

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

**Caracterização Isoenzimática
de Populações de *Vigna unguiculata* (L.) Walp**

Carlos Manuel Gaspar dos Reis

Lisboa
1994

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

**Caracterização Isoenzimática
de Populações de *Vigna unguiculata* (L.) Walp**

Carlos Manuel Gaspar dos Reis

Este trabalho foi expressamente elaborado como dissertação original para o efeito de obtenção do Grau de Mestre em Produção Vegetal, Ramo de Melhoramento de Plantas, sendo apresentado no Instituto Superior de Agronomia. Toda a orientação e colaboração recebidas são mencionadas

Lisboa
1994

Dissertação realizada no Laboratório de Genética do Instituto Superior de Agronomia e na Escola Superior Agrária de Castelo Branco sob orientação da Professora Wanda Viegas, do Instituto Superior de Agronomia.

À Isabel Maria e aos meus Pais.

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que, com o seu contributo, tornaram possível a realização deste trabalho, em especial:

À professora Wanda Viegas, do Instituto Superior de Agronomia, orientador científico, pela disponibilidade de meios laboratoriais, sugestões e leitura crítica do trabalho;

Ao Dr. Victor Carvalho pelos ensinamentos técnicos e científicos que nos transmitiu, pela sua constante disponibilidade no esclarecimento de múltiplas dúvidas e pela leitura crítica do trabalho;

Ao Banco de Germoplasma do Núcleo de Melhoramento de Milho de Braga (NUMI) pela cedência de material vegetal;

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco pela disponibilidade facultada para a realização do Curso de Mestrado e pelas facilidades concedidas na aquisição de meios laboratoriais.

Muito obrigado.

RESUMO

Neste trabalho pretendeu-se fazer a caracterização isoenzimática de algumas populações de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Estudaram-se amostras de 24 populações distribuídas por três subespécies (subsp): *unguiculata*, *cylindrica* e *sesquipedalis*. As amostras da subespécie (subsp.) *unguiculata* pertenciam às cultivares: "Amarelo", "Arroz", "Comum", "Gigante de Marialva" e "Cream".

A obtenção dos padrões isoenzimáticos foi realizada por focagem isoelétrica, tendo-se utilizado extractos de cotilédones e de tecidos vegetativos de plântulas com cerca de 15 dias. As análises comparativas foram conduzidas para os sistemas enzimáticos fosfatase ácida (ACP) e peroxidase (PRX).

Em cotilédones foram detectadas apenas bandas de ACP. Em plântulas foram reveladas bandas de ACP para os órgãos raiz, caule e folha, mas no caso do sistema PRX detectámos actividade isoenzimática apenas em raízes.

Os zimogramas de ACP de cotilédones não apresentaram bandas polimórficas; no caso da folha detectaram-se 10 bandas polimórficas correspondendo-lhes três diferentes padrões isoenzimáticos. Os zimogramas de PRX da raiz apresentavam 6 bandas polimórficas, mas dada a baixa frequência da maioria, apenas uma delas se apresenta com interesse nos estudos comparativos. Com base nos resultados obtidos, é possível fazer a distinção da subsp. *sesquipedalis* e da cultivar "arroz" da subsp. *unguiculata* relativamente às restantes populações estudadas. Verificou-se a existência de uma maior proximidade genética entre as subsp. *unguiculata* e *cylindrica*, relativamente à subsp. *sesquipedalis*.

Palavras chave: *Vigna unguiculata*; isoenzimas; bandas polimórficas; fosfatase ácida; peroxidase.

Abreviaturas: ACP, fosfatase ácida; PRX, peroxidase; subsp., subespécie; subsp., subespécies.

ABSTRACT

With the present research it is intended to describe the isozymatic characterization of some populations of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Samples of 24 populations which belonged to 3 subspecies (subsp.): *unguiculata*, *cylindrica* and *sesquipedalis* were studied. Samples of the subspecies (subsp.) *unguiculata* belonged to the cultivars "Amarelo", "Arroz", "Comum", "Gigante de Marialva" and "Cream".

The electrophoresis were performed by means of isoelectric focusing, and extracts of cotyledons and vegetative tissues of about 15-day-old seedlings were used. The comparative analysis were conducted to the acid phosphatase (ACP) and peroxidase (PRX) enzyme systems.

In cotyledons only ACP bands were detected. In seedlings ACP bands were revealed on root, stem and leaf tissues, but in the case of the PRX system isozymes were detected only in roots.

The ACP zymograms of cotyledons did not show polymorphic bands; in the case of the leaf 10 polymorphic bands, to which 3 different isoenzyme patterns correspond, were detected. The PRX zymograms showed 6 polymorphic bands, but due to the low frequency of the majority, only one of them had some interest in comparative studies. Based in the results obtained, it is possible to distinguish subsp. *sesquipedalis* from the other two subspp. studied, and cultivar "Arroz" from subsp. *unguiculata* relatively to the other populations studied.

The existence of a greater genetic proximity between the subspp. *unguiculata* and *cylindrica*, relatively to subsp. *sesquipedalis* was also detected.

Key-words: *Vigna unguiculata*, isozymes; polymorphic bands; acid phosphatase; peroxidase.

Abbreviations: ACP, acid phosphatase; PRX, peroxidase; subsp., subspecies; subspp., subspecies.

ABREVIATURAS

3A9EC	3-amino-9-etilcarbazol
ACP	Fosfatase ácida
ADH	Álcool desidrogenase
AVh	volt x hora, acumulados
BIS	N'N-metileno bisacrilamida
cv.	Cultivar
CZE	Electroforese de zona contínua
DMF	N,N-dimetilformamida
ESACB	Escola Superior Agrária de Castelo Branco
EST	Esterase
G3P	Glicerol 3-fosfato desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
IEF	focagem isoclétrica
IND	Índia
MTT	Metil tiazolil tetrazólio
MZE	Electroforese de zona descontínua
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NUMI	Núcleo de Melhoramento de Milho de Braga
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PAQ	Paquistão
PI	Índice de polimorfismo
pI	ponto isoclétrico
PMS	Metosulfato de fenazina
PRT	Portugal
PRX	Peroxidase
PVP	Polivinilpirrolidona
subsp.	Subespécie
subspp.	Subespécies
SKD	Chiquimato desidrogenase
SRPIS	Southern Regional Plant Introduction Station, Griffin-USA
TRIS	TRIS-(hidroximetil)-aminometano
Vh	volt x hora

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
3.1 - Perfis de enzimas monoméricas, diméricas e tetraméricas controladas por um <i>locus</i> dialélico.	15
3.2 - Perfis de uma enzima dimérica controlada por dois <i>loci</i> dialélicos.	17
4.1 - Distribuição geográfica das populações nacionais de <i>Vigna unguiculata</i> estudadas.	30
4.2 - Aspecto da variação morfológica de algumas das amostras estudadas.	30
5.1 - Zimogramas de fosfatase ácida de cotilédones de <i>V. unguiculata</i> obtidos por focagem isoeléctrica em gel IEF 3-9.	45
5.2 - Zimogramas de fosfatase ácida de cotilédones de <i>V. unguiculata</i> obtidos por focagem isoeléctrica em gel IEF 4-6,5; estudo de diferentes locais de aplicação das amostras.	45
5.3 - Zimogramas de fosfatase ácida de cotilédones de <i>V. unguiculata</i> obtidos por focagem isoeléctrica em gel IEF 5-8; diferentes soluções de extracção e locais de aplicação dos extractos, com utilização de sementes da cv. "Amarelo" (população 03).	46
5.4 - Zimogramas de fosfatase ácida da folha, caule e raiz de <i>V. unguiculata</i> , obtidos por focagem isoeléctrica em gel IEF 3-9.	48
5.5 - Zimogramas de fosfatase ácida da folha de <i>V. unguiculata</i> em gel IEF 3-9 e IEF 4-6,5.	48
5.6 - Zimogramas de peroxidase da raiz obtidos por electroforese de zona descontínua em Phast Gel HOM 20 e por focagem isoeléctrica	50
5.7 - Zimogramas de peroxidase da folha, caule e raiz de <i>V. unguiculata</i> em gel IEF 3-9; diferentes soluções de extracção (volume/peso: 1/4) da cv. "Amarelo" (população 03) e diferentes locais de aplicação das amostras sobre o gel.	51
5.8 - Zimogramas de peroxidase da raiz de <i>V. unguiculata</i> em gel IEF 3-9; estudo das condições de revelação.	51
5.9 - Zimogramas de peroxidase da raiz de <i>V. unguiculata</i> em gel IEF 3-9; estudo das condições de revelação.	53
5.10 - Diagramas electroforéticos de fosfatase ácida de cotilédones de <i>Vigna unguiculata</i> obtidos por focagem isoeléctrica em gel IEF 4-6,5 e IEF 5-8.	56
5.11 - Zimogramas de fosfatase ácida de cotilédones de <i>V. unguiculata</i> obtidos por focagem isoeléctrica em gel IEF 4-6,5 e IEF 5-8.	57
5.12 - Diagramas electroforéticos de fosfatase ácida da folha de <i>Vigna unguiculata</i> obtidos por focagem isoeléctrica em gel IEF 3-9.	59
5.13 - Zimogramas de fosfatase ácida da folha de <i>V. unguiculata</i> obtidos por focagem isoeléctrica em gel IEF 3-9.	60

5.14	- Diagramas electroforéticos de peroxidase da raiz de <i>Vigna unguiculata</i> obtidos por focagem isoelétrica em gel IEF 3-9.	63
5.15	- Zimogramas de peroxidase da raiz de <i>V. unguiculata</i> obtidos por focagem isoelétrica em gel IEF 3-9.	64

LISTA DE QUADROS

2.1	- Teor de proteínas e de aminoácidos das sementes de algumas leguminosas e do ovo.	8
3.1	- Níveis de variação aloenzimática intrapopulacional em espécies vegetais de acordo com algumas das suas características	21
3.2	-Diversidade genética interpopulacional em espécies vegetais de acordo com algumas das suas características.	22
4.1	- Identificação das amostras de <i>Vigna unguiculata</i> estudadas.	31
4.2	- Condições de separação para PAGE com PhastGel HOM 20.	36
4.3	- Condições de separação para focagem isoelétrica com PhastGel IEF 3-9.	37
4.4	- Condições de separação para focagem isoelétrica com PhastGel IEF 5-8.	37
4.5	- Condições de separação para focagem isoelétrica com PhastGel IEF 4-6,5.	37
4.6	- Relação dos sistemas enzimáticos ensaiados.	38
5.1	- Condições experimentais seleccionadas no âmbito deste trabalho para a detecção de polimorfismos isoenzimáticos em cotilédones, folhas e raízes (de plântulas com aproximadamente 15 dias) de <i>Vigna unguiculata</i> , utilizando os sistemas enzimáticos fosfatase ácida e peroxidase.	54
5.2	- Presença (+) / ausência(-) das bandas polimórficas de fosfatase ácida em folhas de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> .	59
5.3	- Presença (+) / ausência das bandas polimórficas de peroxidase da raiz de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> .	61
5.4	- Zimogramas mais vulgares nas populações estudadas para o sistema enzimático peroxidase.	63
5.5	- Número de bandas monomórficas e polimórficas nos dois sistemas enzimáticos estudados em populações de <i>Vigna unguiculata</i> .	65

ÍNDICE

Resumo	v
Abstract	vi
Abreviaturas	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Quadros	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 CONSIDERAÇÕES GERAIS ACERCA DA ESPÉCIE <i>Vigna unguiculata</i>	3
2.1 Origem e taxonomia	3
2.2 Caracterização botânica	4
2.3 Valor nutricional	7
2.4 Importância económica	8
3 AS ISOENZIMAS NA CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAL VEGETAL	10
3.1 Considerações gerais	10
3.2 Características das isoenzimas	12
3.3 Interpretação genética dos zimogramas	14
3.4 Marcadores genéticos e estudo de características de interesse agronómico	19
3.5 Variação isoenzimática nas populações vegetais	20
3.6 As isoenzimas em estudos de sistemática	22
3.7 As isoenzimas na identificação varietal	24
3.7.1 Estabilidade ambiental	25
3.7.2 Variação intervarietal	25
3.7.3 Variação intravarietal	26
3.8 Factores laboratoriais afectantes dos resultados	27
3.9 Isoenzimas no género <i>Vigna</i>	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Materiais	29
4.1.1 Material biológico	29
4.1.2 Equipamento	31
4.1.3 Reagentes	32

4.2	Métodos	32
4.2.1	Extracção de isoenzimas	32
4.2.2	Electroforese	34
4.2.2.1	Electroforese de zona em tampão descontinuo	35
4.2.2.2	Focagem isoeléctrica	36
4.2.3	Detecção de isoenzimas	38
4.2.3.1	Álcool desidrogenase	39
4.2.3.2	Glicerol 3-fosfato desidrogenase	40
4.2.3.3	Chiquimato desidrogenase	40
4.2.3.4	Glutamato desidrogenase	40
4.2.3.5	Peroxidase	41
4.2.3.6	Esterase	41
4.2.3.7	Fosfatase ácida	41
4.2.4	Fixação e preservação dos géis	42
4.2.5	Cálculo da posição relativa de cada banda	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Estudo comparativo das condições experimentais	43
5.1.1	Álcool desidrogenase, glicerol 3-fosfato desidrogenase, chiquimato desidrogenase, glutamato desidrogenase e esterase	43
5.1.2	Fosfatase ácida	44
5.1.2.1	Semente	44
5.1.2.2	Orgãos vegetativos	47
5.1.3	Peroxidase	49
5.2	Detecção de polimorfismos isoenzimáticos	55
5.2.1	Fosfatase ácida	56
5.2.1.1	Semente	56
5.2.1.2	Folha	58
5.2.2	Peroxidase	60
5.3	Estudo comparativo dos padrões de expressão em diferentes orgãos	65
6.	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

A conservação dos recursos genéticos tem vindo a merecer, nos últimos anos, uma crescente atenção por parte dos cientistas e mesmo dos próprios governos. Com efeito, vários factores, nomeadamente a tendência para uma agricultura de mercado, mecanizada e competitiva, as exigências de natureza económica, a introdução de cultivares mais produtivas, as mudanças verificadas nos padrões de utilização da terra e o rápido crescimento urbano, têm sido responsáveis pela diminuição do número de espécies e de variedades cultivadas.

O interesse da realização de missões de colheita, com o estabelecimento de colecções de germoplasma, resultou precisamente da necessidade de preservar a variabilidade das espécies face a uma erosão genética crescente. Desta forma, conseguem-se salvaguardar genes de variedades e cultivares regionais e também de espécies selvagens biologicamente relacionadas, em risco de desaparecimento, que poderão vir a ter interesse em futuros programas de melhoramento.

Com efeito, embora a investigação científica tenha já desenvolvido técnicas de manipulação genética que permitem a obtenção de plantas transgénicas, é necessário uma fonte de variação onde se possam encontrar os genes responsáveis por características de resistência, adaptação, rendimento e qualidade.

Com o objectivo de estudar a variabilidade genética existente na espécie *Vigna unguiculata*, em Portugal, realizámos em 1989 uma missão de colheita de germoplasma, essencialmente restrita ao Interior Centro e Sul do País. Posteriormente, a colecção foi enriquecida com amostras cedidas pelo Núcleo de Melhoramento de Milho de Braga (NUMI) e também com algum material exótico de bancos de germoplasma estrangeiros. Desta maneira, foi constituída uma pequena colecção que incluía amostras das três subespécies (subsp.) cultivadas de *Vigna unguiculata*: subespécie (subsp.) *unguiculata* (a forma normalmente cultivada em Portugal), subsp. *sesquipedalis* e subsp. *cylindrica*.

No que diz respeito exclusivamente às características morfológicas da semente das amostras nacionais, observámos a existência de distintos fenótipos de forma e dimensão da semente e de pigmentação e textura do tegumento que permitiram, de acordo com a descrição morfológica realizada por Castilho (1951), constatar a existência de material vegetal proveniente de diferentes cultivares.

Na investigação agronómica é importante o conhecimento do material vegetal com o qual se trabalha. O valor de um banco de germoplasma depende, não apenas do número de amostras de que se dispõe mas, sobretudo, do conhecimento que possamos ter de cada uma delas. Interessa por isso obter, pelas metodologias disponíveis, o máximo de informação que permita posteriormente identificar e caracterizar o material vegetal.

A caracterização e avaliação são realizadas tradicionalmente pela descrição morfológica e agronómica das amostras, de acordo com listas de descritores divulgados pelo International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). Os resultados obtidos podem ser posteriormente processados em sistemas computadorizados de base de dados. Contudo, um conjunto numeroso de dados morfológicos é de difícil interpretação no que diz respeito aos padrões de variabilidade entre amostras. A taxonomia numérica simplifica a análise de padrões de variabilidade, permitindo uma escolha mais fácil de um determinado tipo de planta ou a selecção de tipos dissimilares para a realização de hibridações.

Apesar deste tipo de avaliação fenotípica ser extremamente importante, é difícil fazer a interpretação dos dados ao nível genético, já que a maioria dos caracteres estudados são de natureza poligénica, além da sua expressão ser marcadamente mediada por interacções com o ambiente.

A electroforese de isoenzimas apresenta-se, assim, como uma técnica extremamente interessante para a caracterização varietal porque permite estimar quantitativamente a variabilidade genética do material vegetal com base na variação da estrutura molecular de produtos primários dos genes, sendo normalmente independente da influência ambiental.

O principal objectivo deste trabalho foi o de efectuar a caracterização genética, por electroforese de isoenzimas, de algumas populações nacionais e exóticas de *Vigna unguiculata*. Desta forma pretendeu-se estudar, pela detecção de polimorfismos, a variabilidade inter e intravarietal, essencialmente ao nível da subespécie *unguiculata* (a de maior representatividade agronómica em Portugal), e também o estabelecimento, por esta metodologia, de relações de identidade entre as três subespécies cultivadas.

2 CONSIDERAÇÕES GERAIS ACERCA DA ESPÉCIE *Vigna unguiculata*

2.1 Origem e taxonomia

O feijão-frade, *Vigna unguiculata* (L.) Walp ssp. *unguiculata* (Verdcourt, 1970), é uma leguminosa com centro de origem na África Ocidental, devendo ter sido domesticada, no período Neolítico, a partir das formas selvagens das subspp. *dekindtiana* e *mensensis* (Steele e Mehra, 1980). Após a introdução da subsp. *unguiculata* na Índia, o aumento da variabilidade genética resultante da sua expansão terá servido de base, após selecção, para o estabelecimento de duas novas subspp., *sesquipedalis* e *cylindrica* (Steele, 1986).

O feijão-frade terá alcançado a Europa a partir da Ásia ou do Egipto, existindo referências a cultivares desta espécie em textos gregos datados de 300 a.C. No final da era Romana ter-se-á estabelecido, como leguminosa secundária na alimentação humana, no Sul da Europa (Steele, 1986). A introdução da cultura no Novo Mundo ter-se-á devido aos Espanhóis no séc. XVII e ao comércio de escravos a partir da África Ocidental, que terá permitido a introdução de cultivares neutras, quanto ao fotoperíodo, da subsp. *unguiculata*.

Das cerca de 170 espécies incluídas no género *Vigna* 120 encontram-se em África (66 são endémicas), 22 na Índia e Sudeste Asiático (16 são endémicas), localizando-se as restantes na América e na Austrália (Faris, 1965). As afinidades do género *Vigna* com os géneros *Phaseolus* e *Dolichos* originou uma taxonomia algo confusa, a qual viria a ser clarificada por Verdcourt (1970) com o reconhecimento de cinco subspp. de *Vigna unguiculata*, duas das quais selvagens: *denkindtiana* e *mensensis*. Das subspp. cultivadas é a subsp. *unguiculata* a que tem maior dispersão, enquanto as outras duas, *cylindrica* (utilizada como planta forrageira) e *sesquipedalis* (utilizada para consumo das vagens quando verdes), encontram-se sobretudo na Índia e no Extremo Oriente e, apesar de introduzidas em África, não se encontram nos sistemas rurais tradicionais.

As características que permitem diferenciar as três subspp. cultivadas, embora sejam bem evidentes, parecem resultar apenas de factores de variação induzidos pela pressão de selecção. Com efeito, cada um destes *taxa* distingue-se dos restantes por características essencialmente relacionadas com a dimensão das sementes e das vagens, e, por vezes, por

possuir diferentes usos agronômicos. Por este facto, Maréchal *et al.* (1978), referindo coeficientes de similaridade de 97 a 98%, preferem classificar as três subespécies cultivadas, *unguiculata*, *cylindrica* e *sesquipedalis*, em grupos de cultivares, "cultigrupes" (cv-gr.), designando-os, respectivamente, de cv-gr. UNGUICULATA, cv-gr. BIFLORA e cv-gr. SESQUIPEDALIS, incluindo-os numa única subespécie: *unguiculata*.

Relativamente às formas ancestrais, as cultivares apresentam, aparentemente, uma baixa divergência genética e uma divergência cromossômica nula. As cinco subsp. de *V. unguiculata* são interférteis, havendo casos em que as tentativas de hibridação com outras espécies diplóides do mesmo género tiveram sucesso, nomeadamente as realizadas com a espécie *V. pubescens* (Fatokun e Singh, 1987).

A citotaxonomia do género *Vigna* é relativamente simples ($2n=2x=22$), e só há relativamente pouco tempo foram desenvolvidas as primeiras formas poliplóides (AVRDC, 1986, citado por Chen *et al.*, 1989).

2.2 Caracterização botânica

A espécie *Vigna unguiculata* é uma leguminosa anual, compreendendo plantas de tipo elevado, volúvel e trepador, ou de menor estatura e porte suberecto. A germinação é epígea, situando-se a temperatura mínima de germinação próxima dos 15 °C (Martins, 1986).

O sistema radicular é constituído por um eixo central profundante com abundantes ramificações laterais mais superficiais onde se situa a maior densidade de nódulos.

A formação de nódulos e a actividade da enzima nitrogenase são negativamente afectados pelas condições de secura, resultando numa baixa fixação de azoto e decréscimo dos rendimentos em semente (Zablotowicz *et al.*, 1981; Hassan e Hall, 1986). A ocorrência de temperaturas elevadas é também um factor desfavorável à actividade simbiótica.

As duas primeiras folhas são unifoliadas, sésseis e opostas, as restantes são trifoliadas, longamente pecioladas, alternas, glabras, de côr verde carregado, com os folíolos ovado-acuminados e cujo aparecimento se prolonga para além da floração nas cultivares que apresentam crescimento indeterminado.

As flores são amarelado-purpúreas, esbranquiçado-purpúreas, branco-esverdeadas ou violáceas e dispõem-se em cacho. As vagens são pendentes, estreitas, torulosas e compridas (10-20 a 25-80 cm x 0,7-1,0 cm). As sementes, mais ou menos acentuadamente reniformes, elipsóides ou elipsóide-sub-reniformes ou também quase arredondadas, são pequenas e esbranquiçadas, côr de palha ou amarela pálida com o hilo preto ou mais claro, ou acastanhadas, côr de camurça, amarelo-avermelhadas, cinzentas e com o hilo ou o olho

branco. As características das sementes e das vagens são elementos muito importantes na distinção das cultivares.

A resposta ao fotoperíodo é variável existindo plantas neutras (a floração não é afectada pelo comprimento dos dias), plantas de dia curto (a floração só ocorre se o comprimento dos dias for menor do que um determinado valor de fotoperíodo crítico) e plantas de dia longo quantitativas (os dias longos atrasam a floração mas não a inibem) (Hadley *et al.*, 1983). Nas plantas neutras e nas plantas de dia longo quantitativas (mas apenas quando o comprimento do dia é menor do que o fotoperíodo crítico) o número de dias até à primeira flôr é determinado pela temperatura. Na Nigéria, a utilização de plantas neutras possibilita realizar duas safras no mesmo ano, entre Maio e Dezembro (FAO, 1961).

O número de inflorescências é complementar do número de ramificações pelo que quanto mais cedo e profusamente a planta começar a florir menor o número de ramificações (Steele *et al.*, 1984). Em princípio, quanto mais longo for o período reprodutivo maior a produção, apesar do rendimento, expresso pelo número de flores que originam vagem, ser extremamente baixo dada a elevada abscisão de flores e frutos jovens (Martins, 1986).

Durante a floração, as temperaturas elevadas causam a esterilidade masculina e a excessiva abscisão floral (Warrag e Hall, 1983). Considera-se que o efeito das altas temperaturas na esterilidade masculina estará de certa maneira relacionado com a inibição do transporte do aminoácido prolina das paredes das anteras para os grãos de pólen, o que poderá determinar a inviabilidade do pólen (Mutters *et al.*, 1989).

Embora o feijão frade seja uma espécie autogâmica não é de descurar a possibilidade de ocorrência de alguma polinização cruzada entomófila. Foram registados valores próximos de 2% para os cruzamentos naturais (Steele, 1986).

Os efeitos da seca no rendimento final em semente não se fazem sentir de igual forma ao longo do ciclo vegetativo. Assim, durante a fase vegetativa o rendimento potencial em semente não é muito afectado pela seca, desde que as condições ambientais permitam posterior recuperação do crescimento (a planta valoriza pequenos estímulos como seja a ocorrência de precipitação, a descida da temperatura máxima ou o aumento da humidade atmosférica). Durante a floração o efeito da seca faz-se sentir sobretudo no número de vagens/planta, registando-se por vezes, para esta característica, perdas na ordem dos 49% (Hiler *et al.* 1972). Contudo, em determinadas situações, é possível uma recuperação parcial do rendimento em semente já que o curto período de formação e de preenchimento da vagem (17 a 24 dias) associado a um tipo de crescimento indeterminado, conferem alguma plasticidade ao feijão frade, permitindo minimizar os efeitos das condições de extrema seca durante a floração. É sobretudo durante a fase de preenchimento da vagem que as condições de seca reduzem consideravelmente o rendimento final em semente, traduzindo-se quer no

menor número de vagens/planta quer também na menor dimensão das sementes (Kenneth *et al.*, 1980).

O feijão-frade adapta-se a vários tipos de solos, desde os muito ácidos aos alcalinos, crescendo e produzindo em condições de fertilidade edáfica relativamente baixa.

A fertilização azotada durante a sementeira tem efeito reduzido sobre o rendimento em semente e a fixação de azoto atmosférico. Contudo, a aplicação de azoto no início da floração parece influenciar de forma positiva o rendimento, embora diminua a fixação de azoto atmosférico, o que estará essencialmente relacionado com o aumento do número de ramificações, do número de vagens/m² e do peso da semente (Hassan e Hall, 1986).

Apesar da importância desta cultura nos sistemas rurais de subsistência, o seu melhoramento tem-se confinado a alguns centros localizados na zona ocidental de África, provável local de origem e onde a cultura tem maior representatividade. Nos restantes centros de melhoramento mundiais os trabalhos normalmente têm-se restringido à elaboração de colecções de germoplasma e à realização de hibridações em pequena escala.

Os primeiros trabalhos de melhoramento realizados realçavam o acréscimo obtido no rendimento em semente, sobretudo pela diminuição de sensibilidade ao fotoperíodo, obtenção de plantas de crescimento erecto com as vagens inseridas na parte superior da canópis (de maneira a possibilitar a colheita mecânica), e introdução de resistência a pragas e doenças. Actualmente, têm grande importância, pelo seu significado económico, os trabalhos que recorrem à utilização de espécies selvagens para a transferência de genes relacionados com a resistência a factores de natureza biótica. Salientem-se, por exemplo, as tentativas de hibridação de *V. unguiculata* com plantas da espécie *Vigna vexillata* (caracterizadas pela pubescência das folhas, caules e vagens) que são resistentes a determinadas pragas, nomeadamente *Maruca testulalis* e *Callosobruchus maculatus* (Fatokun, 1991). São igualmente importantes os trabalhos desenvolvidos no sentido de melhorar o teor proteico e o valor nutritivo das sementes, pelo acréscimo da proporção de aminoácidos sulfurados (Miller Jr., 1987).

Existem poucas referências relativamente à cultura desta espécie no nosso país. As populações cultivadas em Portugal pertencem maioritariamente à subsp. *unguiculata*, apresentando geralmente crescimento indeterminado.

Castilho (1951) realizou uma descrição bastante pormenorizada das principais cultivares¹ americanas e europeias, conhecidas no nosso país no princípio dos anos 50, com base essencialmente nas características morfológicas das vagens e das sementes. Actualmente, as cultivares mais conhecidas entre nós, constituídas normalmente por plantas de pequena

¹ Embora o autor utilize o termo variedade(s), parece-nos mais correcto a designação de cultivar(es), uma vez que se trata de material vegetal melhorado pelo homem.

estatura e porte erecto, são as seguintes: "Amarelo", de sementes medianas de cor amarelo-palha tostada; "Arroz", de sementes pequenas arredondadas, quase esféricas e de hilo esverdeado; "Comum", de sementes medianas, tegumento branco, liso e hilo orlado de castanho ou preto; "Gigante de Marialva", de sementes grandes, acentuadamente reniformes, com o tegumento enrugado e o hilo orlado de preto.

Dado tratar-se de uma planta de autofecundação e de fraca polinização cruzada, normalmente, o agricultor realiza a multiplicação da sua própria semente. Por esse facto e pelo baixo custo da sua produção, não existe no comércio a oferta de semente com garantia de qualidade, produzida de acordo com as técnicas de melhoramento e multiplicação.

2.3 Valor nutricional

Relativamente ao valor nutritivo, o teor proteico da semente é elevado, variando, normalmente, entre 19 e 26% (Fery, 1981). Na fracção proteica é elevado o teor em lisina, mas, à semelhança de outras leguminosas de grão, existem deficiências em aminoácidos sulfurados, nomeadamente cistina e metionina (Quadro 2.1).

O valor nutritivo da semente melhora com a cozedura que diminui a actividade de factores anti-nutricionais, como os aminoácidos tóxicos inibidores da tripsina e um glúcido cianogénico. Relativamente à semente de *Phaseolus* tem uma cozedura mais rápida, aspecto que é importante nos países pobres onde escasseia a lenha.

A utilização da semente em compostos para a alimentação animal está limitada pela presença do referido glúcido cianogénico, que liberta por hidrólise, aproximadamente, 2,1 mg CNH/100g (Gomez, 1983).

Como cultura forrageira apresenta grande interesse. Os valores encontrados para a digestibilidade da matéria seca *in vitro* variam entre 63 e 79%, de acordo com o órgão vegetativo, sendo comparáveis aos registados para outras espécies forrageiras, nomeadamente a aveia, algumas consociações de aveia com outras leguminosas e o girassol (Marsh *et al.*, 1987). No que se refere à percentagem de proteína total nas folhas, foram observados valores superiores a 20%, semelhantes aos observados noutras leguminosas forrageiras.

O material vegetal que permanece no campo após a colheita da semente é bem valorizado pelos ruminantes, tendo alguma importância nos sistemas de agricultura associados à produção de queijo de ovelha já que a sua disponibilidade coincide com o início do período de lactação dos animais. O referido material vegetal apresenta um baixo teor de matéria seca (19,2%), valores próximos dos 21% para a proteína bruta, oscilando a digestibilidade da matéria seca *in vitro* entre os 62,7 e 73,8 % (Tendinha, 1988).

Quadro 2.1 - Teor de proteína e de aminoácidos das sementes de algumas leguminosas e do ovo (adaptado de Oliveira, 1976).^a

	Ovo	Soja	Feijão	Ervilha	Grão de bico	Fava	<i>Phaseolus lunatus</i>	<i>Vigna</i> spp.	<i>Cajanus cajan</i>
Proteína total (g/100g)	13,5	34,1	22,3	24,1	22,1	25,1	27,0	23,8	20,0
Aminoácidos (g/16g N)									
Arginina	6,4	7,1	5,9	8,0	9,5	7,0	6,4	6,4	6,8
Histidina	2,5	2,3	2,4	1,2	2,4	2,9	3,2	3,0	2,8
Fenil Alanina	5,9	5,7	5,6	4,8	5,8	4,2	5,9	5,2	8,6
Tirosina	4,5	4,1	3,9	3,9	2,9	4,7	2,6	3,0	3,3
Fenil Alanina+Tirosina	10,4	9,8	9,4	8,7	8,6	8,9	8,5	8,2	11,9
Isoleucina	7,0	4,7	5,7	4,1	4,2	6,3	5,8	4,9	6,1
Leucina	9,3	6,6	8,7	6,4	7,1	8,7	8,3	7,5	7,8
Lisina	7,1	5,8	7,4	5,0	6,6	5,6	6,6	6,5	7,1
Metionina	3,7	2,0	1,0	1,0	1,0	0,4	1,6	1,5	1,2
Cistina	2,3	1,9	1,0	1,2	0,9	0,7	1,5	1,3	1,4
Metionina + Cistina	5,9	3,9	2,0	2,2	1,8	1,1	3,1	2,8	2,6
Treonina	4,9	4,0	4,4	3,9	3,5	3,3	4,7	3,9	3,8
Triptofano	1,5	1,2	0,9	0,7	0,8	0,9	0,9	1,0	0,5
Valina	7,3	4,2	6,1	4,0	4,3	5,0	6,3	5,7	5,3
Aminoácido limitante	—	S-AA	S-AA	S-AA	S-AA	S-AA	S-AA	S-AA	S-AA
% ovo	100	66	34	37	30	19	53	47	44

^a S-AA, aminoácidos sulfurados (metionina+cistina); % ovo, valor percentual relativamente aos S-AA do ovo.

2.4 Importância económica

É difícil estimar a importância económica desta cultura, já que normalmente não aparece individualizada nas estatísticas de produção, mas sim associada a outros legumes secos. Mundialmente, a área ocupada pelo feijão-frade está estimada em cinco milhões de hectares (Fery, 1981), o que o torna, se excluirmos a soja e o amendoim, na quarta cultura de legume seco, a seguir ao feijão (*Phaseolus* spp.), grão de bico e ervilha (Martins, 1986).

As principais regiões produtoras de feijão-frade situam-se nas zonas tropicais e sub-tropicais secas de África e América do Sul, onde é um componente importante da dieta alimentar nos sistemas baseados em cereais ou em raízes. Cerca de 90% da produção mundial está localizada em África, sendo a Nigéria um dos principais produtores com aproximadamente 61% da produção mundial (Langer e Hill, 1982). É aliás neste país, no International Institute of Tropical Agriculture (I.I.T.A.), que está situado o principal centro de melhoramento desta espécie.

A sua produtividade varia muito, de acordo com o sistema de agricultura em que se insere, não devendo a sua produção total exceder os dois milhões de toneladas de semente (Steele *et al.*, 1984). Na Nigéria cultiva-se frequentemente em consociação com outras espécies, observando-se baixos rendimentos (12×10^{-3} - 16×10^{-3} kg/m², 120 - 160 kg/ha). Nos USA, onde a cultura está totalmente mecanizada, são cultivados anualmente cerca de 80 000 ha de feijão-frade, com particular incidência nos Estados do Texas, Geórgia e Califórnia (Fery, 1981). No Vale Californiano, em condições de regadio, foram registadas produções de semente na ordem dos 0,4 kg/m² (4 t/ha) (Kenneth *et al.*, 1980).

Em Portugal, embora seja difícil estimar a expressão económica desta espécie por não haver dados estatísticos específicos, a cultura é tradicional no Interior Norte e Centro bem como na região Sul na pequena horta familiar ou em zonas mais restritas como cultura arvense produtora de grão seco e/ou forrageira.

Como cultura arvense o feijão-frade é normalmente utilizado (com tendência para a sua substituição pelo girassol) em revestimento de alqueive destacando-se a sua inserção em sistemas de agricultura baseados na produção de cereais no Alentejo Interior (Martins, 1986) e em sistemas de agricultura associados à produção de queijo de ovelha, como acontece no Campo Albicastrense (Dias, 1986).

Nas nossas condições, as produtividades são baixas e variáveis (oscilando normalmente entre 20×10^{-3} - 30×10^{-3} kg/m², 200 - 300 kg/ha de semente), o que é devido, sobretudo, ao facto de ocorrer intenso "stress" hídrico durante o ciclo cultural, e também aos baixos teores de humidade do solo incapazes de assegurar uma germinação homogénea (Martins, 1986).

3 AS ISOENZIMAS NA CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAL VEGETAL

3.1 Considerações gerais

As metodologias normalmente utilizadas para distinguir e caracterizar o material vegetal baseiam-se fundamentalmente nas diferenças fenotípicas, observadas nas variedades e nas cultivares estudadas. Classicamente, o fenótipo refere-se a um conjunto de atributos de natureza morfológica, assumindo-se que as diferenças observadas têm uma base genética.

Contudo, embora os sistemas de classificação que recorrem a métodos baseados numa caracterização morfológica continuem a desempenhar um papel fundamental, as diferenças morfológicas observadas podem não ser indicadoras da variabilidade genética devido à ocorrência de interações genótipo x ambiente. A utilização desses sistemas de classificação é ainda mais restrita no estudo da variabilidade intraespecífica devido à maior semelhança genética entre os organismos de uma mesma espécie (Roux, 1987).

Sucedem também que sendo muitas características morfológicas controladas por muitos genes, cada um com múltiplos alelos, torna-se difícil inferir acerca do número e estados alélicos dos genes codificantes porque alelos de diferentes *loci* podem influenciar o fenótipo da mesma maneira; ou seja, um elevado número de diferentes genótipos pode produzir o mesmo fenótipo (Crawford, 1983).

Pode-se tentar realizar a distinção de genótipos pela comparação dos seus cromatogramas quando se separam moléculas como flavonoides e antocianinas (Singh e Thompson, 1969; Brown *et al.*, 1969; 1971). Contudo, na cromatografia, a semelhança do que acontece nos descritores morfológicos, é difícil estabelecer uma relação directa entre fenótipo e genótipo pois a maioria desses compostos resulta de complexos processos metabólicos.

A electroforese de proteínas constitui uma metodologia muito importante na análise da variabilidade genética já que estas são o produto directo da expressão dos genes. Contudo, os métodos de coloração da proteína total nem sempre permitem a resolução mais conveniente, pelo que, no que diz respeito à caracterização de recursos genéticos, esta metodologia está praticamente limitada à identificação das amostras vegetais (Simpson e Withers, 1986).

De entre os métodos bioquímicos, a electroforese de isoenzimas constitui um instrumento analítico de grande eficácia e precisão, constituindo estas óptimos "marcadores moleculares" em estudos de identificação e caracterização de genótipos.

As diferenças existentes entre os genes que codificam para os polipéptidos traduzem-se, na electroforese, por variações na mobilidade das enzimas, permitindo o estudo destas o estabelecimento de uma directa relação entre fenótipo e genótipo.

Uma das desvantagens apontadas à utilização das isoenzimas como "marcadores moleculares" relaciona-se com o facto de poderem não discriminar a variabilidade genética global existente entre plantas devido à reduzida fracção do genoma que é analisada e ao facto de muitas alterações nos genes provocarem nas proteínas mudanças que não são detectáveis por electroforese. Daí resulta que as possibilidades para estabelecer ligações entre características de interesse agronómico e genes marcadores isoenzimáticos sejam reduzidas (Smith, 1989).

Actualmente, já é possível identificar variações ao nível do DNA mesmo em situações em que estas não se expressam fenotipicamente. Pequenas diferenças presentes nas sequências de DNA podem ser detectadas como variações no comprimento de fragmentos resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição. As referidas variações foram designadas por "Restriction Fragment Length Polymorfisms" (RFLPs), ou polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição.

Os fragmentos de diferente comprimento, originados pela digestão do DNA por enzimas de restrição, podem ser separados por electroforese em gel de agarose. É possível fazer a localização no gel de um determinado fragmento através da utilização de uma sonda marcada homóloga para toda ou para parte da sequência do DNA do referido fragmento (Beckmann e Soller, 1983).

A principal vantagem dos RFLPs reside na disponibilidade, para algumas espécies, de um elevado número de combinações de enzimas de restrição e sondas que permitem cobrir de uma maneira mais eficaz o genoma dos indivíduos estudados. O método dos RFLPs permite assim estudar um maior número de *loci* do que o método de análise isoenzimática, sendo possível detectar variações mínimas na sequência do DNA por vezes não detectáveis pela análise de isoenzimas, pois nem todas as alterações presentes num gene determinam a alteração da função das proteínas ou a sua mobilidade electroforética.

Relativamente às isoenzimas, os RFLPs apresentam também a vantagem de não serem influenciados nem pela especificidade do tecido, nem pelo estágio de desenvolvimento do organismo, sendo o padrão constante em todas as células.

A principal desvantagem de utilização do método de RFLPs está relacionada com o seu elevado custo e com a necessidade de se proceder a uma exaustiva caracterização prévia dos padrões de variabilidade em cada cultivar.

Não sendo uma metodologia muito onerosa e dada a facilidade e rapidez de execução, a electroforese de isoenzimas continua a ser uma técnica de inegável interesse, constituindo estas óptimos "marcadores moleculares" em estudos de identificação e caracterização de genótipos.

3.2 Características das isoenzimas

As isoenzimas são diferentes formas moleculares de uma enzima, presentes no mesmo indivíduo, que compartilham um substrato comum e catalisam a mesma reacção, mas que diferem na mobilidade electroforética (Markert e Moller, 1959).

As isoenzimas especificadas por alelos do mesmo *locus* foram designadas por aloenzimas (Prakash *et al.*, 1969, citados por Wendel e Weeden, 1990), reservando-se o termo isoenzima para designar as formas que se devem à expressão de genes estruturais de diferentes *loci*. Contudo, o termo isoenzimas é utilizado, normalmente, em sentido lato englobando tanto as aloenzimas como as isoenzimas no sentido restrito do termo.

A ocorrência das isoenzimas poderá ser explicada, em termos genéticos, como o produto de mutações a nível do DNA que se irão reflectir na composição e na sequência dos aminoácidos das cadeias polipeptídicas.

As mutações podem acarretar diferenças significativas nas cargas iónicas das cadeias polipeptídicas e, ainda, nas suas dimensões e nas suas formas. Quando as cadeias polipeptídicas são submetidas a uma diferença de potencial num gel semiporoso de amido ou poliácridamida, verificar-se-ão distintas velocidades de migração, não só pelo efeito eléctrico como também pela crivagem molecular imposta pela estrutura do gel (Castro, 1989). Estes efeitos irão produzir, idealmente, a separação de cada isoenzima presente na amostra em zonas discretas de actividade enzimática ao longo do gel cuja natureza matricial irá manter a posição da molécula proteica após o final da electroforese. A subsequente imersão do gel numa solução que contém um substrato específico para a enzima que se pretende estudar e um corante que precipita ao nível do produto da reacção, permitirá revelar *in situ* as diferentes bandas da mesma enzima. O padrão de bandas observadas no gel para cada amostra é designado de zimograma.

Assim, uma vez que a sequência de aminoácidos de uma proteína é primariamente determinada pela sequência de nucleótidos de um gene estrutural, a análise da estrutura de uma proteína por electroforese é, numa primeira aproximação, uma análise do respectivo gene codificante (Gottlieb, 1977).

Basicamente, são três os mecanismos de produção das isoenzimas (Weeden, 1983; Castro, 1989):

- i) mutação num dado *locus* com a formação de diferentes alelos. As isoenzimas codificadas pelas variantes alélicas do mesmo *locus* são designadas aloenzimas ou alozimas;
- ii) duplicação génica num cromossoma homólogo ou num não-homólogo. Este fenómeno poderá resultar de diferentes processos, como o entrecruzamento desigual entre cromossomas homólogos, a ocorrência de translocações recíprocas entre cromossomas não homólogos ou, mais simplesmente, por poliploidização. Subsequente divergência do gene original pela ocorrência de mutações no(s) gene(s) duplicado(s) poderão conduzir a novas formas do mesmo enzima, codificadas por diferentes *loci*;
- iii) ocorrência de modificações das proteínas após a tradução, nomeadamente por clivagem da cadeia polipeptídica, ligação a outras moléculas, como coenzimas, grupos fosfato, etc., e agregação de cadeias polipeptídicas em unidades multiméricas.

Poder-se-á tentar explicar a ocorrência de múltiplas formas moleculares de uma enzima num organismo pelo facto de a mesma reacção química ocorrer em diferentes compartimentos subcelulares, com diferentes condições de pH e de concentração de metabolitos, sendo necessário, por isso, diferentes isoenzimas para uma catálise eficiente (Gottlieb, 1982).

Alguns sistemas enzimáticos, como as esterases, aminopeptidases e peroxidases, apresentam frequentemente, no mesmo compartimento subcelular, três ou mais isoenzimas, pelo que uma outra hipótese avançada para explicar a abundância de isoenzimas observável é a variação na especificidade do substrato. Contudo, nem sempre se consegue demonstrar a existência de uma divergência funcional entre diferentes isoenzimas, pelo que não se sabe muito bem se estas desempenham realmente um papel importante na fisiologia celular, ou se não serão mais do que proteínas redundantes (Weeden e Wendel, 1990).

Quando comparadas com os restantes "marcadores moleculares", as isoenzimas apresentam algumas propriedades que as tornam extremamente importantes:

- i) As aloenzimas são tipicamente codificadas por alelos de expressão codominante e são herdadas de acordo com as proporções mendelianas, o que permite a distinção fácil entre genótipos homozigóticos e heterozigóticos (Shaw, 1965; Shannon, 1968; Gottlieb, 1977)²;

² No caso dos marcadores morfológicos, em que existe uma interacção do tipo dominante/recessivo, a distinção dos diferentes genótipos só é possível pela realização de cruzamentos-teste e observação das descendências (Castro, 1989).

- ii) as isoenzimas não apresentam interacções de natureza epistática e pleiotrópica e não são influenciadas, salvo raras excepções, por factores ambientais (Simpson e Withers, 1986; Weeden, 1990).
- iii) o conhecimento das frequências alélicas das isoenzimas permite quantificar os níveis de variação genética ao nível da espécie e da população (variação inter e intrapopulacional) e estabelecer relações de identidade entre diferentes *taxa* (Hamrick, 1990);
- iv) muitos dos *loci* expressam-se em todos os estágios do ciclo de vida, sendo possível estudar um elevado número de *loci* utilizando pequenas quantidades de material biológico (Hamrick, 1990);

Uma das limitações inerente à utilização das isoenzimas relaciona-se com o facto de estas poderem não manifestar toda a variabilidade genética existente nos genes estruturais que as codificam. Em primeiro lugar, a electroforese de isoenzimas não permite detectar todas as diferenças existentes ao nível genético, devido à redundância do código genético e ao facto de nem todas as substituições de aminoácidos alterarem a mobilidade electroforética. Segundo, os genes eucariotas possuem sequências de DNA que não são traduzidas. Por último, este método não permite identificar qual a origem genética de enzimas com diferentes mobilidades electroforéticas que poderão ser consequentes de substituições, adições ou deleções de aminoácidos (Crick, 1979; Simpson e Withers, 1986; May, 1992).

Após a sua síntese as cadeias polipeptídicas podem sofrer modificações, sendo estas mudanças controladas pelos produtos de outros *loci*, antes de se constituírem em enzimas activas. Na maioria das situações, a variação na mobilidade electroforética parece no entanto reflectir directamente as mudanças na sequência do DNA do gene estrutural que codifica para a proteína e não o polimorfismo de um ou mais genes envolvidos nos passos de modificação (Weeden, 1990).

Tendo presente as restrições referidas, a análise de isoenzimas é extremamente importante em estudos de biologia evolutiva, sistemática, genética e melhoramento, encontrando-se revisões detalhadas sobre os temas nos trabalhos editados por Tanskley e Orton (1983) e Douglas Soltis e Pamela Soltis (1990).

3.3 Interpretação genética dos zimogramas

O número de bandas de um zimograma depende do número de genes codificantes, dos seus estados alélicos (homozigótico ou heterozigótico), da estrutura quaternária da enzima e da sua compartimentação subcelular (Wendel e Weeden, 1990). Um outro factor a ter em

- ii) as isoenzimas não apresentam interacções de natureza epistática e pleiotrópica e não são influenciadas, salvo raras excepções, por factores ambientais (Simpson e Withers, 1986; Weeden, 1990).
- iii) o conhecimento das frequências alélicas das isoenzimas permite quantificar os níveis de variação genética ao nível da espécie e da população (variação inter e intrapopulacional) e estabelecer relações de identidade entre diferentes *taxa* (Hamrick, 1990);
- iv) muitos dos *loci* expressam-se em todos os estágios do ciclo de vida, sendo possível estudar um elevado número de *loci* utilizando pequenas quantidades de material biológico (Hamrick, 1990);

Uma das limitações inerente à utilização das isoenzimas relaciona-se com o facto de estas poderem não manifestar toda a variabilidade genética existente nos genes estruturais que as codificam. Em primeiro lugar, a electroforese de isoenzimas não permite detectar todas as diferenças existentes ao nível genético, devido à redundância do código genético e ao facto de nem todas as substituições de aminoácidos alterarem a mobilidade electroforética. Segundo, os genes eucariotas possuem sequências de DNA que não são traduzidas. Por último, este método não permite identificar qual a origem genética de enzimas com diferentes mobilidades electroforéticas que poderão ser consequentes de substituições, adições ou deleções de aminoácidos (Crick, 1979; Simpson e Withers, 1986; May, 1992).

Após a sua síntese as cadeias polipeptídicas podem sofrer modificações, sendo estas mudanças controladas pelos produtos de outros *loci*, antes de se constituírem em enzimas activas. Na maioria das situações, a variação na mobilidade electroforética parece no entanto reflectir directamente as mudanças na sequência do DNA do gene estrutural que codifica para a proteína e não o polimorfismo de um ou mais genes envolvidos nos passos de modificação (Weeden, 1990).

Tendo presente as restrições referidas, a análise de isoenzimas é extremamente importante em estudos de biologia evolutiva, sistemática, genética e melhoramento, encontrando-se revisões detalhadas sobre os temas nos trabalhos editados por Tanskley e Orton (1983) e Douglas Soltis e Pamela Soltis (1990).

3.3 Interpretação genética dos zimogramas

O número de bandas de um zimograma depende do número de genes codificantes, dos seus estados alélicos (homozigótico ou heterozigótico), da estrutura quaternária da enzima e da sua compartimentação subcelular (Wendel e Weeden, 1990). Um outro factor a ter em

conta é o grau de ploidia, que poderá reflectir-se não só no acréscimo do número de bandas, como também na variação da sua espessura e intensidade de coloração (Castro, 1989).

A metodologia utilizada no estudo da hereditariedade das isoenzimas é, em tudo, semelhante à seguida para os caracteres mendelianos monogénicos, embora, como anteriormente referido, relativamente a diversos marcadores morfológicos, as isoenzimas apresentem a vantagem de estarem sob o controlo de alelos codominantes. A determinação da constituição genética de cada organismo para esses marcadores faz-se, normalmente, pelo cruzamento do material que apresenta variação enzimática seguido do estudo das descendências segregantes (Crawford, 1983).

As proteínas identificadas por electroforese podem ser formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas, designando-se por monoméricas se constituídas apenas por uma cadeia polipeptídica, diméricas se formadas por duas subunidades, cada uma consistindo numa cadeia polipeptídica simples, tetraméricas se formadas por quatro subunidades, etc.

No caso mais simples, uma enzima monomérica codificada por um *locus* (isto é, monogénica) com dois alelos poderá originar o aparecimento de indivíduos com três fenótipos distintos (Fig. 3.1): bandas simples nos dois tipos de homozigóticos e duas bandas no heterozigótico, ambas resultantes da presença de dois diferentes produtos proteicos codificados pelos dois alelos.

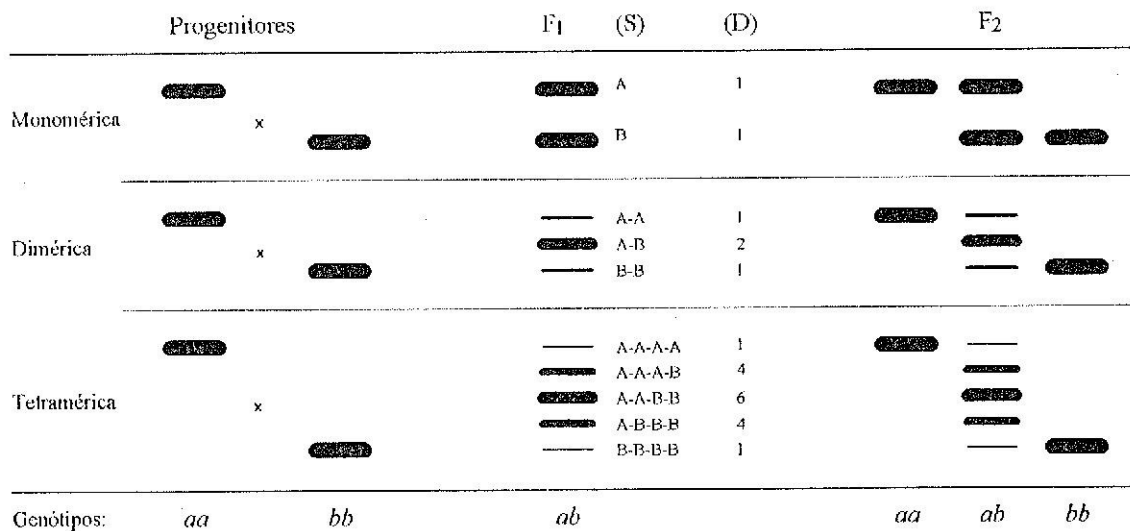


Fig. 3.1 - Perfis de enzimas monoméricas, diméricas e tetraméricas controladas por um *locus* dialélico. O alelo *a* especifica a subunidade polipeptídica A e o alelo *b* especifica a subunidade polipeptídica B. (S), constituição em subunidades de cada isoenzima; (D) quantidade relativa em cada banda (adaptado de Wendel e Weeden, 1990).

Nas enzimas multiméricas os produtos génicos dos *loci* combinam-se ao acaso para produzir a forma enzimática activa. Assim, para uma enzima dimérica, codificada por um

locus com dois alelos, o fenótipo isoenzimático do heterozigótico apresentará três bandas (Fig. 3.1).

As bandas formadas por subunidades polipeptídicas diferentes, são designadas bandas heteroméricas. No caso das enzimas monoméricas nunca não se forma naturalmente uma banda heteromérica. Nas enzimas diméricas, codificadas por um *locus*, o heterozigótico irá produzir uma banda heteromérica (AB) e nas tetraméricas o heterozigótico irá produzir três bandas heteroméricas: AAAB, AABB e ABBB (Fig. 3.1).

Da associação casual das subunidades em formas multiméricas resultam diferentes tipos de moléculas que formam distintas bandas com diferente intensidade de coloração e/ou largura. Do desenvolvimento da expressão binomial $(A+B)^n$, onde A e B representam os polipéptidos especificados pelos alelos *a* e *b*, e *n* o número de polipéptidos da enzima activa, é possível calcular o número de bandas expectável, as proporções isoenzimáticas relativas e a constituição em subunidades de cada banda. No caso de uma enzima tetramérica codificada por um *locus*, com os alelos *a* e *b* em iguais proporções, teremos:

$$(A+B)^4 = A^4 + 4A^3B + 6A^2B^2 + 4AB^3 + B^4$$

que traduz um perfil de cinco bandas nas proporções relativas de 1:4:6:4:1 (Fig. 3.1).

Nos casos em que as enzimas são codificadas por mais de um gene (isto é, policistrónicas) e estando localizadas no mesmo compartimento subcelular, se os polipéptidos especificados pelos alelos se associam de forma casual em produtos multiméricos, será possível o aparecimento de heteromultímeros de natureza intergénica e intragénica. O número de bandas (*n*) expectável num sistema multigénico depende do número de subunidades diferentes (*S*) e do número de subunidades que constituem a enzima (*Q*), podendo ser determinado através da fórmula (Shannon, 1968):

$$n = \frac{(S+Q-1)!}{(Q!)(S-1)!}$$

Assim, por exemplo, no caso de uma enzima dimérica codificada por dois *loci* (1 e 2) heterozigóticos, da associação casual das subunidades, resultará um fenótipo composto por dez bandas, sendo quatro homodímeras (1A1A, 1B1B, 2A2A e 2B2B), duas heterodímeras intragénicas (1A1B e 2A2B) e quatro heterodímeras intergénicas (1A2A, 1A2B, 1B2A e 1B2B) (Fig. 3.2).

Para além da maior complexidade ocasionada pelo aparecimento de bandas multiméricas intra e intergénicas, acontece frequentemente que duas ou mais bandas podem estar sobrepostas, devido a uma resolução electroforética incompleta e à co-migração de um ou

mais produtos diferentes, levantando dificuldades adicionais na interpretação dos zimogramas (Wendel e Weeden, 1990) (Fig. 3.2).

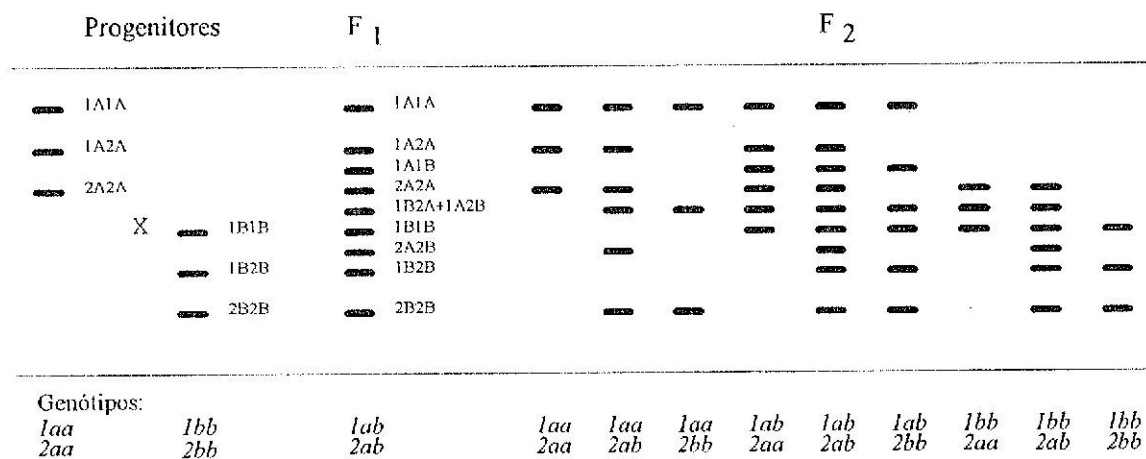


Fig. 3.2 - Perfis de uma enzima dimérica controlada por dois loci dialélicos. No caso do heterozigótico para os dois loci, dez isoenzimas serão produzidas resultantes da associação casual dos diferentes tipos de subunidades polipeptídicas. Contudo, verificando-se proximidade entre bandas com grande carga enzimática, é normal que algumas destas se venham a confundir no gel numa mancha única, não sendo possível discernir todas as bandas (adaptado de Wendel e Weeden, 1990).

Weeden e Gottlieb (1979), num estudo do controlo genético da fosfoglucoisomerase (PGI) em *Clarkia dudleyana* Abrams (planta diplóide anual), resolveram o problema da interpretação genética de zimogramas de maior complexidade fazendo a comparação dos zimogramas de tecidos diplóides com os do grão de pólen. Com efeito, enquanto que nos tecidos diplóides dos heterozigotos é possível a formação de aloenzimas heteroméricas interalélicas, o mesmo não acontece no pólen, já que, sendo haplóide, apenas produzirá uma das subunidades codificada por um dos alelos alternativos. Como em cada grão de pólen só estão presentes as subunidades proteicas codificadas por diferentes loci, só é possível a formação de heterómeros intergênicos. Deste modo, da comparação dos perfis dos tecidos somáticos com os do grão de pólen, é possível, em muitos casos, distinguir as isoenzimas resultantes de associação.

Nas enzimas multiméricas o número de bandas dos zimogramas pode aparecer reduzido se as isoenzimas especificadas por diferentes genes se encontram em diferentes compartimentos subcelulares, já que não se formam as bandas de natureza intergênica. Neste caso, o fenótipo resulta da sobreposição de dois conjuntos independentes de bandas correspondentes a diferentes organelos celulares. A ausência das bandas intergênicas não permite, contudo, concluir de forma inequívoca que existe uma diferente compartimentalização subcelular, já que são conhecidos casos em que subunidades

polipeptídicas especificadas por diferentes *loci* não se associam para formar enzimas activas, embora ocorram no mesmo compartimento subcelular³. Nesta situação, o estudo das isoenzimas a partir de preparações purificadas de organelos celulares, poderá esclarecer algumas dúvidas que eventualmente possam surgir na interpretação de perfis mais complexos (Weeden e Wendel, 1990).

No caso das coníferas, estas apresentam aspectos fisiológicos particulares na formação das sementes o que permite seguir uma metodologia peculiar e simples na análise genética das isoenzimas. O tecido nutritivo das sementes é haplóide (megagametófito) ao contrário do que acontece no endosperma das sementes das angiospérmicas que é geralmente um tecido triploide. Esta característica permite que o estudo das isoenzimas possa ser realizado numa única geração, sem necessidade de cruzamentos controlados (Weeden e Gottlieb, 1979; Gates e Boulter, 1980; Adams, 1983; Castro, 1989).

Para além do exposto, a interpretação dos zimogramas pode ser dificultada pela ocorrência de determinado tipo de fenómenos de origem genética e não genética (Weeden e Wendel, 1990):

- i) ausência de codominância;
- ii) as bandas heterodímeras podem migrar para posições que não são intermédias das bandas homodímeras, ou mesmo, em casos excepcionais, podem migrar para uma zona exterior aos limites definidos por estas;
- iii) ocorrência de "alelos nulos", que são variantes sem actividade enzimática⁴;
- iv) ocorrência de modificações das proteínas após a tradução, originando o aparecimento de bandas adicionais;
- v) introdução de artefactos durante a preparação das amostras ou durante a electroforese;
- vi) ocorrência de bandas duplas ou conjuntos de bandas ("bandas sombra" ou "bandas fantasma"), cujo comportamento genético depende no entanto de um único alelo.

Exemplos de interpretação genética de perfis isoenzimáticos podem ser encontrados nos trabalhos de Shields *et al.*, 1983; Castro, 1989; Wendel e Weeden, 1990; May, 1992.

³ Este fenómeno observa-se com maior frequência em enzimas reveladas com corantes não específicos, como a NADH-desidrogenase, fosfatase ácida e esterase (Wendel e Weeden, 1990).

⁴ O termo "alelos nulos" refere-se aos alelos para os quais não se verifica a produção de um produto proteico activo. Tal pode dever-se a várias causas, nomeadamente: ausência da cópia génica, ausência de transcrição, ausência de tradução, ou inactividade do produto proteico. A presença de alelos nulos pode ser detectada pela observação de um excesso relativo de fenótipos homozigóticos (May, 1992).

3.4 Marcadores genéticos e estudo de características de interesse agronómico

As isoenzimas são marcadores ideais para a construção de mapas genéticos dos cromossomas das espécies vegetais e algumas estão positivamente correlacionadas com determinados genótipos com valor agronómico devido à existência de ligação génica.

Para alguns *taxa* vegetais, nomeadamente o milho (Goodman et al., 1980; Goodman e Stuber, 1983; Wendel et al., 1986), o tomateiro (Tanskley e Rick, 1980; Tanskley, 1983) e o trigo (Hart, 1983), estão documentados mapas extensivos de marcadores isoenzimáticos.

Os marcadores isoenzimáticos podem ser utilizados para detectar os genes desejados nas populações em segregação com base no facto de o *locus* isoenzimático marcador identificar ou "marcar" um segmento cromossómico e permite o seu acompanhamento através das várias manipulações genéticas desenvolvidas no âmbito de programas de melhoramento. Segmentos cromossómicos homólogos, que possuem alelos alternativos no *locus* marcador podem ser identificados em diferentes indivíduos (ou linhas) e comparados pelos seus efeitos na expressão das características a seleccionar (Stuber, 1990).

Consideremos por exemplo a geração segregante produzida pela autofecundação das plantas resultantes do cruzamento entre duas linhas homozigóticas distintas; podendo acompanhar a transmissão de cada segmento cromossómico através da detecção de marcadores genéticos, o genoma de um indivíduo pode ser detalhadamente estudado em relação aos genes associados com a variação de uma determinada característica qualitativa ou quantitativa.

Assim, por exemplo, no tomateiro a utilização como marcador de uma aloenzima de fosfatase ácida (*Aps-1*) que está ligada a um gene para a resistência aos nematodes (Rick e Fobes, 1974; Rick e Tanskley, 1983; citados por Simpson e Withers, 1986), permitiu avanços significativos nos trabalhos de melhoramento neste âmbito. Também Weeden e Marx (1984) demonstraram que na espécie *Pisum sativum* o gene que especifica uma forma da enzima fosfoglucomutase (*Pgm-p*) pode ser utilizado como marcador para o gene recessivo *mo*, o qual confere resistência ao vírus do mosaico amarelo do feijão. Uma ligação semelhante foi encontrada, na mesma espécie, entre um *locus* da enzima álcool desidrogenase (*ADh-1*) e o gene dominante *En*, que confere resistência a um outro vírus ("pea enation mosaic virus") (Weeden e Provvidenti, 1988).

No que se refere às características poligénicas, existem algumas referências de associação positiva entre marcadores isoenzimáticos e características quantitativas, nomeadamente, na espécie *Zea mays* (Stuber e Moll, 1972; Stuber et al., 1980; Stuber et al., 1982; Kahler, 1985) e no género *Lycopersicon* spp. (Tanskley et al., 1982; Vallejos e Tanskley, 1983). Também na espécie *Lolium perenne* foi encontrada uma associação entre o teor de hidratos de carbono solúveis e um *locus* da enzima fosfoglucoisomerase, *PGI-2*

(Humphreys, 1992). Contudo, em muitos outros estudos não foi possível detectar ainda genes para isoenzimas com ligamento a genes determinantes de características agronômicas importantes (citem-se, a título de exemplo, os trabalhos de Bassiri, 1976; Giles, 1984; Graef, *et al.*, 1989; Kusmenoglu, *et al.*, 1992).

Apesar de os marcadores isoenzimáticos constituírem uma ferramenta extremamente útil nos estudos de genética e melhoramento vegetal, é praticamente impossível analisar um número de *loci* isoenzimáticos suficientemente elevado para a caracterização extensiva do genoma dos indivíduos estudados (Stuber, 1990). Tanksley (1983) refere que seria necessário possuir no genoma dos indivíduos em estudo marcadores espaçados a intervalos de 20 cM, para que fosse possível acompanhar, com uma fidelidade de 99%, a transmissão génica. Na maioria das espécies vegetais é impossível um mapeamento isoenzimático desta natureza.

A utilização dos RFLPs apresenta-se mais vantajosa para o estudo de transmissão de características poligénicas pois permite uma análise mais detalhada do genoma dos indivíduos em estudo, sendo possível identificar com maior precisão e facilidade a existência de ligamento entre marcas e características agronômicas de natureza quantitativa (Smith, 1989).

3.5 Variação isoenzimática nas populações vegetais

O conhecimento das frequências alélicas permite o cálculo de parâmetros estatísticos (percentagem de *loci* polimórficos, número médio de alelos por *locus*, número efectivo de alelos por *locus*, número médio de *loci* polimórficos por indivíduo, diversidade genética, etc.) através dos quais é possível quantificar os níveis de variação genética ao nível da espécie e da população (variação inter e intrapopulacional) e estabelecer relações de identidade entre diferentes *taxa*.

Hamrick e Godt (1992), num trabalho de revisão bibliográfica cobrindo mais de 400 espécies vegetais (449 espécies representando 165 géneros), estudaram a variação genética ao nível da espécie, ao nível da população e, dentro da espécie, entre populações. Constataram que, em termos médios, as espécies vegetais são polimórficas para cerca de 50% dos *loci* isoenzimáticos, existindo, ao nível da espécie, uma diversidade genética média de aproximadamente 15%. Menor variação ocorre dentro das populações, verificando-se que, em termos médios, 34% dos *loci* são polimórficos, existindo uma diversidade genética média de 11%. Concluíram ainda que aproximadamente 78% da diversidade aloenzimática total nos *loci* polimórficos ocorre dentro das populações, contribuindo os restantes 22% para a diferenciação entre populações.

Existe grande heterogeneidade nas espécies vegetais no que se refere aos níveis de variabilidade intrapopulacional, estando uma proporção significativa dessa variação associada com a história e as características ecológicas das espécies (Quadro 3.1).

Quadro 3.1 - Níveis de variação aloenzimática intrapopulacional em espécies vegetais de acordo com algumas das suas características (adaptado de Hamrick e Godt, 1992).^a

Características	N	Nº médio populações	Nº médio loci	P	A	A _e	H _e
Forma							
Anual	187	18,5	14,9	30,2	1,48	1,15	0,105
Perene lenhosa	115	9,3	17,0	50,0	1,79	1,21	0,149
Distribuição							
Endémicas	100	6,5	17,8	26,3	1,39	1,09	0,063
Distribuição ampla	85	25,5	14,6	43,0	1,72	1,23	0,159
Fecundação							
Autogâmicas	113	20,3	16,2	20,0	1,31	1,10	0,074
Alogâmicas	102	10,7	16,7	49,7	1,79	1,19	0,148

^a N, número de *taxa* (espécie e subespécie); P, percentagem de *loci* polimórficos; A, número de alelos por *locus*; A_e, número efectivo de alelos por *locus* ($A_e = 1/(1 - H_e)$); H_e, índice de diversidade genética (calcula-se para cada *locus* e população por $H_e = 1 - \sum p_i^2$, sendo p_i a frequência do alelo *i*th em cada população. Calcula-se depois um valor de H_e médio para todos os *loci*).

A distribuição geográfica e o tipo de fecundação parecem ser as características que melhor explicam a variabilidade intrapopulacional (Hamrick e Godt, 1992), sendo as espécies vegetais perenes (H_e = 0,149), com uma área de distribuição geográfica vasta (H_e = 0,159) e alogâmicas (H_e = 0,148), aquelas que possuem os níveis de variabilidade intrapopulacional mais elevados.

A distribuição da variação isoenzimática entre populações resulta da interacção entre vários factores evolutivos, nomeadamente: selecção, dimensão efectiva da população e capacidade da espécie para dispersar o pólen e as sementes. De uma forma geral, a ocorrência de selecção provoca o acréscimo da diferenciação entre populações, enquanto que uma eficaz dispersão do pólen e das sementes relaciona-se com uma menor diferenciação interpopulacional (Hamrick, 1990). O tipo de fecundação parece ser o principal factor que melhor explica a variabilidade intrapopulacional, tendo menor relevo o tipo de distribuição geográfica (Quadro 3.2) (Hamrick e Godt, 1992). A variação entre populações parece ser assim essencialmente influenciada pelo potencial de fluxo genético, pelo que será de esperar que as espécies alogâmicas (G_{st} = 0,099), perenes (G_{st} = 0,076), monóicas ou dióicas, de polinização anemófila, apresentem menor variabilidade interpopulacional relativamente às plantas autogâmicas (G_{st} = 0,510) e anuais (G_{st} = 0,357).

Quadro 3.2 - Diversidade genética interpopulacional em espécies vegetais de acordo com algumas das suas características (adaptado de Hamrick e Godt, 1992).^a

Características	N	Nº médio Populações	Nº médio loci	G _{st}
Forma				
Anual	146	18,5	14,9	0,357
Perene lenhosa	131	9,3	17,0	0,076
Distribuição geográfica				
Endémicas	52	6,5	17,8	0,248
Distribuição ampla	87	25,5	14,6	0,210
Tipo de fecundação				
Autogâmicas	78	20,3	16,2	0,510
Alogâmicas	134	10,7	16,7	0,099
Dispersão das sementes				
Gravidade	161	10,1	16,9	0,277
Vento	121	8,7	16,6	0,143

^a N, número de *taxa* (espécie e subespécie); G_{st}, diversidade genética média entre populações: $G_{st} = D_{st} / H_t$, sendo D_{st} a diversidade genética devida à variação entre populações e H_t a diversidade genética total (Nei, 1973).

O conhecimento da distribuição da variação genética nas populações vegetais é importante para o delimitamento de estratégias de colheita de germoplasma. Marshall e Brown (1975) aconselham a exploração de um maior número de locais, com a colheita de amostras de menor dimensão, em detrimento do tipo de exploração que cobre de forma intensiva apenas determinados locais. Esta estratégia deverá ser reforçada quando se trata de espécies autogâmicas, já que estas, como foi referido, apresentam uma maior variabilidade interpopulacional.

3.6 As isoenzimas em estudos de sistemática

Certamente que a contribuição mais importante da electroforese de isoenzimas nos estudos de sistemática vegetal relaciona-se com a possibilidade de permitir quantificar as semelhanças e diferenças genéticas entre populações e *taxa*, pois a divergência encontrada nos genes que especificam as isoenzimas não está normalmente associada a processos de "especiação"⁵. Pode ocorrer a divergência nos *loci* isoenzimáticos não acompanhada por processos de "especiação" e, reciprocamente, pode verificar-se "especiação" sem uma concomitante divergência nos *loci* isoenzimáticos (Gottlieb, 1984). Também as diferenças de natureza morfológica que permitem reconhecer diferentes *taxa* dentro de uma espécie ocorrem frequentemente sem uma correspondente divergência isoenzimática, fenómeno bastante

⁵ Do inglês "speciation", relativo ao processo biológico de formação das espécies.

notório quando se comparam as espécies domesticadas com os respectivos progenitores selvagens, pelo que se considera que a selecção, para características relacionadas com a domesticação, embora possa ser responsável por rápidas alterações fenotípicas, estas não são normalmente acompanhadas por mutações nos *loci* que especificam para as enzimas (Crawford, 1990).

Embora este aspecto constitua factor limitante para a utilização da electroforese de isoenzimas em taxonomia, existem diversos trabalhos que exemplificam a sua importância na resolução de alguns problemas taxonómicos difíceis. Assim, por exemplo, Jefferies e Gottlieb (1982) estudaram duas espécies diplóides de *Salicornia* que sob o ponto de vista morfológico são quase indistinguíveis, mas que ocupam *habitats* ligeiramente diferentes (embora por vezes se encontrem juntas na natureza). Os referidos autores não detectaram variação alozimática entre os indivíduos de cada espécie nem indícios de hibridação, contudo, verificaram a existência de diferenças isoenzimáticas entre as duas espécies, suficientes para a sua consideração como *taxa* distintos.

Os estudos electroforéticos poderão ter, inversamente, um papel importante nos grupos de espécies taxonomicamente difíceis, particularmente no caso de plantas de grande plasticidade morfológica e portanto difíceis de classificar através destes parâmetros (Crawford, 1990).

Em organismos diplóides os dados obtidos com a electroforese de isoenzimas podem ser utilizados no estudo da importância da hibridação na formação de novas espécies. Uma vez que os alelos de um *locus* produzem diferentes aloenzimas, sendo a sua expressão codominante, é possível verificar se uma planta híbrida expressa ou não as alozimas características dos progenitores. A hipótese de origem híbrida de uma espécie será rejeitada caso o presumível híbrido não apresente ambos os alelos específicos das espécies que são tidas como progenitoras, ou no caso em que apresente alelos que não se encontram nas espécies parentais (Crawford, 1990).

Gallez e Gottlieb (1982) realizaram um estudo no sentido de verificar se a espécie *Stephanomeria diegensis* representaria um híbrido estável resultante do cruzamento entre as espécies *Stephanomeria exigua* e *S. virgata*. Os autores verificaram que em *S. diegensis* em diferentes *loci* existiam alelos característicos de cada uma das espécies progenitoras, encontrando assim evidências para a sua origem híbrida.

Num outro caso, os dados electroforéticos permitiram rejeitar a hipótese da origem híbrida de *Lasthenia burkei* a partir do cruzamento entre *L. fremontii* e *L. conjugens*, como inicialmente se suponha (Ornduff, 1969, citado por Crawford, 1990). Com efeito, para além de se constatar da existência de alelos únicos em cada uma das três espécies, verificou-se que *L. burkei* não possuía qualquer combinação particular de alelos únicos existentes nas espécies tidas como progenitoras (Crawford, 1990).

As isoenzimas constituem, também, uma ferramenta muito importante nos estudos sobre a origem dos poliplóides, permitindo realizar o enquadramento genético de uma determinada espécie como alopoliplóide ou autopoliplóide.

Nos alopoliplóides, uma vez que a hibridação ocorre entre plantas geneticamente diferentes (normalmente espécies), verifica-se a combinação de alelos específicos de cada um dos progenitores. Os alopoliplóides diferem dos híbridos diplóides pelo facto de apresentarem uma heterozigosidade fixa resultante do correcto emparelhamento entre cromossomas homólogos, o que assegura que cada gâmeta receba os alelos alternativos de cada progenitor. Os alopoliplóides resultam certamente do cruzamento entre plantas que apresentam maior divergência genética do que aquela existente entre os progenitores dos híbridos diplóides, já que a poliploidia permite contornar com maior facilidade a esterilidade resultante da hibridação. A maior divergência existente nas aloenzimas dos progenitores dos poliplóides, facilita a detecção da origem híbrida. Por outro lado, a heterozigosidade fixa inerente à poliploidia mantém intactas as combinações alélicas aditivas, enquanto que no caso dos híbridos diplóides a aditividade nos *loci* poderá não se manter pela ocorrência de recombinação (Crawford, 1990).

No caso dos autopoliplóides, uma vez que estes possuem cópias genómicas que são geneticamente similares ou idênticas será de esperar a ocorrência dos mesmos alelos que existem no presumível (ou presumíveis) progenitor diplóide. Se o poliplóide é de origem recente então não deverá exibir alelos únicos; contudo, este poderá também não apresentar todos os alelos presentes no progenitor diplóide (Soltis e Rieseberg, 1986).

Ao contrário dos alopoliplóides, os autopoliplóides não possuem uma hereditariedade dissômica das isoenzimas nem uma heterozigosidade fixa. No caso particular dos autotetraplóides, estes caracterizam-se por uma hereditariedade tetrassômica, já que, contendo quatro conjuntos de cromossomas homólogos, existem idênticas probabilidades para a ocorrência de emparelhamento entre cada um dos quatro cromossomas.

3.7 As isoenzimas na identificação varietal

Bailey (1983) considera os seguintes três critérios para avaliar o potencial de uma característica na descrição e identificação varietal :

- i) estabilidade face ao meio ambiente;
- ii) variação intervarietal identificável;
- iii) variação intravarietal mínima.

3.7.1 Estabilidade ambiental

Para além do carácter expedito das análises, o que torna a análise das isoenzimas extremamente importante é a sua aparente estabilidade face aos factores ambientais.

Considerando-se que em condições padronizadas as isoenzimas têm idêntica oportunidade para experimentar modificações conformacionais devido ao ambiente químico (por exemplo, efeitos da concentração, temperatura, interacções iónicas, etc.), as variações observadas entre zimogramas de diferentes variedades ou cultivares poderão ser atribuídas às diferenças genotípicas entre os *taxa* em comparação (Bailey, 1983).

As condições ambientais não interferem na composição e na sequência dos aminoácidos das isoenzimas e, conseqüentemente, na posição das bandas, embora possam afectar a actividade génica controlando o nível ou a fase de expressão génica.

Alguns factores ambientais como as baixas temperaturas, algumas doenças, danos mecânicos e agentes poluentes atmosféricos, são apontados, na bibliografia, como potenciais elementos determinantes da actividade dos genes para as isoenzimas (Shannon, 1968; McCown, 1969; Roberts, 1969; Curtis e Howell, 1971).

Contudo, a maioria dos trabalhos, realizados no sentido de avaliar a importância de factores ambientais na expressão de genes para as isoenzimas realçam a existência de baixa interacção (citem-se, a título de exemplo, os trabalhos de Cherry e Ory, 1973; Gates e Boulter, 1979; Bringhurst, *et al.*, 1981; Ostergraard e Nielsen, 1981; Cabral, 1990).

3.7.2 Variação intervarietal

Os estudos de variação intervarietal baseiam-se na detecção de diferenças qualitativas e quantitativas entre zimogramas de variedades ou cultivares da mesma espécie.

Considera-se que existe variação qualitativa quando uma determinada banda isoenzimática, caracterizada pela sua taxa de migração, está presente no zimograma de uma cultivar ou variedade mas ausente no zimograma de uma outra variedade ou cultivar, da mesma espécie. As bandas deste tipo são designadas polimórficas, e o número de bandas polimórficas detectáveis determina o valor de um sistema isoenzimático na identificação varietal.

O número de bandas polimórficas observadas no zimograma é função do número de *loci*, do número de alelos por *locus* e da estrutura quaternária do sistema enzimático em estudo.

Verifica-se variação quantitativa quando se observa uma determinada banda nos zimogramas de duas cultivares ou variedades diferentes, mas que difere pela intensidade de

coloração. A variação quantitativa, ao contrário da variação qualitativa, não proporciona diferenças evidentes, pelo que a sua utilização na identificação varietal tem menos interesse. Além disso, a expressão das diferenças quantitativas é normalmente afectada por variações ambientais e ontogénicas, o que dificulta a sua interpretação.

Contudo, apesar da sua menor reprodutibilidade, a variação quantitativa poderá ser utilizada na identificação varietal, pois nalgumas situações, as diferenças quantitativas expressam-se independentemente da variação ambiental e ontogénica. Assim, Payne e Koszykwocki (1978), utilizando sementes de soja, realizaram a distinção entre cultivares, com base na diferente intensidade de coloração existente em duas bandas da enzima esterase, não sendo estas afectadas pelas diferenças fisiológicas existentes entre lotes de sementes. Também Wehner *et al.* (1976) utilizaram diferenças de natureza quantitativa, na enzima peroxidase, para caracterizar cultivares de *Poa pratensis*.

Normalmente, quando se realiza a comparação de cultivares ou variedades com base nas diferenças de natureza quantitativa, são rejeitadas as bandas que apresentam variabilidade intravarietal, sendo utilizadas apenas aquelas onde se verifica variabilidade intervarietal. Pode-se tomar como elemento de referência uma ou mais bandas, existentes em todas as populações, e que possuam uma coloração acentuada e constante.

3.7.3 Variação intravarietal

Considera-se que existe variação intravarietal quando se observam distintos zimogramas entre indivíduos da mesma cultivar ou da mesma variedade.

Nas cultivares das espécies propagadas por via vegetativa, o fenótipo isoenzimático deverá ser extremamente uniforme e estável, pelo que não será de esperar variação intravarietal, pois tanto os genótipos homozigóticos como os heterozigóticos são estabilizados ou "congelados" por esse processo de multiplicação. Os indivíduos dessas cultivares possuem o mesmo genótipo, pelo que a sua análise não requer uma amostragem muito exaustiva (Simpson e Withers, 1986).

Nas espécies autogâmicas, reproduzidas por via seminal, as cultivares, na sua maioria, são formadas por mais de um genótipo, mesmo que a selecção tenha sido conduzida com o objectivo de obter um fenótipo morfológica e fisiologicamente uniforme (Singh *et al.*, 1973; Almgård e Landegren, 1974; Almgård e Clapham, 1975), pelo que é expectável alguma variabilidade intravarietal para alguns sistemas enzimáticos, embora para outros possa existir grande uniformidade.

A ocorrência de variação intravarietal representa uma séria limitação à utilização das isoenzimas na identificação de variedades e cultivares. Neste caso, e em plantas autogâmicas,

poder-se-á tentar ultrapassar o problema optando por uma das seguintes metodologias (Bailey, 1983): o estudo de bandas que revelam perfeita uniformidade intravarietal, mas que diferem de cultivar para cultivar; ou, alternativamente, a selecção de linhas que apresentem zimogramas idênticos seguida da sua multiplicação massal.

Nas espécies alogâmicas, estando as populações em polinização livre, a heterozigosidade e a variabilidade intravarietal são elevadas. Neste caso, não interessa seleccionar pela uniformidade isoenzimática em um ou mais *loci*, devido aos efeitos adversos que esta selecção poderá ter no desempenho agronómico. Uma alternativa possível, para distinguir variedades e cultivares, é a comparação das frequências alélicas isoenzimáticas (Hayward e Mcdam, 1977; Nielson, 1980; Ostergaard e Nielsen, 1981; Bailey, 1983), o que pressupõe não só o conhecimento do controlo génico das isoenzimas como também o estudo de um grande número (> 100) de indivíduos (Bailey, 1983; Simpson e Withers, 1986). Contudo, a comparação de variedades com base nas frequências alélicas não satisfaz totalmente as exigências impostas pelos organismos legais de certificação (Bailey, 1983).

Nalgumas espécies alogâmicas é possível e economicamente viável a produção de variedades híbridas, com a exploração do vigor híbrido ou *heterosis*, resultando estas do cruzamento controlado entre linhas puras. Os padrões isoenzimáticos das linhas ou dos híbridos resultantes do seu cruzamento deverão ser bastante uniformes permitindo portanto aferir a pureza de lotes comerciais de semente, sendo possível detectar a contaminação por pólen estranho na geração referente à produção da semente híbrida, ou nas gerações antecedentes referentes à produção das linhas puras (Cardy e Kannenberg, 1982).

3.8 Factores laboratoriais afectantes dos resultados

São vários os factores que condicionam as características de separação, resolução e definição dos zimogramas, nomeadamente: as modificações no meio de extracção; a composição e porosidade do gel; a composição e pH das soluções tampão; a voltagem durante a electroforese; o método de revelação (substrato enzimático, corante e a temperatura durante a revelação) (Makinen e McDonald, 1968; Almgård e Norman, 1970; Wilkinson e Beard, 1972; Bassiri, 1976).

O tipo de tecido e a idade fisiológica do material vegetal podem afectar os padrões isoenzimáticos. Também as diferenças na qualidade da semente (avaliável, por exemplo, pela faculdade germinativa) podem afectar quantitativamente ou, com menor frequência, qualitativamente os padrões isoenzimáticos.

De maneira a assegurar a reprodutibilidade laboratorial dos resultados, dever-se-á tentar o controlo de todos os factores que possam introduzir variação no fenótipo isoenzimático. Tal

implica, não só a realização de estudos preliminares para a aferição dos processos laboratoriais de extracção das enzimas, separação electroforética e coloração, como também a manipulação do material vegetal em idênticas condições ambientais.

3.9 Isoenzimas no género *Vigna*

Poucos têm sido os trabalhos realizados no género *Vigna* no âmbito do estudo das isoenzimas, não existindo, até ao momento, referências relativamente ao caso particular da espécie *Vigna unguiculata*. Assim, por exemplo, Chen *et al.* (1989) utilizaram os perfis de três sistemas enzimáticos (chiquimato desidrogenase, esterase e 6-fosfogluconato desidrogenase) como marcadores bioquímicos para autenticar os híbridos resultantes dos cruzamentos entre as espécies *Vigna radiata* (L.) Wilczek e *Vigna glabrescens*. Num outro estudo, Jaaska e Jaaska (1989), através da comparação dos perfis de vários sistemas enzimáticos (chiquimato desidrogenase, glucose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogluconato desidrogenase, esterase, peroxidase, aspartato aminotransferase e superóxido dismutase) conseguiram evidências que permitem considerar as espécies *Vigna radiata* (L.) Wilczek e *V. mungo* (L.) Hepper como entidades distintas (apesar da sua proximidade fenotípica), tendo concluído que, provavelmente, a sua diferenciação terá ocorrido antes do processo de domesticação.

Pretendeu-se com este trabalho estudar a variabilidade genética de algumas populações nacionais e exóticas da espécie *Vigna unguiculata* utilizando a metodologia de electroforese de isoenzimas. Especificamente podemos enumerar os objectivos que lhe presidiram da seguinte forma:

- i) estudo comparativo das condições experimentais e dos padrões de expressão das isoenzimas em diferentes tecidos;
- ii) estabelecimento de relações de identidade entre as três subespécies cultivadas de *Vigna unguiculata*;
- iii) detecção de polimorfismos isoenzimáticos que permitam a identificação das diferentes cultivares da subsp. *unguiculata*;
- iv) estudo da variabilidade entre diferentes cultivares da subsp. *unguiculata*, e dentro de cada cultivar da variabilidade intrapopulacional e interpopulacional.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Material biológico

Estudaram-se amostras de 24 populações nacionais e exóticas, da espécie *Vigna unguiculata*, distribuídas por três subespécies: *unguiculata* (21 populações), *sesquipedalis* (1 população) e *cylindrica* (2 populações).

Parte do germoplasma estudado (10 amostras) foi colhido por nós em 1989 (Figuras 4.1 e 4.2), encontrando-se armazenado na ESACB (Escola Superior Agrária de Castelo Branco), sendo as restantes amostras provenientes do NUMI (11 amostras) (Núcleo de Melhoramento de Milho, Braga) e de um banco de germoplasma dos USA (3 amostras), o SRPIS (Southern Regional Plant Introduction Station, Griffin). A sua identificação e procedência está descrita no Quadro 4.1.

De acordo com a descrição realizada por Castilho (1951), com base exclusivamente nas características das sementes, as amostras estudadas da subsp. *unguiculata* foram distribuídas pelas seguintes cultivares (entre parêntesis indica-se o número de amostras): "Amarelo" (4), "Arroz" (1), "Comum" (3), "Gigante de Marialva" (12) e "Cream" (1), sendo esta última de origem americana (Quadro 4.1).

A amostra da subsp. *sesquipedalis* foi colhida no Sul de Portugal e as duas amostras estudadas da subsp. *cylindrica* são originárias da Índia e do Paquistão.

Conforme indicado (secção 2.4), o feijão-frade é uma espécie autogâmica, embora não seja de descurar a possibilidade de ocorrência de alguma polinização cruzada. Tal condicionou a prospecção realizada no campo, pelo que, esperando-se encontrar maior variabilidade interdo que intrapopulacional optou-se pela colheita de amostras de menor dimensão (cerca de 100 indivíduos/população), tendo-se visitado um maior número de locais. Como se pode observar (Fig 4.1) as amostras nacionais pertencem exclusivamente a populações do Interior do País, zona onde esta cultura ainda tem alguma representatividade.

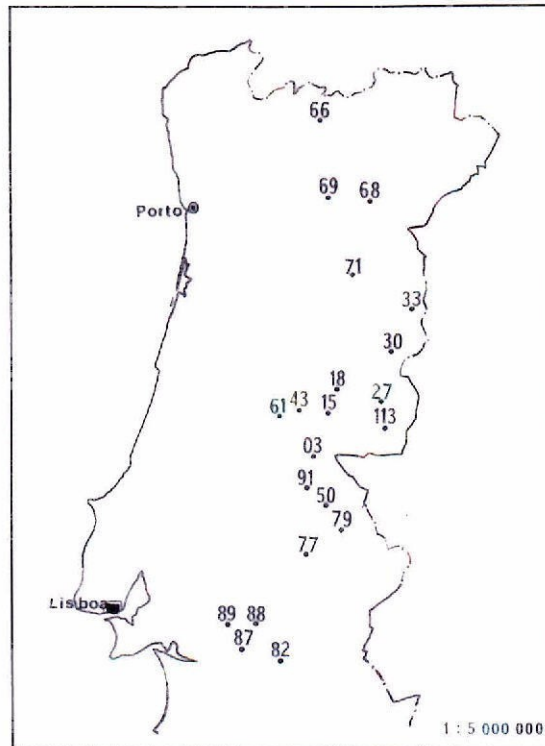


Fig. 4.1 - Distribuição geográfica das populações nacionais de *Vigna unguiculata* estudadas.

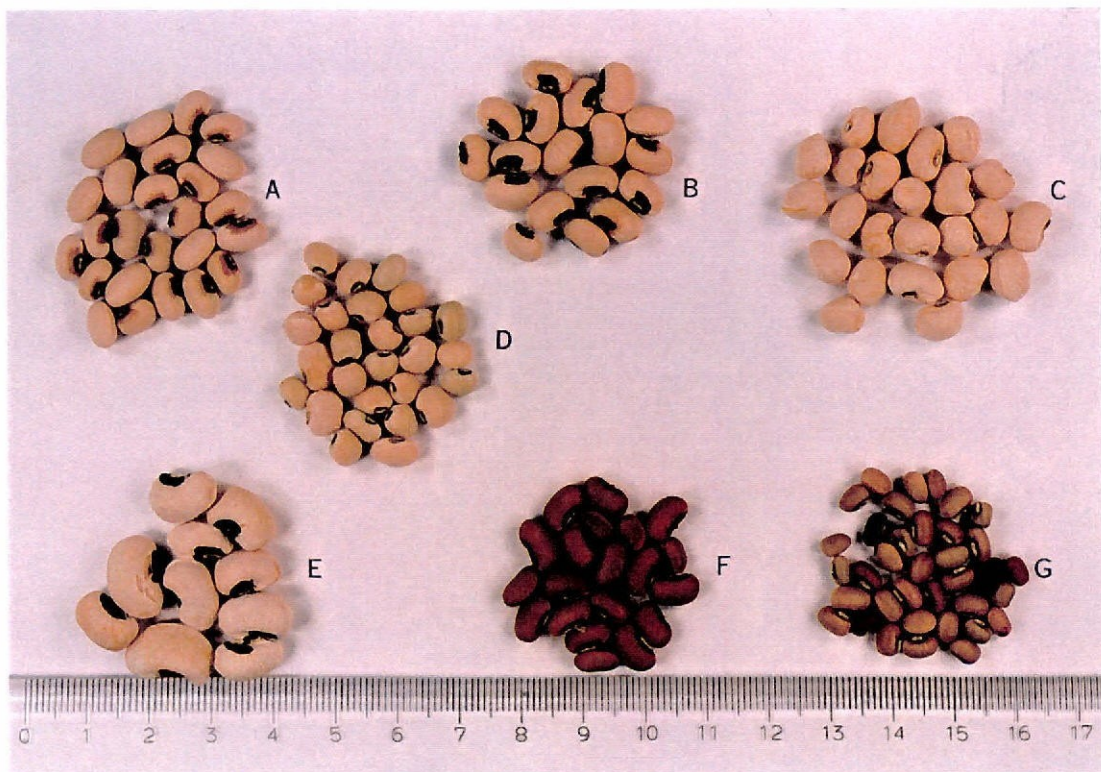


Fig. 4.2 - Aspecto da variabilidade morfológica da semente de algumas das amostras estudadas. A, cv. "Amarelo"; B, cv. "Comum"; C, cv. "Cream"; D, cv. "Arroz"; E, cv. "Gigante de Marialva"; F, subsp. *sesquipedalis*; G, subsp. *cylindrica* (unidade da régua: cm).

Quadro 4.1 - Identificação das amostras de *Vigna unguiculata* estudadas.^a

Amostra	Origem		Local de colheita (Concelho)	Subespécie	Designação
	Instituição	País			
03	ESACB	PRT	Castelo Branco	<i>unguiculata</i>	Amarelo
15	ESACB	PRT	Castelo Branco	<i>unguiculata</i>	Comum
18	ESACB	PRT	Fundão	<i>unguiculata</i>	Amarelo
27	ESACB	PRT	Idanha-a-Nova	<i>unguiculata</i>	Amarelo
30	ESACB	PRT	Penamacor	<i>unguiculata</i>	Comum
33	ESACB	PRT	Almeida	<i>unguiculata</i>	Gigante Marialva
43	ESACB	PRT	Oleiros	<i>unguiculata</i>	Comum
50	ESACB	PRT	Nisa	<i>unguiculata</i>	Gigante Marialva
61	ESACB	PRT	Oleiros	<i>unguiculata</i>	Gigante Marialva
66	NUMI	PRT	Chaves	<i>unguiculata</i>	Gigante Marialva
68	NUMI	PRT	Vila Flor	<i>unguiculata</i>	Gigante Marialva
69	NUMI	PRT	Alijó	<i>unguiculata</i>	Gigante Marialva
71	NUMI	PRT	Trancoso	<i>unguiculata</i>	Gigante Marialva
77	NUMI	PRT	Fronteira	<i>unguiculata</i>	Gigante Marialva
79	NUMI	PRT	Portalegre	<i>unguiculata</i>	Gigante Marialva
82	NUMI	PRT	Évora	<i>sesquipedalis</i>	—
87	NUMI	PRT	Montemor-o-Novo	<i>unguiculata</i>	Gigante Marialva
88	NUMI	PRT	Montemor-o-Novo	<i>unguiculata</i>	Gigante Marialva
89	NUMI	PRT	Montemor-o-Novo	<i>unguiculata</i>	Gigante Marialva
91	NUMI	PRT	Nisa	<i>unguiculata</i>	Amarelo
102	SRPIS	USA	—	<i>unguiculata</i>	Cream
106	SRPIS	IND	—	<i>cylindrica</i>	—
107	SRPIS	PAQ	—	<i>cylindrica</i>	—
113	ESACB	PRT	Idanha-a-Nova	<i>unguiculata</i>	Arroz

^a ESACB, Escola Superior Agrária de Castelo Branco; NUMI, Núcleo de Melhoramento de Milho, Braga; SRPIS, Southern Regional Plant Introduction Station, USA; PRT, Portugal; USA, Estados Unidos da América; IND, Índia; PAQ, Paquistão.

4.1.2 Equipamento

As focagens isoelectricas e as electroforeses de zona em tampão descontínuo foram realizadas num aparelho PhastSystem™ da firma Pharmacia, tendo-se utilizado, respectivamente, o suporte com eléctrodos de titânio platinizado de polaridade normal e o de polaridade reversa. Nas focagens isoelectricas empregaram-se os meios de separação PhastGel IEF 3-9, PhastGel IEF 5-8 e PhastGel IEF 4-6.5. Nas electroforeses de zona em tampão descontínuo utilizou-se o meio de separação PhastGel HOM 20, as esponjas para tampão de eléctrodos (PhastGel buffer strips) e a respectiva placa de suporte (PhastGel buffer strip holder). Para a colocação dos extractos das amostras sobre o gel, recorremos ao aplicador de amostras 8/1 (aplicação simultânea de 8 amostras de 1µl cada) e à placa de alvéolos (PhastGel Sample-Well Stamp).

4.1.3 Reagentes

Os reagentes utilizados na revelação das enzimas estudadas encontram-se listados no Anexo 1, sendo designados o fabricante e a referência do produto.

Os restantes reagentes comuns de laboratório utilizados eram de qualidade pró-análise, tendo sido fornecidos pelas firmas Sigma, Merck e Riedel-de-Haën.

4.2 Métodos

4.2.1 Extracção de isoenzimas

Extractos de diferentes de tecidos podem ser utilizados para separação de isoenzimas por electroforese. A escolha do tecido vegetal recai frequentemente sobre cotilédones sujeitos a imbibição, sementes germinadas ou folhas jovens que, tipicamente, contêm elevada actividade enzimática (Wendel e Weeden, 1990).

Independentemente do tecido escolhido, importa assegurar que as amostras em estudo provenham de órgãos idênticos de organismos desenvolvidos em condições ambientais semelhantes de modo a minimizar quaisquer variações qualitativas ou quantitativas consequentes desses parâmetros.

O isolamento de enzimas envolve a ruptura de tecidos, com a inevitável mistura, quando se procede à maceração e homogeneização, de substâncias que *in vivo* se encontram compartimentadas. Deste facto, resulta com frequência a perda de actividade de algumas enzimas, ou o isolamento de outras que, embora activas, se encontram mais ou menos modificadas relativamente à sua forma nativa (Cabral, 1990).

As células vegetais contêm, nas paredes e nos vacúolos, vários compostos responsáveis pela instabilidade das proteínas. Destes, salientam-se os compostos fenólicos que podem formar complexos com as enzimas, observando-se a perda da actividade enzimática e/ou produção de determinados artefactos.

Este problema é quase sempre mais acentuado nas folhas do que na semente. Além disso, o tecido seminal está menos sujeito às flutuações ambientais do que os tecidos vegetativos proporcionando por isso resultados mais fidedignos (Castro, 1988),

Embora seja difícil fazer previsões acerca da sua eficácia, existem disponíveis vários compostos, que podem ser adicionados à solução de extracção, destinados a evitar a formação de produtos resultantes da interacção das proteínas com os compostos fenólicos. Uma revisão pormenorizada acerca dos principais compostos protectores utilizados na extracção das enzimas é apresentada por Cabral (1990).

Adicionalmente, dever-se-á ter em conta a relação entre o volume da solução de extracção e o peso do tecido utilizado para análise (relação volume/peso). À semelhança do que acontece com a escolha da solução tampão e do(s) produto(s) protector(es) mais adequado(s), a optimização deste parâmetro é, normalmente, feita de maneira empírica, pela realização de ensaios prévios, embora de uma forma geral se considere que as amostras devem ser obtidas num volume mínimo de solução de extracção. Pode suceder, porém, que as amostras obtidas em volumes mínimos se revelem piores do que aquelas obtidas com volumes maiores, devido, provavelmente, à complexação incompleta dos compostos fenólicos (Wendel e Weeden, 1990)

Foram estudados diferentes tecidos vegetais, nomeadamente, cotilédones de sementes não embebidas e, de plântulas com 15 dias, folhas, caules e raízes, tendo-se comparado diferentes soluções de extracção:

- i) sacarose 0,4M;
- ii) tampão pH 7,1 de Tris-HCl 0,1M;
- iii) tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2M
- iv) NaCl 0,1M
- v) tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2M + mercaptoetanol 10 mM + tioglicolato de sódio 50 mM + PVP 0,1g/ml.

No caso dos extractos de cotilédones utilizou-se uma relação volume/peso de 2/1 e no caso dos restantes tecidos estudaram-se as relações de 1/2 e de 1/4.

Para o estudo das isoenzimas das folhas, caules e raízes, colocaram-se as sementes, não inoculadas, em discos de turfa "JIFFY 7", tendo-se efectuado a rega com água destilada sempre que necessário. O crescimento processou-se em câmara de crescimento climatizada a uma temperatura de 25°C dia e 20°C noite, com fotoperíodo dia/noite de 16/8. Os extractos para análise electroforética foram obtidos a partir de plântulas com aproximadamente 15 dias. No caso das raízes procedeu-se à sua lavagem, primeiro com água corrente e depois com água destilada, com o objectivo de remover os detritos aderentes. A água em excesso foi retirada utilizando-se papel absorvente, após o que se realizou imediatamente a extracção das isoenzimas.

Para a extracção das enzimas procedeu-se à maceração, realizada manualmente, e à homogeneização do tecido vegetal com a solução de extracção. Após um período de extracção de 60 minutos, o macerado foi centrifugado a 14 000 rpm (12 928 g) durante 20 minutos. Ambas as operações decorreram a uma temperatura de $\pm 5^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante, desta forma obtido, foi imediatamente utilizado para migração electroforética, ou acondicionado a $\pm 5^{\circ}\text{C}$ para posterior utilização.

4.2.2 Electroforese

A electroforese é uma técnica analítica indicada para individualizar os componentes de uma mistura, baseando-se no princípio da mobilidade diferencial das moléculas carregadas electricamente, num determinado suporte, quando submetidas à acção de um campo eléctrico. O meio de suporte deverá ter características que permitam minimizar os efeitos da difusão e da convecção, facilitando, ao mesmo tempo, a imobilização das moléculas individualizadas.

Podem ser utilizados vários tipos de matrizes, nomeadamente o amido, a agarose e o acetato de celulose. Contudo, as melhores resoluções conseguem-se com a electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (Dunn, 1989). O gel de poliacrilamida resulta da polimerização do monómero acrilamida em longas cadeias, cuja interligação é assegurada pela inclusão de um co-monómero, normalmente N'N-metileno bisacrilamida (bisacrilamida ou BIS) (Andrews, 1986). A composição de um gel de poliacrilamida é normalmente descrita por dois parâmetros, T% e C%. O valor T% representa a concentração total (expressa em g/100 ml) do monómero utilizado na produção do gel (acrilamida mais bisacrilamida); C é a percentagem (em peso) do monómero que funciona como agente de interligação. O diâmetro dos poros do gel de poliacrilamida é influenciado pela concentração total de monómeros na mistura de polimerização e pelo grau de interligação com BIS. Embora inicialmente se considerasse que, independentemente do valor de T%, o diâmetro de poro seria mínimo para um valor de C igual a 5%, actualmente sabe-se que para valores de T relativamente elevados (acima de 15%) a quantidade de C (BIS) necessária para obter uma dimensão de poro mínima aumenta com o valor de T% (Hames, 1990).

Existem vários tipos de técnicas electroforéticas que permitem separar as proteínas com base numa ou na combinação das propriedades: dimensão, forma, densidade de carga e hidrofobicidade relativa.

A electroforese de zona contínua (CZE) é a técnica de PAGE mais simples envolvendo a utilização de um sistema tampão homogéneo e um gel de poliacrilamida de concentração uniforme. Embora relativamente simples este método apresenta a desvantagem de proporcionar uma baixa resolução.

Na electroforese de zona descontínua (MZE) utilizam-se soluções tampão de gel e de eléctrodos diferentes, existindo, na maioria dos sistemas, descontinuidade na composição das soluções tampão e no pH. A grande vantagem da MZE é que permite obter boas resoluções quando se trabalha com amostras muito diluídas, já que as biomoléculas são concentradas em zonas estreitas durante a migração num gel concentrador, que possui grande dimensão de poro, antes da sua separação sobre um gel resolvente de menor dimensão de poro (Hames, 1990).

Na focagem isoelectrica (IEF) as proteínas são separadas na presença de um gradiente contínuo de pH. Nestas condições, as proteínas migram de acordo com a sua carga até atingirem uma zona de pH no gel que coincide com o seu ponto isoelectrico (pI). A focagem isoelectrica proporciona, geralmente, uma melhor resolução do que a electroforese de zona, contudo, para determinados sistemas enzimáticos (como por exemplo as desidrogenases), conseguem-se frequentemente melhores resultados com a electroforese de zona (Roux, 1987).

Uma desvantagem dos sistemas de electroforese convencionais é a morosidade das análises. Uma separação electroforética, realizada de acordo com essas técnicas, pode demorar várias horas. A introdução de sistemas miniaturizados de electroforese, nos quais as distâncias de separação são significativamente reduzidas, tornou possível a execução extremamente rápida das separações, além do que, sendo mais eficiente a dissipação do calor, é possível aplicar gradientes de voltagem mais elevados. Outras vantagens associadas aos sistemas miniaturizados são a maior facilidade na revelação das enzimas, a maior economia em reagentes e a possibilidade de utilizar quantidades mínimas de amostra nas análises (Andrews, 1986).

Em ensaios preliminares, com o objectivo de seleccionar a técnica de electroforese mais adequada para a separação de isoenzimas da espécie em estudo, realizaram-se electroforeses de zona em tampão descontínuo e focagens isoelectricas.

4.2.2.1 Electroforese de zona em tampão descontínuo

A electroforese descontínua foi realizada em gel de poliacrilamida (PAGE descontínua) num aparelho PhastSystem™, utilizando-se para o efeito o gel de poliacrilamida PhastGel HOM 20 (gel concentrador: T 7,5% e C 3%; gel resolvente T 20% e C 2%), de dimensões 50 x 43 x 0,45 mm. Utilizámos um sistema tampão com descontinuidade no pH e na concentração das espécies iónicas, modificado do sistema de Ornstein-Davis para lactato de sódio/glicina (adaptado de Cauderon *et al.*, 1978 e Branlard *et al.*, 1990, citados por Graça, 1992).

O gel foi imerso em 3 x 30 ml de tampão pH 3,08 de lactato de sódio/glicina (10mM/10mM), de forma a substituir o tampão original (os PhastGel contêm de origem tampão pH 6,5 de Tris-acetato de sódio 0,112 M), com agitação, durante 3 x 10 minutos. Os PhastGel Electrode Strips (esponjas para tampão de electrodos) foram imersos em 20 ml de tampão pH 2,75 de lactato de sódio/glicina (10mM/50mM), durante 30 minutos. As soluções foram preparadas, na altura da sua utilização, a partir de "soluções mãe" de glicina 10 mg/ml (0,13 M) e lactato de sódio 0,1 M, tendo sido corrigido o pH com ácido láctico 90% (v/v). As esponjas para tampão de electrodos foram depois colocadas nos espaços existentes na placa

suporte (PhastGel buffer strip holder), a qual tem também por função, durante a electroforese, proteger o gel da dessecação (Pharmacia, 1990).

Para cada placa de gel utilizámos um pente de aplicação simultânea de 8 amostras (1µl em cada capilar do aplicador), o qual foi colocado na posição mais catódica do suporte. As condições de separação utilizadas, nomeadamente voltagem, corrente, potência, temperatura e tempo de corrida, estão descritas no Quadro 4.2.

Quadro 4.2 - Condições de separação para PAGE com PhastGel HOM 20.

Passo	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Temperatura (°C)	Tempo (Vh)
Aplicação das amostras	50	1,0	3,5	15	10
Separação ^a	200	5,0	3,5	15	50
	400	12,5	3,5	15	90

^a A corrida termina após 150 Vh acumulados (aproximadamente 50 minutos)

4.2.2.2 Focagem isoelectrica

As focagens isoelectricas foram realizadas num aparelho PhastSystem™, tendo-se utilizado os meios de separação PhastGel IEF 3-9, PhastGel IEF 5-8 e PhastGel IEF 4-6.5, com gradiente de pH de 3 a 9, de 5 a 8 e de 4 a 6,5. Os referidos meios de separação, são géis homogéneos de poliacrilamida (T 5%, C 3%), de dimensões 50 x 43 x 0,35 mm, contendo anfólitos transportadores Pharmalyte® que permitem gerar gradientes de pH lineares e estáveis. A utilização dos meios de separação PhastGel IEF não requiere o uso de esponjas para tampão de eléctrodos.

As condições de separação, nomeadamente, voltagem, corrente, potência, temperatura e tempo de corrida, realizaram-se, para cada tipo de gel, de acordo com a técnica indicada pelo fabricante, estando especificadas nos Quadros 4.3, 4.4 e 4.5. O tempo de duração de cada focagem isoelectrica foi de aproximadamente 25 minutos em IEF 4-6,5 e 30 minutos em IEF 3-9 e IEF 5-8.

Nos três tipos de gel utilizados, realizou-se uma pré-focagem antes da aplicação das amostras. Com efeito, as enzimas, bem como outras moléculas sensíveis, são instáveis em condições de baixa força iónica, particularmente para valores de pH próximos dos seus pIs. Nestes casos é vantajoso realizar a pré-focagem de forma a que o gradiente de pH se estabeleça antes de as amostras serem aplicadas (Andrews, 1981).

Para cada placa de gel utilizámos um pente de aplicação simultânea de 8 amostras (1 μ l em cada capilar do aplicador). As amostras foram aplicadas automaticamente no final da pré-focagem, tendo-se estudado o efeito do local de aplicação do pente (em isoelectrofocagem o aparelho permite três posições: catódica, mediana e anódica).

Após a separação procedeu-se de imediato à revelação das enzimas seleccionadas para o nosso estudo. A detecção das enzimas fez-se de forma manual, não se tendo utilizado a unidade automática de revelação do aparelho.

Quadro 4.3 - Condições de separação para focagem isoelectrica com PhastGel IEF 3-9. A pré-focagem dura aproximadamente 10 minutos (adaptado de Pharmacia, s.d.).

Passo	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Temperatura (°C)	Tempo (Vh)
Pré-focagem	2000	2,5	3,5	15	75
Aplicação das amostras ^a	200	2,5	3,5	15	15
Focagem	2000	2,5	3,5	15	410

^a O aplicador de amostras é colocado sobre o gel após 75 Vh, levantando após 15Vh (total: 90 Vh).

Quadro 4.4 - Condições de separação para focagem isoelectrica com PhastGel IEF 5-8. A pré-focagem dura aproximadamente 8 minutos (adaptado de Pharmacia, s.d.).

Passo	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Temperatura (°C)	Tempo (Vh)
Pré-focagem	2000	2,0	3,5	15	75
Aplicação das amostras ^a	200	2,0	3,5	15	15
Focagem	2000	5,0	3,5	15	510

^a O aplicador de amostras é colocado sobre o gel após 75 Vh, levantando após 15Vh (total: 90 Vh)

Quadro 4.5 - Condições de separação para focagem isoelectrica com PhastGel IEF 4-6.5. A pré-focagem dura aproximadamente 6 minutos (adaptado de Pharmacia, s.d.).

Passo	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Temperatura (°C)	Tempo (Vh)
Pré-focagem	2000	2,0	3,5	15	75
Aplicação das amostras ^a	200	2,0	3,5	15	15
Focagem	2000	5,0	3,5	15	410

^a O aplicador de amostras é colocado sobre o gel após 75 Vh, levantando após 15Vh (total: 90 Vh)

4.2.3 Detecção de isoenzimas

A adaptação das técnicas de revelação histoquímica para electroforese de isoenzimas, permitindo detectar apenas as bandas que apresentam o mesmo tipo de actividade, foram introduzidas por Hunter e Markert em 1957. O fundamento da técnica baseia-se em adicionar ao gel, onde idealmente estarão separadas e activas todas as bandas das diferentes enzimas existentes na amostra, um substrato específico para a enzima que se pretende revelar. Subsequente combinação dos produtos da reacção enzimática com um corante adequado irá revelar *in situ* os locais de actividade da enzima em análise (Castro, 1989). O conjunto das bandas de cada amostra reveladas sobre o gel é designado de zimograma.

A técnica clássica de detecção enzimática baseia-se na produção de um precipitado corado não difusível no local de actividade enzimática. Contudo, com a introdução de novas metodologias o conceito foi alargado incluindo qualquer reacção ou conjunto de reacções que revelem, por meios físicos e/ou químicos, uma zona discreta (banda) de actividade enzimática (Vallejos, 1983).

A realização das reacções enzimática e de acoplamento numa única solução permite minimizar alguns efeitos adversos, que frequentemente se verificam quando estas são conduzidas separadamente. Assim, por exemplo, no método de sal de diazónio, utilizado para detecção de diversas hidrolases, pode verificar-se a difusão do produto de hidrólise enzimática, aquando da realização da reacção enzimática, originando a má definição da coloração na reacção de acoplamento.

Se, idealmente, o pH da solução utilizada para a reacção enzimática deveria corresponder ao pH óptimo da enzima, em muitos casos este é diferente do pH óptimo para a reacção de acoplamento, sendo necessário, por isso, utilizar um valor de compromisso, quando se faz a detecção enzimática numa única solução (Vallejos, 1983).

No nosso estudo foram experimentados os sistemas enzimáticos constantes no Quadro 4.6.

Quadro 4.6 - Relação dos sistemas enzimáticos ensaiados.

Enzimas	Abrev.	Número E.C. ^a	Classe
Álcool desidrogenase	ADH	E.C. 1.1.1.1	Oxidoreductases
Glicerol 3-fosfato desidrogenase	G3P	E.C. 1.1.1.8	Oxidoreductases
Chiquimato desidrogenase	SKD	E.C. 1.1.1.25	Oxidoreductases
Glutamato desidrogenase	GDH	E.C. 1.4.1.2	Oxidoreductases
Peroxidase	PRX	E.C. 1.11.1.7	Oxidoreductases
Esterase	EST	E.C. 3.1.1.-	Hidrolases
Fosfatase ácida	ACP	E.C. 3.1.3.2	Hidrolases

^a Número da Comissão Internacional das Enzimas

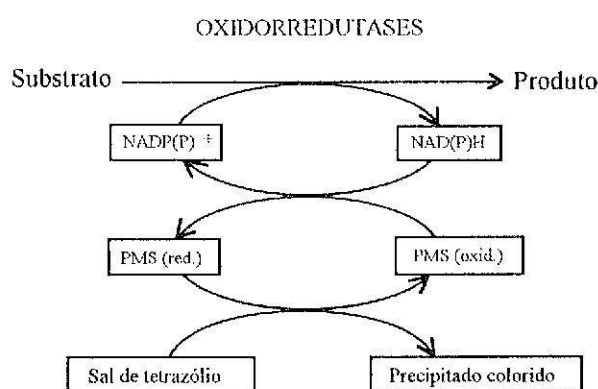
A metodologia utilizada na revelação das enzimas, foi adaptada de Vallejos (1983), Wendel e Weeden (1990) e May (1992) (em Anexo 2 descrevemos a metodologia utilizada na revelação dos sistemas enzimáticos constantes no quadro 4.6).

4.2.3.1 Álcool desidrogenase

É uma oxidorredutase que catalisa reacções do tipo :



Na revelação desta enzima foi utilizado o sal de tetrazólio MTT (metil tiazolil tetrazólio) que quando reduzido forma um precipitado corado e insolúvel. As reacções catalisadas pelas oxidorredutases envolvem a transferência de electrões de um substrato redutor para um aceitador (normalmente NAD(P)^+), podendo depois este funcionar como agente redutor numa outra reacção, nomeadamente a redução do sal de tetrazólio. A utilização de PMS (metosulfato de fenazina) como transportador intermediário de electrões, permite acelerar a reacção de redução do sal de tetrazólio. O conjunto de reacções pode ser esquematizado da seguinte forma (Vallejos, 1983):



A detecção enzimática foi realizada num único passo nas seguintes condições: solução tampão TRIS 0,1 M pH 7,5; NAD 0,45 mM; MTT 0,48 mM; PMS 0,13 mM; etanol 1,2 ml/20 ml de solução tampão. A incubação foi realizada no escuro à temperatura de 30 °C, durante 30 minutos.

4.2.3.2 Glicerol 3-fosfato desidrogenase

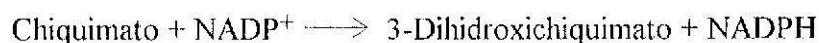
É uma oxidorreductase que catalisa reacções do tipo :



A detecção enzimática foi realizada num único passo nas seguintes condições: solução tampão TRIS 30 mM pH 8,0; glicerofosfato 3,08 mM; NAD 3,0 mM; MTT 0,48 mM; PMS 0,13 mM. Após a mistura dos reagentes com a solução tampão, a incubação foi realizada no escuro à temperatura de 30 °C, durante 30 minutos.

4.2.3.3 Chiquimato desidrogenase

É uma oxidorreductase que catalisa reacções do tipo :



A detecção enzimática foi realizada num único passo nas seguintes condições: solução tampão TRIS 0,1 M pH 7,5; ácido chiquímico 5,74 mM; NADP 0,2 mM; MTT 0,48 mM; PMS 0,13 mM. A incubação foi realizada no escuro à temperatura de 30 °C, durante 30 minutos.

4.2.3.4 Glutamato desidrogenase

É uma oxidorreductase que catalisa reacções do tipo :



A detecção enzimática foi realizada num único passo nas seguintes condições: solução tampão TRIS 0,1M pH 7,5; ácido glutâmico 47,3 mM; NAD 0,45 mM; MTT 0,48 mM; PMS 0,13 mM. Após a mistura dos reagentes com a solução tampão, a incubação foi realizada no escuro à temperatura de 30 °C, durante 30 minutos.

4.2.3.5 Peroxidase

As peroxidases são hemoproteínas que catalisam a decomposição do peróxido de hidrogénio na presença de um dador de electrões:



Na revelação desta enzima utilizámos o corante redox 3-amino-9-etilcarbazol (3A9EC), que em condições de oxidação sofre alterações de solubilidade e coloração (passa de castanho claro a vermelho).

De forma a definir as melhores condições de revelação, estudámos, neste sistema enzimático, o efeito da concentração da solução tampão, tendo para o efeito ensaiado as duas soluções: i) tampão pH 4,5 de acetato de sódio 50 mM (de acordo com Vallejos, 1983) e ii) tampão pH 5,0 de acetato de sódio 0,1M (de acordo com May, 1992). Testaram-se também diferentes concentrações de H_2O_2 , DMF e 3A9EC.

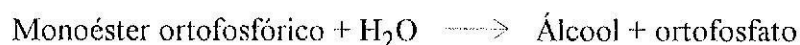
A detecção enzimática foi realizada num único passo, tendo a incubação decorrido a uma temperatura de 30 °C até ao aparecimento de bandas de coloração vermelho (processo que durou aproximadamente 30 minutos).

4.2.3.6 Esterase

Na revelação desta enzima utilizámos como substrato o acetato de α -naftilo e como corante o sal de diazónio Fast Blue RR nas concentrações respectivamente de 5,5 mM e 3,9 mM. A solução tampão foi TRIS pH 0,08M, tido a detecção enzimática sido realizada num único passo. A incubação foi realizada no escuro a 30 °C, durante 60 minutos, até ao aparecimento de bandas escuras.

4.2.3.7 Fosfatase ácida

É uma hidrolase que catalisa reacções do tipo :



Na revelação desta enzima utilizámos como substrato o fosfato ácido de α -naftilo e sódio e como corante o sal de diazónio Fast Garnet GBC, ambos na concentração de 20 mM.

A detecção enzimática foi realizada num único passo, tendo-se estudado as duas soluções tampão: i) tampão pH 5,5 de acetato de sódio 0,2 M (de acordo com Graça, 1992) e ii) Tampão pH 5,0 de acetato de sódio 50 mM (de acordo com Wendel e Weeden, 1990).

A incubação decorreu a uma temperatura de 40 °C até ao aparecimento de bandas de cor castanho escuro (processo que durou 30 a 45 minutos, de acordo com o tecido vegetal estudado).

Em análises prévias foi possível fazer a confirmação da especificidade do método de detecção enzimática pela adição de fluoreto de sódio, inibidor específico da fosfatase ácida, à solução de detecção enzimática.

4.2.4 Fixação e preservação dos géis

Após a revelação, os géis foram imersos, durante um período de aproximadamente 10 minutos, à temperatura ambiente, numa solução aquosa de ácido acético e glicerol (10%: 5%, v/v). Depois de secos, os géis foram cobertos com uma fina camada de glicerol e com uma película de polietileno (película que protege os géis na embalagem de origem), sendo armazenados, após a sua identificação, a uma temperatura de aproximadamente 5 °C.

No caso da enzima peroxidase observámos, nas primeiras análises, alguma degradação dos géis, pelo que, após o seu tratamento de acordo com o anteriormente referido, estes foram imediatamente fotografados (numa mesa de luz comum) e analisados. No que se refere ao sistema enzimático fosfatase ácida não observámos qualquer tipo de degradação durante o período em que decorreu este estudo, mesmo quando os géis se mantinham conservados à temperatura ambiente.

4.2.5 Cálculo da posição relativa de cada banda

As posições relativas de cada banda foram calculadas medindo directamente no gel as distâncias do centro de cada banda a um ponto de referência, tendo-se recorrido para o efeito à linha correspondente à posição do eléctrodo positivo. As medições foram efectuadas com uma régua de precisão em que a menor divisão da escala é 0,05 cm, cometendo-se assim, para além de erros aleatórios inerentes à medição, um erro sistemático de $\pm 0,025$ cm.

A numeração das bandas isoenzimáticas foi realizada de acordo com Webb (1964), tendo sido designada por banda número 1 a forma que se encontrava mais próxima do ânodo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo comparativo das condições experimentais

Foi realizado inicialmente um estudo comparativo das condições experimentais no sentido de definir as condições mais adequadas, de algumas das variáveis que influenciam os fenótipos, para a obtenção de um maior número de bandas e para o melhoramento da sua definição e resolução.

5.1.1 Álcool desidrogenase, glicerol 3-fosfato desidrogenase, chiquimato desidrogenase, glutamato desidrogenase e esterase.

No caso dos sistemas enzimáticos álcool desidrogenase, chiquimato desidrogenase, glicerol 3-fosfato desidrogenase e glutamato desidrogenase, não detectámos actividade enzimática em nenhum dos órgãos estudados: semente, raíz, caule e folha.

Poder-se-á tentar explicar estes resultados com base na ausência das isoenzimas ou, aceitando que estão presentes, estas deverão existir em concentrações muito reduzidas pelo que provavelmente a metodologia utilizada não tem sensibilidade suficiente que permita a sua detecção.

No caso da enzima esterase, sistema para o qual apenas se estudaram as isoenzimas da semente, embora tivesse sido detectada actividade enzimática não foi possível obter bons padrões de separação⁶, resolução⁷ e definição⁸.

De acordo com estes resultados, nenhum destes sistemas enzimáticos foi utilizado nas análises de comparação de genótipos (secção 5.2).

⁶ Distância entre o centro de bandas, independentemente da sua largura.

⁷ Distância entre o centro de bandas, relativamente à sua largura.

⁸ Nitidez dos contornos de uma banda.

5.1.2 Fosfatase ácida

Os zimogramas de fosfatase ácida, obtidos por focagem isoelectrica apresentavam um maior número de bandas, relativamente à electroforese por PAGE. A técnica de focagem isoelectrica parece ser, assim, mais sensível às diferentes propriedades dos isoenzimas de fosfatase ácida permitindo a sua separação num número mais elevado de bandas. De acordo com estes resultados, as restantes análises foram realizadas por focagem isoelectrica.

Neste sistema enzimático foram detectadas bandas em cotilédones e, em plântulas com aproximadamente quinze dias, nos órgãos raiz, caule e folha.

5.1.2.1 Semente

As sementes são frequentemente escolhidas para o estabelecimento de comparações entre diferentes *taxa* pelo facto de serem menos afectadas pelas condições ambientais, por serem pobres em compostos fenólicos, e por apresentarem, normalmente, maiores concentrações proteicas.

Começámos por utilizar o gel IEF 3-9 na análise dos extractos, já que, e uma vez que permite cobrir uma maior amplitude de pH, é aconselhável o seu uso quando se pretende estudar misturas proteicas relativamente complexas ou mal conhecidas (Pharmacia, s.d.). Com este tipo de gel obtiveram-se padrões isoenzimáticos com alguma complexidade e de fraca resolução, sendo difícil a contagem e medição das bandas (Fig. 5.1).

De maneira a otimizar a leitura dos padrões isoenzimáticos optámos por utilizar nas subsequentes separações os géis IEF 5-8 e IEF 4-6,5, os quais, possuindo gradientes de pH mais estreitos, permitiram uma melhor separação das bandas relativamente ao gel IEF 3-9. Através da comparação do mesmo extracto nos dois tipos de gel, é possível identificar as bandas que lhes são comuns e definir com maior exactidão o número de bandas com valores de pI compreendidos entre 4 e 8 (Fig. 5.2 e 5.3).

No que se refere ao local de aplicação dos extractos, teoricamente, estes deverão ser colocados num ponto do gradiente de pH próximo do seu pI. Tal permitirá reduzir o tempo necessário para que os componentes da amostra atinjam os seus pIs de equilíbrio, protegendo a amostra de regiões de pH onde se comporta de forma instável (Andrews, 1986). A este respeito, Righetti *et al.* (1990) referem que muitas das amostras estudadas podem ser aplicadas próxima do cátodo sem realizar a pré-focagem. Contudo, é aconselhável fazer a pré-focagem caso as proteínas sejam sensíveis à oxidação, ou instáveis para o pH médio do gel antes da separação. Deverá excluir-se a aplicação anódica para as amostras com elevado teor de sais e para proteínas que desnaturam a pH ácido. Assim, na maioria das situações, em que

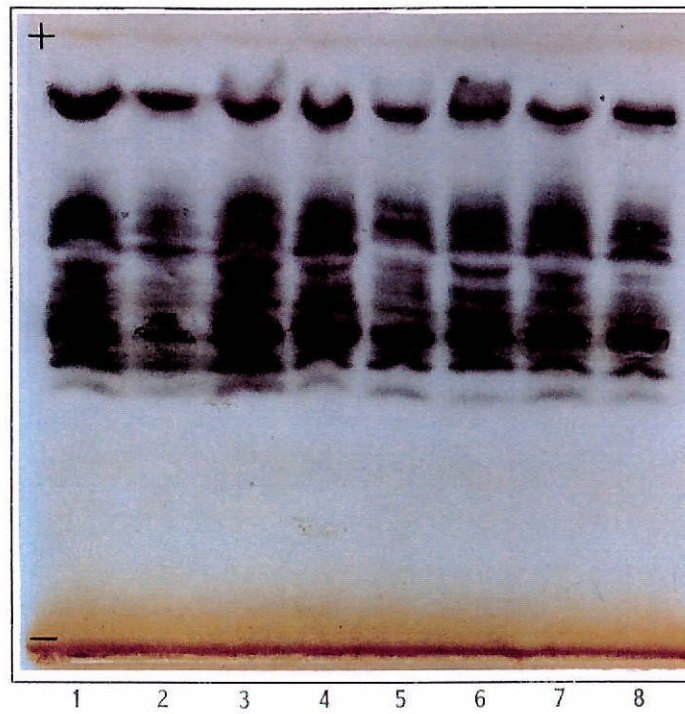


Fig. 5.1 - Zimogramas de fosfatase ácida de cotilédones de *Vigna unguiculata* obtidos por focagem isoelétrica em gel IEF 3-9. 1, cv. "Cream" (população 102); 2, 3, 4 e 5, cv. "Gigante de Marialva" (populações 50, 33, 79 e 77); 6, 7 e 8, cv. "Amarelo" (populações 27, 18 e 03). Extractos obtidos com Sacarose 0,4 M e aplicados na posição mediana; condições de coloração de acordo com o Anexo 2.

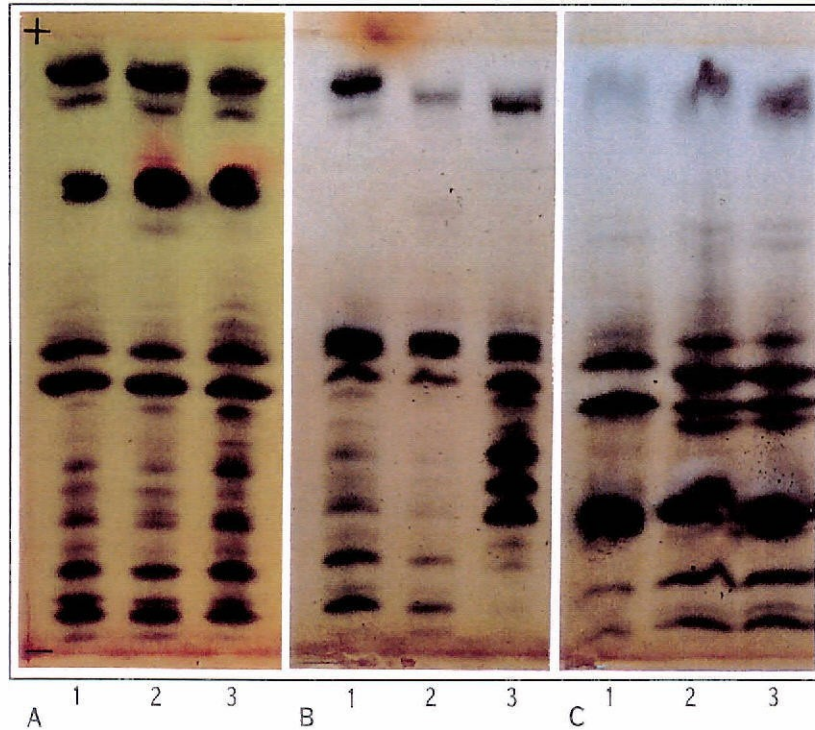


Fig. 5.2 - Zimogramas de fosfatase ácida de cotilédones de *V. unguiculata* obtidos por focagem isoelétrica em gel IEF 4-6,5; estudo de diferentes locais de aplicação das amostras. Posição do pente: A, anódica; B, mediana; C, catódica. 1, cv. "Cream"; 2 e 3 "Comum" (populações 43 e 30). Extractos obtidos com Sacarose 0,4 M; condições de coloração de acordo com o Anexo 2.

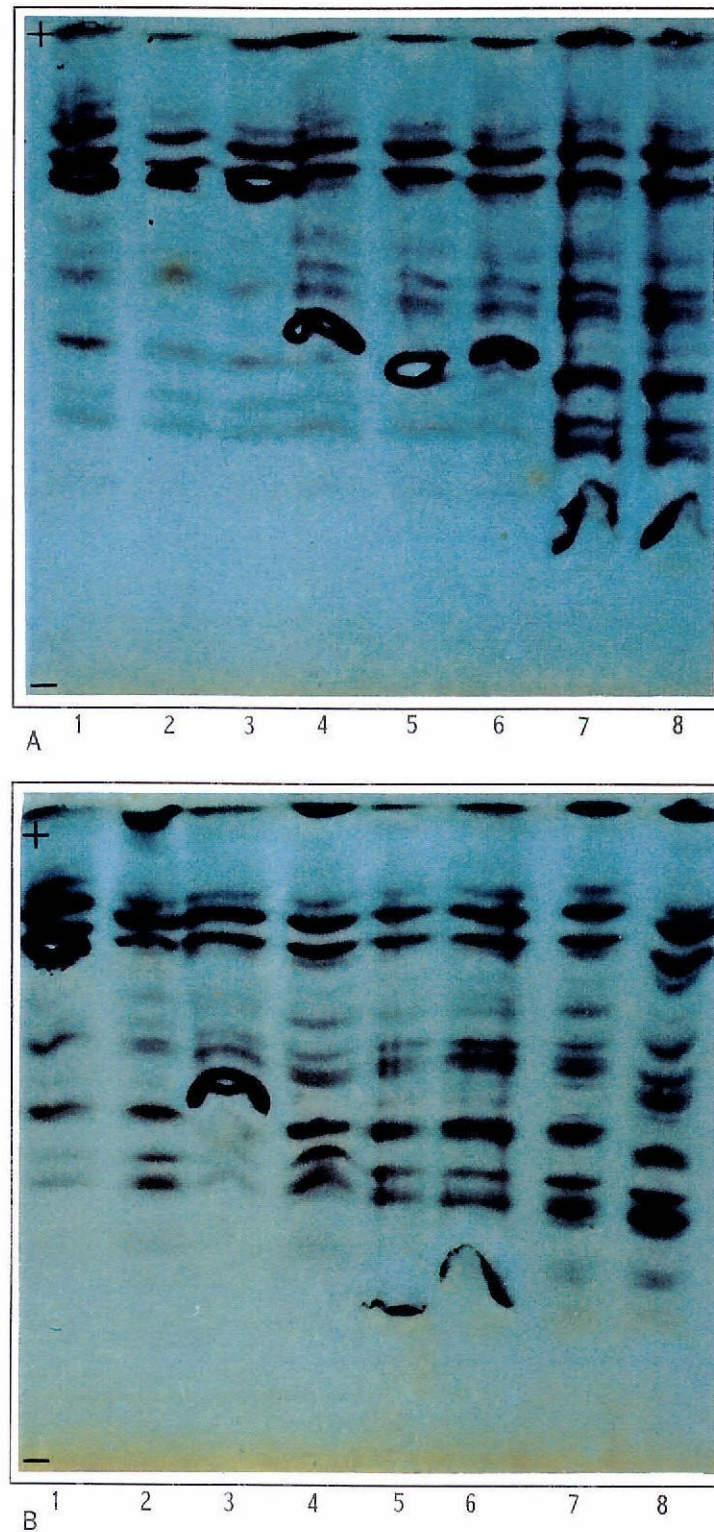


Fig. 5.3 - Zimogramas de fosfatase ácida de cotilédones de *V. unguiculata*, obtidos por focagem isoelétrica em gel IEF 5-8; diferentes soluções de extração e locais de aplicação dos extractos, com utilização de sementes da cv. "Amarelo" (população 03). A: 1, 4 e 7, Sacarose 0,4M; 2, 5 e 8, Tampão pH 7,1 de Tris-HCl 0,1M; 3 e 6, Tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2M. Posição do pente: 1, 2 e 3, anódica; 4, 5 e 6, mediana; 7 e 8, catódica. B: 1, 3 e 6, NaCl 0,1M; 5, Tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2M; 2, 4, 7 e 8, Tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2M + mercaptoetanol 10mM + tioglicolato de sódio 50mM + PVP 0,1g/ml. Posição do pente: 1 e 2, anódica; 3 e 4, mediana; 5, 6, 7 e 8, catódica. Condições de coloração de acordo com o Anexo 2.

se trabalha com extractos mal conhecidos, as condições óptimas deverão ser determinadas experimentalmente, fazendo a aplicação das amostras em diferentes posições do gel .

Nos zimogramas de fosfatase ácida de cotilédones, os melhores resultados, em termos do número, separação, e definição das bandas, observaram-se, em IEF 4-6,5, com a aplicação anódica do pente das amostras (Fig. 5.2 A), e em IEF 5-8 com a aplicação catódica (Fig. 5.3 A, colunas 7 e 8 e Fig. 5.3 B, colunas 5, 6, 7 e 8).

A análise dos perfis isoenzimáticos obtidos por focagem isoelectrica, permite registar diferenças significativas relativamente às soluções de extracção estudadas (Fig. 5.3). A solução de extracção tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2M + mercaptoetanol 10 mM + tioglicolato de sódio 50 mM + PVP 0,1g/ml permite obter zimogramas com um maior número de bandas (Fig. 5.3 B, colunas 7 e 8). No caso dos zimogramas obtidos com as restantes soluções de extracção verifica-se a precipitação proteica no local de aplicação das amostras, causada provavelmente por agregação proteica (Righetti, *et al.*, 1990), não sendo possível detectar as bandas características dessa zona (veja-se por exemplo na Fig. 5.3 B as colunas 5 e 6).

Das duas soluções tampão de revelação ensaiadas, foi a solução tampão de concentração e pH mais elevados (tampão pH 5,5 de acetato de sódio 0,2M) a que proporcionou os melhores resultados; as bandas reveladas com a segunda solução estudada (tampão pH 5,0 de acetato de sódio 50 mM) apresentavam-se pouco nítidas.

5.1.2.2 Órgãos vegetativos

Também no estudo das isoenzimas de órgãos vegetativos, as análises foram conduzidas inicialmente utilizando o meio de separação IEF 3-9 (Fig. 5.4), verificando-se, à semelhança dos padrões isoenzimáticos de cotilédones, a existência de bandas muito próximas, algumas das quais poderão representar mais do que uma isoenzima. Contudo, quando se tentou a separação dos extractos em gradientes de pH mais estreitos (IEF 4-6,5 e IEF 5-8) resultaram padrões de bandas muito ténues (Fig. 5.5 C), provavelmente pela existência de baixas concentrações proteicas, não se conseguindo resoluções idênticas ao verificado com os cotilédones. As análises subsequentes foram, portanto, realizadas utilizando apenas o gel IEF 3-9.

Da análise dos perfis isoenzimáticos de fosfatase ácida da folha, é possível constatar, quando se consideram as diferentes soluções de extracção utilizadas, a inexistência de diferenças significativas no que se refere ao número, separação, resolução e definição das bandas (Fig. 5.4 A). Observa-se, contudo, uma maior intensidade de coloração nos zimogramas das amostras obtidas com a solução de extracção tampão pH 6,1 de acetato de

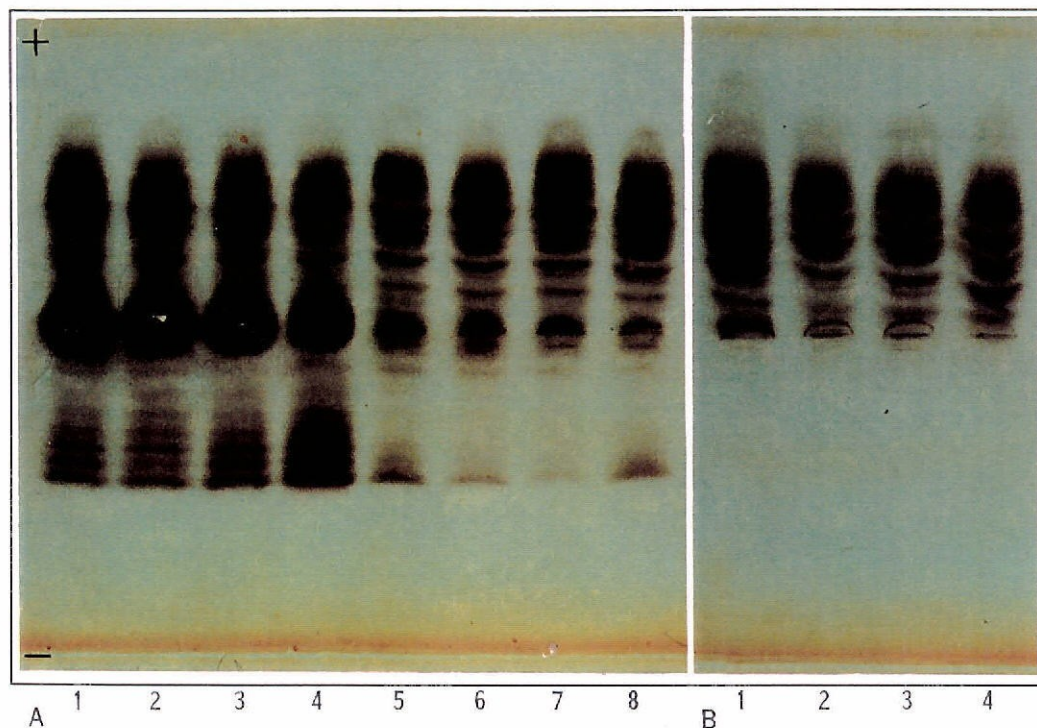


Fig. 5.4 - Zimogramas de fosfatase ácida da folha, caule e raiz de *V. unguiculata*, obtidos por focagem isoelétrica em gel IEF 3-9. Diferentes extractos da cv. "Amarelo" (população 03), aplicados na posição mediana. **A:** 1, 2, 3 e 4, folha; 5, 6, 7 e 8, caule; 1 e 5, Sacarose 0,4M; 2 e 6, Tampão pH 7,1 de Tris-HCl 0,1M; 3 e 7, NaCl 0,1M; 4 e 8, Tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2M+mercaptoetanol 10mM+tioglicolato de sódio 50mM+PVP 0,1g/ml. **B:** 1, 2, 3 e 4, raiz; 1, Sacarose 0,4M; 2, Tampão pH 7,1 de Tris-HCl 0,1M; 3, NaCl 0,1M; 4, Tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2M+mercaptoetanol 10mM+tioglicolato de sódio 50mM+PVP 0,1g/ml. Condições de coloração de acordo com o Anexo 2.

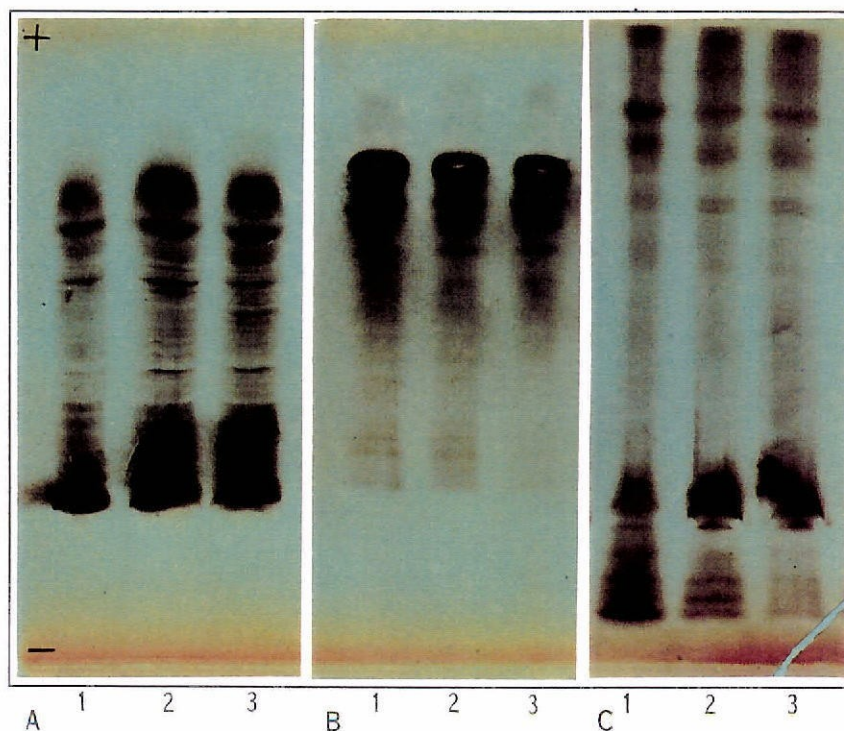


Fig. 5.5 - Zimogramas de fosfatase ácida da folha de *V. unguiculata* em gel IEF 3-9 (**A** e **B**) e IEF 4-6,5 (**C**). Diferentes extractos da cv. "Amarelo" (população 03). Pente na posição: **A**, anódica; **B**, catódica; **C**, catódica. 1, Sacarose 0,4M; 2, Tampão pH 7,1 de Tris-HCl 0,1M; 3, Tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2 M. Condições de coloração de acordo com o Anexo 2.

sódio 0,2M + mercaptoetanol 10 mM + tioglicolato de sódio 50 mM + PVP 0,1g/ml (Fig. 5.4 A, coluna 4).

Os compostos protectores utilizados com a referida solução de extracção não impediram a agregação das proteínas verificando-se, no local de aplicação das amostras a formação de um precipitado proteico (Fig. 5.4 e 5.5).

No que diz respeito aos restantes tecidos vegetativos estudados, são os extractos de caule e raiz obtidos com Sacarose 0,4 M os que proporcionam zimogramas com melhor individualização e definição das bandas observadas (Fig. 5.4 A, coluna 5 e Fig. 5.4 B, coluna 1). Independentemente da solução de extracção utilizada, verifica-se, relativamente aos extractos de folha, uma menor agregação proteica no local de aplicação das amostras.

Extractos colocados em diferentes posições sobre o gel originam zimogramas de diferente resolução, observando-se os melhores resultados para a posição mediana (Fig. 5.4 e Fig. 5.5 A e B).

À semelhança dos extractos de cotilédones, também nos tecidos vegetativos, foi a solução de revelação de concentração mais elevada (tampão pH 5,5 de acetato de sódio 0,2M) aquela que proporcionou os melhores resultados.

Atendendo ao maior número de bandas reveladas nos extractos de folha, (Fig. 5.4), as análises comparativas finais foram realizadas apenas para este tecido (Quadro 5.1).

5.1.3 Peroxidases

Os zimogramas de peroxidase, obtidos por focagem isoelectrica, à semelhança do observado no sistema enzimático fosfatase ácida, apresentavam um maior número de bandas, relativamente à electroforese por PAGE (Fig. 5.6). A técnica de focagem isoelectrica parece ser, assim, mais sensível às diferentes propriedades dos isoenzimas de peroxidase permitindo a sua separação num número mais elevado de bandas. De acordo com estes resultados, as restantes análises foram realizadas por focagem isoelectrica.

Neste sistema enzimático, não se detectaram bandas em cotilédones folhas e caules (Fig. 5.7, colunas 1 e 2); apenas foram reveladas bandas nos extractos de raízes (Fig. 5.7, colunas 3, 4, 5, 6, 7 e 8).

A solução tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2M + mercaptoetanol 10mM + tioglicolato de sódio 50 mM + PVP 0,1g/ml (Fig. 5.7 colunas 4, 6 e 8), quando comparada com as restantes soluções de extracção, permite obter zimogramas com um maior número de bandas, apresentando-se estas melhor definidas. As restantes soluções de extracção não se diferenciam entre si, originando zimogramas sensivelmente idênticos.

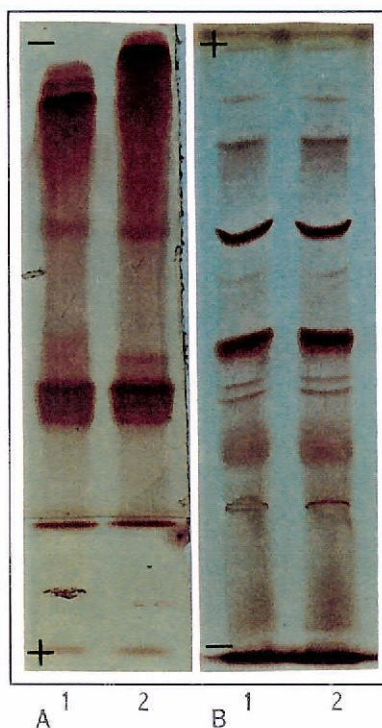


Fig 5.6 - Zimogramas de peroxidase da raiz obtidos por electroforese de zona descontínua em PhastGel HOM 20 (A) e por focagem isoelectrica em gel IEF 3-9 (B). Soluções de extracção: sacarose 0,4M (A, coluna 1) e tampão acetato de sódio 0,2M + mercaptoetanol 10mM + tioglicolato de sódio 50mM + PVP 0,1 g/ml (restantes colunas). Os zimogramas foram obtidos em idênticas condições de revelação.

Os melhores resultados com a referida solução de extracção dever-se-ão sem dúvida à acção diferencial dos compostos protectores utilizados. O mercaptoetanol actua como agente protector dos grupos sulfidrilos das proteínas (Cleland, 1964) e, à semelhança da polivinilpirrolidina solúvel (PVP), é responsável pela inactivação da σ -difenol-oxidase, funcionando aqueles como agentes quelatizantes do cobre (Pierpoint, 1966; Anderson, 1968). A polivinilpirrolidina permite ainda a eliminação de compostos fenólicos simples e complexos (taninos) (Gustavson, 1963, citado por Loomis e Bataille, 1966). Finalmente, o tioglicolato de sódio actua na eliminação de quinonas por redução das quinonas a σ -difenóis (Anderson e Rowan, 1967).

No que se refere à relação volume/peso, a relação 1/4, originando extractos com maior concentração proteica, permite obter zimogramas com bandas de coloração mais intensa.

À semelhança do que foi observado com a fosfatase ácida, no sistema peroxidase observam-se também diferenças, quer no número total de bandas, quer na sua definição, de acordo com o local de aplicação do pente (Fig. 5.7). Regista-se um menor número de bandas quando o pente das amostras é colocado na posição anódica (Fig 5.7, coluna 4). Nas duas opções restantes (coluna 6 e 8), e no que se refere ao número de bandas, não existem diferenças significativas, a posição catódica parece originar contudo uma melhor definição (coluna 8). Verifica-se assim que, em focagem isoelectrica, o local de aplicação das amostras tem alguma importância na aparência final dos zimogramas, pelo que, para além dos factores

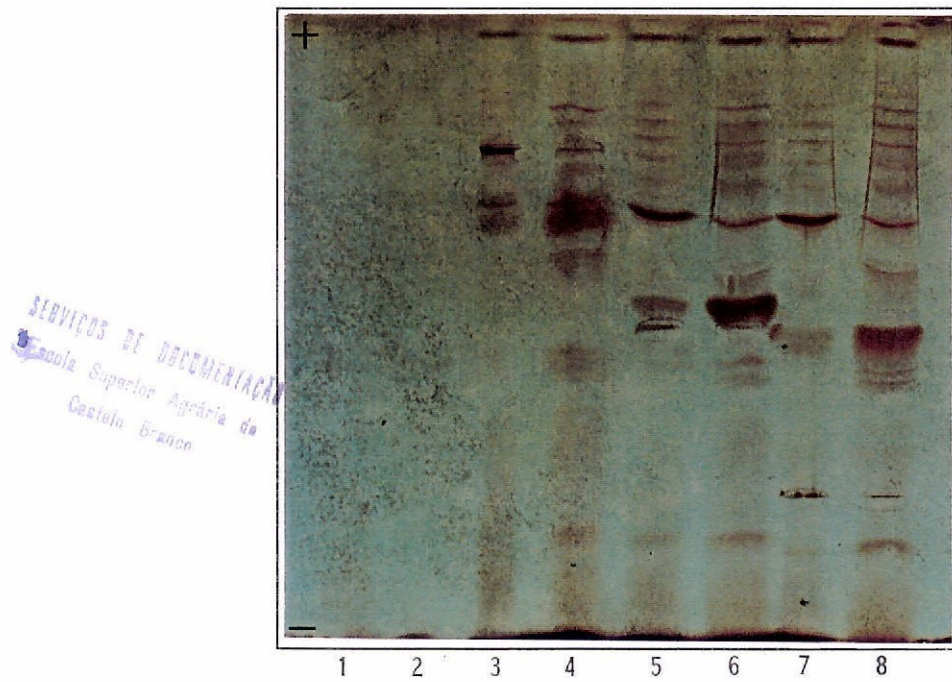


Fig. 5.7 - Zimogramas de peroxidase da folha, caule e raiz de *V. unguiculata* em gel IEF 3-9; diferentes soluções de extracção (volume/peso: 1/4) da cv. "Amarelo" (população 03), e diferentes locais de aplicação das amostras sobre o gel. 1, folha; 2, caule; 3, 4, 5, 6, 7 e 8, raiz. 1, 3, 5 e 7, Sacarose 0,4M; 2, 4, 6 e 8, Tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2M + mercaptoetanol 10mM + tioglicolato de sódio 50mM + PVP 0,1g/ml. Pente na posição: 1, 2 e 3, anódica; 4, 5 e 6, mediana; 7 e 8, catódica.

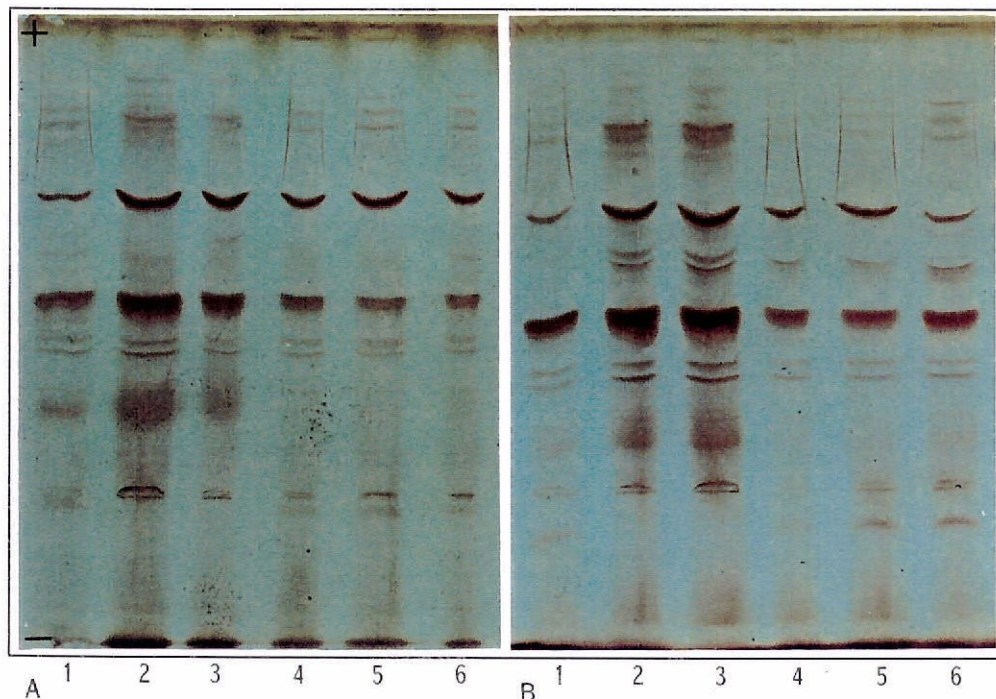


Fig. 5.8 - Zimogramas de peroxidase da raiz de *V. unguiculata* em gel IEF 3-9; estudo das condições de revelação. A: Tampão pH 5,0 de acetato de sódio 0,1M (20 ml); DMF 15% (3 ml); 3A9EC 0,2% (0,04g); 0,5 ml de H₂O₂ 3%. B: Tampão pH 4,5 de acetato de sódio 50mM (20 ml); DMF 15% (3 ml); 3A9EC 0,2% (0,04g); 0,5 ml de H₂O₂ 3%. 1, cv. "Arroz"; 2 e 3, subsp. *sesquipedalis*; 4, subsp. *cylindrica* (população 106); 5, cv. "Amarelo" (população 18); 6, cv. "Cream". Restantes condições: extractos obtidos com Tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2M + mercaptoetanol 10mM + tioglicolato de sódio 50mM + PVP 0,1g/ml (volume/peso de 1/4) e aplicados na posição catódica.

anteriormente apontados (secção 3.8), deverá ser um elemento a ter em atenção quando se pretende assegurar a reprodutibilidade laboratorial dos resultados.

A escolha da solução de extracção, da relação peso/volume e do local de aplicação das amostras, fez-se essencialmente com base nos critérios de obtenção de padrões de bandas com elevada resolução e na discriminação do maior número possível de bandas para cada zimograma.

Assim, com base nos resultados obtidos para este sistema enzimático, em idênticas condições de electroforese e coloração, optámos por realizar as subseqüentes extracções em raízes de plântulas de *Vigna unguiculata* utilizando uma relação volume/peso de 1/4, a solução tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2M + mercaptoetanol 10mM + tioglicolato de sódio 50mM + PVP 0,1g/ml e a aplicação catódica das amostras (Quadro 5.1).

Foi estudado o efeito da concentração da solução tampão na solução de detecção, tendo-se para o efeito ensaiado as duas soluções: tampão pH 4,5 de acetato de sódio 50 mM (de acordo com Vallejos, 1983) e tampão pH 5,0 de acetato de sódio 0,1M (de acordo com May, 1992) (Fig. 5.8). Quando se utilizou o tampão pH 4,5 de acetato de sódio 50mM verificou-se existir não só uma melhor definição, como também, nalguns zimogramas, um maior número de bandas (Fig. 5.8 B). No caso do tampão pH 5,0 de acetato de sódio 0,1M (Fig. 5.8 A) de uma forma geral as bandas são mais ténues, verificando-se, nalguns casos, a ausência de determinadas isoenzimas (comparem-se, por exemplo, as colunas 2, 3 e 6). Os resultados não surpreendem, já que na coloração das peroxidases, concentrações altas da sol. tampão e/ou valores de pH acima de 6,0 originam frequentemente o aparecimento de bandas ténues, mal coradas (Vallejos, 1983, Wendel e Weeden, 1990).

Utilizando o tampão pH 4,5 de acetato de sódio 50mM (20 ml), foram experimentadas várias combinações das concentrações de 3A9EC, de DMF e de H₂O₂ 3% (Fig. 5.9). Para idênticos valores de 3A9EC (0,2%), os piores resultados foram obtidos com concentrações relativamente baixas de DMF e de H₂O₂ 3% (respectivamente, 0,6 ml e 0,150 ml, por 20 ml de solução tampão) (Fig 5.9 A). Quando se aumentou a concentração de DMF de 3% para 7,5%, mantendo constantes as concentrações dos restantes reagentes (Fig. 5.9 B), observou-se uma ligeira melhoria na resolução e definição das bandas (Fig. 5.8 A, colunas 1, 2, e 5 e Fig 5.8 B, colunas 1, 2, 3 e 4). O aumento simultâneo das concentrações de DMF e de H₂O₂ 3% permitiu acentuar a resolução e a definição das bandas, registando-se todavia um limite óptimo, acima do qual o aumento das concentrações dos referidos reagentes não proporcionava melhorias significativas (Fig. 5.9 C, colunas 1, 2, 3 e 4 e Fig 5.8 B, colunas 1, 2, 5 e 6).

Relativamente à concentração do substracto, as duas variações experimentadas (0,2% e 0,4%), não evidenciaram diferenças significativas pelo que as análises posteriores foram realizadas utilizando a menor concentração.

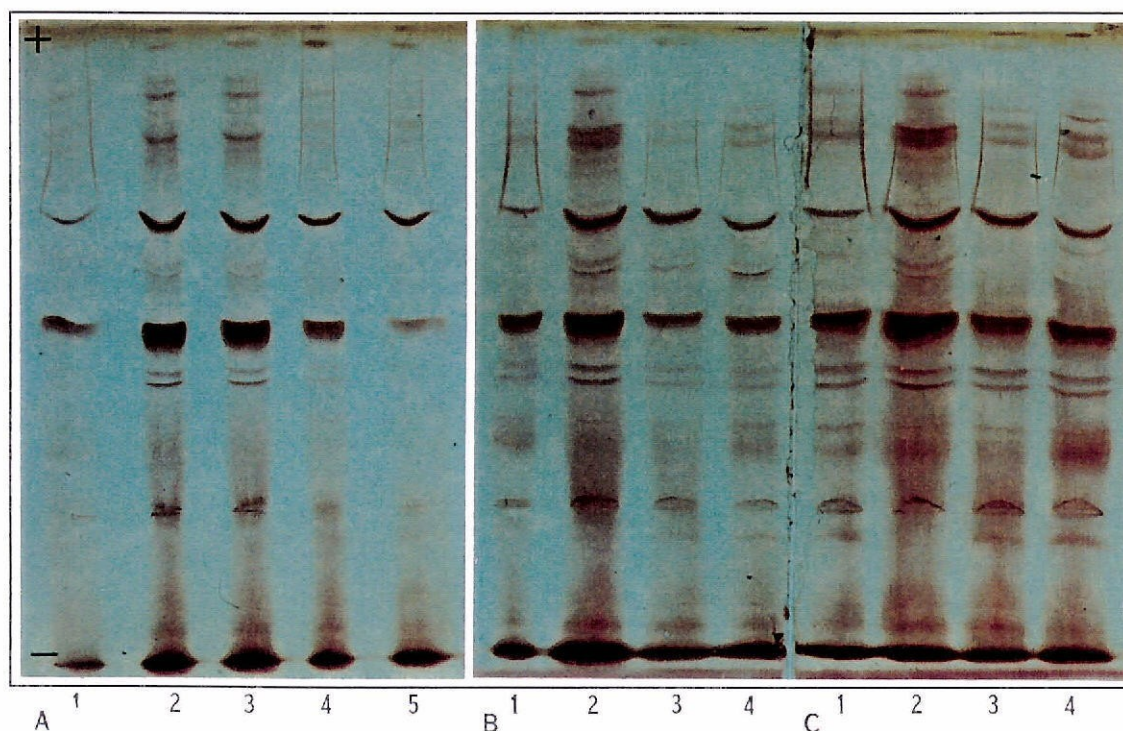


Fig. 5.9 - Zimogramas de peroxidase da raiz de *V. unguiculata* em gel IEF 3-9; estudo das condições de revelação. A: Tampão pH 4,5 de acetato de sódio 50mM (20 ml); DMF 3% (0,6 ml); 3A9EC 0,2% (0,04 g); 0,150 ml de H₂O₂ 3%. 1, cv. "Arroz"; 2 e 3, subsp. *sesquipedalis*; 4, subsp. *cylindrica* (população 106); 5, cv. "Amarelo" (população 18). B: Tampão pH 4,5 de acetato de sódio 50mM (20 ml); DMF 7,5% (1,5 ml); 3A9EC 0,2% (0,04 g); 0,150 ml de H₂O₂ 3%. 1, cv. "Arroz"; 2, subsp. *sesquipedalis*; 3, cv. "Amarelo" (população 18); 4, cv. "Cream". C: Tampão pH 4,5 de acetato de sódio 50mM (20 ml); DMF 15% (3,0 ml); 3A9EC 0,2% (0,04 g); 0,250 ml de H₂O₂, 3%. As populações em C são idênticas às de B. Restantes condições: extractos obtidos com Tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2M + mercaptoetanol 10mM + tioglicolato de sódio 50mM + PVP 0,1g/ml (volume/peso: 1/4) e aplicados na posição catódica.

Neste sistema enzimático, optámos, face aos resultados expostos, por utilizar na coloração das peroxidases as seguintes condições: tampão pH 4,5 de acetato de sódio 50 mM (20 ml), 3A9EC 0,2% (0,04 g), DMF 15% (3 ml) e 0,25 ml de H₂O₂ 3%.

Com base nos resultados do estudo comparativo das condições experimentais foi elaborado o Quadro 5.1 que sintetiza as condições utilizadas nas análises finais de detecção de polimorfismos isoenzimáticos em cotilédones e órgãos vegetativos (folha e raiz) de plântulas de *Vigna unguiculata*.

Quadro 5.1 - Condições experimentais seleccionadas no âmbito deste trabalho para a detecção de polimorfismos isoenzimáticos em cotilédones, folhas e raízes (de plântulas com aproximadamente 15 dias) de *Vigna unguiculata*, utilizando os sistemas enzimáticos fosfatase ácida e peroxidase.^a

Condições	Fosfatase ácida		Peroxidase
	Cotilédone	Folha	Raíz
Extracção			
Solução	E ₅	E ₅	E ₅
Volume/Peso	2/1	1/4	1/4
Electroforese			
Tipo de gel	IEF 4-6,5; IEF 5-8	IEF 3-9	IEF 3-9
Posição do pente	IEF 4-6,5: anódica IEF 5-8: catódica	mediana	catódica
Revelação			
Tampão	F ₁	F ₁	P ₁

^a E₅, Tampão pH 6,1 de acetato de sódio 0,2M + mercaptoetanol 10 mM + tioglicolato de sódio 50 mM + PVP 0,1g/ml; IEF, focagem isoeléctrica; F₁, Tampão pH 5,5 de acetato de sódio 0,2 M; P₁, Tampão pH 4,5 de acetato de sódio 50 mM.

5.2 Detecção de polimorfismos isoenzimáticos

Na análise dos zimogramas foram apenas consideradas as diferenças de natureza qualitativa, não se achando relevante para o nosso estudo as diferenças de natureza quantitativa, traduzidas por diferenças na intensidade de coloração das bandas, que poderão resultar tanto de variações ambientais como de variações génicas.

Através do cálculo das frequências relativas efectuou-se uma avaliação do nível de variação genética encontrado entre as populações estudadas, tendo em consideração a quantificação da presença das bandas isoenzimáticas reveladas no conjunto dos indivíduos analisados, em cada uma das populações.

A quantificação do grau de variação intrapopulacional foi realizada pelo cálculo dos índices de polimorfismo (PI), de acordo com a seguinte expressão (Singh *et al.*, 1973):

$$PI = \frac{\sum_{i=1}^N p_i(1 - p_i)}{N}$$

em que p_i representa a frequência relativa de cada banda e N o número total de bandas por cada sistema enzimático e população. Este índice é susceptível de variar entre 0 e 0,25.

Os resultados relativos aos dois sistemas enzimáticos estudados, que seguidamente passamos a apresentar, referem-se a amostras de cinco (fosfatases ácidas da semente) e oito indivíduos (fosfatases ácidas da folha e peroxidases da raiz), por população. Em ambos os casos, os exemplares estudados foram extraídos aleatoriamente.

Relativamente à interpretação genética dos zimogramas, é, na prática, impossível adiantar hipóteses explicativas, face ao elevado número de bandas reveladas nos dois sistemas enzimáticos estudados. Com efeito, enzimas com substratos não específicos, como as fosfatases e as esterases, originam zimogramas com um elevado número de bandas, pelo que é difícil fazer a sua interpretação genética (número de genes codificantes e os seus estados alélicos), ficando a sua utilização praticamente limitada à comparação de fenótipos (Crawford, 1983).

A comparação de diferentes *taxa* com base na presença/ausência de determinadas bandas deverá ser realizada com algumas reservas já que existem alguns factores que podem influenciar os zimogramas, impedindo uma correcta avaliação da homologia entre génotipos. Assim, por exemplo, enzimas codificadas por diferentes alelos podem possuir mobilidades electroforéticas idênticas, resultando na sobreposição de bandas. Também a existência de

artefactos de extracção, como os compostos fenólicos, podem influenciar o número de bandas dos zimogramas (Gottlieb, 1977; Crawford, 1983).

5.2.1 Fosfatase ácida

5.2.1.1 Semente

Neste órgão foram identificadas, em todas as populações estudadas, em IEF 4-6,5 dezanove bandas diferentes e em IEF 5-8 vinte e duas bandas diferentes. Na Figura 5.10 representam-se os diagramas dos zimogramas correspondentes a cada um dos tipos de gel estudados, assinalando-se, a tracejado, o conjunto de bandas comuns.

Foram observadas apenas diferenças de natureza quantitativa inter e intrapopulacional, não tendo sido detectadas bandas polimórficas, o que inviabiliza o tipo de análise comparativa que se pretendia com este estudo (Fig. 5.11).

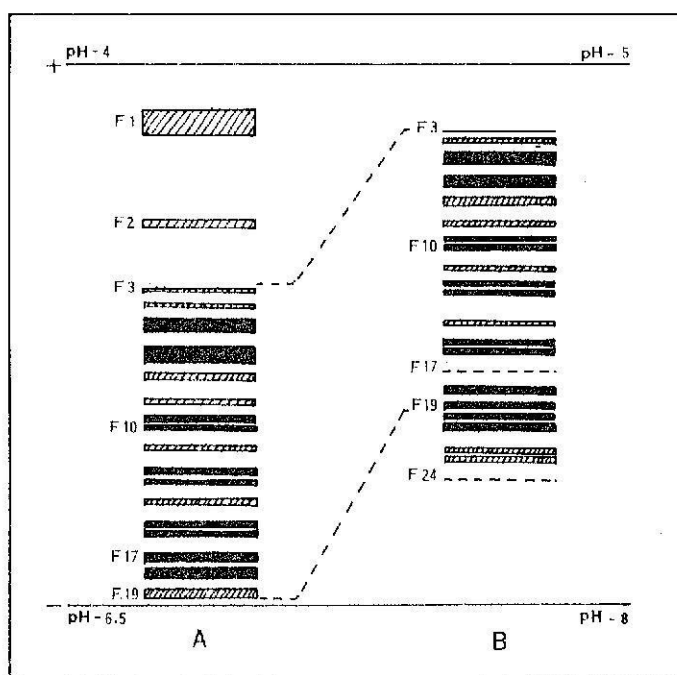


Fig. 5.10 - Diagramas de zimogramas de fosfatase ácida da semente de *Vigna unguiculata* obtidos por focagem isoelétrica em gel IEF 4-6,5 (A) e IEF 5-8 (B). A tracejado estão assinaladas as bandas comuns aos dois géis (a distância entre bandas está representada a uma escala de 2:1 e a largura das bandas a uma escala, sensivelmente, de 4:1).

Da análise simultânea dos géis, é possível inferir a existência de um número total de vinte e quatro bandas diferentes, quando se considera um gradiente de pH 4-8. A primeira

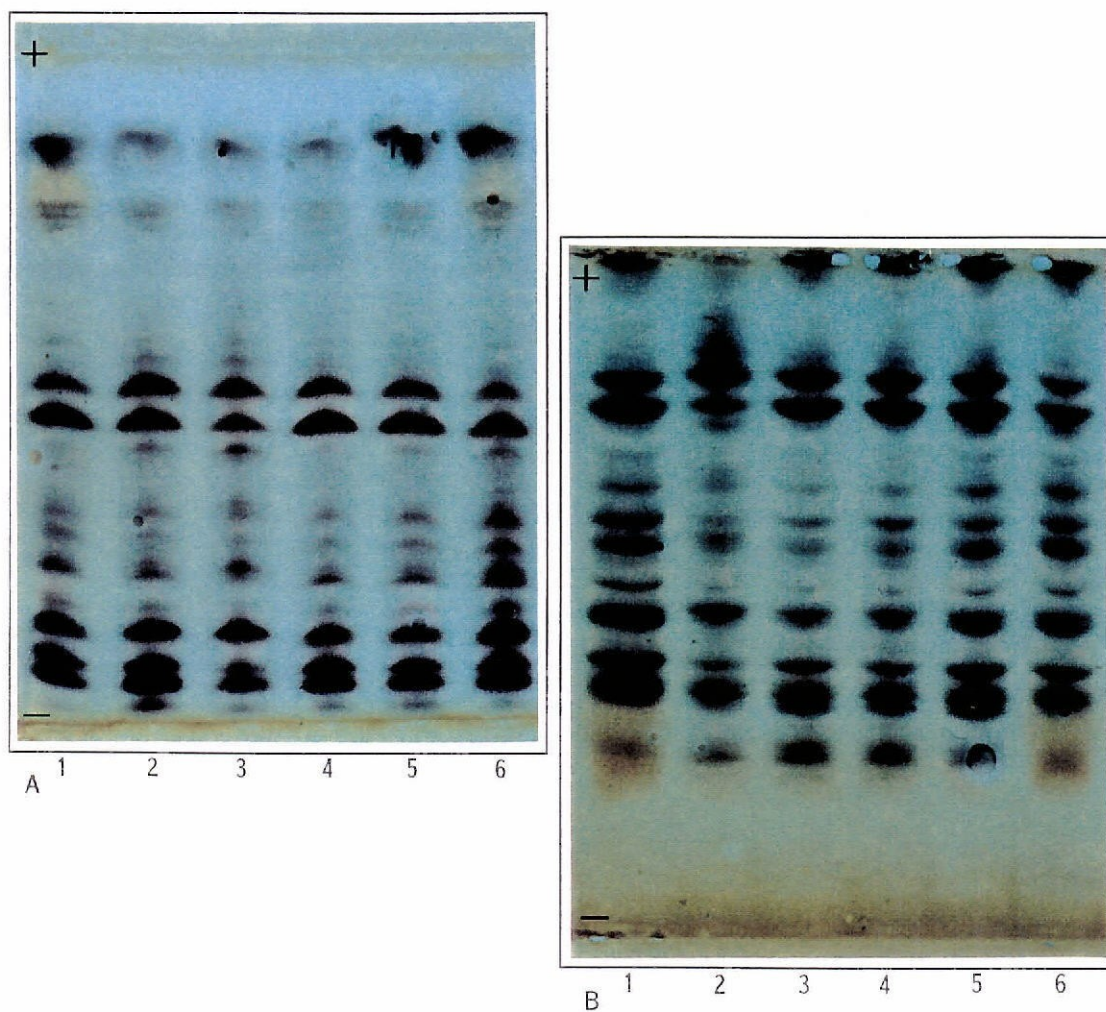


Fig. 5.11 - Zimogramas de fosfatase ácida de cotilédones de *V. unguiculata* obtidos por focagem isoelétrica em gel IEF 4-6,5 (A) e IEF 5-8 (B). A e B: 1, subsp. *sesquipedalis*; 2 e 3, cv. "Gigante Marialva" (populações 88 e 89); 4, cv. "Amarelo" (população 91); 5, cv. "Cream"; 6, subsp. *cylindrica* (população 106).

banda revelada em IEF 5-8, corresponde à banda F-3. As bandas F-1 e F-2 são exclusivas do gel IEF 4-6,5 e o conjunto de bandas F-20 a F-24 surge apenas no gel IEF 5-8.

Existe alguma correspondência nas intensidades de coloração das bandas nos dois tipos de gel, sendo a exceção mais notória a banda F-17 que, em IEF 5-8, aparece muito ténue.

A inexistência, neste sistema, de divergência isoenzimática na semente ao nível da subespécie pode dever-se à sua recente separação como unidades taxonómicas (Crawford, 1990). Como anteriormente foi referido (secção 2.1), as características que permitem diferenciar as três subespécies cultivadas estão relacionadas com factores de variação induzidos pela pressão de selecção, distinguindo-se cada um destes *taxa* por características essencialmente relacionadas com a dimensão das sementes e das vagens. Com efeito, a selecção para determinadas características morfológicas pode ser responsável por rápidas alterações fenotípicas não acompanhadas por mutações nos *loci* que especificam para as enzimas solúveis (Crawford, 1990), pelo que as diferenças de natureza morfológica que permitem reconhecer diferentes *taxa* dentro de uma espécie desenvolvem-se frequentemente sem uma correspondente divergência isoenzimática.

5.2.1.2 Folha

Foram detectadas vinte e duas bandas diferentes, doze das quais monomórficas. No Anexo 3 (Quadros A3.1, A3.2 e A3.3) apresentamos as frequências relativas das bandas de fosfatase ácida da folha, para cada uma das populações estudadas.

Da leitura dos referidos Quadros, observa-se a existência de alguma variabilidade intravarietal, variando os valores de PI entre 0,013 (população 113) e 0,044 (populações 69 e 92), a qual se deve exclusivamente às bandas monomórficas F-10, F-11, F-12 e F-13. No caso particular das bandas polimórficas não se encontrou variabilidade intravarietal, o que valoriza a sua utilização nos estudos comparativos.

Com efeito, nas espécies predominantemente autogâmicas, de reprodução seminal, verifica-se naturalmente mais do que um genótipo na cultivar, mesmo que a selecção tenha sido conduzida com vista à obtenção de um fenótipo morfológica e fisiologicamente uniforme (secção 3.7.3). Sendo assim, é de esperar a existência de variabilidade isoenzimática nalguns sistemas, pela ocorrência de alguma heterozigosidade residual, embora muitos outros possam apresentar uniformidade dentro da variedade.

Dado o seu menor interesse as bandas monomórficas não foram consideradas na elaboração do Quadro 5.2, que se relaciona com os perfis isoenzimáticos atendendo apenas aos aspectos de natureza qualitativa.

Quadro 5.2 - Presença (+) / ausência (-) das bandas polimórficas de fosfatase ácida em folhas de plântulas de *Vigna unguiculata*.

Populações	Bandas										Perfil
	F-1	F-14	F-15	F-16	F-17	F-18	F-19	F-20	F-21	F-22	
82	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	A
113	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	B
Restantes	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	C

As dez bandas polimórficas permitem a definição de apenas três diferentes zimogramas (Fig. 5.12). As bandas F-15, F-17, F-19, F-21 e F-22 foram detectadas nos zimogramas de todas as populações excepto no da cv. "Arroz" da subsp. *unguiculata* (população 113) e no da subsp. *sesquipedalis* (população 82). As bandas F-14, F-16, F-18 e F-20 existem apenas nos zimogramas das populações 82 e 113 e a banda F-1 é exclusiva da subsp. *sesquipedalis* (população 82), permitindo assim fazer a sua distinção relativamente à cv. "Arroz" da subsp. *unguiculata* (população 113).

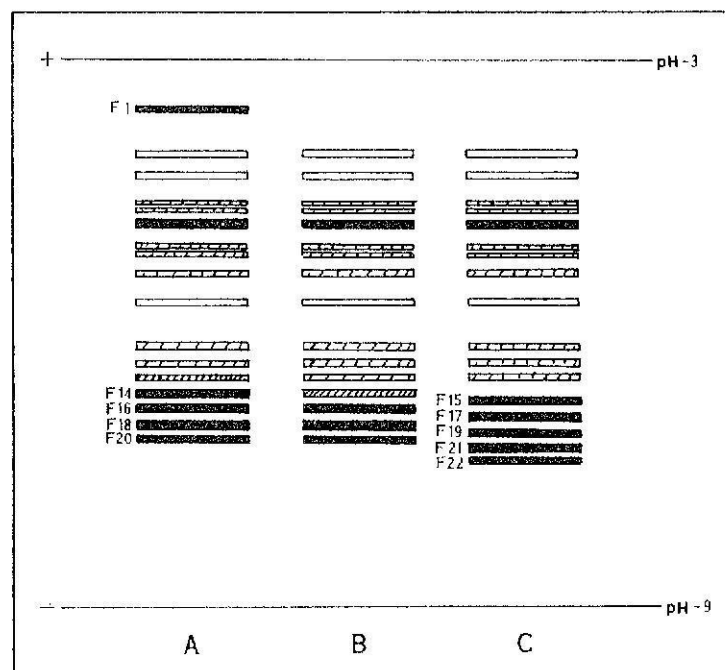


Fig. 5.12 - Diagramas de zimogramas de fosfatase ácida da folha de *Vigna unguiculata* obtidos por focagem isoelectrica em gel IEF 3-9. A, população 82 (subsp. *sesquipedalis*); B, população 113 (cv. "Arroz" - subsp. *unguiculata*); C, restantes populações (subsp. *cylindrica* e *unguiculata*) (a distância entre bandas está representada a uma escala de 2:1 e a largura das bandas a uma escala, sensivelmente, de 4:1).

Exceptuando a cultivar "Arroz", que apresenta um perfil isoenzimático distinto, verifica-se a existência de zimogramas idênticos para as diferentes cultivares da subsp. *unguiculata*. É portanto de realçar que o estudo comparativo dos zimogramas de fosfatase ácida da folha permite-nos considerar que existe uma maior proximidade isoenzimática entre as subspp. *unguiculata* e *cylindrica*, relativamente à subsp. *sesquipedalis*.

Na Figura 5.13 é possível observar os três diferentes tipos de zimogramas de fosfatase ácida da folha obtidos por focagem isoelectrica em gel IEF 3-9.

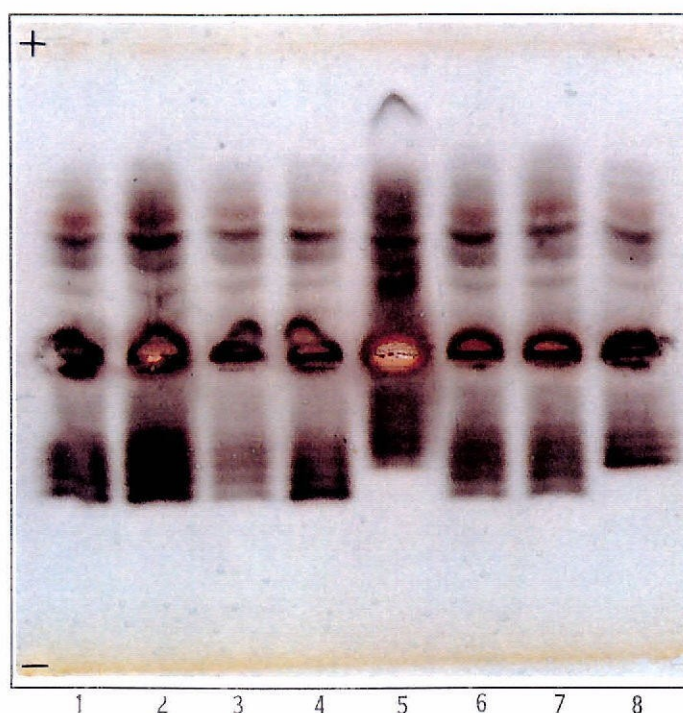


Fig. 5.13 - Zimogramas de fosfatase ácida da folha de *V. unguiculata* obtidos por focagem isoelectrica em gel IEF 3-9. 1, cv. "Amarelo" (população 03); 2, cv. "Comum" (população 15); 3, cv. "Gigante Marialva" (população 33); 4, cv. "Gigante Marialva" (população 68); 5, subsp. *sesquipedalis*; 6, Cv. "Cream"; 7, subsp. *cylindrica* (população 106); 8, Cv. "Arroz".

5.2.2 Peroxidase

As análises comparativas finais, realizadas com extractos de raízes de plântulas com aproximadamente quinze dias, permitiram identificar trinta e duas bandas diferentes de isoenzimas de peroxidase (Fig. 5.14, coluna A).

Nos Quadros A3.4, A3.5 e A3.6, do Anexo 3, apresentamos os valores das frequências relativas para o sistema enzimático peroxidase, em raízes de *V. unguiculata*. Da sua

observação, é possível constatar a presença de um elevado número de bandas que são constantes em todas as populações estudadas (bandas monomórficas) e que, como tal, não apresentam particular interesse numa caracterização e identificação de populações por via isoenzimática.

As bandas monomórficas não foram consideradas na elaboração dos Quadros 5.3 e 5.4, que descrevem somente os aspectos de natureza qualitativa.

Quadro 5.3 - Presença (+) / ausência (-) das bandas polimórficas de peroxidase da raiz de plântulas de *Vigna unguiculata* (os valores entre parêntesis indicam, para cada população, o número de indivíduos onde se observou a banda)

Populações		Bandas					
Designação	Nº	P-17	P-18	P-22	P-23	P-28	P-32
Amarelo	03	-	+ (1)	+ (8)	+ (3)	-	+ (8)
Amarelo	18	-	-	+ (3)	-	+ (1)	+ (8)
Amarelo	27	+ (4)	+ (6)	+ (4)	-	-	+ (8)
Amarelo	91	+ (2)	+ (7)	+ (4)	-	-	+ (8)
Comum	15	+ (6)	+ (7)	+ (5)	-	-	+ (8)
Comum	30	-	-	+ (5)	+ (3)	-	+ (8)
Comum	43	+ (4)	-	+ (4)	-	-	+ (8)
Gig. Marialva	33	+ (4)	+ (4)	+ (4)	-	-	+ (8)
Gig. Marialva	50	+ (7)	-	+ (4)	-	+ (4)	+ (8)
Gig. Marialva	61	-	-	+ (8)	-	-	+ (8)
Gig. Marialva	66	-	+ (8)	+ (8)	-	-	+ (8)
Gig. Marialva	68	-	-	+ (8)	-	-	+ (8)
Gig. Marialva	69	-	-	+ (8)	-	-	+ (8)
Gig. Marialva	71	-	+ (2)	+ (8)	-	-	+ (8)
Gig. Marialva	77	-	-	+ (8)	-	-	+ (8)
Gig. Marialva	79	-	-	+ (8)	-	-	+ (8)
Gig. Marialva	87	-	+ (1)	+ (5)	-	-	+ (7)
Gig. Marialva	88	-	-	+ (4)	-	-	+ (8)
Gig. Marialva	89	+ (2)	+ (1)	+ (8)	+ (1)	-	+ (8)
Cream	102	+ (1)	+ (8)	+ (6)	+ (1)	-	+ (7)
Arroz	113	-	+ (7)	+ (1)	+ (2)	-	+ (8)
<i>cylindrica</i>	106	+ (1)	+ (8)	+ (1)	+ (1)	-	+ (8)
<i>cylindrica</i>	107	+ (1)	+ (8)	-	+ (1)	-	+ (8)
<i>sesquipedalis</i>	82	-	+ (8)	-	-	-	-
Frequência das bandas (%)		16,7	39,6	63,5	6,3	2,6	94,8

Da leitura do Quadro 5.3 observa-se que algumas bandas raras (P-23 e P-28) estão presentes nos perfis isoenzimáticos de um pequeno número de populações, enquanto que a

banda P-32, muito frequente, aparece nos perfis revelados em todas as populações excepto na população 82 (subsp. *sesquipedalis*).

No caso das cultivares representadas por mais do que uma população (grupos: "Amarelo", "Comum" e "Gigante de Marialva"), verifica-se a existência de uma grande variação entre populações não se encontrando uma zimograma único para cada cultivar. Assim, por exemplo, no grupo de designação "Amarelo" a banda P-18 aparece em mais de 50% dos indivíduos nas populações 27 e 91, não surgindo no entanto na população 18. De igual forma, no grupo "Gigante de Marialva", a banda P-17 aparece apenas em três das doze populações estudadas, populações 33, 50 e 89, mas apenas no segundo caso em mais de 50% dos indivíduos estudados. Outros exemplos análogos podem ser inferidos a partir da leitura do referido Quadro, confirmando a existência de uma elevada variabilidade génica intrapopulacional nessas cultivares.

Tal poder-se-á tentar explicar pela ocorrência de alguma diferenciação local, cuja origem poderá ser atribuída à ocorrência de alguma polinização cruzada e mutação. Com efeito, sendo a semente multiplicada pelo próprio agricultor, não são cumpridos, normalmente, os requisitos de pureza, qualidade, sanidade e uniformidade, podendo facilmente estabelecer-se uma "distância genotípica" relativamente às populações de origem.

Dever-se-á, no entanto, ter em atenção o número de indivíduos estudados; a afirmação anterior só poderá ser confirmada caso os resultados descritos se confirmem quando se realize uma amostragem de maior dimensão. Com efeito, as amostras de reduzida dimensão podem conduzir a conclusões incorrectas quando se pretende comparar diferentes populações, relativamente à presença/ausência de um determinado alelo, embora normalmente não se considere necessária a realização de amostragens exaustivas, pois os alelos de baixa frequência têm pouco significado (Crawford, 1990). Marshall e Brown (1975) sugerem que, na maioria das situações, uma amostragem de trinta indivíduos diplóides permite detectar todos os alelos de um determinado *locus* (caso estejam presentes vinte alelos com uma frequência de 0,05), com uma probabilidade de 95%.

À semelhança do observado nas fosfatases ácidas da folha, os resultados obtidos para o índice de polimorfismo no sistema enzimático peroxidase (Anexo 3, Quadros A3.4, A3.5 e A3.6) indicam a existência de alguma variabilidade intrapopulacional em todas as populações estudadas, variando os valores de PI entre 0,009 (população 61) e 0,037 (população 106).

Se atendermos às bandas mais frequentes em cada população, podemos considerar a existência de sete perfis diferentes para o sistema enzimático peroxidase (Quadro 5.4 e Fig. 5.14). Contudo, como já foi referido, estes deverão ser tomados com algumas reservas face ao número de indivíduos estudados por população.

Quadro 5.4 - Zimogramas mais comuns nas populações estudadas para o sistema enzimático peroxidase (considerou-se que uma determinada banda polimórfica é característica de uma população quando aparece em pelo menos 50% dos indivíduos estudados).^a

Populações	Bandas						Perfil
	P-17	P-18	P-22	P-23	P-28	P-32	
- 03; 30; 61; 68; 69; 71; 77; 79; 87; 88; 89.	-	-	+	-	-	+	B
- 18.	-	-	-	-	-	+	C
- 27; 15; 43; 33.	+	+	+	-	-	+	D
- 91; 66; 102.	-	+	+	-	-	+	E
- 50.	+	-	+	-	-	+	F
- 82.	-	+	-	-	-	-	G
- 106; 107; 113.	-	+	-	-	-	+	H

^a O perfil isoenzimático A, que inclui todas as bandas, não é característico de nenhuma das populações estudadas.

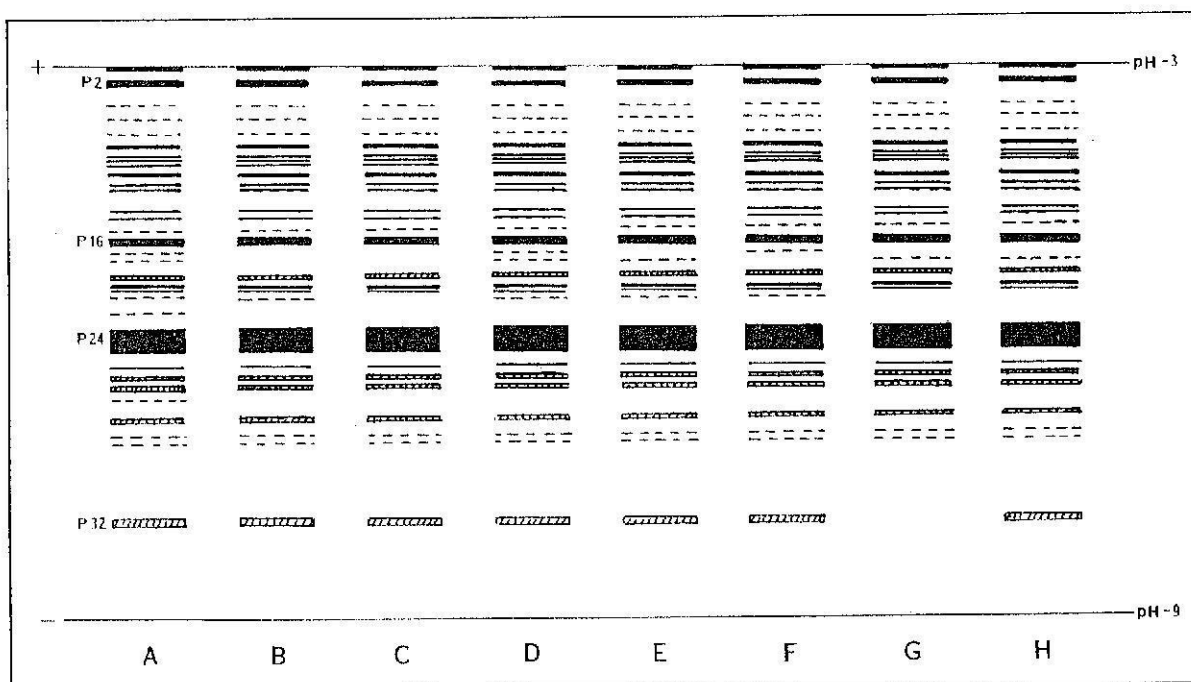


Fig. 5.14 - Diagramas de zimogramas de peroxidase da raiz de *Vigna unguiculata* obtidos por focagem isoelétrica em gel IEF 3-9. A, zimograma geral com todas as bandas; B, C, D, E, F, G e H, zimogramas mais vulgares nas populações: B, 03, 30, 61, 68, 69, 71, 77, 79, 87, 88 e 89; C, 18; D, 27, 15, 43 e 33; E, 91, 66 e 102; F, 50; G, 82; H, 106, 107 e 113 (a distância entre bandas está representada a uma escala de 2:1 e a largura das bandas a uma escala, sensivelmente, de 3:1).

Atendendo ao pequeno número de indivíduos responsáveis pelo aparecimento de bandas polimórficas, e à inexistência de um padrão único, quando se considera o grupo de populações relacionadas, poderemos concluir que existe baixa dissemelhança intervarietal para se poder distinguir com segurança os diferentes grupos de cultivares pertencentes à subespécie *unguiculata*, com base exclusivamente no sistema enzimático peroxidase.

Contudo, já é possível fazer uma identificação segura entre a subsp. *sesquipedalis* e as populações estudadas das duas restantes subsp. com base na presença/ausência da banda P-32. A população estudada da subsp. *sesquipedalis* (população 82) caracteriza-se pela ausência da referida banda no fenótipo isoenzimático (Quadro 5.3, Figura 5.14, coluna G, e 5.15, coluna 1). À semelhança do observado com as fosfatases ácidas da folha, é possível inferir a existência de um maior afastamento génico da subsp. *sesquipedalis* relativamente às outras duas subsp. estudadas, tendo em conta a variabilidade isoenzimática observada.

No caso da cultivar Gigante de Marialva foram estudadas populações com origem geográfica diversa (Fig. 4.1), sendo possível individualizar os grupos de proveniência: i) Norte (populações 66, 68 e 69); ii) Centro (população 61) e iii) Sul (populações 87, 88 e 89). Não se encontra contudo, qualquer tipo de associação entre a frequência de determinado tipo de banda e a distribuição geográfica.

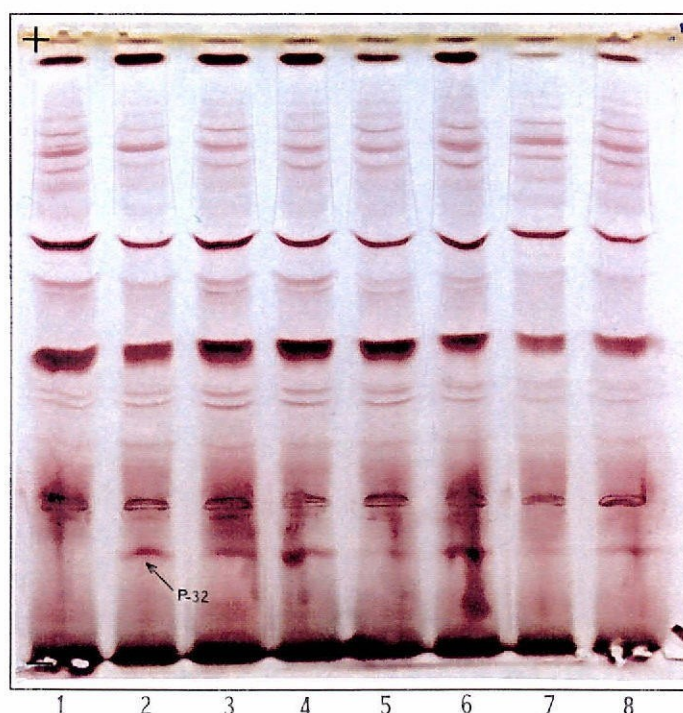


Fig. 5.15 - Zimogramas de peroxidase da raiz de *V. unguiculata* obtidos por focagem isoelectrica em gel IEF 3-9. 1, subsp. *sesquipedalis*; 2 e 3, cv. "Gigante Marialva" (populações 88 e 89); 4, cv. "Amarelo" (população 91); 5, cv. "Cream"; 6 e 7, subsp. *cylindrica* (populações 106 e 107); 8, cv. "Arroz" (a seta na figura assinala a banda P-32).

O Quadro 5.5 sintetiza a informação obtida neste estudo relativamente ao número total de bandas, número de bandas monomórficas e número de bandas polimórficas.

É possível constatar que os zimogramas, embora apresentem alguma complexidade, possuindo um elevado número de bandas, são constituídos maioritariamente por bandas monomórficas. As bandas polimórficas, que definem a importância de um sistema enzimático nos trabalhos de identificação e caracterização de genótipos, existem em menor número. Acrescente-se ainda que, exceptuando a banda P-32, as restantes bandas polimórficas de peroxidase da raiz surgem com baixas frequências nas populações estudadas (Quadro 5.3).

Quadro 5.5 - Número de bandas monomórficas e polimórficas nos dois sistemas enzimáticos estudados em populações de *Vigna unguiculata*.

Número de bandas	Fosfatase ácida		Peroxidase
	Cotilédone	Folha	Raíz
Monomórficas	24	12	26
Polimórficas	0	10	6
Total	24	22	32

5.3 Estudo comparativo dos padrões de expressão em diferentes órgãos

A revelação de isoenzimas de fosfatase ácida possibilitou o estudo comparativo dos padrões de expressão em diferentes órgãos.

Observaram-se diferentes padrões isoenzimáticos para os três órgãos vegetativos estudados (Fig. 5.4), confirmando a especificidade de algumas isoenzimas quanto ao tipo de tecido.

O desenvolvimento de um organismo desde o estado de embrião até à fase adulta é acompanhado por uma expressão diferencial das enzimas, necessárias ao metabolismo bioquímico, nos diferentes tipos de células, tecidos e órgãos. O mecanismo de expressão enzimático é controlado por *loci* reguladores, podendo este efeito ocorrer ao nível da transcrição, pós-transcrição, tradução e pós-tradução (Mcmillin, 1983). Coube a Markert e Moller (1959), demonstrar pela primeira vez, em tecidos animais, que algumas isoenzimas apresentam especificidade quanto ao tecido, estado de desenvolvimento e espécie estudada. Tal viria a ser confirmado, mais tarde, por Scandalios, 1964; Thurman *et al.*, 1965; Macnicol, 1966; Siegel e Galston, 1967 (citados por Mcmillin, 1983) em tecidos vegetais nas espécies

Pisum sativum e *Zea mays*. De uma forma geral, as diferenças observadas nos zimogramas de diferentes tecidos podem enquadrar-se numa das seguintes situações (Scandalios, 1969):

- i) as isoenzimas apresentam idêntica mobilidade electroforética verificando-se apenas diferenças na intensidade de coloração;
- ii) a metodologia utilizada pode não ter a sensibilidade necessária para a detecção de determinadas isoenzimas que existem em reduzidas concentrações em determinados estados do desenvolvimento, ou as isoenzimas de um determinado sistema podem estar ausentes nesse tecido;
- iii) para um determinado sistema, podem ocorrer isoenzimas únicas em determinado tecido, encontrando-se ausentes noutro tecido.

Relativamente aos resultados por nós obtidos, a primeira condição parece verificar-se nas bandas de fosfatase ácida da folha e do caule (Fig. 5.4 A), já que neste último as bandas mais próximas do cátodo apresentam menor intensidade de coloração. As raízes (Fig 5.4 B) e os cotilédones (Fig. 5.1) apresentam zimogramas distintos, verificando-se, assim para estes órgãos, a terceira condição.

6 CONCLUSÕES

O estudo realizado visando a caracterização isoenzimática de populações da espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp e o estabelecimento de relações de identidade entre as subespécies *unguiculata*, *sesquipedalis* e *cylindrica*, cujos resultados e discussão apresentamos no capítulo 5, permite-nos fundamentar as seguintes conclusões:

- i) Os zimogramas de fosfatase ácida dos diferentes órgãos estudados diferem entre si, verificando-se portanto uma especificidade das isoenzimas em relação ao órgão de onde provêm.
- ii) Os zimogramas de fosfatase ácida da semente permitem detectar um número total de vinte e quatro bandas; contudo face à inexistência de polimorfismos isoenzimáticos a sua utilidade nos trabalhos de identificação de génotipos é pouco relevante.
- iii) Da análise do material vegetal observaram-se vinte e duas bandas nos zimogramas da fosfatase ácida da folha, dez das quais eram polimórficas. Verificou-se, contudo, a existência de apenas três diferentes tipos de zimogramas: o da subsp. *sesquipedalis*, o da cultivar "Arroz" da subsp. *unguiculata* e um comum às restantes populações das cultivares estudadas da subsp. *unguiculata*.
- iv) Em raízes de plântulas verificou-se, num total de trinta e duas bandas, a existência de seis bandas polimórficas de peroxidase, cinco das quais em baixa frequência e uma nitidamente caracterizante (P-32). Para posterior utilização deste sistema na identificação de génotipos considera-se necessário a análise de um maior número de indivíduos por população e de um maior número de populações de modo a se obter informação suficiente para uma correcta interpretação e utilização das bandas polimórficas registadas.

- v) A banda P-32 de peroxidase da raiz não existe na população estudada da subsp. *sesquipedalis*, permitindo, assim, a sua identificação relativamente às restantes populações das subspp. *cylindrica* e *unguiculata*.
- vi) No sistema enzimático peroxidase, verificou-se, na subsp. *unguiculata*, a existência de variabilidade entre populações da mesma cultivar, não se registando um zimograma único para os grupos de designação: "Gigante de Marialva", "Amarelo" e "Comum". Sabendo-se que a maioria da semente utilizada nesta cultura é multiplicada pelo próprio agricultor, não sendo cumpridas, normalmente, as normas de manutenção varietal (requisitos de pureza, qualidade, sanidade e uniformidade), é de se sugerir que a variabilidade observada resulte da ocorrência de polinização cruzada e/ou de ocasionais mutações.
- vii) A detecção de variabilidade entre as populações do mesmo grupo de designação varietal, quando se estudam as peroxidases da raiz, suporta a importância da realização de maior colheita de material vegetal nesta espécie, mesmo que apresentem idênticos fenótipos morfológicos.
- viii) Relativamente às relações de identidade entre as três subespécies estudadas, ambos os sistemas enzimáticos estudados demonstram a existência de uma maior proximidade génica entre as populações das subspp. *cylindrica* e *unguiculata*, relativamente à subsp. *sesquipedalis*.

Os resultados deste estudo e as respectivas conclusões referem-se a dois sistemas enzimáticos, reflectindo, portanto, apenas uma pequena fracção do genoma dos indivíduos estudados. Uma melhor caracterização das populações e uma melhor compreensão das relações génicas existentes entre as três subespécies estudadas requer no entanto a análise de outros sistemas enzimáticos para os quais se detectem polimorfismos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, W. T. 1983. Application of isozymes in tree breeding. *In* S. D. Tanksley and T. J. Orton (eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part A, 381-400. Elsevier, Amsterdam.
- Almgård, G. e Norman, T. 1970. Biochemical technique as an aid to distinguish some cultivars of barley and oats. *Agri. Hort. Genet.* **28**: 117-123.
- _____ e Landegren, V. 1974. Isoenzymatic variation used for the identification of barley cultivars. *Z. Pflzücht.* **72**: 63-73.
- _____ e Clapham, D. 1975. Isoenzyme variation distinguishing 18 *Avena* cultivars grown in Sweden. *Swed. J. Agric. Res.* **5**: 61-67.
- Anderson, J. W. e Rowan, K. S. 1967. Extraction of soluble leaf enzymes with thiols and other reducing agents. *Phytochem.* **6**: 1047-1065.
- Anderson, J. W. 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochem.* **7**: 1973-1988.
- Andrews, A. T. 1981. *Electrophoresis. Theory, techniques and biochemical and clinical applications.* Oxford University Press, New York.
- Bailey, D. C. 1983. Isozymic variation and plant breeders' rights. *In* S. D. Tanksley e T. J. Orton (eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part A, 425-440. Elsevier, Amsterdam.
- Bassiri, A. 1976. Barley identification by use of isozyme electrophoretic patterns. *Can. J. Plant. Sci.* **56**: 1-6.
- Beckmann, J. S. e Soller, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* **67**: 35-43.
- Bringhurst, R.S., Arulsekar, S., Hancock, J. F., Jr. e Voth, V. 1981. Electrophoretic characterization of strawberry cultivars. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **106**: 684-687.
- Brown, G. B., Deakin, J. R. e Wood, M. B. 1969. Identification of *Cucumis* species by paper chromatography of flavonoids. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **94**: 231-234.
- _____, _____ e Hoffman, J. C. 1971. Identification of snap bean cultivars by paper chromatography of flavonoids. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **96**: 477-481.

- Cabral, Fernanda, M. M. 1990. *Polimorfismo isoenzimático em Lupinus. Identificação e caracterização de populações (L. albus L. e L. luteus L.)*. Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Agronomia, para efeito de obtenção do grau de Doutor. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Cardy, B. J. e Kannenberg, W. 1982. Allozymic variability among maize inbred lines and hybrids: applications for cultivar identification. *Crop Sci.* **22**: 1016-1020.
- Castilho, A. 1951. *Manual enciclopédico do agricultor português, legumes alimentares, feijanico*, 149-175. Gazeta das Aldeias, Lisboa.
- Castro, L. F. T. 1988. Identificação de variedades em espécies vegetais através das isoenzimas. *Anais UATD* **1**: 41-50.
- _____. 1989. *Isoenzimas do Pinus pinaster Ait. numa perspectiva de aplicação ao melhoramento genético da espécie*. Dissertação apresentada à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, para efeito de obtenção do grau de Doutor. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Chen, H. K., Mok, M. C., Shanmugasundaram, S. e Mok, D. W. S. 1989. Interspecific hybridization between *Vigna radiata* e *V. glabrescens*. *Theor. Appl. Genet.* **78**: 641-647.
- Cherry, J. P. e Ory, R. L. 1973. Electrophoretic characterization of six selected enzymes of peanut cultivars. *Phytochemistry* **12**: 283-289.
- Cleland, W.W. 1964. Dithioireitol, a new protective reagent for -SH groups. *Biochem.* **3**: 480-482.
- Crawford, D. J. 1983. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. In S. D. Tanksley e T. J. Orton (eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part A. 257-287. Elsevier, Amsterdam.
- _____. 1990. Enzyme electrophoresis and plant systematics. In D. E. Soltis e P. S. Soltis (eds), *Isozymes in Plant Biology*, 146-164. Chapman and Hall, London.
- Crick, F. 1979. Split genes and RNA splicing. *Science* **204**: 264-271.
- Curtis, C. R. e Howell, R. K. 1971. Increases in peroxidase activity in bean leaves exposed to low doses of ozone. *Phytopatology* **61**: 1306-1307.
- Dias, J. C. S. 1986. *Produção e adaptação de culturas forrageiras Outono-Invernais no Campo Albicastrense*. Curso de Mestrado em Produção Vegetal, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Dunn, M. J. 1989. Electrophoretic analysis methods. In E. L. Harris e S. Angal (eds.), *Protein purification methods: a practical approach*, 18-42. IRL Press, Oxford.
- FAO. 1961. *Semences agricoles et horticoles. Production, contrôle et distribution*, 334-337. Rome.
- Faris, D. G., 1965. The origin and evolution of the cultivated forms of *Vigna sinensis*. *Can. J. Genet. Cytol.* **7**: 433-452.

- Fatokun, C. A. e Singh, B. B. 1987. Interspecific hybridization between *Vigna pubescens* and *V. unguiculata* (L.) Walp through embryo rescue. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **9**: 229-233.
- _____. 1991. Wide hybridization in cowpea: problems and prospects. *Euphytica* **54**: 137-140.
- Fery, R. L. 1981. Cowpea production in the United States. *HortScience* **16**(4): 474.
- Gallez, G. P. e Gottlieb, L. D. 1982. Genetic evidence for the hybrid origin of the diploid plant *Stephanomeria diegensis*. *Evolution* **36**: 1158-1167.
- Gates, P. e Boulter, D. 1979. The use of seed isoenzymes as an aid to the breeding of field beans (*Vicia faba* L.). *New Phytol.* **83**: 783-791.
- _____. 1980. The use of pollen isoenzymes as an aid to breeding of field beans (*Vicia faba* L.). *New Phytol.* **84**: 501-504.
- Giles, B. E. 1984. A comparison between quantitative and biochemical variation in the wild barley *Hordeum murinum*. *Evolution* **38**: 34-41.
- Gomez, A. 1983. Los granos de leguminosas como componentes proteicos para la alimentación animal. In J. I. Cubero e M. T. Moreno (eds.), *Leguminosas de grano*, 249-262. Mundi-Prensa, Madrid.
- Goodman, M. M., Stuber, C. W., Newton, K. e Weissinger, H. H. 1980. Linkage relationships of 19 isozyme loci in maize. *Genetics* **96**: 697-710.
- _____, _____. 1983. Maize. In S. D. Tanksley e T. J. Orton (eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part B, 1-33. Elsevier, Amsterdam.
- Gottlieb L. D. 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gdn.* **64**: 161-180.
- _____. 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* **216**: 373-380.
- _____. 1984. Electrophoretic analysis of the phylogeny of the selfing populations of *Clarkia xantiana*. *Pl. Syst. Evol.* **147**: 91-102.
- Graça, M. I. F. C. D. 1992. *Utilização de zimogramas de fosfatase ácida para o estudo de interações génicas em híbridos trigo x centeio*. Relatório de Estágio de Licenciatura em Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa.
- Graef, G. L., Fehr, W. R. e Cianzio, S. R. 1989. Relation of Isozyme Genotypes to Quantitative Characters in Soybean. *Crop Sci.* **29**: 683-688.
- Hadley, P., Roberts, E. H., Summerfield, R.J. e Minchrin, F. R. 1983. A quantitative model of reproductive development in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in relation to photoperiod and temperature, and implications for screening germplasm. *Ann. Bot.* **51**: 531-543.
- Hames, B. D. 1990. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In B. D. Hames e D. Rickwood (eds.), *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*, 1-139. Oxford University Press, New York.

- Hamrick, J. L. 1990. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In D. E. Soltis e P. S. Soltis (eds.), *Isozymes in plant biology*, 87- 105. Chapman and Hall, London.
- _____ e Godt, M. J. 1992. Allozyme diversity in plant species. In A. Brown, M. Clegg, A. Kahler e B. Weir (eds.), *Plant population genetics, breeding and genetic resources*, 43-63. Sinauer, Massachusetts.
- Hart, G. E. 1983. Hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). In S. D. Tanksley e T. J. Orton (eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding, Part B*, 35-56. Elsevier, Amsterdam.
- Hassan, O. A. E. e Hall, A. E. 1986. Influences of early and late nitrogen fixation on yield and nitrogen fixation of cowpea under well-watered and dry conditions. *Field Crops Research* **15**: 229-244.
- Hayward, J. L. e McAdam, N. J. 1977. Isoenzyme polymorfism as a mesure of distinctiviness and stability in cultivars of *Lolium perenne*. *Z. Pflzücht.* **79**: 59-68.
- Hiler, E. A., Van Bavel, C. H. M., Hossain, M. M. e Jordan, W. R. 1972. Sensitivity of southern peas to plant water deficit at three growth stages. *Agron. J.* **64**: 60-64.
- Humphreys, M. O. 1992. association of agronomic traits with isozyme loci in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Euphytica* **59**: 141-150.
- Hunter, R. L. e Markert, C. L. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* **125**: 1294-1295.
- Jaaska, V. e Jaaska, V. 1989. Isoenzyme differentiation between Asian beans *Vigna radiata* e *V. mungo*. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **185**: 41-53.
- Jefferies, R. L. e Gottlieb, L. B. 1982. Genetic differentiation of the microspecies *Salicornia europaea* L. (*sensu stricto*) and *S. ramosissima* J. Woods. *New Phytol.* **92**: 123-129.
- Kahler, A. L. 1985. Associations between enzyme loci and agronomic traits in maize. *Proceedings of the 40th Annual Corn and Sorghum Research Conference, American Seed Trade Association* **40**: 66-89.
- Kenneth, J. Turk, Hall, Anthony E. e Asbell, C. W. 1980. Drought adaptation of cowpea. Influence of drought on seed yield. *Agron. J.* **72**: 413-420.
- Kusmenoglu, I. Muehlbauer, F. J. e Kazan, K. 1992. Inheritance of isozyme variation in Ascochyta blight-resistance chickpea lines. *Crop Sci.* **32**: 121-127.
- Langer, R. H. M. e Hill, G. D. 1982. *Agricultural plants*. Cambridge Univiversity Press, Cambridge, 249-251.
- Loomis, W. D. e Bataille, J. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochem.* **5**: 423-438.
- Makinen, Y. e McDonald, T. 1968. Isoenzyme polymorfism in flowering plants. II. Pollen enzymes and isoenzymes. *Physiol. Plant.* **21**: 477-486.

- Markert, C. L e Moller, F. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, autogene and species specific patterns. *Proc. Natn. Acad. Sci.* **45**: 753-763.
- Maréchal, R., Mascherpa, J. M. e Stainer, F. 1978. Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (*Papilionaceae*) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera*. **28**: 1-273.
- Marsh, D. B., Waters, L. Jr. and Marten, G. C. 1987. Forage potential of cowpea in a double-cropping system following greenpeas. *HortScience* **22**: 241-243.
- Marshall, D. R. e Brown, A. D. H. 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation. In O. H. Frankel e J. G. Hawkes (Eds.), *Crop genetic resources for today and tomorrow*, 53-78. Cambridge University Press, Cambridge.
- Martins, L. F. B. 1986. O feijão frade, uma proteagínosa esquecida em Portugal. In *Jornadas Portuguesas de Proteagínosas*, 241-249. Oeiras.
- May, B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes. In A. R. Hoelzel (ed.), *Molecular genetic analysis of populations, a practical approach*, 1-27. Oxford University Press, New York.
- McCown, B. H., Hall, T. C. e Beck, G. E. 1969. Plant leaf and stem proteins. II. Isozymes and environmental change. *Plant Physiol.* **44**: 210-216.
- McMillin, D. E. 1983. Plant isozymes: a historical perspective. In S. D. Tanksley e T. J. Orton (eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part A, 1-13. Elsevier, Amsterdam.
- Miller Jr., J. C. 1987. Cowpea production and research - historical and current perspectives. *Proceedings of the Southernpea (cowpea) workshop*. Texas, USA.
- Mutters, R. G., Ferreira, L. G. R. e Hall, A. E. 1989. Proline content of the anthers and pollen of heat-tolerant and heat sensitive cowpea subjected to different temperatures. *Crop Sci.* **29**: 1497-1500.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 3321-3323.
- Nielson, G. 1980. Identification of all genotypes in tetraploid ryegrass (*Lolium* spp.) segregating for four alleles in a PGI-enzyme locus. *Hereditas* **92**: 49-52.
- Oliveira, J. S. 1976. *Proteínas vegetais. Sua contribuição actual e potencial para a cobertura do défice proteico mundial*. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Ostergaard, H. e Nielsen, G. 1981. Cultivar identification by means of isozymes. I. Genotypic survey of the PGI-2 locus in tetraploid ryegrass. *Z. Pflzücht.* **87**: 121-132.
- Payne, R. C. e Koszykowski, T. J. 1978. Esterase isoenzyme differences in seed extracts among soybean cultivars. *Crop Sci.* **18**: 557-559.
- Pharmacia. s.d. IEF and electrophoretic titration curve analysis. *Separation Technique File n° 100, PhastSystem*. Pharmacia, Sweden.
- _____ 1990. *PhastSystem. Users manual*. Pharmacia, Sweden.

- Pierpoint, W. S. 1966. The enzymic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinones produced. *Biochem. J.* **98**: 567-580.
- Righetti, P. G., Gianazza, E., Gelfi, C. e Chiari, M. 1990. Isoelectric focusing. In B. D. Hames e D. Rickwood (eds.), *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*, 149-216. Oxford University Press, New York.
- Roberts, D. W. A. 1969. A comparison of the peroxidase isozymes of wheat plants grown at 6 °C and 20 °C. *Can. J. Bot.* **47**: 263-265.
- Roux, L. 1987. Utilisation des isoenzymes comme marqueurs genetiques. *Le selectionneur français* **39**: 31-39.
- Scandalios, J. G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochem.Genet.* **3**: 37-79.
- Shannon, L. M. 1968. Plant isoenzymes. *Ann. Rev. Pl. Physiol.* **19**: 187-210.
- Shaw, C. R. 1965. Electrophoretic variations in enzymes. *Science* **149**: 936-943.
- Shields, C. R., Orton, T. J. e Stuber, C. W. 1983. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissues. In S. D. Tanksley e T. J. Orton (eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part A, 443-468. Elsevier, Amsterdam.
- Simpson, M. J. A. e Withers, L. A. 1986. *Characterization of plant genetic resources using isozyme electrophoresis: a guide to the literature*. IBPGR, Rome.
- Singh, C. F. e Thompson, B. D. 1969. the possibility of identification of vegetable varieties by paper chromatography of flavonoid compounds. *Proc. Natn. Acad. Sci.* **77**: 520-527.
- Singh, R. S., Jain, S. K. e Qualset, C. O. 1973. Protein electrophoresis as an aid to oat variety identification. *Euphytica* **22**: 98-105.
- Smith, J. S. C. 1989. Gene markers and their use in the conservation, evaluation, and utilization of genetic resources of maize (*Zea mays* L.). In H.T. Stalker e C. Chapman (eds.), *Scientific management of germplasm: characterization, evaluation and enhancement*, 127-135. IBPGR, Rome.
- Soltis, D. E. e Rieseberg, L. H. 1986. Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae); genetic insights from enzyme electrophoresis. *Amer. J. Bot.* **73**: 310-318.
- _____ e Soltis, P. S. 1990. *Isozymes in plant biology*. Chapman and Hall, London.
- Steele, W. M. and Mehra, K. L. 1980. Structure evolution and adaptation to farming systems and environments in *Vigna*. In Summerfield e A. H. Bunting (eds.), *Advances in legume Science*, 393-404. London.
- _____, Allen, D. J. e Summerfield, R.J. 1984. Cowpea. In Summerfield e R. E. H. Collins (eds.), *Grain legume crops*, 520-583. London.
- _____ 1986. Cowpeas. In N. W. Simmonds (ed.), *Evolution of crop plants*, 183-185. Longman, U. K.

- Stuber, C. W. e Moll, R. H. 1972. Frequency changes of isozyme alleles in a selection experiment for grain yield in maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* **12**: 337-340.
- _____, Goodman, M. M., Schaffer, H. E. e Weir, B. S. 1980. Allozyme frequency changes associated with selection for increased grain yield in maize (*Zea mays* L.). *Genetics* **95**: 225-236
- _____, Edwards, M. D. e Moll, R. H. 1982. Improvement of yield and ear number resulting from selection at allozyme loci in a maize population. *Crop Sci.* **22**: 737-740.
- _____. 1990. Isozymes as markers for studying and manipulating quantitative traits. In D. E. Soltis e P. S. Soltis (eds), *Isozymes in Plant Biology*, 206-219. Chapman and Hall, London.
- Tanksley, S. D. e Rick, C. M. 1980. Isozyme linkage map of tomato: Applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.* **57**: 161-170.
- _____, Medina-Filho, H. e Rick, C. M. 1982. Use of naturally-occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. *Heredity* **49**: 11-25.
- _____ e Orton, T. J. 1983. *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier, Amsterdam.
- _____. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**: 3-8
- Tendinha, I. M. V. F. 1988. *Caracterização química e nutritiva do resíduo de feijão frade *Vigna unguiculata* (L.) Walp.* Universidade Técnica de Lisboa, Escola Superior de Medicina Veterinária, Lisboa.
- Vallejos, C. E. 1983. Enzyme staining. In S. D. Tanksley e T. J. Orton (eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part A, 469-516. Elsevier, Amsterdam.
- _____ e Tanksley, S. D. 1983. Segregation of isozyme markers and cold tolerance in an interspecific backcross of tomato. *Theor. Appl. Genet.* **66**: 241-247.
- Verdcourt, B. 1970. Studies on the Leguminosae-papilionoideae for the flora of the East Tropical Africa IV. *Kew Bull.* **24**: 507-569.
- Warrag, M. O. A. e A. E. Hall. 1983. Reproductive responses of cowpea to heat stress: genotypic differences in tolerance to heat at flowering. *Crop Sci.* **23**: 1088-1092.
- Weeb, E. 1964. *Nature* **497**: 821.
- Weeden, N. F. e Gottlieb, L. D. 1979. Distinguishing allozymes and isozymes of phosphoglucosomerase by electrophoretic comparisons of pollen and somatic tissues. *Biochem. Genet.* **17**: 287-296.
- _____. 1983. Evolution of plant isozymes. In Tanksley e T. J. Orton (eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part A, 177-208. Elsevier, Amsterdam.
- _____ e Marx, G. A. 1984. Chromosomal location of twelve isozyme loci in *Pisum sativum*. *J. Hered.* **75**: 365-370.

- _____ e Provvidenti, R. 1988. A marker locus, *Adh-1*, for resistance to pea enation mosaic virus in *Pisum sativum*. *J. Hered.* **79**: 128-131.
- _____ 1990. Genetics of Plant Isozymes. In D. E. Soltis e P. S. Soltis (eds), *Isozymes in Plant Biology*, 46-72. Chapman and Hall, London.
- Wehner, D. J., Duich, J. M. e Watschke, T. L. 1976. Separation of kentucky bluegrass cultivars using peroxidase isoenzyme banding patterns. *Crop Sci.* **16**: 475-480
- Wendel, J. F., Stuber, C. W., Edwards, M. D. e Goodman, M. M. 1986. Duplicated chromosomal segments in maize (*Zea mays* L.): Further evidence from hexokinase isozymes. *Theor. Appl. Genet.* **72**: 178-185.
- _____ e Weeden, N. F. 1990. Visualization and Interpretation of Plant Isozymes. In D. E. Soltis e P. S. Soltis (eds), *Isozymes in Plant Biology*, 5-45. Chapman and Hall, London.
- Wilkinson, J. F. e Beard, J. B. 1972. Electrophoretic identification of grape varieties by isozyme banding patterns. *Am. J. Enol. Vitic.* **27**: 68-73.
- Zablotowicz, R. M., Focht, D. D. e Cannell G.H. 1981. Nodulation and N fixation of field-grown California cowpeas as influenced by well-irrigated and drought conditions. *Agron. J.* **73**: 9-12.

ANEXO 1

Compostos químicos utilizados na detecção das isoenzimas

Quadro A1.1 - Lista dos reagentes químicos utilizados na detecção das isoenzimas.

Composto Químico	Firma	Referência
3A9EC	Sigma	A-5754
Ácido Chiquímico	Sigma	S-5375
Ácido glutâmico	Sigma	G-1626
Acetato de α -naftilo	Merck	12154
DMF	Sigma	D-8654
Fosfato ácido de α -naftilo de sódio	Sigma	N-7000
Glicerofosfato	Sigma	G-2138
MTT	Sigma	M-2128
NAD	Sigma	N-8521
NADP	Sigma	N-0505
PMS	Sigma	P-9625
Sal de diazônio Fast Blue RR	Sigma	F-0500
Sal de diazônio Fast Garnet GBC	Fluka	44710

ANEXO 2

Condições utilizadas na revelação das isoenzimas

A2.1 - Álcool Desidrogenase (ADH)

TRIS 0,1 M	20,0 ml	pH 7,5
NAD	6,0 mg	
MTT	4,0 mg	
PMS	0,8 mg	
Etanol	1,2 ml	

Procedimento: Após a mistura dos reagentes com a solução tampão, a incubação foi realizada no escuro à temperatura de 30 °C, durante 30 minutos.

A2.2 - Glicerol 3-fosfato desidrogenase (G3P)

TRIS 30 mM	20,0 ml	pH 8,0
Glicerofosfato	20,0 mg	
NAD	40,0 mg	
MTT	4,0 mg	
PMS	0,8 mg	

Procedimento: Após a mistura dos reagentes com a solução tampão, a incubação foi realizada no escuro à temperatura de 30 °C, durante 30 minutos.

A2.3- Chiquimato desidrogenase (SKD)

TRIS 0,1 M	20,0 ml	pH 7,5
Ácido chiquímico	20,0 mg	
NADP	3,0 mg	
MTT	4,0 mg	
PMS	0,8 mg	

Procedimento: Após a mistura dos reagentes com a solução tampão, a incubação foi realizada no escuro à temperatura de 30 °C, durante 30 minutos.

A2.4 - Glutamato desidrogenase (GDH)

TRIS 0,1 M	20,0 ml	pH 7,5
CaCl ₂	20,0 mg	
Ácido glutâmico	160,0 mg	
NAD	6,0 mg	
MTT	4,0 mg	
PMS	0,8 mg	

Procedimento: Após a mistura dos reagentes com a solução tampão, a incubação foi realizada no escuro à temperatura de 30 °C, durante 60 minutos.

A2.5 - Peroxidase (PRX) - Condições utilizadas nas análises finais

Acetato de sódio 50 mM	20,0 ml	pH 4,5
DMF	3,0 ml	
3A9EC	40,0 mg	
H ₂ O ₂ 3%	0,25 ml	

Procedimento: Dissolver o 3A9EC no DMF e adicionar depois à solução tampão. O peróxido de hidrogénio é adicionado imediatamente antes da incubação, a qual se realiza à temperatura de 30 °C durante aproximadamente 30 minutos.

A2.6 - Esterase (EST)

TRIS 0,08 M	20,0 ml	pH 8,0
Acetato de α -naftilo	20,0 mg	
Fast Blue RR	30,0 mg	
Acetona	1,0 ml	

Procedimento: dissolver o substrato na acetona e o sal de diazónio na solução tampão. Misturar em seguida as duas soluções. A incubação foi realizada no escuro à temperatura de 30°C, durante 60 minutos.

A2.7 - Fosfatase Ácida (ACP) - Condições utilizadas nas análises finais

Tampão acetato de sódio 0,2 M	20,0 ml	pH 5,5
Fosfato ácido de α -naftilo de sódio	0,1 g	
Fast garnett GBC	0,1 g	

Procedimento: Dissolver o sal de diazónio na solução tampão e adicionar depois o fosfato ácido de α -naftilo. A incubação foi realizada no escuro à temperatura de 40 °C, durante 30-45 minutos.

ANEXO 3

Frequências relativas das bandas dos sistemas enzimáticos fosfatase ácida e peroxidase

Quadro A3.1 - Frequências relativas das bandas do sistema enzimático fosfatase ácida, obtidas por focagem isoelétrica, em folhas de *Vigna unguiculata*.^a

Bandas	Populações							
	03	15	18	27	30	33	43	50
F - 01	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
F - 02	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 03	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 04	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 05	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 06	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 07	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 08	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 09	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 10	0,625	0,750	0,750	0,625	0,750	0,625	0,750	0,750
F - 11	0,500	0,750	0,625	0,500	0,500	0,500	0,625	0,625
F - 12	0,625	0,625	0,750	0,500	0,500	0,625	0,625	0,625
F - 13	0,750	0,625	0,500	0,750	0,500	0,625	0,750	0,750
F - 14	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
F - 15	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 16	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
F - 17	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 18	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
F - 19	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
F - 21	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 22	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
PI	0,041	0,039	0,039	0,042	0,043	0,043	0,038	0,038

^a 03, "Amarelo"; 15, "Comum"; 18, "Amarelo"; 27, "Amarelo"; 30, "Comum"; 33, "Gigante de Marialva"; 43, "Comum"; 50, "Gigante de Marialva"; PI, índice de polimorfismo.

Quadro A3.2 - Frequências relativas das bandas do sistema enzimático fosfatase ácida, obtidas por focagem isoelectrica, em folhas de *Vigna unguiculata*.^a

Bandas	Populações							
	61	66	68	69	71	77	79	82
F - 01	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
F - 02	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 03	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 04	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 05	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 06	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 07	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 08	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 09	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 10	0,750	0,625	0,750	0,625	0,750	0,625	0,750	0,750
F - 11	0,500	0,625	0,625	0,625	0,750	0,500	0,625	0,750
F - 12	0,625	0,500	0,750	0,500	0,625	0,625	0,500	1,000
F - 13	0,625	0,625	0,500	0,500	0,500	0,625	0,750	1,000
F - 14	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
F - 15	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
F - 16	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
F - 17	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
F - 18	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
F - 19	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
F - 20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
F - 21	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
F - 22	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
PI	0,041	0,043	0,039	0,044	0,039	0,043	0,039	0,017

^a 61, "Gigante de Marialva"; 66, "Gigante de Marialva"; 68, "Gigante de Marialva"; 69, "Gigante de Marialva"; 71, "Gigante de Marialva"; 77, "Gigante de Marialva"; 79, "Gigante de Marialva"; 82, subsp. *sesquipedalis*; PI, índice de polimorfismo.

Quadro A3.3 - Frequências relativas das bandas do sistema enzimático fosfatase ácida, obtidas por focagem isoclétrica, em folhas de *Vigna unguiculata*.^a

Bandas	Populações							
	87	88	89	91	102	106	107	113
F - 01	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
F - 02	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 03	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 04	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 05	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 06	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 07	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 08	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 09	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
F - 10	0,750	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,750	0,750
F - 11	0,500	0,500	0,625	0,500	0,750	0,500	0,625	0,875
F - 12	0,500	0,750	0,750	0,625	0,625	0,750	0,625	1,000
F - 13	0,625	0,625	0,500	0,500	0,500	0,625	0,750	1,000
F - 14	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
F - 15	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
F - 16	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
F - 17	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
F - 18	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
F - 19	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
F - 20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
F - 21	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
F - 22	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
PI	0,042	0,041	0,041	0,044	0,041	0,041	0,038	0,013

^a 87, "Gigante de Marialva"; 88, "Gigante de Marialva"; 89, "Gigante de Marialva"; 91, "Amarco"; 102, "Cream"; 106, subsp. *cylindrica*; 107, subsp. *cylindrica*; 113, "Arroz"; PI, índice de polimorfismo.

Quadro A3.4 - Frequências relativas das bandas do sistema enzimático peroxidase, obtidas por focagem isoeléctrica, em raízes de *Vigna unguiculata*.^a

Bandas	Populações							
	03	15	18	27	30	33	43	50
P - 01	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 02	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 03	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 04	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 05	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 06	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 07	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 08	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 09	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 10	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 11	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 12	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 13	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 14	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 15	0,375	0,500	0,500	0,375	0,375	0,875	0,750	0,500
P - 16	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 17	0,000	0,750	0,000	0,500	0,000	0,500	0,500	0,875
P - 18	0,125	0,875	0,000	0,750	0,000	0,500	0,000	0,000
P - 19	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000
P - 20	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 21	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 22	1,000	0,625	0,375	0,500	0,625	0,500	0,500	0,500
P - 23	0,375	0,000	0,000	0,000	0,375	0,000	0,000	0,000
P - 24	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 25	0,750	0,750	0,750	0,875	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 26	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 27	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 28	0,000	0,000	0,125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500
P - 29	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 30	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 31	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 32	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
PI	0,024	0,030	0,024	0,032	0,021	0,027	0,021	0,027

^a 03,"Amarelo";15,"Comum";18,"Amarelo"; 27,"Amarelo"; 30,"Comum"; 33,"Gigante de Marialva"; 43,"Comum"; 50," Gigante de Marialva"; PI, índice de polimorfismo.

Quadro A3.5 - Frequências relativas das bandas do sistema enzimático peroxidase, obtidas por focagem isoeléctrica, em raízes de *Vigna unguiculata*.^a

Bandas	Populações							
	61	66	68	69	71	77	79	82
P - 01	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 02	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 03	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 04	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 05	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 06	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 07	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 08	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 09	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 10	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 11	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 12	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 13	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 14	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 15	0,250	0,375	0,250	0,250	0,375	0,375	0,250	0,250
P - 16	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 17	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
P - 18	0,000	1,000	0,000	0,000	0,250	0,000	0,000	1,000
P - 19	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 20	1,000	0,750	1,000	1,000	0,875	1,000	1,000	0,875
P - 21	1,000	1,000	1,000	1,000	0,875	1,000	1,000	0,250
P - 22	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
P - 23	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
P - 24	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 25	0,875	0,375	0,375	0,375	0,500	0,375	0,375	0,250
P - 26	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 27	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 28	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
P - 29	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 30	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 31	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 32	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
PI	0,009	0,014	0,013	0,013	0,028	0,015	0,021	0,021

^a 61, "Gigante de Marialva"; 66, "Gigante de Marialva"; 68, "Gigante de Marialva"; 69, "Gigante de Marialva"; 71, "Gigante de Marialva"; 77, "Gigante de Marialva"; 79, "Gigante de Marialva"; 82, subsp. *sesquipedalis*; PI, índice de polimorfismo.

Quadro A3.6 - Frequências relativas das bandas do sistema enzimático peroxidase, obtidas por focagem isoeléctrica, em raízes de *Vigna unguiculata*.^a

Bandas	Populações							
	87	88	89	91	102	106	107	113
P - 01	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 02	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 03	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 04	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 05	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 06	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 07	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 08	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 09	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 10	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 11	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 12	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 13	1,000	1,000	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 14	1,000	1,000	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 15	0,375	0,000	0,500	0,250	0,125	0,625	0,250	0,125
P - 16	1,000	1,000	0,100	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 17	0,000	0,000	0,250	0,250	0,125	0,125	0,125	0,000
P - 18	0,125	0,000	0,125	0,875	1,000	1,000	1,000	0,875
P - 19	0,750	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 20	1,000	0,875	1,000	1,000	1,000	0,750	1,000	0,125
P - 21	1,000	0,625	1,000	0,875	1,000	0,500	0,625	0,125
P - 22	0,625	0,500	1,000	0,500	0,750	0,125	0,000	0,125
P - 23	0,000	0,000	0,125	0,000	0,125	0,125	0,125	0,250
P - 24	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 25	0,750	0,375	1,000	0,875	0,625	0,750	1,000	0,750
P - 26	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 27	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 28	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
P - 29	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 30	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 31	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
P - 32	0,875	1,000	1,000	1,000	0,875	1,000	1,000	1,000
PI	0,027	0,029	0,036	0,029	0,027	0,037	0,020	0,029

^a 87, "Gigante de Marialva"; 88, "Gigante de Marialva"; 89, "Gigante de Marialva"; 91, "Amarelo"; 102, "Cream"; 106, subsp. *cylindrica*; 107, subsp. *cylindrica*; 113, "Arroz"; PI, índice de polimorfismo.