PERSPECTIVAS DA UTILIZAÇÃO DE ISOENZIMAS NA IDENTIFICAÇÃO
DE HÍBRIDOS DE FEIJÃO (*PHASEOLUS SP.*) RESISTENTES AO
MOSAICO DOURADO DO FEIJOEIRO

ADEILDO ROSA DE LIMA JUNIOR

Dissertação apresentada à Escola
Superior da Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Ciências, Área de
Concentração: Fisiologia e Bio-
química de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 1994

OFICINA DE LINGUAGEM E COMUNICAÇÃO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - CAMPUS DE PIACABUA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

L732p Lima Júnior, Adeildo Rosa de
Perspectivas da utilização de isoenzimas na identificação de híbridos de feijão (*Phaseolus sp.*) resistentes ao mosaico dourado do feijoeiro. Piracicaba, 1994
69p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia

1. Eletroforese 2. Feijão - Melhoramento 3. Híbrido de feijão - Resistência à doença 4. Isoenzimas 5. Mosaico dourado do feijoeiro - Variedade resistente I. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba

CDD 635.652

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	
FACULDADE DE AGRICULTURA	
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA	
DISCIPLINA DE GENÉTICA	
ALUNO: ADEILDO ROSA DE LIMA JUNIOR	
TÍTULO: PERSPECTIVAS DA UTILIZAÇÃO DE ISOENZIMAS NA IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS DE FEIJÃO (PHASEOLUS SP.) RESISTENTES AO MOSAICO DOURADO DO FEIJOEIRO	
ORIENTADOR: Prof. Dr. OTTO J. CRÓCOMO	
DATA: 1994	

PERSPECTIVAS DA UTILIZAÇÃO DE ISOENZIMAS NA IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS DE FEIJÃO (PHASEOLUS SP.) RESISTENTES AO MOSAICO DOURADO DO FEIJOEIRO

ADEILDO ROSA DE LIMA JUNIOR
Engenheiro Florestal

Orientador: Prof. Dr. OTTO J. CRÓCOMO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica da Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 1994

PERSPECTIVAS DA UTILIZAÇÃO DE ISOENZIMAS NA IDENTIFICAÇÃO
DE HÍBRIDOS DE FEIJÃO (*PHASEOLUS SP.*) RESISTENTES AO
MOSAICO DOURADO DO FEIJOEIRO

ADEILDO ROSA DE LIMA JR

Aprovada em: 08.03.94

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Otto Jesu Crócomo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

ESALQ/USP

Prof. Dr. Murilo Melo

ESALQ/USP

Prof. Dr. OTTO JESU CRÓCOMO
Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Biotecnologia Agrícola - CEBTEC, por permitir o uso de seus laboratórios e área experimental para realização deste trabalho e ao seu corpo técnico-científico e administrativo pelo apoio recebido.

Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, Coordenador Científico do CEBTEC e do projeto "Production of interespecific hybrids of Phaseolus and their characterization", no qual está inserido este trabalho, por possibilitar um treinamento de alto nível em biotecnologia agrícola.

Ao Prof. Dr. Murilo Melo, pela orientação, amizade e paciência demonstradas durante a elaboração do plano de trabalho, sua execução, discussão dos resultados e redação final, sem as quais não seria possível a realização desta dissertação.

A Antônio Francisco de Campos Amaral, por ter ensinado e acompanhado todos os procedimentos relativos às análises químicas, participado ativamente na discussão dos resultados e pela sincera amizade desenvolvida durante todo este período, dentro e fora do CEBTEC.

A Marcus Vinícius Mendonça (BADI), aluno de graduação do curso de agronomia, pela imprescindível ajuda na preparação, instalação e condução do experimento no campo.

Ao Prof. Dr. Sergio Florentino Pascholati, pelas valiosas sugestões à redação final deste trabalho

À Prof^a Nadege da Silva Mendonça (DCB/UFPB) pela revisão e correções gramaticais do texto.

Aos companheiros de república Paulo Cesar, Flávio, Sérgio, Ricardo, Paulo Gallo, Emílio e Jorge, pela amizade e incentivo ao longo do curso.

A Jaime Wüñch, Renato (Mutreta), Júlio & Jaqueline, Milton Krieger e Mônica, amigos de escola e companheiros do Partido, por tudo que só nós sabemos.

À companheira Luísa Malusá por todo apoio recebido na realização deste trabalho.

E a todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a execução de todo o programa de pós-graduação.

A Adeildo e Auxiliadora
À Elenildes, Daniela e Cecília

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ANEXOS	xi
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	4
- Relação Gens x Enzimas x Resistência	8
- A Eletroforese	10
- As Peroxidases	10
- As Fosfatases Ácidas	12
- As Esterases	13
- Marcadores Bioquímicos	14
3 - OBJETIVOS	16
4 - MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 - Os híbridos	17
4.2 - Ensaio a campo	18
4.3 - Análises químicas	20
4.3.1 Os géis	20
4.3.2 Preparação das amostras	22
4.3.3 Determinação do teor de proteínas das amostras	22
4.3.4 Aplicação das amostras no gel ..	22
4.3.5 A corrida dos géis	23
4.3.6 Revelação dos géis para proteína	23
4.3.7 Revelação dos géis para fosfatase ácida	24
4.3.8 Revelação de géis para esterase .	25
4.3.9 Revelação de géis para peroxida- se	25
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Avaliação dos dados de campo	27

5.2	Avaliação das análises químicas	34
5.2.1	As proteínas	36
5.2.2	As peroxidases	36
5.2.3	As esterases	46
5.2.4	As fosfatases ácidas	46
6	- CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
	ANEXOS	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Perfis isoenzimáticos para população de híbridos de feijão	35
Figura 2 - Caracterização dos 3 "loci" para as isoenzimas de peroxidase, extraídas das folhas dos híbridos de feijoeiro 16807-4 e 16989-3, antes e após a exposição ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro	37
Figura 3 - Atividade das isoperoxidasases extraídas das folhas dos híbridos de feijoeiro 16807-4 e 16989-3, antes e após a exposição ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro	38
Figura 4 - Isoperoxidasases extraídas das folhas dos híbridos de baixa tolerância à virose do mosaico dourado do feijoeiro, antes (A) após (B) a exposição ao vírus	41
Figura 5 - Isoperoxidasases extraídas das folhas dos híbridos de alta tolerância à virose do mosaico dourado do feijoeiro, antes (A) e após (B) a exposição ao vírus	42
Figura 6 - Isoperoxidasases extraídas das folhas dos híbridos de alta e baixa tolerância à virose do mosaico dourado do feijoeiro, antes da exposição ao vírus	43
Figura 7 - Isoperoxidasases extraídas das folhas dos híbridos de alta e baixa tolerância à virose do mosaico dourado do feijoeiro, após a exposição ao vírus	44
Figura 8 - Perfis eletroforéticos para o uso de isoperoxidasases, extraídas de folhas, como marcador bioquímico, em híbridos de	

feijoeiro, de tolerância ao mosaico dourado do feijoeiro	45
Figura 9 - Caracterização dos 3 "loci" para as iso-enzimas de esterase, extraídas das folhas dos híbridos de feijoeiro 16807-4 (En) e 16989-3 (Gn), antes e após a exposição ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro	47
Figura 10 - Isoesterases, extraídas das folhas de híbridos, antes da exposição ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro	48
Figura 11 - Isoesterases, extraídas das folhas de híbridos, após exposição ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro	49
Figura 12 - Isoesterases, extraídas das folhas dos híbridos de feijoeiro 16807-4 (En) e 18989-3 (Gn), antes e após a exposição ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro	50
Figura 13 - Caracterização dos 4 "loci" de isoenzimas de fosfatase ácida, extraídas das folhas de híbridos de feijoeiro	51
Figura 14 - Fosfatases ácidas, extraídas das folhas de híbridos de alta (AT) e baixa (BT) tolerância à virose do mosaico dourado do feijoeiro, antes (A) e após (B) a exposição ao vírus	53
isoenzimas de fosfatase ácida	51

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Comportamento de híbridos interespecíficos, de <i>Phaseolus sp.</i> à diferentes viroses, em plantio na fazenda "Areão" no período outubro/90 a fevereiro/91 .	28
Tabela 2 - Comportamento de híbridos interespecíficos, de <i>Phaseolus sp.</i> à diferentes viroses, em plantio na fazenda "Areão" no período março a agosto/91	29
Tabela 3 - Avaliação das respostas de diferentes híbridos interespecíficos de <i>Phaseolus sp.</i> ao mosaico dourado do feijoeiro, em condições de campo	32

LISTA DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1 - Relação dos híbridos e cruzamentos de origem	66
ANEXO 2 - Esquema do ensaio no campo	67
ANEXO 3 - Soluções estoques	68

PERSPECTIVAS DA UTILIZAÇÃO DE ISOENZIMAS NA IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS DE FEIJÃO (*PHASEOLUS* SP.) RESISTENTES AO MOSAICO DOURADO DO FEIJOEIRO

Autor: ADEILDO ROSA DE LIMA JUNIOR

Orientador: PROF. Dr. OTTO J. CRÓCOMO

RESUMO

O gênero *Phaseolus*, originado no Continente Americano compreende mais de 100 espécies e somente 4 delas (*P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolium* e *P. lunatus*) são economicamente cultiváveis.

Entre os grãos, o feijão *Phaseolus* ocupa o 4º lugar em área cultivada e o 6º lugar em importância econômica. O Brasil ocupa o 1º lugar no mundo em produção bem como em consumo de feijão. Portanto, qualquer fator que afete a produção deste grão refletirá na esfera sócio-econômica do País.

O crescimento e a produção do feijão são afetados por doenças de origem bacteriana (*Xanthomonas phaseoli* e *Pseudomonas phaseolicola*), fúngica (*Isariopsis griseola*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Macrophomina phaseoli*, *Uromyces phaseoli* e *Rhizoctonia* sp.) e virótica (mosaico comum e mosaico dourado).

Diferentes níveis de tolerância das espécies de *Phaseolus* cultiváveis aos agentes causais acima têm sido estudados.

Este trabalho foi embasado na utilização do perfil eletroforético das isoenzimas para identificação de híbridos interespecíficos de *Phaseolus*, selecionados de cruzamentos de paternais que mostram tolerância ao vírus do

mosaico dourado do feijoeiro.

As isoenzimas de fosfatase ácida, peroxidase e esterase de 14 híbridos, obtidos de 6 cruzamentos diferentes envolvendo *P. vulgaris* e *P. coccineus*, foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

Os resultados indicam que após a exposição das plantas ao vetor da doença no campo, a atividade das isoenzimas de peroxidase e fosfatase ácida foi sempre maior do que a observada antes da exposição. Resultado oposto foi observado para isoenzimas de esterase.

Um perfil eletroforético de isoperoxidase é sugerido para ser usado como marcador bioquímico para tolerância ao BGMV, no feijão *Phaseolus*.

PERSPECTIVES ON THE UTILIZATION OF ISOZYMES FOR THE IDENTIFICATION OF BEAN HYBRIDS (PHASEOLUS SP.) RESISTANT TO BEAN GOLDEN MOSAIC VIRUS

Author: ADEILDO ROSA DE LIMA JUNIOR

Adviser: PROF. DR. OTTO J. CRÓCOMO

SUMMARY

The genus Phaseolus, originated from American Continent, contains more than 100 especies and only four of them (P. vulgaris, P. coccineus, P. acutifolium and P. lunatus) are economically cultivated.

Among brazilian crops, Phaseolus beans are ranked 4° place in cultivated area and 6° place in cash revenue. Brazil is also ranked 1° in the world in common bean production and consumption. Therefore, any factor affecting this crop production will affect Brazilian economy to some extention. The growth and production of Phaseolus bean plants are affected by bacterial diseases (Xanthomonas phaseoli and Pseudomonas phaseolicola), fungal diseases (Isariopsis griseola, Macrophomina phaseoli, Uromyces phaseoli, Colletotrichus lindemuthianum and Rhizoctonia sp.) and by virus diseases (common mosaic and golden mosaic). Different levels of tolerance to any the above disease agents by some of the cultivated especies of Phaseolus have been reported.

This work was aimed at the utilization of isozyme electrophoretical profiles to identify Phaseolus hybrids which show tolerance to the bean golden mosaic virus (BGMV). The isozymes of peroxidase, acid phosphatase

and esterase of 14 hybrids obtained from 6 different crosses involving P. vulgaris and P. coccineus were separated by polyacrilamide gel electrophoresis.

The results indicated that after the hybrid plants were exposed to the disease vector in the field, the activity of peroxidase and acid phosphatase isozymes was always higher in tolerant plants than in their susceptible counterpart. Opposite results were observed for esterases isozymes.

An isoperoxidase electrophoretical profile that could be used as a biochemical marker for BGMV tolerance in phaseolus plants is suggested.

1 - INTRODUÇÃO

Na América Latina, o feijão é uma cultura de caráter eminentemente social, sendo a principal fonte substituta de proteína animal para as populações de baixo poder aquisitivo. O hábito de consumo de feijão, pelo brasileiro, tanto das zonas urbanas como do meio rural, associado a sua ampla adaptação climática, torna esta cultura bem distribuída em todo território nacional. Assim, o Brasil tem sido o maior produtor mundial e também o maior consumidor dessa leguminosa, com um consumo médio anual de 20Kg/habitante/ano (TEIXEIRA & ROCHA, 1988).

No Brasil, o feijão é o 4º produto em área plantada e o 6º em valor de produção agrícola (IBGE, 1992). Em vista disso, qualquer problema que afete a produtividade da cultura, reflete na esfera sócio-econômica do País.

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) teve origem no continente americano, tendo sido levado para o Velho Mundo como planta ornamental, depois do descobrimento da América.

O gênero *Phaseolus*, no qual todas as espécies são diploides ($2n = 22$), compreende mais de 100 espécies das quais apenas 4 são cultivadas comercialmente: *P. vulgaris* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* Gray var. *latifolius* Fremm. e *P. lunatus* var. *lunatus*, todos, segundo EVANS (1976), descendentes de um ancestral comum.

O feijão sofre efeitos de inúmeras doenças dependendo das condições ecológicas e da altitude onde é cultivado. No Brasil, as principais doenças de importância econômica são: as bacterioses causadas por *Xanthomonas pha-*

seoli (crestamento bacteriano comum) e *Pseudomonas phaseolicola* (crescimento bacteriano de halo); as doenças fúngicas causadas por *Isariopsis griseola* (mancha angular), *Colleotrichum lindemuthianum* (antracnose), *Macrophomina phaseoli* (podridão cinzenta do caule), *Uromyces phaseoli* (ferrugem) e *Rhizoctonia ssp.*; e as viroses conhecidas como mosaico comum e mosaico dourado do feijoeiro.

Todas estas doenças são transmitidas pela semente, exceto o mosaico dourado e a ferrugem, e ocorrem indiscriminadamente no Brasil.

No caso das viroses, o controle da doença vem sendo feito através do controle químico do vetor e das práticas de rotação de culturas e zoneamento agrícola, por não existir entre as variedades cultivadas nenhuma que apresente um grau de tolerância economicamente viável. ALMEIDA et al. (1984), estudando 12 cultivares comerciais constatou reduções de até 85%, na produção de grãos, em plantas infectadas pelo mosaico dourado.

Vários autores concordam que o melhoramento para resistência varietal seria a medida mais adequada para obtenção de um método econômico e efetivo de controle das viroses.

A utilização de alguns métodos bioquímicos, que permitem a caracterização de plantas, tem sido uma ferramenta importante em vários programas de melhoramento com diversas espécies. Dentre estes métodos a eletroforese em gel de poliacrilamida tem se mostrado bastante eficiente.

A partir do estabelecimento de um perfil eletroforético que identifique uma característica qualquer da planta é possível, através da comparação de perfis, saber se uma outra planta, da mesma espécie, apresenta a mesma característica. Deste modo se reduz o tempo e o custo dos programas de melhoramento por permitir uma seleção segura dos parentais que apresentem as características desejáveis, bem como dos descendentes sem que seja necessário

levar estes últimos ao campo.

Alem disso, a eletroforese permite o estudo de diferenças genotípicas que não se manifestam fenotipicamente, o que não é possível em programas de melhoramento tradicionais.

Este trabalho visa estudar, através da análise de perfis eletroforéticos, o comportamento bioquímico de plantas de feijão submetidas à virose do mosaico dourado, através das isoenzimas peroxidase, fosfatase ácida e esterase, relacionando estes perfis com a resistência a doença.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

Segundo COSTA e ZIMMERMANN (1988), os métodos mais utilizados para melhoramento de feijão são: seleção massal, seleção de linhas puras (seleção de plantas individuais com teste de progênie), hibridação e condução de materiais segregantes e hibridação interespecífica.

No gênero *Phaseolus* a hibridação interespecífica costuma ser difícil, embora haja alguns casos de sucesso para resistência a bacterioses (HONMA, 1956; COYNE e SHUSTER, 1970).

KAMMERMANN e BEMIS (1960), afirmam que o cruzamento entre *P. vulgaris* e *P. coccineus* é relativamente mais fácil do que com outras espécies, embora existam bloqueios fisiológicos e morfológicos entre estas espécies.

A hibridação interespecífica vem sendo utilizada para tentar resolver alguns problemas considerados difíceis, como a resistência à viroses.

A doença causada pelo vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF), conhecida no Brasil desde 1961, foi descrita por COSTA (1965) como sendo uma virose sem maior gravidade dessa leguminosa. No entanto, a partir de 1973, assumiu proporções alarmantes nas regiões produtoras do Centro Oeste, Sudeste e Sul, afetando principalmente a safra da seca.

O fato foi atribuído à grande proliferação da "mosca branca" (*Bemisia tabaci* Genn.), inseto vetor do vírus que prolifera nas grandes extensões de soja e, no final do ciclo vegetativo da soja, provavelmente migra para os feijoads novos da safra da seca (De FAZIO, 1985).

De FAZIO (1985), descreve o quadro sintomatológico desta virose: "é característico o mosaico amarelo brilhante nas folhas, que pode ser mais ou menos intenso e é visível na totalidade do limbo foliar. Em certos casos pode aparecer, além do mosaico, um certo enrolamento do limbo para baixo e, um certo nanismo com encurtamento dos entrenós."

Variações nos sintomas, desde um mosaico forte até um mosaico fraco, são visíveis nas folhas, inclusive de uma mesma planta (De FAZIO, 1981).

Os sintomas são geralmente visíveis em plantas não muito jovens, na fase de florescimento (BIANCHINI et al., 1981).

O "Bean Gold Mosaic Virus (BGMV)", uma doença muito semelhante a que ocorre no Brasil, foi constatada em diversos países da América Central, Caribe, Colômbia e Venezuela. Os trabalhos de purificação e caracterização bioquímica deste vírus revelaram tratar-se de um Geminivírus (GOODMAN et al., 1977; GALVEZ e CASTANO, 1976).

Os Geminivírus são uma classe especial de vírus, de partículas com morfologia dímica, possuindo um DNA circular de cadeia simples (GOODMAN, 1981)

Um levantamento (CHAGAS et al., 1981) revelou que diversas Leguminosas, Solanáceas e Malváceas podem ser susceptíveis ao vírus em condições naturais ou experimentais.

As hospedeiras silvestres do BGMV, mais representativas entre as leguminosas são: *Galactia striata*, *Macroptilium erythroloma*, *Phaseolus longepedunculatus* e *Malvastrum coromandelianum* (HABER et al., 1983).

Se o vírus for uma variante espontânea do complexo da clorose infecciosa das Malváceas, então todas as famílias que são encontradas na vegetação espontânea, apresentando esse tipo de clorose, poderiam eventualmente se tornar hospedeiras naturais do vírus, entre elas

Euphorbiaceas, Compostas e Labiadas. Além disso, nas plantações escalonadas do feijão, as culturas mais velhas podem servir como fonte e reservatório natural do vírus para as mais novas (De FAZIO, 1985).

Até o momento não se conhece cultivar resistente à virose. Alguns cultivares demonstraram, em condições de campo, uma certa tolerância ao vírus, isto é, apresentaram alta produtividade apesar da doença (De FAZIO, 1985)

Alguns cultivares de *P. vulgaris* e *P. lunatus*, considerados altamente tolerantes na Colômbia, foram testados no Brasil, e todos se mostraram susceptíveis à infecção provocada pelo vírus que aqui ocorre (De FAZIO e VICENTE, 1982).

O grau com que a planta reponde a entrada e subsequente desenvolvimento do patógeno em seus tecidos ou o grau com que é danificada pela ação do patógeno são, frequentemente, utilizados como referência para a resistência ou susceptibilidade (NELSON, 1973)

De acordo com SINGH (1986), a resistência pode ser qualificada como alta, intermediária ou baixa, pois pode haver níveis entre a extrema resistência e a extrema susceptibilidade.

Vários autores concordam que a resistência está condicionada a inúmeros fatores internos e externos, atuando para reduzir a oportunidade ou o grau da infecção.

Um dos mecanismos de resistência utilizados pelas plantas é o da tolerância, que pode ser definida como a capacidade, inerente ou adquirida, de suportar a ocorrência da doença (NELSON, 1973) e apresentar desenvolvimento satisfatório (RAO, 1968).

RUSSEL (1978) cita a existência de três tipos de resposta do mecanismo de tolerância às viroses:

- o vírus é capaz de se multiplicar, mas os sintomas não aparecem;

- a infecção provoca um quadro de sintomas severo, porém, o desenvolvimento da planta é pouco afetado (referindo-se como tolerantes doentes); e
- a infecção não causa um quadro de sintomas severo e o desenvolvimento da planta praticamente não sofre efeito da virose (referindo-se como tolerantes verdadeiras).

Uma das formas de as plantas apresentarem resistência à patógenos é decorrente de mecanismos de natureza bioquímica que, segundo SINGH (1986), podem ser classificados em:

- a) Pré-existentes: - produção de substâncias alelopáticas;
 - presença de inibidores a nível celular antes da infecção;
 - deficiência de nutrientes essenciais ao patógeno.
- b) Induzidos:- produção de substâncias como resposta aos danos causados após a infecção.

Neste último caso as substâncias mais comuns são os compostos fenólicos, que sofrem aumento na sua síntese e no seu acúmulo, sendo tóxico ao patógeno, e as fitoalexinas, de diversa natureza, inclusive fenólica, que não se encontram presentes na planta antes da infecção e agem inibindo o desenvolvimento do patógeno.

Segundo DIENER (1963), os efeitos fisiológicos das infecções virais em plantas estão associados, principalmente, a: a) decréscimo da atividade fotossintética; b) incremento da taxa de respiração; c) acúmulo de compostos nitrogenados, particularmente amidas; d) incremento da atividade da polifenoloxidase e acúmulo de compostos derivados da oxidação de polifenóis; e e) decréscimo na

atividade de substâncias reguladoras do crescimento.

Relação Gens x Enzimas x Resistência

Diversos autores mostram que a resistência está associada ao genótipo, sendo considerada monogênica quando é governada por apenas um par de gens e poligênica quando governada por vários pares de gens (HARTMAN & SUSKIND, 1969). Alguns autores preferem utilizar o termo oligogênica quando a resistência está associada a 2, 3 ou 4 pares de gens e poligênica quando a um número maior (SINGH, 1986).

Vários trabalhos apontam para uma estreita relação entre a atividade de algumas enzimas e a resistência da planta a doenças de natureza variadas, utilizando-se de técnicas de análise de isoenzimas (WILLIAMSOM & COLWELL, 1991; UPADHYA et al., 1985; WEEDEN et al., 1984)

Segundo SHANNON (1967), o termo isoenzima foi utilizado por Markert & Moller (1959) para descrever diferentes formas moleculares de proteínas que exibiam a mesma especificidade.

Para SHAW (1969) as isoenzimas são geralmente definidas como as múltiplas e separadas formas de enzimas que ocorrem em todo organismo e realizam atividades catalíticas similares.

Diversos autores demonstram que a biossíntese de isoenzimas está sobre controle genético.

SHANNON (1967), citando Watson (1965) e Yanofsky & St. Lawrence (1961), afirma que os estudos das estruturas e das atividades biológicas dos gens, têm fornecido evidências convincentes da relação direta entre gen e proteína, sendo a sequência de aminoácidos da proteína determinada pela sequência de nucleotídeos do gen que a codifica.

Gottlieb (1977) e Simpson & Withers (1986), citados por PACCOLA-MEIRELLES et al. (1980), afirmam que mutações gênicas, as quais causam depleção ou adição de aminoácidos na estrutura de uma enzima, podem ser detectadas se estas alterações afetam a migração eletroforética. Afirmam ainda, que as diferentes formas moleculares de uma mesma enzima são chamadas "alozimas" se seus polipeptídeos são codificados por diferentes alelos em um único locus e que o termo "isoenzima" é aplicado a diferentes formas de uma enzima as quais catalizam a mesma reação mas, são codificadas por mais de um locus gênico.

GOTTLIEB (1977) afirma que o fenótipo eletroforético de proteínas e enzimas pode ser considerado a expressão do produto primário do gen.

A mobilidade eletroforética das proteínas possibilita obter informações genéticas mais precisas no que se refere a detecção de diferenças fenotípicas causadas por substituições alélicas de um único locus e a estimativa da produção de loci que mostram a variação na população (HUBBY & LEWONTIN, 1966).

Para HEIDRIC SOBRINHO (1982), apesar de seus limites, principalmente os concernentes a erros na técnica, a eletroforese constitui o melhor instrumento para estudos sobre a variação e diversidade genética entre populações.

Em espécies onde o alelo que confere resistência a algum fator está ligado a alguma ação isoenzimática, é possível selecionar indivíduos resistentes baseando-se apenas no padrão eletroforético. Esta aplicação em plantas também permite que o programa de melhoramento caminhe com maior rapidez e que seja menos dispendioso, pois não há necessidade de se levar a planta ao campo e realizar ensaios de resistência (PACCOLA-MEIRELLES et al., 1980).

A Eletroforese

Segundo SHANNON (1967), a eletroforese, em vários tipos de suporte, a filtração de géis e técnicas imunoquímicas têm sido utilizadas para detecção de isoenzimas, sendo a eletroforese em géis de poliacrilamida uma das técnicas mais empregadas.

A eletroforese baseia-se na separação de moléculas ou partículas carregadas em uma solução, sob a influência de um campo elétrico. As proteínas podem, em função do pH da solução, adquirir cargas positivas ou negativas, uma vez que são substâncias anfóteras e, por isso, quando aplicadas em um gel de poliacrilamida migram, em uma taxa que é determinada pela sua carga, configuração, tamanho e pH do meio, de um pólo para outro do campo elétrico (GUIMARÃES, 1978), sendo este percurso chamado "corrida".

Uma vez terminada a corrida, os géis são especificamente revelados permitindo a visualização de uma ou mais bandas coloridas que corresponde à posição de migração das isoenzimas da amostra. Quando a enzima é homogênea apenas uma banda pode ser vista. Quando várias bandas são visualizadas a amostra contém enzimas com cargas, tamanhos ou configurações espaciais diferentes (PACCOLA-MEIRELLES et al., 1980).

As Peroxidases

Entre as enzimas mais investigadas e com maior frequência encontradas em tecidos vegetais estão as peroxidases (VALDÊS et al., 1983).

De acordo com GRAHAM et al. (1964), as peroxidases (E.C. 1.11.1.7) são enzimas que oxidam o substrato (peróxido de hidrogênio) produzindo água de acordo com a seguinte reação;

UMAREUS, 1959; SEEVERS et al., 1971; MACKO et al., 1968 e SHEEN & DIACHUN, 1978, sugerem que variações na atividade destas enzimas estejam ligadas a processos de resistência às doenças de plantas. Outros autores acreditam em uma participação ativa em processos como atividade respiratória (NOVACKY & HAMPTON, 1968), lignificação de certos tecidos vegetais (SAUNDERS et al., 1964), formação da parede celular (FREUNDBERG, 1959), degradação do ácido indolacético (JANSEN, 1955) e biossíntese do etileno (HALL & SEXTON, 1972).

KEDAR (1959), KAWASHIMA & URITANI (1965), além de VETCH (1976) sugerem a existência de uma estreita relação entre as peroxidases e o mecanismo de compostos fenólicos já que elas catalisam processos de oxidação de muitos fenóis.

VALDES et al. (1983), trabalhando com plantas de *Phaseolus vulgaris*, infectadas com o vírus do "mosaico comum do feijoeiro" (BCMV), encontraram uma maior atividade de peroxidases em plantas infectadas do que em plantas saudáveis, que se relacionou com a presença do vírus nos tecidos. As zonas onde aparecem distribuídos os compostos fenólicos coincidiram com as zonas de grande atividade de peroxidases.

Resultados semelhantes foram obtidos por BATES & CHANT (1970), trabalhando com tecidos necrosados de *P. vulgaris* e *Vigna sinensis* infectados com o vírus do "mosaico do tabaco" (TMV).

FARKAS & STARMANN (1966), estudando *P. vulgaris* infectados com "southern bean mosaic virus" (SBMV), encontraram um incremento na atividade das peroxidases bem como um aumento no número de isoperoxidases.

A separação em gel de poliacrilamida, mostrou a existência de duas isoperoxidases em plantas saudáveis. Quando a planta

era infectada surgiam duas novas formas da enzima. As quatro peroxidases, após purificação, mostraram-se como proteínas bem definidas, com diferentes características físico-químicas e propriedades enzimológicas. Concluíram que o aumento do complexo de peroxidases nas folhas dos feijões infectados, se deve a dois fatores indiretamente associados à multiplicação do vírus: a aceleração da senescência induzida pelo parasitismo do vírus e aos danos mecânicos e a necrobiose que acompanha o desenvolvimento da lesão.

Os mesmos autores sugerem, ainda, que a formação de novas peroxidases, em tecidos infectados, seja baseada na síntese protéica.

SURLÍ et al. (1981b), estudando isoperoxidasas em plantas de *P. vulgaris* infectadas com vírus do "mosaico comum do feijão" (BCMV), chegaram a resultados semelhantes. Comparando o padrão eletroforético de uma variedade resistente com o de uma variedade susceptível, encontraram nesta última um maior número de isoperoxidasas, mesmo antes da infecção, e um aumento da atividade destas isoenzimas após a infecção. O incremento na atividade das isoperoxidasas, após a infecção, foi maior nas plantas resistentes do que nas susceptíveis.

O aumento na concentração de compostos fenólicos nas plantas que se mostraram resistentes à virose levou os autores a sugerirem a existência de uma possível relação entre as peroxidases e a síntese de fitoalexinas.

As Fosfatases Ácidas

De acordo com WILLIAMSON & COLWELL (1991) as fosfatases ácidas (E.C. 3.1.3.2) são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de fosfato inorgânico em monoésteres fosfóricos em pH ácido.

Esta reação pode ser descrita da seguinte

forma:

Estas enzimas encontram-se largamente distribuídas nos vegetais, apresentando grande variação no tocante a forma, tamanho e regulação da expressão, além da localização a nível de tecidos e no interior das células.

Vários trabalhos sugerem que as fosfatases ácidas estejam associadas a transformação de fosfato inorgânico em fosfato orgânico, em plantas que se desenvolvem em condições de deficiência de fósforo.

BAKER & TAKEO (1973) relatam um aumento da atividade das fosfatases ácidas nas folhas, durante a maturação e senescência, em plantas de tomate.

Estas isoenzimas têm sido utilizadas como marcadores para resistência à nematóides em algumas variedades de tomate (PAUL & WILLIAMSON, 1987 e RICK & FOBES, 1974), e comumente associadas à resistência de diversas espécies de insetos aos inseticidas.

As Esterases

As esterases são enzimas de pouca especificidade, que hidrolizam ligações éster produzindo ácido e álcool. São subdivididas de acordo com o substrato. Neste trabalho utilizou-se a arilesterase (E.C. 3.1.1.2) que catalisa a seguinte reação:

De modo geral as esterases têm sido utilizadas nos estudos de variabilidade genética em diversos cereais como arroz (*Oriza sativa*) (NAGAHARA et al., 1975),

aveia (*Avena sativa*) (WILLIAMSON et al., 1968), alfafa (*Mendicago sativa*) (MILLER et al., 1972), entre outros.

Diversos trabalhos sugerem o uso das esterases como marcador bioquímico para identificação de variedades de algodão (*Gossypium sp*) (CHERRY & KATTERMAN, 1971), soja (*Glycine max*) (PAYNE & KOSZYKOWSKI, 1978) e painço (*Eleusine coracana*) (UPADHYA et al., 1985).

Marcadores Bioquímicos

De acordo com MELO (1992), a consolidação da tecnologia envolvendo o estudo de proteínas, o produto da expressão gênica, tem tornado estas biomoléculas bastante úteis no estabelecimento dos chamados marcadores bioquímicos, que permitem uma rápida identificação de alterações de ação gênica, mesmo que esta não se expresse fenotipicamente.

DAUSSANT (1991) afirma que além das proteínas, as enzimas e segmentos de DNA constituintes de macromoléculas vem sendo utilizados como marcadores bioquímicos, nas áreas de melhoramento vegetal e em alguns processos industriais.

Segundo ANDREWS (1988) sempre que for possível associar a presença, variação na atividade ou ausência de uma proteína (enzima) a um caráter fenotípico, se terá determinado um marcador bioquímico para aquele caráter.

Trabalhos em diversas áreas tem utilizados os marcadores bioquímicos no estudo de embriogênese somática (EVERET et al., 1985; MOORE & LITZ, 1984; NOR & MINOCHA, 1990), na identificação de cultivares (ARRAMBIDE et al., 1992; BACH et al., 1992; SAWAZAKI et al., 1992), na caracterização da resistência de plantas a patógenos (BOLKAN et al., 1983; KEDAR, 1959; NOVACK & HAMPTON, 1968; PAUL & WIL-

LIAMSON, 1987) entre outras aplicações.

Como afirma UPADHYA et al, (1985) o maior problema enfrentado pelos geneticistas, especialmente os melhoristas de plantas, e produtores de sementes é a identificação de variações genéticas nas espécies e cultivares.

Neste contexto, o uso de marcadores bioquímicos, como as isoenzimas, têm contribuído para uma melhor seleção de plantas com características agronômicas desejáveis, diminuindo os custos e o tempo de obtenção destas plantas.

3 - OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivos:

- 1) Determinar a resposta de alguns híbridos de feijão (*Phaseolus sp.*) à infecção pelo mosaico dourado do feijoeiro;
- 2) Estabelecer o perfil eletroforético para as isoenzimas de peroxidase, fosfatase ácida e esterase dos híbridos de feijão selecionados;
- 3) Estabelecer relações entre os perfis eletroforéticos e a resistência ou a susceptibilidade dos híbridos de feijão ao vírus do "mosaico dourado do feijoeiro" (BGMV);
- 4) Definir um perfil eletroforético de, pelo menos, uma das isoenzimas, que possa ser usado com marcador de resistência ou susceptibilidade ao BGMV.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi montado na Fazenda Areão, área experimental da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), localizada no município de Piracicaba-SP (alt. 540m ; lat. 22°42'30" S e long. 47°38'01" W) e as análises químicas realizadas no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) da ESALQ/USP.

O trabalho constituiu-se de duas fases distintas:

- a) seleção dos híbridos, plantio e coleta de material para análise, e;
- b) análises químicas, através de eletroforese em gel de poliacrilamida, de proteínas e das isoenzimas de peroxidase, fosfatase ácida e esterase.

4.1 - OS HÍBRIDOS

Os híbridos, em número de catorze, pertencentes a coleção do CEBTEC, foram obtidos a partir de seis cruzamentos distintos. Quando da escolha, levou-se em consideração os seguintes critérios:

- a) existência entre a ascendência de, no mínimo, um componente com histórico de resistência, tolerância ou susceptibilidade ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro;
- b) a característica de, no mínimo, um híbrido por cruzamen-

to quanto a resistência, tolerância ou susceptibilidade ao vírus do "mosaico dourado do feijoeiro"; e

- c) existência de sementes em número suficiente para a realização do experimento.

As informações sobre os ascendentes dos híbridos foram fornecidas pela "Faculté des Sciences Agronomiques des Glemboux", da Bélgica.

As características dos híbridos, em relação à virose estudada, foram obtidas mediante experimento prévio, conduzido na mesma área experimental, sob responsabilidade do CEBTEC, onde foram plantados 39 híbridos e avaliada a característica de resistência e susceptibilidade a diversas viroses, entre elas a do mosaico dourado. Foram também avaliados alguns ascendentes dos híbridos (CROCOMO et al., 1993).

A relação dos híbridos estudados e seus respectivos cruzamentos de origem encontra-se no Anexo 1.

4.2 - ENSAIO A CAMPO

O experimento foi instalado no mês de outubro/92, na Fazenda "Areão, em uma área de 360m², sendo 80m² (16 retângulos de 2,5m x 2,0m) destinados ao plantio dos híbridos de *Phaseolus sp.* e os 280m² restantes à separação entre as áreas de plantio.

Nestes 280m² foi plantado, 30 dias antes, o *Phaseolus vulgaris* G-25848, da coleção do CEBTEC, reconhecidamente susceptível ao vírus do mosaico dourado, o que permitiu a identificação da presença do vírus, bem como do vetor, no local do experimento. Este híbrido foi arrancado 10 dias após o plantio dos híbridos, objeto do estudo, forçando a migração do vetor para as parcelas.

A germinação das sementes dos híbridos foi efetuada em bandejas plásticas com vermiculita sendo transferidas, após 3 dias de germinadas, 3 plântulas das bandejas por saco plástico de 5 litros, contendo uma mistura de esterco, areia e argila na relação 1:1:1. Após 5 dias foram eliminadas duas plantas de cada saco, com base em análise visual do vigor, permanecendo as remanescentes em casa de vegetação, no CEBTEC, por 28 dias.

Durante este período foram feitas aplicações de inseticidas e fungicidas, o que permitiu um desenvolvimento sadio das plantas.

Cada planta foi identificada com uma letra que correspondia a um híbrido, e um número que correspondia à parcela na qual a planta seria plantada.

No 25º dia, após o plantio nos sacos plásticos, foi coletada de cada planta uma amostra de aproximadamente 2g de folhas que foram acondicionadas em sacos plásticos previamente identificados com informações da planta, e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em "freezer", a -15°C, para posterior análise.

No 28º dia, as plantas foram transferidas para o campo onde ocuparam, em covas, as 16 parcelas, sendo cada uma formada por uma planta de cada híbrido identificado pelas letras C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N,O e P, e por duas plantas do *P. vulgaris* G-25848, identificadas pelas letras A e B, distribuídas conforme esquema constante no Anexo 2, tendo um espaçamento entre plantas de aproximadamente 0,5m x 0,5m.

As plantas permaneceram por 43 dias no campo. Durante este período, foram realizadas duas capinas, dentro e fora das parcelas e feita a irrigação quando necessário.

Ao fim deste período, foi realizada uma avaliação da condição de cada planta, no que se refere aos sintomas do mosaico dourado, sendo atribuída a cada uma

delas uma nota, de acordo com o grau de sintomatologia apresentado.

As notas variaram de 0 a 3, sendo assim definidas:

- 0 - nenhum sintoma em nenhuma folha;
- 1 - poucos sintomas em poucas folhas;
- 2 - poucos sintomas em muitas folhas ou muitos sintomas em poucas folhas; e
- 3 - muitos sintomas em muitas folhas.

As plantas foram, então, arrancadas, acondicionadas em sacos plásticos que eram colocados em solução refrigeradora composta por gelo, acetona e ácido acético e posteriormente transferidos para câmara fria do CEBTEC, por 2 dias. Neste período foi feita a coleta das folhas destas plantas, que eram lavadas em água corrente, e a seleção das que se apresentavam mais íntegras fisicamente as quais, em seguida, eram novamente colocadas em sacos plásticos e armazenadas em "freezer", à temperatura de -15°C .

4.3 - ANÁLISES QUÍMICAS

A técnica utilizada neste trabalho foi a de eletroforese vertical, com gel de poliacrilamida em sistema descontínuo, submetido a uma tensão de 100V e corrente de 15mA, em câmara fria a aproximadamente 4°C .

4.3.2 - OS GÉIS

Os géis foram montados entre placas de vidro temperado, separadas por espaçadores de acrílico de 1,0mm de espessura. As canaletas para aplicação das amostras foram feitas com "pentes" de acrílico, tendo cada uma o

volume aproximado de 100 μ l.

Utilizou-se géis de poliacrilamida, a 7,0%, confeccionados a partir das soluções estoques constante no Anexo 3, nas seguintes formulações:

a) Gel Separador

- 3,0ml da solução estoque do tampão do gel separador
- 7,0ml da solução estoque de acrilamida
- 16,8ml da solução tampão do tanque
- 0,225ml de Persulfato de Amônia a 10%
- 0,015ml de TEMED

b) Gel Empilhador

- 1,5ml da solução estoque do tampão do gel empilhador
- 2,0ml da solução estoque de acrilamida
- 11,4 ml da solução tampão do tanque
- 0,112ml de Persulfato de Amônia a 10%
- 0,015ml de TEMED

Os géis separadores apresentavam dimensões equivalentes a 9,5cm x 14,0cm x 1,0mm. Após a sua solução ser vertida entre as placas era colocada uma solução de butanol a 60% para permitir uma melhor polimerização do gel. Esta solução de butanol não se misturava à solução do gel. O tempo de polimerização era de aproximadamente 3 horas.

Polimerizado o gel separador, era removida a solução de butanol e cuidadosamente seca a superfície do gel. Em seguida era colocada, sobre esta, a solução do gel empilhador, que apresentava dimensões de 3,0cm x 14,0cm x 1,0ml, e colocado o "pente" para a formação das canaletas, em número de 10, durante a polimerização.

4.3.3 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram preparadas a partir de 1g de limbo foliar, retiradas as nervuras de maior diâmetro maceradas em cadinho de porcelana com 1ml da solução tampão da amostra para extração de enzimas (Anexo 3), em uma cuba com gelo para manter a baixa temperatura evitando, assim, a denaturação das proteínas. Os extratos obtidos eram colocados em tubos de ensaio e centrifugados a 10.000g, por 10 minutos, à temperatura de 0°C, em centrífuga refrigerada.

Os precipitados obtidos nesta centrifugação eram descartados e os sobrenadantes, fontes de enzimas, eram transferidos para tubos de "Eppendorf" de 1,5ml e submetidos a nova centrifugação a 10.000g, por 3 minutos em centrífuga apropriada.

4.3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS

O teor de proteínas nas amostras foi determinado através do método descrito por LOWRY (1951), sendo feitas as leituras da densidade ótica a 540nm, em espectrofotômetro da marca HITACHI, modelo U-3210, tendo como padrão uma amostra de 20µg de albumina de soro bovino.

Para a determinação do teor de proteína das amostras foi feita uma média de duas leituras de concentração obtidas a partir de alíquotas de 5µl e 10µl de cada amostra.

4.3.5 - APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS NO GEL

Com a polimerização do gel empilhador o "peixe" era retirado e as canaletas lavadas com solução tampão do tanque, isto após a placa ser presa a cuba eletroforé-

tica.

Para a aplicação no gel, alíquotas das amostras eram transferidas para tubos de ensaio, onde se adicionava o tampão da amostra para aplicação no gel (Anexo 3). Os valores das alíquotas variavam entre as amostras, pois dependiam do teor de proteína de cada uma delas. Manteve-se entretanto, a relação de 3 volumes da amostra para 1 volume da solução tampão. Nos géis foram aplicadas alíquotas que continham 400µg de proteínas de cada amostra.

4.3.6 - A CORRIDA DOS GÉIS

Os géis, em número de dois por cuba, eram submetidos, inicialmente, a uma tensão de 200V até a frente de bromofenol atingir o final do gel empilhador. Neste momento a tensão era reduzida para 100V, permanecendo constante até o final da corrida, ou seja, quando a frente de bromofenol atingia o nível da solução tampão do tanque inferior da cuba eletroforética, o que acontecia após seis horas, aproximadamente. Em ambas tensões a corrente era mantida constante em 15mA.

Todo esse processo era realizado em câmara fria a, aproximadamente, 4°C, para evitar o aquecimento dos géis e a denaturação das proteínas.

Ao fim da corrida os géis eram removidos das placas e seguiam-se os processos de revelação de acordo com a sua destinação (proteína ou isoenzimas).

4.3.7 - REVELAÇÃO DOS GÉIS PARA PROTEÍNAS

Para esta revelação utilizou-se o método descrito por PACCOLA-MEIRELLES et al. (1988).

Os géis, após serem retirados das placas,

eram mergulhados, por 12 horas, numa solução de 50ml de FIXADOR PAGE (45ml de metanol, 10ml de ácido acético e 45ml de água deionizada) e 50mg de "Azul de Comassie " ("Brilhan Blue R250"), a temperatura ambiente.

Após este período, os géis, eram transferidos para uma solução descorante (5ml de metanol, 7ml de ácido acético e 88ml de água deionizada) e mantidos à temperatura ambiente até a descoloração do fundo e individualização das bandas. Terminada a revelação, os géis eram fotografados e colocados em sacos plásticos devidamente identificados, contendo uma solução de etanol a 10% e armazenados em geladeira.

Estes géis não foram objetos de análise sendo utilizados, apenas, para confirmar se às bandas observadas nos géis de isoenzimas correspondiam respectivas proteínas.

4.3.8 - REVELAÇÃO DOS GÉIS PARA FOSFATASE ÁCIDA

Utilizou-se, nesta revelação a metodologia descrita por VALLEJOS (1983).

Após a remoção das placas, os géis eram imersos em uma solução tampão acetato 0,5M de pH 5,0, e colocados em geladeira, por uma hora, para equilibrar o pH.

Em seguida eram incubados, por 12 horas, em local escuro à temperatura ambiente, em uma solução reveladora de fosfatase ácida, com a seguinte composição:

- tampão acetato 0,5M, pH 5,0
- 1mg de α -naftilfosfato/ml de solução tampão
- 1mg de "Fast Red"/ml de solução tampão
- 1mg de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ /100ml de solução tampão

Decorrido este período, seguia-se uma lavagem com água deionizada e duas lavagens com solução de água deionizada, etanol e ácido acético, na proporção de 5:5:1. Em seguida, os géis eram fotografados e acondicionados em sacos plásticos, identificados, com solução de etanol a 10% e guardados em geladeira.

4.3.9 - REVELAÇÃO DOS GÉIS PARA ESTERASE

A revelação destes géis foi feita com base na metodologia proposta por PAYNE e KOSZYKOWSKY (1978).

Os géis eram retirados das placas e colocados em geladeira, por uma hora, incubados numa solução tampão fosfato 0,1M de pH 6,0. Após equilibrado o pH, os géis eram transferidos para uma solução reveladora de esterase com a composição abaixo e mantidos no escuro à temperatura ambiente por 12 horas,

- tampão fosfato de pH 6,0
- 0,5mg de "Fast Blue RR"/ml de solução tampão
- 0,2mg de α -naftilacetato/ml de solução tampão

Ao fim deste período, seguia-se a fixação dos géis em solução de água, etanol e ácido acético, na proporção de 5:5:1, por 5 minutos. Depois de fotografados, os géis eram embalados em sacos plásticos, identificados, contendo solução de etanol a 10% e colocados em geladeira.

4.3.10 - REVELAÇÃO DOS GÉIS PARA PEROXIDASE

Nestas revelações foi empregado o método descrito por GRAHAM et al. (1964).

Os géis, após removidos das placas, eram in-

cubados em solução tampão acetato de sódio 0,05M de pH 5,0, por uma hora, em geladeira. A seguir eram transferidos para uma solução reveladora de peroxidase, com a seguinte formulação:

- tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0
- 0,5mg de 3-amino-9-ethylcarbazol/ml de solução tampão
- 0,06ml de N-N-dimetilformamida/mg de 3-amino-9-ethylcarbazol
- 7 gotas de H₂O₂ a 30% / 100ml de solução tampão
- 3,0ml de CaCl₂ 1M/100ml de solução tampão

Nesta solução os géis permaneciam por 12 horas, em local escuro à temperatura ambiente. Passado este período eram lavados com água deionizada, fotografados e armazenados em geladeira, em sacos plásticos identificados contendo solução de etanol a 25%.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - AVALIAÇÃO DOS DADOS DE CAMPO

Através do projeto "PRODUCTION OF INTERESPECIFIC HYBRIDS OF *Phaseolus* AND THEIR CHARACTERIZATION", foi realizada, no período de maio/89 a agosto/91, pelo CEBTEC a avaliação de 15 híbridos, obtidos a partir de 8 cruzamentos distintos, no tocante a tolerância às viroses: mosaico dourado do feijoeiro (BGMV), mosaico comum do feijoeiro (BCMV) e mosaico do complexo clorótico das malváceas (BCIMV).

Esta avaliação foi feita em dois plantios, realizados em épocas diferentes, na mesma área experimental da fazenda "Areão", onde foi montado o experimento do presente trabalho. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

Observa-se que houve uma maior incidência de plantas afetadas pelo BGMV nos híbridos relacionados na Tabela 1. Isto pode ser devido a época do plantio, que neste caso ocorreu no fim do mês de outubro/90, o que coincide com o aumento da população da mosca branca. O plantio dos híbridos da Tabela 2 realizou-se no mês de março/91, quando há uma diminuição na ocorrência do vetor.

Dos 15 híbridos avaliados, 10 tinham origem em 4 cruzamentos que apresentavam relações entre os parentais. Estes 10 híbridos mostraram um certo grau de tolerância ao BGMV, embora, analisando cada um isoladamente, tenha-se encontrado plantas susceptíveis à virose, o que sugere uma possível existência de variabilidade genética

Tabela 1 - Comportamento de híbridos interespecíficos, de *Phaseolus sp.* à diferentes viroses, em plantio na fazenda "Areão", no período outubro/90 a fevereiro/91 (adaptado de CRÓCOMO *et al.*, 1993).

Nº de controle	Espécies envolvidas*	Nº de plantas**	Nº de plantas com		
			BGMV	BClMV	BCMv
16004-0	[(c x v) x c] x v	17(11)	6	0	0
21214-4	(c x v) x c	33(6)	4	8	1
18985-9	[(c x v) x v] x v	5(2)	1	1	0
18979-5	(c x v) x c	9(8)	-	-	-
19923-3	v x c	9(0)	1	6	0
18989-6	(c x v) x c	24(3)	6	7	4
14476-1	[(c x v) x c] x v	12(0)	3	2	1
18983-6	(c x v) x c	16(0)	2	2	3
19935-4	v x c	5(0)	2	0	0
19938-2	v x c	13(0)	2	0	0
18985-6	(c x v) x c	3(0)	0	1	1

* v = *P. vulgaris*; c = *P. coccineus*

** o número entre parênteses indica plantas mortas

BGMV - "Bean Gold Mosaic Virus"

BClMV - "Bean Clorotic Mosaic Virus"

BCMv - "Bean Common Mosaic Virus"

Tabela 2 - Comportamento de híbridos interespecíficos, de *Phaseolus sp.* à diferentes viroses, em plantio na fazenda "Areão", no período março a agosto/91 (adaptado de CRÓCOMO *et al.*, 1993).

Nº de controle	Espécies envolvidas*	Nº de plantas**	Nº de plantas com		
			BGMV	BCIMV	BCMV
19930-2	v x c	14(4)	0	0	0
19935-4	v x c	15(5)	0	5	0
18938-2	v x c	50(11)	3	9	6
19941-2	v x c	12(7)	2	1	0
18985-6	(c x v) x c	11(7)	2	0	0
18983-6	(c x v) x c	13(12)	0	0	0
18989-6	(c x v) x c	11(5)	1	0	0
19926-5	v x c	15(8)	0	0	0

* v = *P. vulgaris*; c = *P. coccineus*

** o número entre parênteses indica o nº de plantas mortas

BGMV - "Bean Gold Mosaic Virus"

BCIMV - "Bean Chlorotic Malvaceas Virus"

BCMV - "Bean Common Mosaic Virus"

dentro de cada híbrido.

Estes cruzamentos e respectivos híbridos foram:

- a) DOR-306 (*P. vul.*) x NI-15 (*P. coc.*)
19935-4, 19938-2, 19930-2 e 19941-2
- b) DOR-306 (*P. vul.*) x NI-229 (*P. coc.*)
19923-3
- c) (NI-889 (*P. coc.*) x D-145 (*P. vul.*)) x NI-16 (*P. coc.*)
18983-6 e 18985-6
- d) (NI-889 (*P. coc.*) x D-145 (*P. vul.*)) x NI-15 (*P. coc.*)
21214-4, 18989-6 e 18979-5

Para o presente trabalho foram selecionados 12 híbridos destes 4 cruzamentos, sendo 7 deles avaliados pela primeira vez, como forma de tentar encontrar uma consistência de segregação, dos cruzamentos, para a tolerância ao BGMV, além de 2 híbridos, obtidos de 2 cruzamentos distintos não avaliados anteriormente.

O plantio realizado no mesmo local dos anteriores, visou obter as mesmas condições de meio e a época (dezembro/92) foi determinada por ser a de maior incidência do vetor da virose, segundo a literatura. A utilização do mesmo número de plantas por híbridos e a forma de distribuição dentro das parcelas, buscou uma maior uniformidade de exposição ao vetor.

Dos 14 híbridos, inicialmente propostos, 2 não apresentaram plantas em condições de análise: o híbrido 16813-1, cujas plantas não sobreviveram no campo, e o híbrido 18983-5, cujo número de plantas sobreviventes (4) não foi suficiente para as análises químicas, sendo portanto descartados.

Os dados de avaliação obtidos a partir deste experimento, permitiram uma melhor caracterização dos híbridos, no tocante a tolerância ao BGMV, bem como avaliar os cruzamentos de origem sob o mesmo aspecto.

Os dados da Tabela 3, permitiram a separação dos híbridos em dois grupos:

- a) híbridos com alta tolerância ao BGMV: aqueles que apresentaram menos de 20% de indivíduos com sintomas da virose; e
- b) híbridos com baixa tolerância ao BGMV: aqueles que apresentaram mais de 80% dos indivíduos com sintomas da virose.

No primeiro grupo encontram-se os híbridos 21213-1 (15%), 16816-5 (11%), 18983-6 (15%) e 21208-4 (12,5%).

No segundo grupo encontram-se os híbridos 19923-3 (100%), 19930-2 (90%) e 19935-4 (100%).

Embora alguns híbridos tenham apresentado um comportamento intermediário, quanto ao percentual de indivíduos com sintomas, não foi possível classificá-los em um grupo de tolerância intermediária. Nos híbridos 16807-4 (40%) e 16989-3 (55%), as plantas com sintomas receberam notas 1 ou 2, o que os diferencia do híbrido 19938-2 (70%), onde a maioria das plantas com sintomas receberam notas 2 e 3.

O caso dos híbridos 16807-4 e 16989-3, talvez possa ser enquadrado no que RUSSEL (1978) referiu-se como "tolerantes verdadeiras", já que o desenvolvimento destas foi pouco afetado, enquanto que no híbrido 19938-2, cujas plantas doentes mostraram grande comprometimento no desenvolvimento, as plantas sadias podem ser explicadas através do mecanismo de escape ou da variabilidade do vírus

Tabela 3 - Avaliação das respostas de diferentes híbridos inter-específicos de *Phaseolus sp.* ao mosaico dourado do feijoeiro, em condições de campo.

Nº de controle	Plantas		Mosaico		Notas				
	vivas	mortas	sim	não	0	1	2	3	
G-25848	15	1	13 (87%)	2	2	2	4	7	
G-25848	13	3	12 (92%)	1	1	3	4	5	
14620-2	11	5	2 (18%)	9	9	2	-	-	AT *
16919-1	10	6	- (0%)	10	10	-	-	-	AT
16807-4	10	6	4 (40%)	6	6	2	2	-	
16813-1	-	16	-	-	-	-	-	-	
16989-3	9	7	5 (55%)	4	4	3	2	-	
21213-1	13	3	2 (15%)	11	11	2	-	-	AT
16816-5	9	7	1 (11%)	8	8	1	-	-	AT
18983-5	4	12	2 (50%)	2	2	-	2	-	
18983-6	13	3	2 (15%)	11	11	2	-	-	AT
21208-4	8	8	1 (12,5%)	7	7	-	1	-	AT
19923-3	15	1	15 (100%)	-	-	1	3	11	BT
19930-2	10	6	9 (90%)	1	1	-	2	7	BT
19935-4	9	7	9 (100%)	-	-	-	3	6	BT
19938-2	13	3	9 (70%)	4	4	-	3	6	

* AT - alta tolerância à virose

BT - baixa tolerância à virose

infectante.

O híbrido 18983-5 (50%) não foi considerado nas análises devido ao baixo número de plantas sobreviventes, não sendo possível determinar a causa da alta mortalidade.

A análise dos cruzamentos de origem dos híbridos mostrou que:

- a) o cruzamento DOR-306 (P. vul.) x NI-15 (P. coc) resultou em híbridos com baixo grau de tolerância à virose (19930-2 e 19935-4), mesmo considerando-se o caso do híbrido 19938-2;
- b) o cruzamento DOR-306 (P. vul.) x NI-229 (P. coc) originou um híbrido (19923-3) com baixo grau de tolerância ao vírus do mosaico dourado, com 100% dos indivíduos apresentando sintomas da virose
- c) o cruzamento (NI-889 (P. coc.) x D-145 (P. vul.)) x NI-16 (P. coc.) originou híbridos com alta tolerância à virose (16816-5, 18983-6 e 21208-4), não se considerando o quarto híbrido deste cruzamento (18983-5) devido ao baixo número de plantas sobreviventes para avaliação (4 plantas);
- d) o cruzamento (NI-889 (P. coc.) x D-145 (P. vul.)) x NI-15 (P. coc.) segregou um híbrido com alta tolerância (21213-1) e dois que apresentaram sintomas em 40% (16807-4) e 55% (16989-3) dos indivíduos sem que estes comprometessem seu desenvolvimento.
O quarto híbrido deste cruzamento (16813-1) não teve indivíduos sobreviventes no campo.

e) os cruzamentos:

[(NI-889 x G-3807) x A-113] x G-35010 ; e

[(NI-889 x G-3807) x A-113] x G-35145,
segregaram híbridos (14620-2 e 16919-1) com alta tolerância à virose. Em termos de espécies estes cruzamentos são:

[(*P. coc.* x *P. vul.*) x *P. vul.*] x *P. coc.*

Estas observações permitem considerar que a maior participação de *Phaseolus coccineus* nos cruzamentos eleva a possibilidade de obtenção de híbridos com maior grau de tolerância ao BGMV.

Permitem, ainda, especular a possibilidade do *P. coccineus* NI-16 apresentar uma maior tolerância ao BGMV do que o *P. coccineus* NI-15, não sendo possível a comprovação experimental devido a inexistência de sementes destes *Phaseolus* no CEBTEC.

5.2 - AVALIAÇÃO DAS ANÁLISES QUÍMICAS

No mesmo período em que se realizava o trabalho de campo, no CEBTEC foi realizada a determinação do perfil eletroforético para proteínas e para as isoenzimas peroxidase, fosfatase ácida e esterase, de 30 híbridos cultivados em casa de vegetação e livres de viroses.

A análise destes perfis permitiu o estabelecimento de diferenças bioquímicas entre os híbridos, bem como possibilitou, sugestivamente, a determinação do número de "loci" que regularia a atividade de cada isoenzima testada.

Foram sugeridos 4 "loci" para a fosfatase ácida, 3 "loci" para a esterase e 3 "loci" para a peroxidase (CRÓCOMO *et al.*, 1993). A Figura 1 mostra a distribuição dos "loci" e o número máximo de bandas em cada "loci" para as 3 isoenzimas.

De cada híbrido foram analisadas duas amos-

Figura 1 - Perfis isoenzimáticos para população de híbridos de feijão. As letras correspondem aos "loci" e as bandas representam os alelos.

FONTE: CRÓCOMO *et al.*, 1993.

tras de 4 plantas, sendo uma amostra antes da planta ir ao campo, ou seja, livre do vírus e uma após a planta encontrar-se exposta ao vírus no campo.

Cada amostra foi revelada para proteína e para as 3 isoenzimas.

5.2.1 - PROTEÍNAS

Os géis de proteínas foram utilizados, apenas, como fator de controle, confirmando se as bandas visualizadas nos géis das isoenzimas correspondiam às proteínas existentes na planta.

Não foi possível caracterizar os híbridos, quanto à tolerância à virose, utilizando estes géis.

5.2.2 - AS PEROXIDASES

Como era esperado as peroxidases apareceram distribuídas em 3 "loci", como pode ser observado na Figura 2. Também não houve muita variação no número e posicionamento das bandas, quando comparados com os padrões determinados anteriormente.

Independentemente do híbrido estudado, sempre se constatou uma maior atividade de isoperoxidasas após as plantas serem expostas ao patógeno e manifestarem ou não os sintomas da virose. Esta maior atividade foi expressa por uma maior intensidade na coloração das bandas nos géis, como pode ser visto na Figura 3.

Resultado semelhante foi descrito por VALDES *et al.* (1983), trabalhando com duas variedades de *Phaseolus vulgaris* infectadas com o vírus do mosaico comum do feijoeiro (BGMV); SURLÍ *et al.* (1981a), em trabalho com duas variedades de *P. vulgaris* infectadas com o BCMV; BATES & CHANT (1970), em trabalho com *P. vulgaris* e *Vigna sinensis*,

Figura 2 - Caracterização dos 3 "loci" para isoenzimas de peroxidase, extraídas das folhas dos híbridos de feijoeiro 16807-4 e 16989-3, antes e após a exposição ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro

- 1 - Planta E₁, após exposição, sem sintomas
- 2 - Planta E₁, antes da exposição
- 3 - Planta E₈, após exposição, com sintomas
- 4 - Planta E₈, antes da exposição
- 5 - Planta G₁, após exposição, sem sintomas
- 6 - Planta G₁, antes da exposição
- 7 - Planta G₁₄, após exposição, com sintomas
- 8 - Planta G₁₄, antes da exposição

E_n - híbrido 16807-4

G_n - híbrido 16989-3

Figura 3 - Atividade das isoperoxidases extraídas das folhas dos híbridos de feijoeiro 16807-4 e 16989-3 antes e após a exposição ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro

- 1 - Planta E₁₃, após exposição, sem sintomas
- 2 - Planta E₁₃, antes da exposição
- 3 - Planta E₄, após exposição, com sintomas
- 4 - Planta E₄, antes da exposição
- 5 - Planta G₃, após exposição, sem sintomas
- 6 - Planta G₃, antes da exposição
- 7 - Planta G₈, após exposição, com sintomas
- 8 - Planta G₈, antes da exposição

E_n - híbrido 16807-4

G_n - híbrido 16989-3

infectadas com o vírus do mosaico do tabaco (TMV); e FARKAS e STAHMANN (1966), em trabalhos com *P. vulgaris* infectado do com o "southern bean mosaic virus" (SBMV).

Os perfis eletroforéticos dos híbridos que apresentaram baixa tolerância à virose (19923-3, 19930-2 e 19935-4), vistos na Figura 4, mostram a presença de duas novas isoperoxidasas no "locus" 2, após a exposição dos indivíduos ao BGMV, posicionadas acima daquelas observadas antes da exposição à virose. FARKAS e STAHMANN (1966), trabalhando com *P. vulgaris* infectado com "southern bean mosaic virus" (SBMV), também observaram o mesmo fato. Nos demais "loci" não observam-se diferenças qualitativas significativas constatando-se apenas o aumento da atividade da isoenzima após a infecção pelo BGMV.

Nos híbridos que mostraram alta tolerância à virose do mosaico dourado (14620-2, 16919-1, 21213-1, 16816-5, 18983-6 e 21208-4), observam-se diferenças nos perfis eletroforéticos das amostras antes e depois da exposição ao BGMV, sempre se registrando uma maior atividade das isoperoxidasas após a exposição ao vírus. Este aumento na atividade é mais acentuado no "locus" 2, como visto na Figura 5.

Neste "locus" o comportamento dos híbridos mostrou-se variado. Os híbridos 16919-1, 16816-5 e 21208-4 apresentaram uma atividade quase nula antes da exposição ao vírus (Figura. 5A), tendo esta atividade sofrido um incremento com o surgimento de 3 bandas distintas após a exposição ao vírus (Figura 5B).

Os híbridos 14620-2, 21213-1 e 18983-6, já apresentaram atividade neste "locus", antes da exposição ao vírus (Fig. 5(A)). No híbrido 14620-2 foram visualizadas apenas 2 bandas enquanto que 3 foram observadas nos híbridos 21213-1 e 18983-6. Após a exposição ao vetor da doença, observou-se, além do aumento da atividade, a presença de 3 bandas em todos eles, posicionadas de modo semelhante as

dos híbridos 16919-1, 16816-5 e 21208-4, com exceção da primeira banda do híbrido 14620-2 que se encontra mais acima (Fig. 5(B)).

Quando da comparação dos perfis eletroforéticos dos híbridos que mostraram alta tolerância com os de baixa tolerância, feitos antes e depois da exposição ao BGMV (Figs. 6 e 7), observou-se, em ambos os casos, que o posicionamento das bandas, no "locus" 2, se mostra de maneira distinta e característica do grupo a qual pertence o híbrido.

Este comportamento na distribuição das bandas no "locus" 2 pode, nos limites deste trabalho, sugerir a utilização da peroxidase como marcador bioquímico da tolerância ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro, utilizando-se para tal os perfis eletroforéticos propostos na Figura 8.

Os indivíduos do híbrido 19938-2, cujo o percentual de plantas com sintomas foi de 70%, independente de apresentarem ou não sintomas da virose, mostraram um perfil eletroforético idêntico aos seus irmãos, híbridos 19930-2 e 19935-4, que tiveram baixa tolerância ao BGMV (Figs. 4, 6 e 7). As plantas sem sintomas, neste caso, poderiam ser explicadas através dos mecanismos de "escape", da variabilidade do patógeno ou possivelmente de "crossing-over" no gen que codifica o marcador bioquímico.

Os híbridos 16807-4 e 16989-3, que apresentaram, respectivamente 40% e 55% de indivíduos com sintomas, mostraram um perfil eletroforético, independente de apresentarem ou não sintomas da virose (Figuras 2 e 3), idêntico aos dos híbridos que apresentaram alta tolerância à virose, onde encontra-se o híbrido 21213-1 que tem origem no mesmo cruzamento. Como os indivíduos com sintomas, destes dois híbridos, receberam notas de avaliação 1 e 2, pode-se considerar que o aparecimento dos sintomas, sem que a planta mostre redução no seu desenvolvimento seja, como

(A)

(B)

Figura 4 - Isoperoxidases extraídas das folhas dos híbridos de baixa tolerância à virose do mosaico dourado do feijoeiro, antes (A) e após (B) a exposição ao vírus

- 1 - Planta M₁₆ - híbrido 19923-3 (P. vul. x P. coc.)
- 2 - Planta N₉ - híbrido 19930-2 (P. vul. x P. coc.)
- 3 - Planta O₁₂ - híbrido 19935-4 (P. vul. x P. coc.)
- 4 - Planta P₁₅ - híbrido 19938-2 (P. vul. x P. coc.)

Figura 5 - Isoperoxidases extraídas das folhas dos híbridos de alta tolerância à virose do mosaico dourado do feijoeiro, antes (A) e após (B) a exposição ao vírus

- 1 - Planta C₉, sem sintomas - híbrido 14620-2
[(P. coc. x P. vul.) x P. vul.] x P. coc.
- 2 - Planta D₁₆, sem sintomas - híbrido 16919-1
[(P. coc. x P. vul.) x P. vul.] x P. coc.
- 3 - Planta H₁₅, sem sintomas - híbrido 21213-1
(P. coc. x P. vul.) x P. coc.
- 4 - Planta I₁₅, sem sintomas - híbrido 16816-5
(P. coc. x P. vul.) x P. coc.
- 5 - Planta K₁₁, sem sintomas - híbrido 18983-6
(P. coc. x P. vul.) x P. coc.
- 6 - Planta L₅, sem sintomas - híbrido 21208-4
(P. coc. x P. vul.) x P. coc.

Figura 6 - Isoperoxidasas extraídas das folhas dos híbridos de alta e baixa tolerância à virose do mosaico dourado do feijoeiro, antes da exposição ao vírus.

1 - Planta C ₁₆ - híbrido 14620-2 (alta tolerância)	
2 - Planta D ₁₅ - híbrido 16919-1 (	")
3 - Planta H ₁₆ - híbrido 21213-1 (	")
4 - Planta I ₅ - híbrido 16816-5 (	")
5 - Planta K ₇ - híbrido 18983-6 (	")
6 - Planta L ₄ - híbrido 21208-4 (	")
7 - Planta M ₉ - híbrido 19923-3 (baixa tolerância)	
8 - Planta N ₄ - híbrido 19930-2 (	")
9 - Planta O ₁₁ - híbrido 19935-4 (	")
10 - Planta P ₅ - híbrido 19938-2 (	")

Figura 7 - Isoperoxidases extraídas das folhas dos híbridos de alta e baixa tolerância à virose do mosaico dourado do feijoeiro, após a exposição ao vírus.

1	- Planta C16, sem sintomas	- híbrido 14620-2	AT
2	- Planta D15, sem sintomas	- híbrido 16919-1	AT
3	- Planta H16, sem sintomas	- híbrido 21213-1	AT
4	- Planta I5, sem sintomas	- híbrido 16816-5	AT
5	- Planta K7, sem sintomas	- híbrido 18983-6	AT
6	- Planta L4, sem sintomas	- híbrido 21208-4	AT
7	- Planta M6, com sintomas	- híbrido 19923-3	BT
8	- Planta N4, com sintomas	- híbrido 19930-2	BT
9	- Planta O11, com sintomas	- híbrido 19935-4	BT
10	- Planta P5, sem sintomas	- híbrido 19938-2	BT

Figura 8 - Perfis eletroforéticos para o uso de isoperoxidases, extraídas de folhas, como marcador bioquímico, em híbridos de feijoeiro, de tolerância ao mosaico dourado do feijoeiro.

- A - híbrido de alta tolerância antes da exposição ao vírus
- B - híbrido de alta tolerância após a exposição ao vírus
- C - híbrido de baixa tolerância antes da exposição ao vírus
- D - híbrido de baixa tolerância após a exposição ao vírus

afirma RUSSEL (1978), uma das formas de tolerância das plantas às doenças.

5.2.3 - AS ESTERASES

Estas isoenzimas apresentaram sua expressão em 3 "loci" (Fig. 9), como já observado anteriormente nos trabalhos no CEBTEC (CROCOMO *et al.*, 1993).

O número de bandas por "locus" variou entre 2 e 5, ocupando diferentes posições de acordo com o híbrido.

Não foi possível se estabelecer uma relação entre o perfil eletroforético desta isoenzima e a tolerância dos híbridos ao BGMV.

Ao contrário das peroxidases, as esterases apresentaram uma acentuada diminuição na sua atividade nas plantas expostas à virose, principalmente no "locus" 3.

As Figuras 10, 11 e 12 mostram que este comportamento foi o mesmo para todos os híbridos independente do seu grau de tolerância ao mosaico dourado, não sendo encontrado na literatura subsídios para discussão deste comportamento.

5.2.4 - AS FOSFATASES ÁCIDAS

Estas isoenzimas confirmaram o resultado obtido anteriormente no CEBTEC por CROCOMO *et al.* (1993), demonstrando sua expressão em 4 "loci", como mostra a Figura 13, não havendo variação no número de bandas por "locus" após a exposição das plantas ao mosaico.

Estas isoenzimas, assim como as isoperoxidasas, apresentaram um aumento de atividade depois que as plantas foram expostas à virose independentemente de apre-

Figura 9 - Caracterização dos 3 "loci" para as isoenzimas de esterase, extraídas das folhas dos híbridos de feijoeiro 16807-4 (E_n) e 16989-3 (G_n), antes e após a exposição ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro.

- 1 - Planta E_{13} , sem sintomas, após exposição ao vírus
- 2 - Planta E_{13} , antes da exposição ao vírus
- 3 - Planta E_4 , com sintomas, após exposição ao vírus
- 4 - Planta E_4 , antes da exposição ao vírus
- 5 - Planta G_3 , sem sintomas, após exposição ao vírus
- 6 - Planta G_3 , antes da exposição ao vírus
- 7 - Planta G_6 , com sintomas, após exposição ao vírus
- 8 - Planta G_6 , antes da exposição ao vírus

Figura 10 - Isoesterases, extraídas das folhas de híbridos, antes da exposição ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro.

- 1 - Planta C₉ - híbrido 14620-2
- 2 - Planta D₁₆ - híbrido 16819-1
- 3 - Planta H₁₅ - híbrido 21213-1
- 4 - Planta I₁₅ - híbrido 18816-5
- 5 - Planta K₁₁ - híbrido 18983-6
- 6 - Planta L₅ - híbrido 21208-4
- 7 - Planta M₁₆ - híbrido 19923-3
- 8 - Planta N₉ - híbrido 19930-2
- 9 - Planta O₁₂ - híbrido 19935-4
- 10 - Planta P₁₅ - híbrido 19938-2

Figura 11 - Isoesterases, extraídas das folhas de híbridos, após exposição ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro.

- 1 - Planta C₉, sem sintomas - híbrido 14620-2
- 2 - Planta D₁₆, sem sintomas - híbrido 16819-1
- 3 - Planta H₁₅, sem sintomas - híbrido 21213-1
- 4 - Planta I₁₅, sem sintomas - híbrido 16816-5
- 5 - Planta K₁₁, sem sintomas - híbrido 18983-6
- 6 - Planta L₅, sem sintomas - híbrido 21208-4
- 7 - Planta M₁₆, com sintomas - híbrido 19923-3
- 8 - Planta N₉, com sintomas - híbrido 19930-2
- 9 - Planta O₁₂, com sintomas - híbrido 19935-4
- 10 - Planta P₁₅, sem sintomas - híbrido 19938-2

Figura 12 - Isoesterases, extraídas das folhas dos híbridos de feijoeiro 16807-4 (En) e 18989-3 (Gn), antes e após a exposição ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro.

- 1 - Planta E₁, sem sintomas, após a exposição ao vírus
- 2 - Planta E₁, antes da exposição ao vírus
- 3 - Planta E₈, com sintomas, após a exposição ao vírus
- 4 - Planta E₈, antes da exposição ao vírus
- 5 - Planta G₁, sem sintomas, após a exposição ao vírus
- 6 - Planta G₁, antes da exposição ao vírus
- 7 - Planta G₁₆, com sintomas, após a exposição ao vírus
- 8 - Planta G₁₆, antes da exposição ao vírus

Figura 13 - Caracterização dos 4 "loci" de isoenzimas de fosfatase ácida, extraídas das folhas de híbridos de feijoeiro.

- 1 - Planta C₁₆ - híbrido 14620-2
- 2 - Planta D₁₅ - híbrido 16919-1
- 3 - Planta H₁₆ - híbrido 21213-1
- 4 - Planta I₅ - híbrido 16816-5
- 5 - Planta K₇ - híbrido 18983-6
- 6 - Planta L₄ - híbrido 21208-4
- 7 - Planta M₉ - híbrido 19923-3
- 8 - Planta N₄ - híbrido 19930-2
- 9 - Planta O₁₁ - híbrido 19935-4
- 10 - Planta P₅ - híbrido 19938-2

sentarem ou não os sintomas da doença, como pode ser visto na Figura 14. Este aumento mostrou-se mais acentuado nos "loci" 2, 3 e 4.

Embora a literatura forneça poucos subsídios para a discussão deste comportamento, pode-se especular que o mesmo se deva a condições de estresse a que foram submetidas as plantas no campo.

Para todas as isoenzimas testadas, independentemente de ocorrência de sintomas, as plantas ao serem transferidas para o campo manifestaram alterações no perfil eletroforético original.

Embora a técnica de eletroforese permita, de modo bastante eficiente, o estudo de efeitos fisiológicos, causados por agentes de diversas naturezas em plantas, não foi possível, neste trabalho, associar efeitos fisiológicos específicos com as alterações observadas nos perfis eletroforéticos após a exposição das plantas ao BGMV, principalmente devido a impossibilidade de controle dos fatores ambientais, presentes no campo, e que causam estresses de diferentes natureza e intensidade, com efeitos direto sobre o metabolismo das plantas.

(A)

(B)

Figura 14 - Fosfatases ácidas, extraídas das folhas de híbridos de alta (AT) e baixa (BT) tolerância à virose do mosaico dourado do feijoeiro, antes (A) e após (B) a exposição ao vírus

- 1 - Planta C₉ - híbrido 14620-2 - AT
- 2 - Planta D₁₆ - híbrido 16819-1 - AT
- 3 - Planta H₁₅ - híbrido 21213-1 - AT
- 4 - Planta I₁₅ - híbrido 18816-5 - AT
- 5 - Planta K₁₁ - híbrido 18983-6 - AT
- 6 - Planta L₅ - híbrido 21208-4 - AT
- 7 - Planta M₁₆ - híbrido 19923-3 - BT
- 8 - Planta N₉ - híbrido 19930-2 - BT
- 9 - Planta O₁₂ - híbrido 19935-4 - BT
- 10 - Planta P₁₅ - híbrido 19938-2 - BT

6 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem, à nível das limitações deste trabalho, a consideração das seguintes conclusões:

- 1 - Exceto os cruzamento envolvendo o paternal DOR-306 (*P. vulgaris*) todos os demais cruzamentos apresentaram descendência com alto grau de tolerância ao BGMV, que foram consistentemente identificados bioquimicamente, estando, portanto, aptos a serem utilizados em programas de melhoramento para resistência à esta virose;
- 2 - Após exposição à virose, os híbridos apresentaram aumento na atividade das isoenzimas de peroxidase e fosfatase ácida e diminuição na atividade das esterases;
- 3 - As isoenzimas de fosfatase ácida e esterase não se mostraram adequadas como marcadores bioquímicos potenciais; e
- 4 - As isoperoxidasas podem ser usadas como marcadores bioquímicos da tolerância ao BGMV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L.D.; PEREIRA, J.C.V.N.A.; COSTA, A.S.; RONZELLI JUNIOR, P. Avaliação de perdas causadas pelo mosaico dourado do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 9:213-19, 1984.
- ANDREWS, A.T. *Electrophoresis: theory, techniques and biochemical and clinical applications*, Oxford, Oxford Univ. Press, 1988, 452p.
- ARRAMBIDE, E.; BISIO, L.; CARO, M.; CARREGA, G. e VIGNALE, B.A. La actividad fosfatasa acida en los citrus y su utilidad en mejoramiento varietal. In: ENCONTRO SOBRE APLICAÇÕES DA ELETROFORESE NA AGROPECUÁRIA. São Paulo, 1992. *Anais*. São Paulo, Instituto Biológico, 1992. p.64 (resumo).
- BACH, E.E.; LEME, A.C.; GROSSO, G.C.; ALCANTARA, V.; ALCANTARA, P. e VEASEY, E.A. Padrão de isoenzimas-esterase na diferenciação de variedades de "capim-elefante" (*Pennisetum purpureum* Schum.) In: ENCONTRO SOBRE APLICAÇÕES DA ELETROFORESE NA AGROPECUÁRIA. São Paulo, 1992. *Anais* São Paulo, Instituto Biológico, 1992. p.61 (resumo).
- BAKER, J. e TAKED, T. Acid phosphatase in plant tissue.1. Changes in activity and multiple forms in tea leaves and tomato fruit during maturation and senescence. *Plant*

- Cell Physiology*, New York, 14:459-71, 1973.
- BATES, D.C. & CHANT, S.R. Alterations in peroxidase activity and peroxidase isozymes in virus-infected plants. *Annals of Applied Biology*, Great Britain, 65:105-10, 1970.
- BIANCHINI, A.; HOHMANN, C.L.; ALBERINI, J.L. Distribuição geográfica e orientação técnica para prevenção do mosaico dourado do feijoeiro no estado do Paraná. *Informe da Pesquisa*. IAPAR, Paraná, n. 42, 1981, 3p.
- BOLKAN, H.A.; WILLIAMSON, V.M.; WATERS, C.M. Use of cellulose acetate electrophoresis as an alternative to starch gel electrophoresis for detecting root-knot nematode resistance in tomato. *Plant Disease*, Washington, 71:1001-03, 1983.
- CHAGAS, C.M.; BARRADAS, M.M.; VICENTE, M. Espécies hospedeiras do vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF). *Arquivos do Instituto Biológico*. São Paulo, 48(1/4):123-17, 1981.
- CHERRY, J.P. & KATTERMAN, F.R.H. Nonspecific esterase isozyme polymorphism in natural populations of *Gossypium thurberi*. *Phytochemistry*, USA, 10:141-45, 1971.
- COSTA, A.S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo. *Plant Protect Bulletin*, Roma, 13(6):1-12, 1965.
- COSTA, J.G.C. & ZIMMERMANN, M.J.O. Melhoramento genético In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. *Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba, POTAFOS, 1988. p.229-45.

- COYNE, D.P. & SHUSTER, M.L. "Jules" a great northern variety tolerant to common blight bacterium (*Xanthomonas phaseoli*). *Plant Disease Report*, Washington, 54:557-59, 1970.
- CRÓCOMO, O.J.; BAUDOUIN, J.P.; SCHMIT, V.; MELO, M.; CHADADD JR., J.; FANCELLI, A.L. & AMARAL, A.F.C. Production of interespecific hybrids of *Phaseolus* and their characterization. Final Summary Report, Comissão Científica da Comunidade Europeia. Belgica, 1993. (No prelo).
- DAUSSANT, J. Biochemical markers In: CRÓCOMO, O.J.; SHARP W.R. & MELO, M. *Bioteecnologia para produção vegetal*. CEBTEC/FEALQ, Piracicaba, 1991. p.431-62
- De FAZIO, G. O mosaico dourado do feijoeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 10:41-7, 1985.
- De FAZIO, G. Cytokinin levels in healthy and bean golden mosaic virus (BGMV) infected beans plant (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, 4:57-61, 1981.
- De FAZIO, G. & VICENTE, M. Susceptibilidade de cultivares colombianos de *Phaseolus* ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF), *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 7:533, 1982 (resumo).
- DIENER, T.O. Physiology of virus-infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 1:187-218, 1963.
- EVANS, A.M. Beans (*Phaseolus* ssp. *Leguminosae-Papilionatae*) In SIMMONDS, N.W. *Evolution of crop plants.*, London, Longman, 1976, p.168-72.

- EVERETT, N.P.; WACH, M.J. E ASHWORTH, D.J. Biochemical markers of embryogenesis in tissue cultures of maize inbred 373. *Plant Science*, Washington, 41:133-44, 1985.
- FARKAS, G.L. & STARMANN, M.A. On the nature of changes in peroxidase isoenzymes in bean leaves infected by southern bean mosaic virus. *Phytopathology*, St. Paul, 56:669-77, 1966.
- FREUNDENBERG, K. Biosynthesis and constitution of lignin. *Nature*, London, 183:1152-55, 1959.
- GALVEZ, G.E. & CASTANO, M. Purification of whitefly transmitted bean golden mosaic virus. *Turrialba*, Coronado, 26:205-07, 1976.
- GOODMAN, R.M. Geminiviruses, *Journal of Genetic Virology*. London, 54:9-21, 1981.
- GOODMAN, R.M.; BIRD, J.; THONGMEEARKOM, P. An unusual virus like particle associated with golden mosaic of beans. *Phytopathology*, St. Paul, 69:37-42, 1977.
- GOTTLIEB, L.D. Gel electrophoresis new approach to the study of evolution. *Biociencia*, Whashington, 21:939-44, 1977.
- GRAHAM, R.C.; LUNDHOLM, U.; KARNOVSKI, M. J. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, New York, 13:150-52, 1964.
- GUIMARÃES, R.C. Eletroforese em géis de poliacrilamida. *Ciência e Cultura*, SIMP. II, São Paulo, 1978, p.137-46.

- HABER, S.; IKEGAMI, M.; BAJET, M.J.; GOODMAN, R.M. Evidence for divided genome in bean golden mosaic virus a geminivirus. *Nature*, London, 289:289-324, 1983.
- HALL, J.L. & SEXTON, R. Cytochemical localization of peroxidase activity in root cells. *Plant*, New York, 108:103-20, 1972.
- HARTMAN, P.E. & SUSKIND, R.S. *Gene action*. New Jersey, Prentice Hall, 1969. 313p.
- HEIDRICH-SOBRINHO, E. Isoenzimas como marcadores na identificação de nove linhagens de milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 17:281-86, 1982.
- HONMA, S.A. A bean interespecific hibrid. *Journal of Heredity*, Washington, 47:217-20, 1956.
- HUBBY, J.L. & LEWONTIN, R.C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. *Genetics*, London, 54:577-94, 1966.
- IBGE - FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola Rio de Janeiro, 1992, v.23-28
- JANSEN, W.A. The histochemical localization of peroxidases in roots and induction by indolacetic acid. *Plant Physiology*, Rockville, 30:426-33, 1955.
- KAMMERMMANN, N.K. & BEMIS, W.P. Hibridization between two species of *Phaseolus* separate by physiological and morphological blocks. *Proceeding of the American Society for Horticultural Science*, St. Joseph, 76:397-402, 1960.

- KAWASHIMA, N. & URITANI, I. Some properties of peroxidase produced in sweet potato infected by black rot fungus. *Plant Cell Physiology*, New York, 6(2):247-65, 1965.
- KEDAR, N. The peroxidase test as a tool in the selection of potato varieties resistant to late blight. *American Potato Journal*, Drano, 36(9):315-24, 1959.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 193:265-75, 1951.
- MACKO, V.; WOODBURY, W. STAHMANN, M.A. The effect of peroxidase on germination and growth of mycelium of *Puccinia graminis* F. sp. *tritici*. *Phytopathology*, St. Paul, 58(9):1250-54, 1968.
- MELO, M. Eletroforese aplicada no CEBTEC In: ENCONTRO SOBRE APLICAÇÕES DA ELETROFORESE NA AGROPECUÁRIA. S. Paulo, 1992, *Anais*, 1992, Instituto Biológico. p.26-39.
- MILLER, M.K.; SCHONHORST, M.H. & Mc DANIEL, R.J. Identification of hybrids from alfalfa crosses by electrophoresis of single seed proteins. *Crop Science*. Washington, 12:535-37, 1972.
- MOORE, G.A. & LITZ, R.E. Biochemical markers for *Carica papaya*, *C. cauliflora* and plants from somatic embryos of their hybrid. *Journal American Society for Horticultural Science*. St. Joseph, 109:213-18, 1984.
- NAGAHARA, M.; AKIHAMA, T. & HAYASHI, K. Genetic variation and geographic clone of esterase isozymes in native rice varieties. *Japan. Journal Genetic*. 50:373-82, 1975.

- NELSON, R.R. The meaning of disease resistance in plants.
In: NELSON, R.R. *Breeding plants for disease resistance: concepts and applications*. Londres, Pa. State Univ. Press. 1973. p.13-25.
- NOH, E.W. & MINOCHA, S.C. Pigment and isozyme variation in aspen shoots regenerated from callus culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 23:39-44, 1990.
- NOVACKY, A. & HAMPTON, R.E. Peroxidase isozymes in virus infected plants. *Phytopathology*, St. Paul, 58(3):301-05 1968.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. *Manual de técnicas eletroforéticas em microorganismos*. Piracicaba, FEALQ, 1988, 54p.
- PAUL, E.M. & WILLIAMSON, V.M. Purification and properties of acid phosphatase-1 from a nematode resistant tomato cultivar. *Plant Physiology*, Rockville, 84:399-403, 1987.
- PAYNE, R.C. & KOSZYKOWSKI, T.J. Esterase isoenzyme differences in seed extracts among soybean cultivars. *Crop Science*, Washington, 18:557-59, 1978.
- RAO, U.P. Control of plant diseases: some possible approaches. *Indian Journal of Genetic and Plant Breeding*, N. Delhi, 28:128-41, 1968.
- RICK, C.M. & FOBES, J. Association of an allozyme with nematode resistance. *Tomato Gen Cooperative Rep.* 24:25, 1974, (resumo).
- RUSSEL, G.E. *Plant breeding for pest and disease resistance*

- Londres, Butterworth, 1978. 485p.
- SAUNDERS, B.C.; SIEDLE, H.; STARK, B.P. *Peroxidase*. London Butterworths. 1964. 72p.
- SAWAZAKI, H.E.; PIO, R.M.; MULLER, G.W. & SODEK, L. Identificação de cultivares de citrus através de polimorfismo enzimático. In: ENCONTRO SOBRE APLICAÇÕES DA ELETROFORESE NA AGROPECUÁRIA. S.Paulo, 1992, *Anais*, 1992, Instituto Biológico. p.58 (resumo).
- SEEVERS, P.M.; DALY, J.M.; CATEDRAL, F.F. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease *Plant Physiology*, Rockville, 48:353-60, 1971.
- SHANNON, L.M. Plant isozymes. *Annual Review of Plant Physiology*, California, 1:187-210, 1967.
- SHAW, C.R. Isozymes: classification, frequency and significance. *International Review of Cytology*, New York, 25:297-332, 1969.
- SHEEN, S.J. & DIACHUN, S. Peroxidase of red clovers resistant and susceptible to bean yellow mosaic virus. *Acta Phytopathology*. Washington, 13(1-2):21-28, 1978.
- SINGH, D.P. *Breeding for resistance to diseases and insect pest*. Berlin, Springer-Verlag, 1986. 222p.
- SURLÍ, J.A.; LASTRES, N.; RIVERA, M. Actividad de las peroxidasas en plantas de *Phaseolus vulgaris* infectadas con el virus del mosaico común del frijol (BCMV). *Ciencias de la Agricultura*. Habana, 9:61-70, 1981a.
- SURLÍ, J.A.; LASTRES, N.; RIVERA, M. Isoperoxidasas en

- plantas de *Phaseolus vulgaris* infectadas com el virus del mosaico común del frijol (BCMV). *Ciencias de la Agricultura*. Habana, 9:71-8, 1981b.
- TEIXEIRA, S.M. & ROCHA, L.S.A. Análise socio-econômica da produção. In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M. & YAMADA, T. *Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade* Piracicaba, POTAFOS, 1988. p.229-45.
- UMAREUS, V. The relationship between peroxidase activity in potato leaves and resistance to *Phytophthora infestans*. *American Potato Journal*., Orano, 36(4):124-31, 1959.
- UPADHYA, A.; GOVARDHAN, L.K.; VEERABHADRAPPA, P.S. Esterases as genetic markers in finger millet. *Journal of Science Food Agricultural*., Oxford, 36:319-25, 1985.
- VALDÉS, E.; PERZ, N.; SURLÍ, J.A. Localizacion histoquímica de la actividad de peroxidasas en plantas de *Phaseolus vulgaris* infectadas con el virus del mosaico común del frijol (BCMV). *Ciencias de la Agricultura*, Habana, 14:57-61, 1983.
- VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S. D. & ORTON, T.J. *Isozymes in plant genetics and breeding*. Amsterdam, Elsevier, 1983. p.469-516.
- VETCH, J.A. Localization of peroxidase in *Rizoctonia solani* infected cotton seedlings. *Phytopathology*, St. Paul, 66(9):1072-75, 1976.
- WEEDEN, N.F.; PROVVIDENTI, R.; MARX, G.A. An isozymes marker for resistance to bean yellow mosaic virus in *Pisum sativum*. *The Journal of Heredity*, Washington, 75:411-12, 1984.

WILLIAMSON, V.M. & COLWELL, S. Acid phosphatase-1 from nematode resistant tomato. *Plant Physiology*, Rockville, 97:139-46, 1991.

WILLIAMSON, J.A.; KLEESE, R.A. & SNYDER, J.R. Electrophoretic variation in esterases of three varieties of oats (*Avena sativa*). *Nature*. London. 220:1134-36, 1968.

A N E X O S

ANEXO I - RELAÇÃO DOS HÍBRIDOS E CRUZAMENTOS DE ORIGEM

HÍBRIDO	CRUZAMENTO
A - G-25848	<i>Phaseolus vulgaris</i>
B - G-25848	<i>Phaseolus vulgaris</i>
C - 14620-2	[(NI-889 x G3807) x A-113] x G-35010 (*)
D - 16919-1	[(NI-889 x G-3807) x A-113] x G35145 (*)
E - 16807-4	(NI-889 x D-145) x NI-15 (*)
F - 16813-1	(NI-889 x D-145) x NI-15 (*)
G - 16989-3	(NI-889 x D-145) x NI-15 (*)
H - 21213-1	(NI-889 x D-145) x NI-15 (*)
I - 16816-5	(NI-889 x D-145) x NI-16 (*)
J - 18983-5	(NI-889 x D-145) x NI-16 (*)
K - 18983-6	(NI-889 x D-145) x NI-16 (*)
L - 21208-4	(NI-889 x D-145) x NI-16 (*)
M - 19923-3	DOR-306 x NI-229
N - 19930-2	DOR-306 x NI-15
O - 19935-4	DOR-306 x NI-15
P - 19938-2	DOR-306 x NI-15

(*) - híbridos avaliados pela primeira vez.

ANEXO 2 - ESQUEMA DO ENSAIO NO CAMPO

A B C D	B C D E	C D E F	D E F G
E F G H	F G H I	G H I J	H I J K
I J K L	J K L M	K L M N	L M N O
M N O P	N O P A	O P A B	P A B C

E F G H	F G H I	G H I J	H I J K
I J K L	J K L M	K L M N	L M N O
M N O P	N O P A	O P A B	P A B C
A B C D	B C D E	C D E F	D E F G

I J K L	J K L M	K L M N	L M N O
M N O P	N O P A	O P A B	P A B C
A B C D	B C D E	C D E F	D E F G
E F G H	F G H I	G H I J	H I J K

M N O P	N O P A	O P A B	P A B C
A B C D	B C D E	C D E F	D E F G
E F G H	F G H I	G H I J	H I J K
I J K L	J K L M	K L M N	L M N O

ANEXO 3 - SOLUÇÕES ESTOQUES

a) Solução Estoque de Acrilamida

- 75,0g de acrilamida.
- 2,0g de N,N'-Metileno-bis-acrilamida.
- 250ml de água deionizada.

b) Tampão do gel separador - pH 8,9

- 45,75g de Tris-(hidroximetil)aminometano, dissolvidos em HCl 1M e água deionizada, completando um volume final de 100ml.

c) Tampão do gel empilhador - pH 6,8

- 7,475g de Tris-(hidroximetil)aminometano, dissolvidos em HCl 1N e água deionizada, completando um volume final de 100ml.

d) Tampão da amostra para extração de enzimas

- 0,65g de Tris-(hidroximetil)aminometano, 0,05M
- 0,15g de Ácido Cítrico monoidratado, 7mM
- 0,10g de Cisteína-HCl
- 0,10g de L-Ácido Ascorbico-Na
- 1,00g de Polietilenoglicol Mr 350
- 0,008ml de 2-Mercaptoetanol
- água deionizada, completando um volume final de 100ml.

e) Tampão da amostra para aplicação no gel

- 5,0ml de glicerol
- 2,5ml do tampão do gel empilhador
- 2,5ml de Azul de Bromofenol
- água deionizada, completando um volume final de 25ml.

ANEXO 3 - SOLUÇÕES ESTOQUES (continuação)

f) Tampão do tanque ou eletrólito - pH 8,9

- 63,2g de Tris-(hidroximetil)aminometano, dissolvidos em HCl 1M
 - 39,9g de glicina
 - água deionizada, completando um volume final de 1,0l.
- No momento do uso este tampão era diluído, na proporção de 1:9, em água deionizada.

Estas soluções eram mantidas em geladeira, com exceção dos tampões dos geis separador e empilhador, que eram mantidos à temperatura ambiente.