que ficaram num mesmo grupo.



**Figura 2.** Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre subamostras de feijão-fava obtido pelo UPGMA, a partir de isoenzimas esterases.

## CONCLUSÃO

As isoenzimas  $\alpha$ - e  $\beta$ -esterases em gel de poliacrilamida foram eficientes na distinção das subamostras de fava do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-fava da UFPI e podem ser usados para análise da estrutura genética na espécie.

As subamostras que apresentaram maior distância genética entre si foram a UFPI 230 e UFPI 704; e a subamostra UFPI 463 apresentou maior distância genética em relação às subamostras da variedade “Boca-de-moça” (UFPI 699 e UFPI 650), podendo ser recomendadas para cruzamentos específicos em programas de melhoramento genético da espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MAQUET, A.; ZORO BI, I.; DELVAUX, M.; WATHELET, B.; BAUDOIN, J. P. Genetic structure of a Lima bean base collection using allozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.980-991, 1997.

SANTOS, D.; CORLETT, F.M.F.; MENDES, J.E.M.F.; WANDERLEY JÚNIOR, 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, p.1407-1412, 2002.

VIEIRA, R. F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n.174, p.30-37, 1992.

ZORO BI, I.; MAQUET, A; BAUDOIN, J. P. Population genetic structure of wild *Phaseolus lunatus* (fabaceae), with special reference to population sizes. **American Journal of Botany**. 90(6): 897–904. 2003.

**Palavras-chave:** Diversidade genética. Esterase. *Phaseolus lunatus*.