

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS
ESALQ/USP
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FLORESTAIS

SÉRIE TÉCNICA
ISSN – 0100-8137

**UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DA ELETROFORESE EM GENÉTICA
FLORESTAL**

Arnoldo Meister Pimentel

Sér. Téc. - IPEF	Piracicaba	v.5	n.15	p. 1 – 27	Mai. 1988
------------------	------------	-----	------	-----------	-----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

2. ELETROFORESE

3. VANTAGENS DA ISOENZIMA COMO MARCADOR GENÉTICO

4. APLICAÇÕES EM QUE “LOCOS” ENZIMÁTICOS SÃO UTILIZADOS COMO REPRESENTATIVOS DO GENOMA

4.1. Estimativa de Níveis de Variabilidade Genética em Populações Naturais

4.2. Fornecimento de Informações Úteis para a Conservação de Genes

5. APLICAÇÃO DE ISOENZIMAS NO MELHORAMENTO FLORESTAL

5.1. Certificação e Identificação de Parentais, Clones de Árvores e Híbridos

5.2. Certificação e Identificação de Lotes de Sementes

5.3. Determinação da validade de Cruzamentos Controlados

5.4. Estudos Sobre a Eficiência Genética de Pomares de Sementes

5.5. Determinação da Eficácia de Polinização Massal Suplementar

5.6. Correlação entre Características de Importância Econômica e Genótipo-Isoenzima

6. CONCLUSÃO

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DA ELETROFORESE EM GENÉTICA FLORESTAL

ARNOLDO MEISTER PIMENTE

Pós-Graduando em Genética

ESALQ/USP

Caixa Postal, 9 – 13400 – Piracicaba - SP

1. INTRODUÇÃO

A eletroforese está sendo muito usada e tem provocado entusiasmo nas áreas de genética de populações e evolutiva, sistemática e melhoramento vegetal. Esta técnica possibilita o estudo da variação genética ao nível de enzimas, as quais representam a expressão primária do gene.

Os procedimentos laboratoriais utilizados nesta técnica sofrem variações conforme a espécie que está sendo pesquisada, o tipo de tecido que está sendo coletado (semente, raiz, folhas, bulbos, tecido cortical ou vegetativo, etc.), o tipo de proteína observada, etc...

Esta técnica, em sido adotado em muitos países para identificação de cultivares e registro de patentes, principalmente em trigo, milho, cevada e aveia.

Os estudos de natureza evolutiva tam'bem tem tido muita importância nos campos de genética de populações e sistemática, na medida que detectam uma maior parte da variabilidade genética existente no indivíduo, em comparação com as técnicas mendelianas clássicas.

Isoenzimas obtidas por eletroforese forma inicialmente utilizadas em estudos genéticos de espécies florestais há aproximadamente 10 anos (Ferret & Bergmann, 1979, citados por ADAMS, 1983), para investigações da estrutura genética de populações naturais. Embora o resultado destas investigações tenham tido indubitável valor para o estudo da genética das espécies florestais, a aplicação direta de isoenzimas em resoluções de problemas do melhoramento florestal tem sido bastante limitada (Ferret & Bergmann, 1979; Rudin & Lundkvist, 1980, citados por ADAMS, 1983).

Apesar disso, isoenzimas apresentam um elevado potencial que deve ser explorado e aplicado em programas de melhoramento florestal, principalmente para identificação de subpopulações e de progenitores, origem de sementes, determinação da eficiência de técnicas de polinização massal e do nível de endogamia ou de contaminação em pomares de sementes e como instrumento auxiliar em programas de melhoramento através de seleção indireta (YEH, 1979).

2. ELETROFORESE

Das muitas técnicas existentes para a análise de proteínas (enzimáticas ou não), a eletroforese em gel é sem dúvida a mais versátil e facilmente aplicável. A eletroforese pode ser definida como a migração de modo diferencial e próprio de partículas eletricamente carregadas, quando submetida a um determinado potencial elétrico em um pH dado (LOPES, 1984).

Na prática, quantidades mínimas de extratos crus de tecidos (sangue, insetos, folhas, caules, cotilédones ou endospermas de plantas esmagadas, etc.) homogeneizados de vários indivíduos são colocados em uma fenda de um suporte normalmente feito de amido de

batata, poliacrilamida, agar, agarose, acetato de celulose, ou qualquer outra substância capaz de formar uma matriz homogênea. Quando se faz passar uma corrente elétrica através do gel, as proteínas do tecido migram a uma velocidade determinada em função da carga elétrica dos aminoácidos que a constituem, embora o tamanho e a configuração da proteína possam também influir na velocidade de migração. A eletroforese é tão sensível que se podem detectar proteínas que só diferem em um aminoácido de um total de várias centenas que as constituem (AYALA, 1978).

As proteínas sintetizadas por diferentes indivíduos de uma população são comparadas fazendo-as correr em posição vizinha no gel durante um determinado tempo. Uma vez que as proteínas tenham migrado, determina-se a posição das mesmas aplicando um corante específico para a proteína que está em estudo. Como produto da reação CORANTE-ENZIMA forma-se um complexo colorido e insolúvel no gel. Dessa forma, pode-se visualizar, no gel, uma banda colorida, correspondente à posição de migração de enzima originalmente presente na amostra. Se a enzima for homogênea, apenas uma banda será vista no gel. No caso de amostra analisada conter enzimas com diferentes cargas ou de diferentes tamanhos ou configurações espaciais, diversas frações são separadas dando origem a diversas bandas coloridas no gel (MEDINA FILHO, 1983).

Como cada cadeia de aminoácidos de uma proteína (algumas proteínas são formadas por mais de uma cadeia) é o produto de um só gene, este estudo permite ao pesquisador estimar o número de locos de uma população que apresenta alelos múltiplos e quantos estão em homozigose.

A eletroforese, portanto, constitui-se em uma técnica que permite a detecção de mutações que alteram a estrutura das enzimas, que passa a ter múltiplas formas moleculares, modificando sua mobilidade eletroforética, porém, mantendo suas atividades catalíticas (PIRES, 1983).

O termo “isoenzima” foi proposto por MARKET & MOLLER (1959) para descrever diferentes formas moleculares de proteínas, que apresentam especificidade enzimática similar ou idêntica. Segundo a “Enzyme Commission for the International Union of Biochemistry” (1976), o termo “isoenzima” deveria ser limitado às formas diferentes que surgissem por modificações da estrutura primária das proteínas e o termo “formas múltiplas” seria mais abrangente, incluindo todas as formas moleculares de uma proteína com a mesma atividade enzimática. Um outro termo- “aloenzima” – foi criado para designar as proteínas variantes, produzidas por diferentes alelos de um mesmo loco (GOTTLIEB, 1971).

De forma mais elucidativa poderemos diferenciar o termo isoenzima de aloenzima da seguinte maneira: ao colocarmos um corante específico em um substrato onde procedeu-se uma corrida eletroforética observamos que surgem um número “n” de bandas, as quais denominamos de isoenzimas. Quando algumas destas bandas são identificadas como produtos de diferentes alelos de um mesmo loco, passam a ser chamadas de aloenzimas.

O fenômeno da multiplicidade enzimática já era conhecida em alguns casos, há muitos anos, porém foi somente após o desenvolvimento da técnica do zimograma (padrão eletroforético observado para um determinado sistema enzimático) por Hunter & Markert, citados por LOPES (1984), que a ocorrência de isoenzimas passou a ser investigada ativamente.

3. VANTAGENS DA ISOENZIMA COMO MARCADOR GENÉTICO

Os enormes avanços obtidos no conhecimento científico no último quarto do século foram alcançados, em boa parte, através da introdução de novas técnicas científicas. Entre estas encontra-se a eletroforese, que tem possibilitado ampliar as fronteiras da análise química e biológica até então difíceis ou impossíveis de serem alcançadas (SMITH & FEIMBERG, 1979).

As isoenzimas obtidas por eletroforese apresentam-se como excelente material para estudos genéticos, pois:

1º) São muito pouco influenciadas pelo ambiente (PIRES, 1983), de tal forma que a variação no padrão de bandeamento pode ser diretamente comparada à variação do gene que codifica proteínas variantes (GOTTLIEB, 1971);

2º) O padrão de bandas é tratado como um fenótipo e investigado por testes genéticos que determinam quais bandas são codificadas por genes alélicos e quais são especificadas por genes não alélicos (GOTTLIEB, 1971);

3º) Apresentam um controle monogênico (PIRES, 1983), com as bandas quase sempre segregando como simples fatores medelianos, o que obviamente simplifica grandemente a análise (GOTTLIEB, 1971);

4º) A utilização de técnicas eletroforéticas requer apenas algumas horas ou dias (PIRES, 1983);

5º) Elas podem ser empregadas como marcadores, constituindo-se em um método indireto de seleção de características de importância econômica, porque os genes que codificam certas enzimas podem estar ligados a genes que controlam essas características quantitativas (Medina Filho & Tanksley, citados por PIRES, 1983);

6º) Quando houver homogeneidade na população a expressão das isoenzimas será qualitativa;

7º) Possibilita a contagem de locos que variam e que apresentam variação (GOTTLIEB, 1971).

HUBBY & LEWONTIN (1966) salientam que a eletroforese permite a detecção de diferenças fenotípicas causadas por substituição alélica em um único loco do indivíduo, a identificação de substituições alélicas em outros locos e a avaliação de uma amostra substancial do genoma. Todos os cálculos baseados em eletroforese são influenciados pela pequena fração do genoma analisado, pela exclusão dos genes reguladores e pelo fato de nem todas as substituições de aminoácidos serem detectadas (WAGNER & SELANDER, 1974). Algumas dessas afirmações serão melhor discutidas nos próximos tópicos.

Deve-se salientar que a técnica de eletroforese é aplicável a qualquer tipo de planta e, de imediato, revela grande número de locos e alelos. O equipamento (Figura 1) empregado em eletroforese é de fácil operação, econômico, bastante simples e de fabricação nacional, podendo mesmo ser construído de forma artesanal (MEDINA FILHO, 1983).

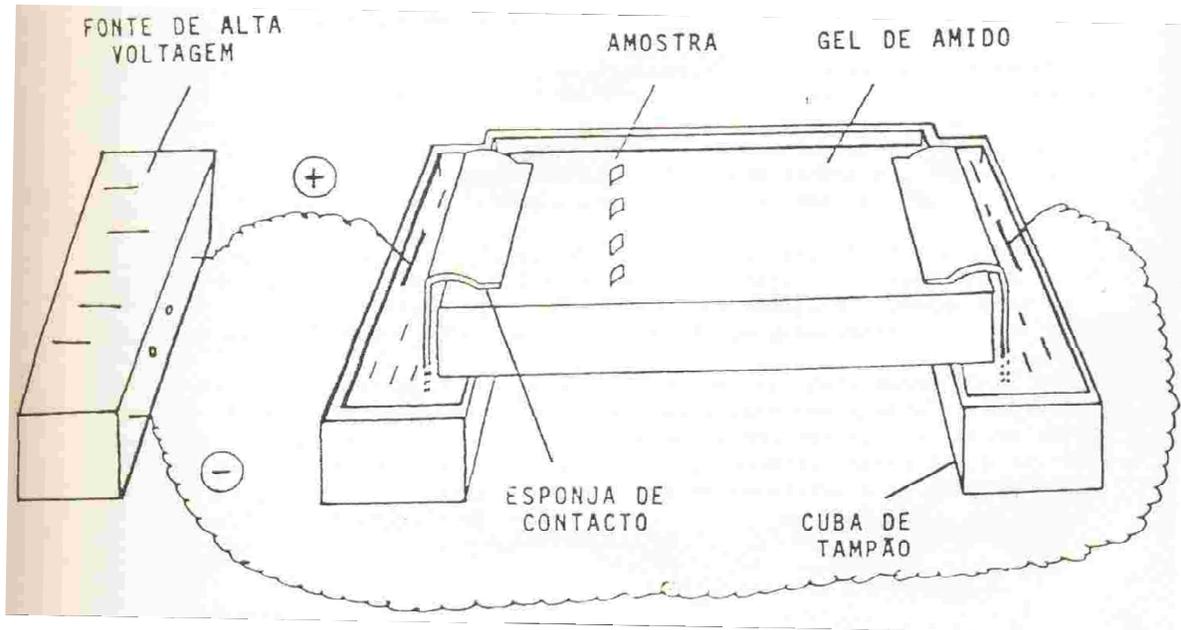


FIGURA 1. Equipamento utilizado em eletroforese horizontal de amido.

A técnica de eletroforese é também bastante simples (Figura 2), sendo necessária apenas pequena quantidade de material vegetal a qual não requer purificação ou outro processamento adicional para ser analisada (MEDINA FILHO, 1983).

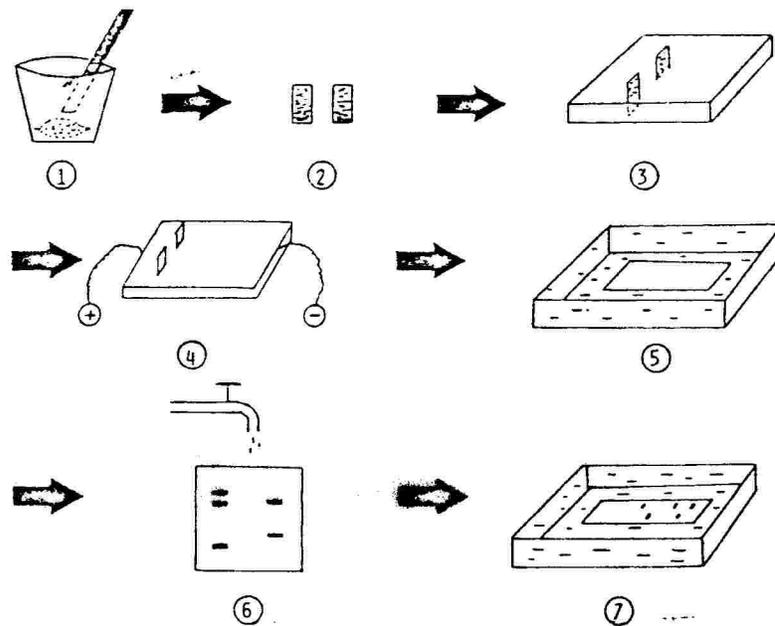


FIGURA 2. Representação esquemática do processo de eletroforese em gel de amido: 1) tecido vegetal de plantas individuais é macerado para a liberação das enzimas; 2) o líquido resultante contendo as enzimas (proteínas) é absorvido em papel filtro; 3) inserido no gel de amido; 4) submetido então à passagem de corrente elétrica para a migração das proteínas; 5) remoção da cuba de tampão para visualização das bandas.

após a migração, o gel é colocado numa bandeja de revelação contendo substrato e corante; 6) após o aparecimento das bandas, procede-se à lavagem; 7) fixação do gel.

4. APLICAÇÕES EM EU LOCOS ISOENZIMÁTICOS SÃO UTILIZADOS COMO REPRESENTATIVOS DO GENOMA

4.1. Estimativa de níveis de variabilidade genética em populações naturais

A controvérsia a respeito dos processos responsáveis por manterem altos níveis de polimorfismo genético em populações naturais pode ser em parte esclarecida e essa variabilidade ser detectada por eletroforese. Mais do que caracteres morfológicos, as isoenzimas obtidas por eletroforese são extraordinariamente mais sensíveis para estimar variabilidade genética, tendo em vista que elas representam a expressão primária do gene (MARCON, 1985).

As técnicas de eletroforese para estimar a variação genética em populações primeiramente foram aplicadas no homem por Harris (citação feita por DOBZHANSKY et alii, 1977). A partir de então, sua aplicação começou a se difundir rapidamente, envolvendo populações de vários organismos.

O grau de polimorfismo varia muito de um loco para outro numa mesma população. Na maioria dos organismos estudados existe uma grande variação genética, no entanto, em algumas populações pesquisadas não foi detectada variação genética. Nestes casos a explicação mais conveniente parece ser o fato de que estas populações, num período recente, foram reduzidas a um pequeno número de indivíduos (DOBZHANSKY et alii, 1977).

Com o auxílio desta técnica tem sido possível determinar variabilidade entre e dentro de famílias e de populações, mesmo nos casos onde os caracteres morfológicos não o permitiram. Este tipo de estudo com base em um grande número de locos enzimáticos é um caminho para gerar considerável informação genética em um tempo limitado. Os resultados obtidos e cuidadosamente interpretados geram informações que podem ter bastante valor para a decisão a ser tomada.

Informações sobre o nível de diversidade isoenzimática podem ser muito úteis para se decidir com que espécie em uma determinada área deve-se começar a desenvolver um programa de melhoramento.

HAMRICK et alii (1979) estudaram 20 espécies de coníferas que tem muitas de suas características em comum e concluíram que existe uma grande variação genética entre elas. Os resultados de muitas pesquisas com isoenzimas tem indicado que a maior parte da variação existente em coníferas encontra-se dentro de populações individuais e uma pequena proporção desta variação ocorre entre populações (WOODS, BLAKE & ALLENDORF, 1983). Da mesma forma NIKOLIÉ & TUIÉ (1983), usando métodos estatísticos, constataram que a heterogeneidade dentro de populações é maior que a heterogeneidade entre populações ou subespécies.

YEH em 1979 cita uqe os estudos de O'Malley et alii (1979), Yeh & El Kassaby (1979), Yeh & Layton (1979) e Yeh & O'Malley (1979) tem mostrado que a maior parte das coníferas apresentam alta heterozigosidade. O elevado nível de diversidade genética detectada em coníferas provavelmente é devido a certos fatores como: seleção divergente para adaptação macrogeográfica (Allard et alii, citado por YEH, 1979); seleção balanceada por diferenciação microgeográfica (Hamrick e Allard, Mitton et alii, citados por YEH, 1979)

e sistemas abertos de cruzamento que facilitam o fluxo de genes entre e dentro de subpopulações (YEH, 1979).

Uma notável exceção para a elevada heterozigosidade em coníferas é em **Pinus resinosa** (Flower & Morris, citados por YEH, 1979). A falta de variabilidade genética dentro de **P. resinosa** tem sido explicada como resultado de um severo afinamento da população, que provavelmente ocorreu durante o Pleistoceno, quando esta espécie foi reduzida a uma pequena população remanescente da glaciação. Esta explicação, dada por YEH (1979), é coerente com a formulada por DOBZHANSKY et alii (1977) e citada anteriormente.

Esta mesma espécie foi utilizada por DAMS (1983), para demonstrar que o espaço geográfico ou amplitude ecológica de uma espécie pode não refletir corretamente seu potencial genético. Assim ele exemplifica: **Pinus torreyana** apresenta a mais restrita distribuição entre todas as espécies de **Pinus** e é extremamente uniforme em seu nível isoenzimático. Isto obviamente era de se esperar; no entanto baixa diversidade genética também caracteriza duas espécies de grande dispersão: **Pinus resinosa** e **Thuja plicata**. Nas três espécies observa-se uma grande uniformidade para um grande número de características morfológicas, bioquímicas e de crescimento.

Mesmo tendo baixa diversidade, observa-se que as espécies apresentam padrões de distribuição geográfica diferentes.

Os conhecimentos da distribuição e dos padrões de variabilidade genética ajudam na compreensão da genética ecológica das coníferas. A aquisição de tal conhecimento poderá ser extremamente útil no entendimento e no desenvolvimento de populações-base e de estratégias de melhoramento.

Entretanto deve-se levar em conta que a eletroforese subestima a variabilidade genética, pelas seguintes razões:

- Redundância do código genético, de tal forma que nem todas as mutações ou substituições no DNA dão lugar à mudança na seqüência de aminoácidos da proteínas (AYALA, 1978).

- Nem toda mutação altera as propriedades elétricas da molécula. Conseqüentemente, não existe migração diferencial no campo elétrico e a mutação não é detectada (AYALA, 1978).

- O método somente amostra uma pequena porção do genoma, primariamente genes estruturais que codificam proteínas solúveis em água e não ligadas a membranas. Não são amostrados genes que codificam proteínas solúveis em água e não ligadas a membranas. Não são amostrados genes que codificam enzimas insolúveis e enzimas de membranas limites (membrane-bound), ou hormônios polipeptídicos e genes com funções reguladoras ou aqueles que codificam para vários RNAs (GOTTLIEB, 1971).

Embora seja aceito o cálculo da variabilidade das populações naturais obtidas por eletroforese, estas estimativas são imprecisas em virtude das considerações feitas (AYALA, 1978). Atualmente, muitos laboratórios tentam resolver este problema, objetivando determinar a variabilidade genética com maior precisão.

De qualquer modo, a variabilidade genética observada em populações naturais é superior ao predito pela teoria darwiniana clássica (a qual é baseada somente em características fenotípicas influenciadas pela seleção natural). Os indivíduos em vez de serem homozigotos para o alelo dominante na maioria dos locos, são heterozigotos nestes locos numa proporção elevada (AYALA, 1978).

4.2. Fornecimento de informações úteis para a conservação de genes

As perdas de genes ocorrem sob várias formas e em diversas intensidade, mas salvo raras exceções elas são provocadas pela atividade humana (FRANKEL, 1970; HARLAN, 1972; HAUKES, 1974) e sua máxima expressão resulta na extinção da espécie (ILTIS, 1972; FRANKEL & SOULÉ, 1981).

Os modernos princípios de manejo florestal e a rápida exploração dos recursos florestais em muitas partes do mundo tornaram necessário acelerar e promover todas as atividades que favoreçam a conservação dos recursos genéticos (EHRENBERG, 1974).

EHRENBERG (1974) lista alguns métodos de conservação e sua conveniência para manutenção da variação genética, os quais são transcritos a seguir:

Tipo de Banco de Gene	Variação Genética
A. Variação Genética conservada in situ ou como coleção de árvores.	
01. Floresta virgem	ampla. Regulado somente por seleção natural. Pode conter um alto grau de variabilidade críptica.
02. Povoamento natural	mais ou menos reduzida. Pode conter um grande número de genótipos adaptados ao ambiente local.
03. Banco clonal	muito reduzido. Os clones selecionados representam uma pequena fração da variação genética existente. Pomar de sementes clonal também pode servir como banco de clones.
04. Arboreto	pequena. Contém um ou poucos indivíduos de uma espécie.
05. Jardim Botânico	valor muito limitado como banco de genes. Espécies freqüentemente representadas por um simples indivíduo de origem desconhecida.
06. Coleção de procedências	relativamente ampla. Amostra de povoamentos que são considerados apropriados para teste fora de seu habitat natural. Base valiosa para o melhoramento genético.
07. Plantação de progênie ou plantação para conservação gênica	relativamente ampla. Se corretamente estabelecida a freqüência gênica do povoamento original pode ser mantida.
08. Variação genética conservada em bancos de genes artificiais.	
09. Estaca Semente Banco	ampla se armazenadas em condições ótimas. Mudanças genéticas podem ocorrer durante o armazenamento, mudando a estrutura genética da população.
10. Pólen	
11. Cultura de tecidos	ampla. O método é caro e tecnicamente difícil.
12. Congelamento de células e tecidos	ampla. O método é caro e tecnicamente difícil.

O desenvolvimento de estratégias eficientes para conservação de genes requer informações sobre a estrutura genética da população (ADAMS, 1981), que segundo METTLER & GREGG (1973), tem sido pesquisada nas últimas décadas, principalmente para se conhecer:

- quanto de variabilidade realmente existe numa população panmítica diplóide;
- qual a proporção de locos heterozigóticos num indivíduo médio;

- como a variabilidade é mantida em face destas cargas.

Portanto, dados genéticos são um pré-requisito essencial para análise da estrutura genética de populações de árvores (BROWN & MORAN, 1979).

Atualmente o uso de isoenzimas é a melhor maneira de se medir níveis da diversidade genética em árvores florestais (ADAMS, 1981).

Estudos de modelos de variação isoenzimática em populações de árvores selvagens (naturais) podem servir como base para que se julgue o futuro impacto da domesticação em níveis de variabilidade (ADAMS, 1983). Por exemplo, dados de isoenzimas indicam que a domesticação de espécies cultivadas tem geralmente reduzido a variação dentro de populações (BROWN & MORAN, 1979).

Atualmente o uso de isoenzimas é a melhor maneira de se medir níveis da diversidade genética em árvores florestais (ADAMS, 1981).

Estudos de modelos de variação isoenzimática em populações de árvores selvagens (naturais) podem servir como base para que se julgue o futuro impacto da domesticação em níveis de variabilidade (ADAMS, 1983). Por exemplo, dados de isoenzimas indicam que a domesticação de espécies cultivadas tem geralmente reduzido a variação dentro de populações (BROWN & MORAN, 1979).

Apesar da subestimação da variabilidade através da eletroforese, conforme discutido anteriormente, dados isoenzimáticos podem ser usados diretamente para avaliar recursos genéticos em árvores florestais e podem também ser usados para monitorar e manipular estes recursos (BROWN & MORAN, 1979).

Uso de isoenzimas como marcas genéticas para monitorar autofecundações e estudar diversidade genética em populações naturais ou melhoradas e nos diferentes métodos de conservação é um excelente caminho para se saber se a estrutura genética está sendo alterada ou não.

Baseado em estimativas de diversidade genética calculadas através de dados de aloenzimas (proteínas variantes, produzidas por diferentes alelos de um mesmo loco), populações de Douglas-fir recentemente domesticado não apresentaram variabilidade menor que populações naturais nas mesmas regiões. Segundo ADAMS (1981), isto é atribuível a processos que enfatizam uma base genética mais ampla em materiais melhorados.

YAZDANI et alii (1985) investigaram a composição genética de árvores (***Pinus sylvestris***) adultas, embriões de sementes de várias árvores, e árvores jovens em um hectare situado em Vindeln, Suíça (latitude 64°). A comparação da frequência aloenzimática mostrou diferenças significativas entre diferentes estágios do ciclo de vida para os locos LAP-A, F-EST, e ADH-B. As frequências genotípicas em árvores jovens e adultas seguiram as expectativas do equilíbrio de HARDY-WEIMBER, mas achou-se desvios nos embriões. Foi encontrado um excesso de homocigotos nos embriões para vários locos quando comparado com plantas jovens e adultas, este excesso pode ter sido devido a autofecundações. Segundo os autores as plantas oriundas de sementes autofecundadas seriam eliminadas na população por seleção natural devido à alta depressão que ***Pinus sylvestris*** apresenta quando com endogamia.

A eletroforese permite a detecção das diferenças genéticas decorrentes dos efeitos ambientais e também decorrentes de amostragens feitas nos diferentes ambientes. Possibilita a separação dos alelos de um mesmo gene, determinando o genótipo de um indivíduo através de uma amostra de seus genes. Pode-se também fazer comparações de ordem puramente genética entre os indivíduos ou entre as populações de onde eles provém,

além de se construir uma imagem da estrutura genética total das amostras e do grau de divergência entre elas.

Um estudo interessante foi conduzido por VIGNERON (1984) em que foram feitas comparações de ordem puramente genéticas entre populações de **Terminalia superba**, com o objetivo de descobrir o local de procedência e construir uma imagem da estrutura genética total das amostras e do grau de divergência entre elas. O autor observou que esta espécie é subdividida em dois grandes grupos denominados Fraké (África do Oeste – Costa do Marfim) e Limba (África Central – Congo) sendo que elas apresentam não só diferenças geográficas e qualitativas mas também genéticas. Para chegar a esta conclusão Vigneron estudou algumas procedências do Congo (N’Goia II, Divinié, Titi, Sibiti, Passi-Passi, Kimongo e Bilala, sendo a zona realmente explorada Mayombe, Niari, Chaillu) e outras procedências da Costa do Marfim (Guiglo, Diva, Sinfra, Zaranan, Gregbeu, Sangoné e Bian-Kouma, escolhidas dentro de toda a zona Suriense) através de oito sistemas enzimáticos.

Neste trabalho o autor constatou que:

- Existe uma maior diferenciação dentro de procedências quanto à distribuição e número de alelos, estruturação e taxa de heterozigosidade, nas populações da Costa do Marfim (Fraké) em relação às do Congo (Limba).

- Realmente existem dois grandes grupos, sendo que a separação se deve mais à ausência de alelos raros em Limba do que à existência de alelos específicos de um ou outro grupo.

- Deve ser possível encontrar populações na Costa do Marfim que se assemelhem fortemente pelos seus alelos àqueles de Limba, mas não pela sua estrutura – Guiglo poderia ser um exemplo. O inverso, ao contrário, é muito pouco provável de ocorrer (ao menos para os doze locos estudados).

Esta disjunção, uma vez estável, mostra ser interessante refletir acerca de sua origem e função, levando-se em conta o número de indivíduos e a representatividade das procedências. A falta de alelos no Congo poderia ser explicada pela forte distribuição agregada de Limba e da importância da deriva genética na formação de tal população em relação ao estado mais disperso das populações de Fraké. Provavelmente os povoamentos naturais de Limba devem ter sido originados a partir de um conjunto restrito de genitores. Os indivíduos locais pertencem provavelmente a um pequeno número de famílias de meios-irmãos ou irmãos-gêmeos, resultado de uma população que tenha sofrido uma forte deriva genética. Conseqüentemente, apresentam uma taxa de endogamia elevada e uma heterozigosidade inferior ao outro grupo.

Através deste estudo foi possível detectar um maior polimorfismo nas populações da Costa do Marfim, mas uma maior diferenciação interpopulacional nas populações do Congo.

O estudo das populações intermediárias, tais quais as de Camarões, e do limite leste da área (República centroafricana) deve trazer novas informações sobre estas questões.

As análises de diversidade inter e intra-descendência, completando a que já foi feita, permitirá se precisar a estruturação das populações de Lima e Fraké e sugerir métodos de amostragem específicos a cada grupo.

Análises de isoenzimas podem, portanto, auxiliar no conhecimento da diversidade e estrutura genética, o que possibilita sugerir métodos de amostragem específicos para cada população, bem como ajudar na escolha da melhor estratégia para conservação de genes.

Podem também contribuir na identificação dos locais onde as espécies apresentam a maior variabilidade genética, tais como os refúgios do pleistoceno (teoria desenvolvida para explicar a grande diversidade de espécies existentes na Amazônia), possibilitando a obtenção de informações precisas para a definição de unidades de conservação do tipo Parques Nacionais, Reservas Biológicas ou outros.

5. APLICAÇÃO DE ISOENZIMAS NO MELHORAMENTO FLORESTAL

5.1. Certificação e identificação de parentais, clones de árvores e híbridos

Existe um elevado nível de diversidade isoenzimática em muitas espécies de árvores (Hamrick et alii, citado por ADAMS, 1983), de tal forma que isoenzimas podem ser efetivamente usadas para identificação de árvores parentais e de clones utilizados no melhoramento florestal, bem como para a certificação comercial de clones usados em reflorestamento (Feret & Bergmann; Coke & Adams; Adams & Joly; Adams, citados por ADAMS, 1983). Isoenzimas também estão sendo muito úteis para a identificação de espécies híbridas (ADAMS & COUTINHO, 1977). Isto se torna viável devido ao grande número de diferentes genótipos isoenzimáticos que podem ser gerados com somente uma pequena segregação no loco (Conkle & Adams, citado por ADAMS, 1983).

MIYAZAKI & MIYAJIMA (1981) estudaram a possibilidade de aplicar isoenzima peroxidase para identificação de vários clones de **Cryptomeria japonica** D. Don em Kyushu, Japão. Foram coletados galhos e folhas de vinte e nove variedades de clones em seis diferentes locais de Kyushu os quais eram armazenados em congelador a uma temperatura de -20°C até serem examinados eletroforéticamente.

Nos vinte e nove clones examinados detectou-se que a isoenzima peroxidase era composta por quinze bandas, que foram designadas como: Pa, Pb, Pc, Pd, Pe, Pf, Pg, Ph, Pi, Pj, Pk, Pl, Pm, Pn e Pp. A intensidade de coloração das bands que apresenta alta repetibilidade foram classificadas em 5 graus, de acordo com a alta ou baixa intensidade. As intensidades Pb, Pe, Pf, Pg, Ph, Pi, Pj, Pk, Pl, Pn e Pp foram utilizadas como índice para identificação dos clones. Padrões de isoenzima peroxidase dos respectivos clones apresentaram-se da seguinte forma, onde n = número de bandas, a = atividade total.

(01) Aya-sugi	(n = 8, a:15	Pi, Pj, Pk, Pm e Pn)
(02) Akaba	(n = 9, a:21	Pg, Pi, Pj, Pk, Pm e Pn)
(03) Hon-sugi	(n = 9, a:30	Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(04) Yabukugury	(n = 8, a:33	Pg, Ph, Pi, Pk e Pn)
(05) Measa	(n = 10, a:21	Pe, Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(06) Nami-ao	(n = 11, a:42	Pe, Pf, Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(07) Obi-aka	(n = 10, a:37	Pa, Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(08) Arakawa	(n = 10, a:21	Pe, Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(09) Tosa-guro	(n = 8, a:33	Pg, Ph, Pi, Pm e Pn)
(10) Garim	(n = 9, a:33	Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(11) Tosa-aka	(n = 10, a:43	Pe, Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(12) Haara	(n = 7, a:21	Pf, Pk, Pm e Pn)
(13) Chirimen-dosa	(n = 10, a:45	Pe, Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(14) Hidari-maki	(n = 10, a:29	Pe, Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(15) Eda-naga	(n = 9, a:28	Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(16) Kuro	(n = 10, a:39	Pe, Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(17) Kara-tsuki	(n = 9, a:28	Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(18) Mizorogi	(n = 10, a:33	Pf, Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(19) Hiki	(n = 11, a:44	Pf, Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(20) Aoshima-arakawa	(n = 9, a:33	Pg, Ph, Pi, Pk, Pm e Pn)
(21) Iwao	(n = 8, a:18	Pg, Pi, Pk, Pm e Pn)
(22) Fuji-sugi	(n = 8, a:18	Pg, Pi, Pk, Pm e Pn)
(23) Naji-kawa	(n = 10, a:35	Pg, Ph, Pi, Pj, Pk, Pm e Pn)
(24) Shichi-zo	(n = 8, a:32	Pg, Ph, Pi, Pk, Pm)
(25) Wakatsu	(n = 8, a:21	Pg, Pi, Pk, Pm e Pn)
(26) Naka-muro	(n = 8, a:21	Pg, Pi, Pk, Pm e Pn)
(27) Urase-baru	(n = 7, a:16	Pg, Pi, Pj, e Pn)
(28) Hinode	(n = 8, a:21	Pg, Pi, Pk, Pm e Pn)
(29) Kijin	(n = 6, a:25	Pg, Pj, Pm)

O estudo de eletroforese descrito acima demonstra que a comparação de modelos de isoenzimas permite detectar diferenças genéticas entre os vários clones de **Cryptomeria japonica**, podendo efetivamente ser usado para identificação de clones.

No mesmo trabalho foram analisados através de zimogramas alguns grupos de clones que tem sido propagados por estaquia desde há muito tempo (um ou vários séculos).

1º Grupo de Clone Measa

O grupo de clones Measa é constituído de 3 sub-grupos: Satsuma-measa, Higo-measa e Amakusa-measa. Observou-se que o modelo de peroxidase desse grupo de clone é constituído de 12 Bandas: Pb, Pc, Pd, Pe, Pg, Ph, Pi, Pj, Pk, Pl, Pm e Pn. Contudo, as intensidades Pb, Pd, Pm e Pn são relativamente baixas e freqüentemente observadas, sendo as bandas Pc, Pe, Pg, Pi, Pj, Pk e Pl usadas como índice para análise do complexo de clones.

Modelos de peroxidase detectado em oito amostras de árvores são sumarizados como se mostra:

(1) Satsuma-measa de Kirishima Shrine	(n:10 a:33	Pc,Pe,Pg,Ph,Pi, Pk)
(2) Satsuma-measa de Sano Shrine	(n:10 a:32	Pc,Pe,Pg,Ph,Pi, Pk)
(3) Satsuma-measa de Kamoo Shrine	(n: 8 a:32	Pg,Ph,Pi, Pk)
(4) Amakusa-measa de Amakusa(original)	(n: 7 a:18	Pe, Pj, Pl)
(5) Amakusa-measa de Amakusa(propagado)	(n: 7 a:18	Pe, Pj, Pl)
(6) Higo-measa de Amakusa	(n:10 a:29	Pc,Pe,Pg,Ph,Pi, Pk)
(7) Higo-measa de Aso Shrine	(n:10 a:33	Pc,Pe,Pg,Ph,Pi, Pk)
(8) Higo-measa Kuni-Zukuri Shrine	(n: 9 a:31	Pc, Pg,Ph,Pi, Pk)

Comparando-se as árvore de Kirishima Shrine (1) com Sano Shrine (2) conclui-se que apresentam a mesma distribuição de bandas, snedo que somente pequenas diferenças foram achadas na banda Pc. Portanto, (1) e (2) foram julgadas como sendo do mesmo clone. Ao contrário, árvores de Kamoo Shrine (3) mostraram padrões distintos onde não se encontram bandas Pc e Pe. Amakusa-measa (4) e (5) foram investigadas usando árvores muito velhas com cerca de 300 anos junto com suas progênies ou progênies de progênies. Demonstrou-se ser o mesmo clone. A maior diferença entre Satsuma-measa e Amakusa-measa estava na presença de Pj e Pl e ausência de Pc e Pk em Amakusa-measa. Higo-measa coletado em Aso Shrine (7) e Kunizuhuri Shrine (8) mostraram modelos de isoenzimas diferentes, sendo que o (7) apresentava menor intensidade de Pg, Ph e Pi.

2º Grupo de Clone Yabukuguri

Forma investigadas cinco árvores individuais de cinco localidades. O modelo de peroxidase era constituído por 8 bandas Pb, Pc, Pd, Pg, Ph, Pi, Pk e Pn. Não houve diferença entre as cinco procedências.

- (1) Yabukuguri de várias procedências
(n: 8, a: 33, Pb, Pc, Pd, Pg, Ph, Pi, Pk e Pn)

Contudo é interessante comentar que Bezaiten-sugi, uma árvore muito velha com cerca de 4 séculos, que se encontra em Saga, exhibe não somente o mesmo modelo de peroxidase, mas tem características vegetativas similares às características dos clones da variedade Yabukuguri. Por conseguinte, Bezaiten-sugi pode ser a árvore ancestral ou o progenitor da variedade.

Conclui-se que estudos de eletroforese através da comparação de modelos de peroxidase detectaram diferenças genéticas nos clones das variedades **Cryptomeria japonica**, podendo efetivamente ser utilizado para identificação de clones.

Eletroforese de isoenzimas tem se mostrado eficaz na identificação de diferentes clones de **Populus tremuloides** devido a grande variação aloenzimática que existe nesta espécie (Cheliak & Dancik, Mitton & Grant, citados por CHELIAK & PITEL, 1984).

CHELIAK & PITEL (1984) analisaram dezesseis locos enzimáticos em 10 amostras de clones de **Populus tremuloides**, dos quais nove apresentavam variação, ou seja, dos 16 locos estudados na amostra havia variação em 50% deles; além destes, a enzima malato desidrogenase (MDH) também apresentou variação. Observaram-se dois alelos para Pgi-2 e Aat-3. Os outros locos eram monomórficos. Excluiu-se o MDH porque, em média, 1,65 alelos eram detectados por locos.

Somente os clones D e 6 apresentaram-se compostos por ramos geneticamente uniformes, pelo menos para os locos considerados. Nos outros oito clones estudados,

observou-se que eles eram compostos de 2 a 5 genótipos diferentes baseados em suas marcas (Tabela 1).

A Tabela 1 mostra que os genótipos 3 e 7 compartilham dos mesmos multilocos da mesma forma os genótipos 5, 6 e 26 partilham dos mesmos multilocos.

Tabela 1. Sumário dos multilocos observados para cada 10 clones amostrados de **Populus tremuloides** de uma população natural

Clone suposto	Nº de genótipo	Loco gênico variável									N ^b
		Pgi-2	Aal-3	6Pgd-2	Aço-2	Idh	MDH ^b	Lap-1	Lap-2	Sdh	
1	1	11	11	11	11	11	2	00	11	11	1
1	2	12	11	11	11	11	2	00	11	11	1
1	3	11	11	11	11	11	1	00	11	12	1
1	4	11	12	11	11	11	2	11	11	11	1
1	5	11	11	11	11	11	2	11	11	11	5
1-A	6	11	11	11	11	11	2	11	11	11	1
1-A	7	11	11	11	11	11	1	00	11	12	2
2	8	11	11	11	11	11	3	00	11	22	3
2	9	11	11	11	11	11	3	11	11	12	2
2	10	12	11	11	11	11	3	11	11	12	1
2	11	11	11	11	11	11	3	00	11	12	5
2	12	12	11	11	11	11	3	11	11	11	4
D	13	11	11	11	11	11	6	10	11	11	8
C	14	11	12	11	11	11	1	00	11	11	4
C	15	11	12	11	11	11	3	00	11	11	1
C	16	11	11	11	11	11	-	00	11	11	3
B	17	11	11	11	11	11	2	10	11	12	8
B	18	12	11	11	11	11	3	10	12	11	1
B	19	11	11	11	11	11	2	00	11	12	1
A	20	12	12	11	11	11	1	10	11	11	9
A	21	12	11	11	11	11	1	10	12	11	1
6	22	13	11	11	11	11	6	11	11	22	10
7	23	11	12	11	11	11	6	11	11	11	13
7	24	11	11	11	12	11	7	00	11	12	1
7	25	11	11	11	11	12	7	00	11	12	2
7	26	11	11	11	11	11	2	11	11	11	2
8	27	12	12	11	11	11	5	10	11	11	11
8	28	11	13	11	11	11	3	10	11	11	3
8	29	11	13	11	11	11	1	10	11	11	10
8	30	11	11	12	11	11	1	11	11	12	2

a – Identificado e delineado no campo usando características fenotípicas

b – Número de ramos que definiram o clone por eletroforese.

CHELIAK & PITEL (1984).

Os autores comentam que os clones 1 e 1-A estão espacialmente próximos um do outro (separados por 20 m), portanto, os genótipos 3 e 7 poderiam ser estacas de um mesmo

clone. Similarmente, os genótipos 5 e 6 poderiam ser ramos de outro clone. Por causa da variabilidade genética observada no suposto clone 1, considerando-se todos os genótipos observados, poder-se-ia invalidar o reconhecimento do clone 1-A como um clone distinto do clone 1. Como o clone 26 é separado dos clones 5 e 6 por aproximadamente 1,4 km é pouco provável que 5, 6 e 26 sejam estacas de um mesmo clone.

A composição genética dos 10 clones ocorre em 4 classes distintas. Por exemplo: nos clones D e 6 todos os indivíduos são identificados como tendo o mesmo genótipo eletroforético. Em uma 2ª classe os clones são compostos por um genótipo multilocular predominante com uma baixa frequência de outro genótipo detectado no grupo fenotípico. A última classe é representada pelo clone 2 onde não existe nenhum genótipo predominante entre as plantas.

Cada um dos dez clones foi identificado e delimitado usando uma combinação de caracteres poligênicos, sendo que a maioria dos caracteres apresentavam modificações devidas ao ambiente e às interações. Portanto, diferenças realmente genéticas foram individualmente detectadas através do uso de isoenzimas. Entretanto, deve-se salientar que as diferenças ambientais foram capazes de induzir diferenças entre clones suficientes para serem confundidas com diferenças genéticas entre clones.

Em outro trabalho FINESCHI (1984) aplicando a técnica desenvolvida por Bartels & Bergmann testou vários sistemas isoenzimáticos em endospermas dormentes de duas subespécies de **Pinus nigra**: **P. laricio** (Calábria e Sicília) e **P. nigra** (Alpes Orientais) presentes na Itália (Tabela 2). Resultados foram analisados através da distância genética (Tabela 3 e 4) calculada segundo a fórmula de Gregorius, citado por FINESCHI (1984).

$$do = 1/2 \sum_{i=1}^n [X_i - Y_i]$$

onde X_i e Y_i = indicam a frequência do alelo i na população X e Y , respectivamente.

n = indica o número de alelos por loco gênico

do = distância genética entre as populações X e Y

Dos vários sistemas isoenzimáticos estudados, o que apresentou maior diferença entre as subespécies aqui discutidas foi a desidrogenase shiquimato (SKDH). Este sistema é controlado por dois locos gênicos. A Tabela 5 mostra a frequência alélica de duas isoenzimas observadas em uma população e a Tabela 3 e 4 mostra os valores das distâncias genéticas nas populações foi relativamente homogênea e uma baixa diferenciação foi detectada. Ao contrário, o loco B mostra uma grande distância entre as populações da Córsega e todas as outras populações. Em particular a população Córsega mostrou uma alta frequência do alelo B1, quando comparada não somente com as subespécies **nigra** (população 8 até 11), mas também quando comparadas com subespécies do grupo Calábria, sendo por este motivo considera como uma subespécie larício.

Tabela 2. Localização geográfica das procedências.

Espécies	Procedências	Abbr.	Latitude	Longitude	Altitude acima do nível do mar em m
1. P. laricio corsicana	Valdoniello	Co 1	42° 19' N	8° 54' E	1015-1325
2. P. laricio corsicana	Marmano	Co 2	42° 01' N	9° 10' E	1000
3. P. laricio corsicana	Vizzavona	Co 4	42° 06' N	9° 07' E	940-1160
4. P. laricio corsicana	Noceta	Co 5	42° 09' N	9° 09' E	820-895
5. P. laricio calabrica	Sila Cosenza (Tasso)	Ca 1	39° 15' N	16° 20' E	1000
6. P. laricio calabrica	Sila Catanzaro	Ca 2	38° 58' N	16° 35' E	1000
7. P. laricio calabrica	Sila Cosenza (Monaco)	Ca 3	39° 15' N	16° 20' E	1000
8. P. nigricana itálica	Villetta Barrea	VB 14	42° 47' N	13° 46' E	1000-1200
9. P. nigricana itálica	Villetta Barrea	VB 83	42° 47' N	13° 46' E	1000-1200
10. P. nigricana austríaca	Monte Toriagio	Mt	46° 05' N	11° 05' E	697
11. P. nigricana austríaca	Slovenia	YU			
13. P. laricio	Monti Pisan	P1	43° 05' N	10° 15' E	125-195
14. P. laricio	Monti Pisani	P2	43° 05' N	10° 15' E	125-195

Tabela 3. Distância genética no loco SKDH-A

População	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Co 1	Co 2	Co 4	Co 5	Ca 1	Ca 2	Ca 3	VB 14	VB 83	MT	YU
1 Co1	----										
2 Co2	.005	----									
3 Co4	.082	.086	----								
4 Co5	.200	.204	.118	----							
5 Ca1	.130	.134	.049	.119	----						
6 Ca2	.161	.166	.079	.074	.045	----					
7 Ca3	.058	.062	.042	.160	.072	.103	----				
8 VB14	.046	.050	.052	.170	.084	.115	.012	----			
9 VB83	.209	.213	.127	.034	.094	.048	.151	.183	----		
10 MT	.052	.047	.133	.251	.181	.212	.109	.097	.260	----	
11 YU	.041	.046	.077	.194	.088	.121	.035	.024	.169	.093	----

Tabela 4. Distância genética no loco SKDH-B

População	1 Co 1	2 Co 2	3 Co 4	4 Co 5	5 Ca 1	6 Ca 2	7 Ca 3	8 VB 14	9 VB 83	10 MT	11 YU
1 Co1	----										
2 Co2	.074	----									
3 Co4	.010	.083	----								
4 Co5	.193	.140	.203	----							
5 Ca1	.912	.859	.922	.719	----						
6 Ca2	.850	.798	.860	.658	.575	----					
7 Ca3	.835	.782	.845	.642	.173	.418	----				
8 VB14	.690	.638	.700	.497	.576	.160	.403	----			
9 VB83	.738	.685	.758	.545	.620	.112	.447	.092	----		
10 MT	.949	.896	.958	.756	.709	.196	.614	.355	.263	----	
11 YU	.926	.873	.935	.733	.686	.173	.591	.332	.240	.023	----

Tabela 5. Frequência relativa dos alelos do Loco SKDK.

Frequência nas populações	A1	A2	A3	Tamanho da amostra A	B1	B2	B3	B0	Tamanho da amostra B
1 Co1	.067	.933	0	134	.948	.051	0	0	136
2 Co2	.062	.937	0	48	.875	.104	0	.200	48
3 Co4	.149	.851	0	47	.958	.041	0	0	48
4 Co5	.266	.733	0	45	.755	.244	0	0	45
5 Ca1	.147	.803	.049	61	.036	.290	.672	0	55
6 Ca2	.193	.722	.035	57	.098	.804	.098	0	51
7 Ca3	.107	.875	.018	52	.114	.386	.500	0	44
8 VB14	.096	.887	.016	62	.258	.645	.097	0	62
9 VB83	.241	.724	.034	57	.210	.737	.053	0	57
10 MT	.015	.984	0	64	0		0	0	67
11 YU	.072	.891	.036	83	.023	.977	0	0	87

Homogeneidade de ambos locos gênicos como observada nas populações da Córsega também pode ser observada dentro de cada variedade austríaca e itálica (Tabela 2). Estas duas variedades diferem uma da outra pelo loco B, de maneira que elas compõem a subespécie **nigrans** (FINESCHI, 1984).

O grupo calábrica (populações 5, 6 e 7) é relativamente heterogêneo, e a população 6 (Ca 2) difere marcadamente das outras duas, de tal forma que no loco B Ca 2 aproxima-se mais das populações da subespécie **nigrans** do que de Ca 1 e Ca 3. Deve-se notar que os resultados para os dois locos gênicos não são contrastantes.

Por esta metodologia foi portanto possível a distinção dentro da subespécie larício em duas populações da Córsega e Calábria. Esta distinção observada confirmou os resultados de Arluz e Millier, citados por FINESCHI (1984), os quais dividiram a subespécie larício em duas variedades: var. corsicana e var. calabrica, baseados em diferenças anatômicas e identificações de monoterpenos.

Além destes resultados foi possível analisar uma população não conhecida de **Pinus laricio** (área de Monte Pisani), para determinar se esta amostra de árvore provém do grupo Córsega ou Calábrica. De acordo com os resultados obtidos, a estrutura genética das

árvores de Monte Pisani foi similar quanto à frequência alélica à população Córsega, sendo, portanto, provável que este grupo de **Pinus laricio** tenha se originado da Córsega.

PIRES (1983) estudou alfa esterase e beta esterase em plântulas no estágio “orelha de onça” de 20 populações de **Eucalyptus grandis** (10 australianas e 1 brasileira) e 2 de **E. saligna** (1 australiana e 1 brasileira), utilizando a técnica de eletroforese horizontal em gel de amido Connaught.

Inicialmente foi tentado o estudo de 11 sistemas enzimáticos para a determinação genética dos 22 tratamentos. Foram escolhidos os sistemas de melhor resolução leucina aminopeptidase, alfa esterase, beta esterase e fosfatase ácida. Porém, pela perfeição da resolução obtida, só foram estudadas as frequências de 3 possíveis locos de alfa esterase e 3 de beta esterase, os quais não forneceram informações suficientes para identificação dos tratamentos. Os dados, segundo o autor, sugerem que a população brasileira de **E. saligna** afastou-se mais da sua espécie tipo do que **E. grandis**, sendo uma das possíveis causas a maior facilidade de cruzamento dentro do subgênero.

Resultados mais interessantes foram obtidos por BELL et alii (1985), os quais utilizaram 12 locos isoenzimáticos (Mdh 1 e 2, Pgi 1 e 2, Adh, Idh, Sdh, GPgd 1 e 2, Ap, Est, Mr) para tentar elucidar a confusão de identidades de **Eucalyptus** introduzido na República da África do Sul (RAS) sob o nome de **Eucalyptus saligna**. Dos 12 locos escolhidos, oito tinham frequências de isoenzimas que poderiam ajudar na distinção entre **E. grandis** e **E. saligna**.

O loco Pgi-2 continha 4 alelos (1, 4, 6 e 6). Os sete lotes de sementes RAS estudadas tinham frequência de alelos que coincidiam com **E. grandis** mas não com **E. saligna**.

No loco GPgd-1, seis lotes de sementes RAS assemelhavam-se à distribuição de **E. grandis**, mas um dos lotes, designado lote 26 (área de Tazaneen), era mais parecido com **E. saligna**. No loco Mdh-2, 4 lotes de sementes assemelhavam-se com **E. grandis**, mas 3 lotes designados 26, 27 e 28 tinham frequência alélica intermediária entre as duas espécies nativas.

No loco Sdh-1, todos os sete lotes de sementes RAS tinham uma alta frequência do alelo 2 e baixa frequência do alelo 3, o que é típico de **E. grandis** mas não de **E. saligna**. Todos os lotes de sementes RAS tinham uma frequência de alelo 4 mais baixa que a esperada, embora não diferisse significativamente de **E. grandis**. A presença do alelo 1 não foi detectada em **E. grandis** nativo e foi detectada em somente uma população nativa de **E. saligna** (Glen Innes) e em uma das 5 populações intermediárias nativas (Crediton). A presença deste alelo em populações RAS é de difícil explicação, mas isto pode ser devido ao não conhecimento das coleções de sementes originais, sendo que não é conhecido o número de árvores parentais coletadas para formar os lotes de sementes e nem é conhecido o local onde foram coletadas. Este alelo raro segundo BELL et alii (1985) poderia ter vindo de uma única árvore da população original que não foi coletada nas populações nativas aqui amostradas. Este resultado é interessante principalmente porque possibilita a relação do lote 26 com **E. saligna**. As sementes deste lote forma coletadas de uma plantação próxima de Westfalia, onde **E. grandis** e **E. saligna** crescem lado a lado, podendo haver a ocorrência de hibridação. Algumas sementes deste lote poderiam ter sido introduzidas nas plantações onde os lotes de sementes 27 e 28 foram coletadas.

Estes dados indicam que os lotes de RAS são mais semelhantes a **E. grandis** do que **E. saligna** quando todos os locos são considerados. As poucas incoerências, segundo os autores, poderiam ser explicadas por problemas de amostragem ou pela presença de genes de **E. saligna** em lotes de RAS. Isto poderia ter ocorrido se a importação original tivesse

misturado origens ou poderia ser esperado hibridação local com espécies de população de Westfalia. Hibridação entre 2 espécies em lotes de sementes originais introduzidas no RAS é pouco provável, pois segundo Burgess & Bell, citados por BELL et alii (1985), a hibridação é muito rara em populações nativas.

A análise de todos os dados usando programas de análise padrão claramente indicaram uma relação estreita entre lotes RAS e população natural de **E. grandis** (BELL et alii, 1985).

Vimos neste tópico que a eletroforese pode ser utilizada de forma eficiente para identificação de clones, registro de clones e identificação de miscelâneas de clones, podendo também ser útil para procurar descobrir os progenitores ou árvores ancestrais de um clone.

5.2. Certificação e Identificação de Lotes de Sementes

A identificação e certificação de sementes segue o mesmo princípio básico visto anteriormente para identificação e certificação de árvores parentais e de clones utilizados no melhoramento florestal.

Isoenzimas podem ser úteis para identificar erros na manipulação de sementes ou progênes de mudas, ou para certificação de lotes de sementes vindas de parentais individuais ou de um limitado número de parentais (ADAMS, 1983).

ANDRESEN (1975) cita dois tipos de testes que podem ser realizados com auxílio de eletroforese em lotes de sementes. Um simples, utilizado para confirmar a identidade de uma procedência ou variedade por comparação com um padrão. E um mais difícil, utilizado para determinar a identidade da semente ou para descrever uma nova variedade.

A confirmação da identidade de um lote de sementes não é difícil e em tais casos é necessário distinguir se o espectro eletroforético das sementes difere do padrão (KONAREV et alii, 1981). Sementes de coníferas apresentam-se como um excelente material para este tipo de análise, pois o gametófito feminino ou endosperma, tecido de reserva que envolve o embrião na semente, após a fertilização é haplóide e possui a mesma constituição genética do gameta feminino (oosfera). A análise de muitos endospermas de diferentes sementes de uma árvore revela o genótipo desta árvore. Bandas enzimáticas de um alelo particular consistentemente migram para o mesmo local no gel. Uma árvore que é homocigota para um gene terá bandas em somente um local no gel. Uma árvore heterocigota para um gene terá bandas em somente um local no gel. Uma árvore heterocigota para alelos de um gene terá bandas em dois ou mais locais. Heterocigotos serão determinados se duas formas segregantes aparecerem com proporção 1 = 1 (CONKLE & ADAMS, 1977). O embrião por sua vez é diplóide paterna provinda do pólen fertilizador, conforme a Figura 3.

O genótipo do embrião (2N) pode ser também determinado por várias enzimas. Conhecendo o genótipo do embrião e do seu endosperma adjacente, a contribuição do pólen pode ser inferida. Deste modo, o genótipo da árvore parenta, o genótipo do óvulo e do pólen podem ser determinados pela análise de sementes de uma simples árvore (CONKLE & ADAMS, 1977).

Quando este método é usado, um genótipo poderá ser incorretamente identificado somente se todos os endospermas amostrados de um indivíduo heterocigoto carregarem o mesmo alelo aloenzimático. Com N endosperma, esta probabilidade é igual a $\left(\frac{1}{2}\right)^{N-1}$ para

um simples loco. Para uma amostra de somente dez sementes, a probabilidade de identificação incorreta do genótipo de um clone ou árvore em um loco qualquer é menor que 0,2% (ADAMS, 1979).

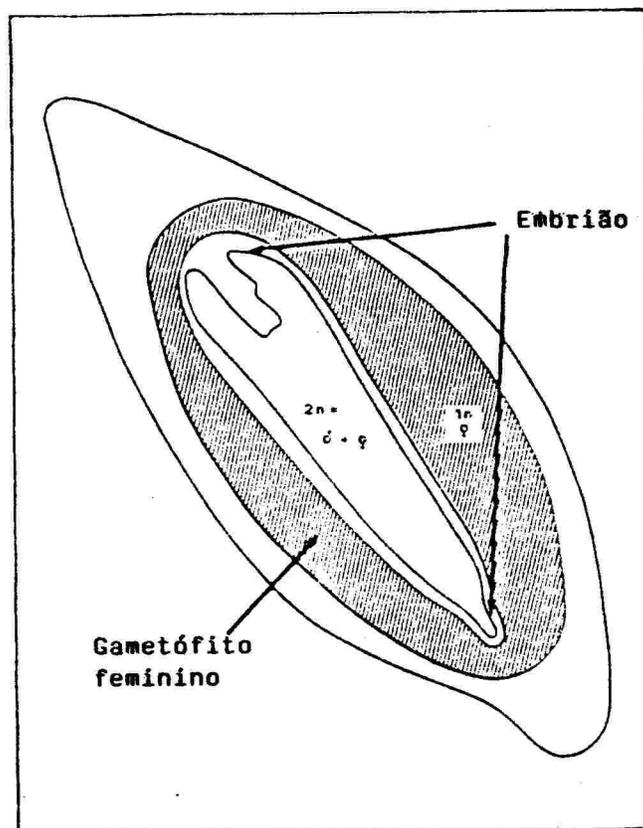


Figura 3. Composição genotípica de semente de conífera madura. (CHELIAK & PITEL, 1984).

HUNIER (1977), por exemplo, com base na composição aloenzimática observada em endospermas de **Pinus taeda** L. detectou erros de identificação de árvores de pomares de sementes. Foi constatado que 6 entre 22 clones, representados por mais de uma estaca (ramets) tinham pelo menos um deles entre os demais que diferiam de todos os outros representantes do clone.

CONKLE & ADAMS (1977) analisaram sementes de árvores de **Pinus taeda** L. crescendo em condições naturais e também em dois pomares de sementes. Alelos de onze locos enzimáticos foram encontrados nos genótipos de árvores em populações naturais na Carolina do Norte. As árvores apresentaram alta variabilidade para todos os alelos; em média 30% dos locos de cada árvore eram heterozigotos. Níveis similares de variabilidade e heterozigosidade foram encontrados entre os clones dos dois pomares de sementes, de tal forma que todos os clones nos dois pomares tinham genótipos únicos, aparecendo somente 1 genótipo comum para um clone em cada pomar.

BERGMANN (1978) demonstrou que procedências diferentes de Norway spruce (**Picea abies**) podem ser caracterizados por meio de frequência alélica de seis locos isoenzimáticos. Com a caracterização das procedências (Suécia, Finlândia, Polônia e

Alemanha) foi subsequentemente possíveis a identificação de lotes de sementes com identificação não conhecida.

Usando aloenzimas, ADAMS & SOLY (1980) investigou o grau de variabilidade genética entre clones e a proporção de progênies resultantes de autofecundação em dois pomares adjacentes de *Pinus taeda* L.. Considerando a variabilidade genética, foi achado que dos 15 locos estudados em 50 clones nos dois pomares, 12 eram polimórficos tendo em média 3,4 alelos e aproximadamente 25% dos locos polimórficos eram heterozigotos em cada indivíduo. O potencial do uso de aloenzimas para identificação de clones em programas de melhoramento é demonstrado pelo fato de que 47 de 50 clones poderiam ser identificados unicamente baseando-se em seus genótipos aloenzimáticos. A frequência aloenzimática nos dois pomares de sementes foram similares, sendo que os alelos mais frequentes em um pomar eram também os mais frequentes no outro. No entanto os pomares distinguíam-se muitas vezes em combinações de alelos que estavam ausentes, ou presentes em baixa frequência. Muitos destes alelos eram únicos para clones individuais e poderiam ser usados para determinar de como um clone específico contribuía para a produção de sementes e como o pólen era distribuído entre e dentro dos pomares. Pela conservação da frequência destes alelos únicos, em 513 sementes de 5 clones, estimou-se que somente 1,2% era oriunda de autofecundação. Aparentemente autofecundações tinham pequena influência na composição genética de sementes colhidas nestes pomares.

Assim, o mais efetivo meio de se identificar lotes de sementes parece ser por arranjo de alelos que são esperados de ocorrer em baixa frequência. É claro que quanto mais baixa for a frequência de um alelo mais difícil será detectá-lo em uma amostra de sementes colhidas. Com amostras de 50 genomas por exemplo, poderia se detectar um alelo ocorrendo a uma frequência de 0,06 ou acima com no mínimo 95% de chance de acerto; com 100 genomas amostrados, alelos que ocorrem com a frequência de 0,03 ou acima seriam detectados com 95% de probabilidade (ADAMS, 1983).

O segundo tipo de teste é mais difícil, pois é necessário catalogar o espectro eletroforético de todos os clones e/ou parentais conhecidos. Este tipo de identificação de sementes ou descrição de cultivares tem sido utilizado com grande êxito em alguns países (Austrália, Áustria, Canadá, França, Itália, Reino Unido, URSS e EUA) em culturas de interesse agrícola, tais como: trigo, milho, cevada e aveia, principalmente. Por exemplo, BARRIGA et alii (1985) identificaram e catalogaram 52 cultivares de trigo, no Chile durante 10 anos, por eletroforese em gel de poliacrilamida. As fórmulas dos zimogramas foram calculadas com base na mobilidade relativa e intensidade de coloração das bandas de gliadina que apresentaram cada cultivar, com relação ao trigo “Marquis” usado como padrão. Todos os cultivares puderam ser facilmente diferenciados por seus eletroforegramas. Para facilitar o processo de identificação, desenvolveu-se um programa de computação que compara a ordem das bandas de gliadina de um cultivar desconhecido com a de todos os cultivares armazenados na memória do computador. Similarmente, isoenzimas poderiam ser utilizadas para identificação ou descrição de espécies florestais.

5.3. Determinação da validade de cruzamentos controlados

Cruzamentos controlados são básicos para estratégias de melhoramento aplicado e sua precisão é que vai garantir se estes programas vão ou não ter o progresso esperado (ADAMS, 1983).

Geralmente os cruzamentos controlados são assumidos como sendo feitos sem erros, isto porque muitas vezes os métodos utilizados para avaliar os cruzamentos tem baixa precisão.

Um procedimento simples para avaliar a validade de cruzamentos controlados é por comparação de genótipos-isoenzimas em sementes com aquele esperado com base no genótipo de seus supostos parentais (isto é possível se existir variabilidade isoenzimática entre clones de árvores parentais). Além disto, a origem parental de alguns erros detectados pode ser determinados pelo exame de ambos conjunto de óvulos e pólen da progênie resultante do cruzamento (ADAMS, 1983). Isto pode ser muito interessante para auxiliar no diagnóstico das causas dos erros, sendo que os erros detectados normalmente são divididos a autofecundações ou contaminação por pólen estranho. Os erros são definidos como alelos inesperados, ou seja, alelos que não estão presentes em todos os supostos parentais, ou no caso de autofecundação que aparecem em homozigose.

Para demonstrar esta aplicação escolhemos o trabalho de ADAMS (1979), onde foram coletadas sementes de 30 cruzamentos de **Pinus taeda** feitos em 3 diferentes instituições (designadas A, B, C) na Carolina do Norte. Lotes adicionais de sementes de todos os clones parentais utilizados foram também coletados. Endospermas de no mínimo 10 sementes parentais foram analisadas e o genótipo isoenzima dos clones foi inferido para 6 locos. Embriões e endospermas de 20 a 30 sementes de cada cruzamento controlado forma também examinados para os mesmos seis locos. Analisando os tecidos haplóide e diplóide foi possível determinar a composição alélica dos óvulos e dos pólen. O conjunto de pólen (isto é, pólen efetivo na fertilização de sementes viáveis) dos cruzamentos, pode então ser comparado com o esperado com base em cada genótipo-isoenzima do pólen parental. Similar comparação pode ser feita com o conjunto de óvulos de 15 cruzamentos para avaliação independente do genótipo do parental utilizado como fêmea.

Erros na identificação de progenitores femininos foram encontrados em somente um cruzamento entre 30 (cruzamento 18 x 19). Sementes do clone 18 tinham aparentemente se misturado com sementes de um ou mais clones diferentes, isto porque entre as sementes amostradas algumas continham no endosperma alelos que não poderiam ter vindo do clone 18. As sementes contaminantes poderiam ter vindo do clone 19, pois os alelos do loco deste clone não foram achados em nenhuma outra amostragem de clones, sendo somente achados no lote de sementes contaminadas.

Na instituição C apareceu um sério problema de contaminação. A composição do conjunto de pólen foi como a esperada, mas um entre 20 cruzamentos na instituição A e B e 8 entre 10 cruzamentos na instituição C continham alelos que não poderiam ter vindo do pólen do suposto pai. Aparentemente, estes erros podem ter surgido devido a problemas no manuseio, no transporte do pólen ou no próprio ato de polinizar, resultando em considerável contaminação.

Segundo o autor, cuidados devem ser tomados na hora de comparar validade de cruzamentos feitos em diferentes instituições com o auxílio de eletroforese, pois a habilidade para detectar erros depende de alelos carregados pelos parentais em um ou mais locos, os quais são relativamente infrequentes entre outras origens de pólen. Se a variação entre clones é geralmente grande os resultados diferentes instituições podem ser comparados. Deve-se salientar que a extensão de contaminação pode ser subestimada por esta técnica se os contaminantes tiverem a mesma composição alélica que a do parental esperado, não sendo detectadas diferenças.

Outros exemplos, bem como a explicação da comparação do endosperma com o embrião da semente fora descritas no tópico anterior (certificação e identificação de sementes).

5.4. Estudos sobre a eficiência genética de pomares de sementes

Pomares de sementes desempenham um papel importante em programas de melhoramento florestal, sendo a principal forma de se viabilizar os ganhos genéticos (ADAMS, 1983).

Quando os clones dos pomares de sementes alcançam a maturidade sexual, é assumido que eles acasalam-se ao acaso e produzem sementes de elevada qualidade e grande variabilidade genética (ADAMS, 1983).

Pomares de sementes são considerados geneticamente eficientes. Contudo, as polinizações são usualmente realizadas pelo vento, o que é uma boa razão para acreditar que a eficiência genética pode ser baixa e bem limitada (Woessner & Franklin, citados por ADAMS, 1983).

Segundo este autor os fatores que poderiam reduzir a eficiência genética em polinizações pelo vento em pomares de sementes são:

1. Elevado nível de autofertilização (resultando progênes com alto grau de depressão endogâmica).
2. Contaminação com pólen oriundo de árvores que não pertencem ao pomar, ou seja, não pertencente a árvores selecionadas.
3. Cruzamentos entre clones não ao acaso, restringindo a dispersão de pólen, resultando em menos cruzamentos férteis e com menor variabilidade genética em sementes colhidas que o esperado.

Isoenzimas são muito úteis para estudos da proporção dos vários fatores que afetam a eficiência genética.

A técnica de eletroforese tem sido usada para estimar a proporção da progênie de pomares de sementes resultantes de autofecundação (ADAMS, 1983). Uma das maneiras de se avaliar a autofecundação é com o uso de alelos raros; por exemplo, se os clones são homozigóticos e únicos no pomar, é fácil detectar os homozigóticos entre a progênie polinizada. Pode-se também fazer o contrário, ou seja, usando clones com alelos únicos e homozigóticos. Por exemplo, assumindo que 1 clone possui genótipos B_2/B_2 o número de plântulas descendentes que possuem alelos diferentes no local do B_2 pode ser usado para estimar a frequência de polinização cruzada (RUDIN & LINDGREN, 1977). ADAMS (1983) estimou que 8% da progênie viável produzida em 20 anos em pomares de ***Pseudotsuga menziesii*** eram autofertilizações. Esta estimativa é compatível com os resultados obtidos pelo mesmo autor através de multilocos em estandes naturais de “Douglas-fir” (***Pseudotsuga menziesii***). Contudo, ele lembra que a proporção de autofertilização variou de 0-16% entre 6 pomares clonais.

Marcas isoenzimáticas podem também ser usadas para estimar o grau de dispersão efetiva de pólen e passagem de pólen contaminante para pomares de sementes. ADAMS (1983) cita dois trabalhos onde a dispersão de pólen foi estudada em Pinheiro escocês (***Pinus sylvestris***, L.) em dois pomares de sementes, com base na proporção de marcas isoenzimáticas detectadas no pólen de ramos a diferentes distâncias do clone original, mas os resultados foram contraditórios.

Em um primeiro estudo (SHEN et alii, 1981) foi achado que o grau de dispersão do pólen dependia não somente da distância entre ramos receptores e doadores, mas também da direção do vento durante o florescimento e o tempo de florescimento entre ramo de origem e receptores. Num segundo estudo (MULLER-STARCK, 1979) a direção do vento e a fenologia da flor foram aparentemente não examinados e não foi achada relação entre dispersão de pólen e distâncias. Visto que fatores afetando a dispersão do pólen deverão ser considerados no futuro para o planejamento e delineamento de pomares de sementes (Denison & Franklin, citados por ADAMS, 1983) mais estudos deste tipo são necessários.

Aparentemente, somente um único estudo tem sido relatado com marcas isoenzimáticas para estimar contaminações em pomares de sementes (Friedmann & Adams, citados por ADAMS 1983). Este estudo foi conduzido em pomares de “loblolly pine” (**Pinus taeda**) de 16 anos, cercados por uma zona de diluição de pólen de 122 m (i.e. uma mistura de **Pinus** onde todas as árvores que estavam florescendo eram periodicamente removidas). Com base em 4 marcas isoenzimáticas presentes em **Pinus taeda**, mas ausentes nas árvores do pomar, foi possível estimar a proporção de semente do pomar fertilizadas por espécies que cercavam a zona de diluição, obtendo-se como resultado 28% de contaminantes.

Esta elevada passagem de pólen contaminado no pomar sugere que a limitada zona de diluição de pólen por si só pode não providenciar bastante proteção para infiltração de pólen que não pertença a árvores do pomar (ADAMS, 1983).

5.5. Determinação da eficácia de Polinização Massal Suplementar

Polinização Massal Suplementar (PMS) é uma técnica para aplicação de pólen em grande escala com flores não ensacadas, com pulverizadores costais ou outros aplicadores mecânicos, sendo sugerida como uma forma de incrementar a fertilização cruzada e reduzir a autofecundação e a contaminação de pólen em pomares de sementes. PMS foi também sugerido como uma forma de produzir progênies de cruzamentos específicos sem ter o custo da polinização controlada (ADAMS, 1983).

5.6. Correlação entre características de importância econômica e genótipo-isoenzima

As associações genéticas entre marcadores isoenzimáticos e características economicamente importantes podem resultar de quatro mecanismos básicos:

- Pleiotropia: propriedade pela qual um gene afeta duas ou mais características, sendo que alguns genes podem aumentar ambas as características, enquanto outros aumentam uma e reduzem a outra, sendo que os primeiros tendem a ter uma correlação positiva e os últimos uma correlação negativa;
- Ligação que pode existir entre dois locos, um dos quais controla um marcador genético e o outro uma característica de importância econômica;
- Correlação entre heterozigidade isoenzimática e poder adaptativo ou competitivo.
- Surgimento de novas bandas ou de bandas com intensidades diferentes resultantes da presença de microorganismos patogênicos.

Numerosos estudos em florestas tem recentemente demonstrado correlações entre medidas de taxa de crescimento e níveis de heterozigosidade em locos isoenzimáticos.

A relação, no entanto, não tem sido consistente entre várias espécies investigadas, Mitton et alli, citados por ADAMS (1983), relataram a correlação entre números de locos isoenzimáticos heterozigotos (3 ou 4 locos) e projeção de média de crescimento anual e variação da taxa de crescimento em **Populus tremuloides**, **Pinus contorta** e **Pinus ponderosa**. A taxa de crescimento foi determinada através de incrementos anuais dos anéis radiais de crescimento.

Foi encontrada correlação positiva entre crescimento anual médio e aumento de heterozigosidade em **Populus tremuloides**, mas em **P. ponderosa** e **P. contorta** não houve diferença nas taxas de crescimento entre árvores predominantemente heterozigotas ou predominantemente homozigotas. No entanto, variabilidade no aumento de crescimento teve correlação positiva com o aumento da heterozigosidade em **P. tremuloides** e **P. ponderosa**, mas negativa com **P. contorta**.

Ledig et alii, citados por ADAMS (1983), realizaram uma investigação mais elucidativa da associação entre heterozigosidade isoenzimática e taxa de crescimento. Em seus estudos foram amostradas entre 28 e 57 árvores de cada 8 povoamentos de **Pinus**, sendo que a taxa de crescimento foi medida pelo aumento da área basal anual; o cálculo da heterozigosidade foi baseado em 21 locos isoenzimáticos. Uma forte associação foi achada entre variabilidade, incremento de crescimento e heterozigosidade. Heterozigose isoenzimática e taxa de crescimento anual teve forte correlação em quatro povoamentos; no entanto, em um deles a correlação foi negativa. Uma explicação para estes resultados variáveis entre diferentes povoamentos é eu a correlação entre heterozigosidade de indivíduos e a taxa anual de incremento é relatada para a idade do povoamento. A correlação do coeficiente de regressão relacionando crescimento à heterozigotos em função da idade foi alto e positivo ($r = 0,85$).

Esta superioridade que os heterozigotos aparentemente apresentam só se manifesta em populações mais velhas. Superioridade do heterozigoto pode não ser expressada até que a competição apareça à medida que o povoamento se feche. Esta suposição é associada à observação de que a superioridade do heterozigoto estava mais fortemente expressada nos povoamentos mais densos.

Forte correlação entre modelos isoenzimáticos e taxa de crescimento pode ser uma maneira de auxiliar a seleção em estágios iniciais de desenvolvimento, o que seria de fundamental importância principalmente no melhoramento florestal, tendo em vista o longo tempo de cada geração e o período gasto no campo com testes de melhoramento. Contudo, não é ainda muito prudente realizar de forma generalizada tais associações pois os mecanismos ainda não estão completamente compreendidos (ADAMS, 1983).

Talvez o potencial mais promissor do uso de isoenzimas seja como auxílio para selecionar marcas de blocos de ligação que carregam genes ou grupos de genes que controlam características de importância econômica.

Um trabalho elucidativo, apesar de não ser com uma espécie florestal, foi realizado em tomate e se refere à seleção de plantas resistentes a nematóides causadores de galhas nas raízes. Devido à ligação genética do alelo Aps. 1 da enzima fosfatase ácida com o alelo Mi que confere resistência a várias espécies de **Meloidogyne**, é possível selecionar as plantas resistentes, baseando-se unicamente no padrão eletroforético. Com isso, não é necessário submeter as plantas ao ataque pelo nematóide. Uma vez que o gene de resistência (Mi) é dominante, pelo método clássico de seleção a distinção entre plantas resistentes homozigotas e heterozigotas só é possível na geração seguinte, através do

chamado teste de progênie. Neste, as progênies de plantas heterozigotas segregam na proporção de três resistentes para uma susceptível, enquanto as progênies de plantas homozigotas dão origem somente a plantas resistentes.

Neste caso, utilizando-se o método da eletroforese, o teste de progênie não é necessário, visto que as plantas homozigotas e as heterozigotas tem padrões de bandas diferentes (Figura 4). Com esse método, o programa de melhoramento é mais barato e eficiente e progride com maior rapidez (MEDINA FILHO, 1983).

GENÓTIPO	+/+	+/1	1/1
FENÓTIPO	—	— —	—

Figura 4. Padrão eletroforético de tomateiros homozigotos e heterozigotos para o loco 1 de fosfatase ácida (Aps-1). Plantas homozigotas para o alelo avançado + são suscetíveis ao nematóide **Meloidogyne**. Plantas heterozigotas (+/1) e aquelas homozigotas para o alelo retardado 1 são resistentes. (MEDINA FILHO, 1983).

A eletroforese também pode ser usada para verificar a pureza de um produto pela ausência de contaminates iônicos de mobilidade e/ou intensidades diferentes. Um estudo interessante, demonstrando a possibilidade de tal verificação em espécies florestais foi realizado por SUTHERLAND et alii (1981) em **Picea sitchensis**. Foram analisados lotes de sementes contaminados e não contaminados por **Colascipha fulgens** através de eletroforese em gel de poli-acrilamida para vários sistemas enzimáticos (esterase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina, glucose-6-fosfatase, malato desidrogenase, isocitrato desidrogenase). Várias diferenças foram detectadas entre os modelos isoenzimáticos, mas a principal diferença foi a elevada atividade da fosfatase alcalina. A análise desenvolvida para diferenciar lotes de sementes infectadas e livres da doença baseou-se na presença ou ausência da fosfatase alcalina, sendo que a alta atividade deste sistema enzimático foi determinada como sendo de origem patogênica.

Verificamos neste tópico, através dos trabalhos descritos, que a eletroforese pode auxiliar programas de melhoramento através da seleção indireta. Contudo, devemos salientar que tais estudos, apesar de interessantes, são também bastante complicados, laboriosos e principalmente de difícil interpretação.

6. CONCLUSÃO

Ao longo deste trabalho observa-se que a identificação de diferentes formas de enzimas pelo processo de eletroforese é um poderoso instrumento de pesquisa para a análise genética de árvores florestais. Demonstrou-se que isoenzimas obtidas por eletroforese são extraordinariamente mais sensíveis em detectar variabilidade genética do que caracteres morfológicos, pois aquelas representam a expressão primária do gene (MARCON, 1985). Torna-se, portanto, possível, com o auxílio desta técnica, determinar a

variabilidade entre e dentro de famílias, mesmo nos casos onde os caracteres morfológicos nem sempre o permitem (ADAMS, 1983).

A certificação e identificação de árvores parentais, clones e lotes de sementes podem ser feitas através da técnica da eletroforese, desde que envolva um número limitado de parentais, o que se deve à existência de um elevado nível de variabilidade isoenzimática em espécies florestais.

A interpretação dos resultados obtidos da eletroforese pode também ser muito útil para testar a eficiência de cruzamentos controlados, especialmente em coníferas onde análises de endosperma e embrião tornam possível identificar o progenitor que contribui com o pólen. Marcas isoenzimáticas podem ser usadas para investigar fatores que afetam a eficiência genética de pomares de sementes tais como: grau de fertilização cruzada entre clones dentro do pomar e grau de fertilização por pólen oriundo de plantas de fora do pomar.

A eletroforese pode ainda ser utilizada para testar a eficiência de polinização massal suplementar, desde que se use unicamente pólen com marcas isoenzimáticas (ADAMS, 1983).

Isoenzimas tem sido úteis para estimar diferenças genéticas entre e dentro de populações, possibilitando desse modo a obtenção de informações prévias da estrutura genética da população e permitindo dessa forma obter inferências sobre o nível de variabilidade e do potencial de manipulação da mesma, através de programas de melhoramento. Além disto, isoenzimas podem ser usadas no monitoramento de alterações que possam ocorrer pela domesticação, como também para definição de estratégias de conservação genética.

Finalmente, deve-se salientar que a técnica de eletroforese é aplicável a qualquer tipo de planta, que o equipamento é de fácil operação, econômico, bastante simples e de fabricação nacional, entretanto, para se ter grande confiabilidade nos resultados, é necessário usar um grande número de sistemas enzimáticos, o que ainda requer produtos importados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W.T. – Application of isozymes in tree breeding. In: TANKSÇEY, S.D. & ORTON, T.J. – **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam, Elsevier, 1983. v.1, p.381-400.

ADAMS, W.T. – Applying isozyme analyses in tree-breeding programs. **USDA. Forest Service. PSW general technical report**, Berkeley (48): 60-4, 1979.

ADAMS, W.T. – Population genetics and gene conservation in Pacific North-West conifers. In: SCUDDER, G.C.E. & REVEAL, J.L. – **Evolution today**. s.i., 1981. p.401-15.

ADAMS, W.T. & COUTINHO, S. – Isoenzyme genetic markers useful for studies of the **Pinus rigida X P. taeda** hybrid. In: NORTHEASTERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 24, Broomall, 1977. **Proceedings**. Broomall, NE Forest Experiment Station, 1977. p.1-13.

- ADAMS, W.T. & JOLY, R.J. – Allozyme studies in loblolly pine seed orchards: clonal variation and frequency of progeny due to self-fertilization. **Silvae genetica**, Frankfurt, 29: 1-4, 1980.
- ANDRESEN, J.W. – Arboricultural communication. **Journal of arboriculture**, 1(2): 21-8, 1975.
- AYALA, F.J. – The mechanisms of evolution. In: **EVOLUTION**. San Francisco, Scientific American, 1978. p.14-27.
- BARRIGA, P. et alii – **Catálogos de fórmulas de electroforegramas em trigo cultivado em Chile**. Agro-Sur, Valdivia, 1985. p.13-23.
- BELL, J.C. et alii – The identity of trees currently known as **Eucalyptus grandis** in the republic of South Africa based on isozyme frequencies. **South African forestry journal**, Pretoria, 135(12): 24-30, 1985.
- BERGMANN, F. – The allelic distribution at an acid phosphatase locus in Norway spruce along similar climatic gradients. **Theoretical applied genetic**, 53: 57-64, 1978.
- BROWN, A.H.D. & MORAN, G.F. – Isozymes and the genetic resources of forest trees. **USDA Forest Service PSW general technical report**, Berkeley (48): 1-10, 1979.
- CHELIAK, W.M. & PITEL, J.A. – Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. **Information report PI-X**, Chalk River (42): 1-13, 1984.
- CONCKLE, M.T. & ADAMS, W.T. Use of isoenzyme techniques in forest genetics research. In: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 14, Gainesville, 1977. **Proceedings**. New Orleans, SO Forest Experiment Station, 1977. 219-26.
- DOBZANSKY, T. et alii – The genetic structure of populations. In: DOBZANSKY, T. et alii – **Evolution**. San Francisco, Scientific American, 1977. p.20-56.
- EHRENBERG, C. – Exploration and conservation of forest gene resources in Sweden. In: JOINT IUFRO MEETING, 1974. **Proceedings**. Stockholm, Department of Forest Genetics, 1974. p.469-73.
- FINESCHI, S. – Determination of the origin of an isolated group of trees of **Pinus nigra** through enzyme gene markers. **Silvae genetica**, Frankfurt, 33(4/5): 169-72, 1984.
- FRANKEL, O.H. – Genetic danger in the green revolution. **World agriculture**, 19: 9-13, 1970.
- FRANKEL, O.H. & SOULÉ, M.E. – **Conservation and evolution**. Cambridge, Cambridge University Press, 1981. p.10-30.

- GOTTLIEB, L.D. – Gel eletroforesis: new approach to the study of evolution. **Bioscience**, 21: 939-44, 1971.
- HAMRICK, J.L et alii – Levels of genetic variation in trees: influence of life history characteristics. **USDA. Forest Service. PSW general technical report**, Berkeley (48): 35-41, 1979.
- HARLAN, J.R. – Genetic of disaster. **Journal of environmental quality**, 3: 212-5, 1972.
- HAWKES, J.G. – Germoplasm collection preservation and use. In: VENETH, J.F. **Plant breeding**. Ames, Iowa University Press, 1974. p.57-129.
- HUBBY, J.L. & LEWOBIN, R.C. – A molecular approach to the study of genie heterozygosity in natural populations. **Genetics**, 54: 577-94, 1966.
- HUNTER, A.C. – **An electrophoretic analysis of isoenzyme variation in a Piedmont loblolly pine seed orchard**. Raleigh, 1977, 48p. (Tese-Mestrado-NCSV).
- ILTIS, H.H – The extinction of species and destruction of ecosystems. **American biology teacher**, 34: 201-5, 1972.
- JOLY, R.J. & ADAMS, W.T. – Aozyme analysis of pitch x loblolly pine hybrids produced by supplemental mass-pollination. **Forest science**, 29: 423-32, 1983.
- KONAREV, V.G. et alii – Electrophoretic and serological methods in seed testing. **Seed science and technology**, Leningrad, 9: 807-17, 1981.
- LOPES, C.R. – **Estudos sobre as relações filogenéticas entre algumas espécies de Coffea**. Botucatu, 1984. 169p (Tese-Professor-UNESP).
- MARCON, G. – **Variabilidade citogenética em autogramas**. Piracicaba, ESALQ/DG, 1985. 36p. (não publicado).
- MARKET, C.L. & MOLLER, F. – Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proceedings of Natural Academy of Sciences**, 45: 753-63, 1959.
- MEDINA FILHO, H.P. – Eletroforese em gel de amedo: aplicações em genética e melhoramento de plantas. **Circular. IAC**, Campinas (121): 1-15, 1983.
- METTLER, L.E. & GREGG, T.G. – **Genética de populações e evolução**. Viçosa, Imprensa Universitária, 1973. 279p.
- MIYAZAKI, Y. & MIYAJIMA, H. – Identification of clone varieties in **Cryptomeria japonica** in Kyushu usine peroxidase isozyme pattern. In: IUFRO WORLD CONGRESS, 17, Ibarashi, 1981. **Proceedings**. Ibarashi, IUFRO, 1981. v.1, p.219-24.

- MULLER-STARCH, G. – Estimates of self and cross fertilization in a scots pine seed orchard. In: RVOIN, D. – **Biochemistry, genetic forest trees**. Umea, 1979. p.170-9.
- NIKOLIÉ, D. & TUIÉ, N. – Isoenzyme variation within and among populations of European black pine. **Silvae genetica**, Frankfurt, 32(3/4): 80-9, 1983.
- PIRES, C.L. da S. – **Estudo do polimorfismo enzimático em esterases de Eucalyptus grandis**. Campinas, 1983. 138p. (Tese-Mestrado-UNICAMP).
- RUDIN, D. & LINDGREN, D. – Isozymes studies in seed orchards. **Studia forestalia suecica**, Stockholm (139): 1-23, 1977.
- SHEN, H. et alii – Study of pollination pattern in a scots pine seed orchard by means of isozyme analysis. **Silvae genetica**, Frankfurt, **30**(1): 7-15, 1981.
- SMITH, I. & FAINBERG, J.G. – **Cromatografia sobre papel y capa fina: electroforesis**. Madri, Exedra, 1979. 258p.
- VIGNERON, P. – Polymorphisme enzymatique et variabilité génétique des provenances ivoiriennes et congolaises de **Terminalia superba**. **Bois et forêts des Tropiques**, Nogent-sur-Marne (204): 41-9, 1984.
- WAGNER, R.R. & SELANDER, R.K. – Isozymes in insects and their significance. **Annual review of entomology**, 19: 117-38, 1974.
- WOODS, J.H.; BLACKKE, G.M. & ALLENDORF, F.W. – Amount and distribution of isozyme variation in ponderosa pine Eastern Montana. **Silvae genetica**, Frankfurt, 32(5/6): 151-7, 1983.
- YAZDANI, R. et alii – Genetic structure of a **Pinus sylvestris**: seed tree stand and naturally regenerated understory. **Forest science**, Bethesda, 31(2): 430-6, 1985.
- YEH, H.C. – The role of isozyme research in tree improvement. In: SYMPOSIUM ON TREE IMPROVEMENT IN THE BOREAL FOREST, Gander, 1979. **Proceedings**, Ottawa, Canadian Forestry Service, 1979. p.101.