

se zimogramas em gel de amido, obtidos a partir de extrato de folhas, de pólen e de plântulas mantidas por micropropagação e de plântulas obtidas de sementes. Testaram-se quatro métodos mecânicos para a maceração dos tecidos vegetais, cinco sistemas — tampão para a extração das enzimas e 16 sistemas-tampão (gel/eletrodo) para a eletroforese. São apresentados e discutidos os resultados obtidos com o uso dos sistemas-tampão na identificação de 37 enzimas nos quatro materiais mencionados. Este trabalho fornece uma escolha de marcadores isoenzimáticos aplicáveis no melhoramento de eucalipto.

## 1 — INTRODUÇÃO

A descrição da estrutura genética de populações vegetais naturais ou cultivadas depende da disponibilidade de marcadores que demonstram a variabilidade nelas presente. Os marcadores genéticos podem ser morfológicos ou químicos. As isoenzimas são marcadores químicos que representam enzimas estruturalmente distintas, mas compatíveis com um mesmo substrato. Geralmente são controladas por um ou por poucos loci gênicos que, por sua vez, são identificáveis por meio de análise de segregação.

A herança de marcadores isoenzimáticos tem sido descrita em numerosas espécies florestais (NEALE *et alii*, 1984; BROWN *et alii*, 1985). A análise de isoenzimas nas espécies florestais tem proporcionado informações importantes sobre a variabilidade genética dentro e entre populações (LINHAET *et alii*, 1981; HAMRICK e LOVELESS, 1986; GURIES e LEDIG, 1979; YEH *et alii*, 1976), sobre os sistemas de cruzamento (BROWN *et alii*, 1975; FRIPP *et alii*, 1987) e sobre as relações taxonômicas entre espécies (COPES e BECKWITH, 1977; YEH e ARNOTT, 1986; BURGUESS e BELL, 1983 e 1985). A utilização de isoenzimas como marcadores genéticos tem, ainda, gerado informações que permitem determinar métodos mais eficientes de melhoramento, e tem, também, orientado o manejo e a conservação de recursos genéticos florestais (BROWN e MORAN, 1981; FRYER, 1987, MITTON *et alii*, 1979).

Neste estudo procurou-se determinar os métodos mais adequados para a extração e a separação eletroforética de isoenzimas de *Eucalyptus* spp., para que esses marcadores possam ser utilizados no monitoramento da diversidade genética em populações-base no melhoramento e na produção de sementes híbridas.

## 2 — MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Extração de Enzimas

Empregaram-se folhas jovens de mudas mantidas em casa de vegetação e folhas maduras, sem lesões, de árvores adultas, de plântulas obtidas por microcultura e a partir de sementes. As sementes foram tratadas com hipoclorito de sódio (300 ppm de cloro ativo), lavadas em água destilada, colocadas sobre papel de filtro úmido em placas de Petri, por dois ou três dias, e utilizadas após a germinação. As microculturas de brotações epi-

## ISOENZIMAS DE *Eucalyptus*: TÉCNICAS PARA EXTRAÇÃO E ELETROFORESE\*

Ingrid Peters

CNPF/EMBRAPA - Curitiba - PR - Brasil

Acelino Couto Alfenas

Universidade Federal de Viçosa

Viçosa - MG - Brasil

Aparecida Maria Moreira

Bahia Sul Celulose

Teixeira de Freitas - BA - Brasil

Francisco de Assis Ribeiro

CAF - Bom Despacho - MG - Brasil

Francisco Carlos Gilli Martins

Aracruz Florestal S/A

Aracruz - ES - Brasil

### RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar os métodos mais adequados para a extração e a separação eletroforética de isoenzimas de eucalipto. Examinaram-

\* Trabalho apresentado no 6.º Congresso Florestal Brasileiro, realizado em Campos do Jordão — São Paulo — Brasil, de 22 a 27 de setembro de 1990.

córmicas foram cedidas pela Companhia Aracruz Florestal e multiplicadas na Universidade Federal de Viçosa. O pólen foi extraído de anteras por agitação em água destilada, sedimentado por centrifugação e ressuspenso nos tampões de extração de isoenzimas descritos posteriormente. A suspensão de pólen foi utilizada imediatamente ou armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2. Métodos de Extração

Compararam-se os métodos de trituração em homogeneizador de vidro, em Polytron e o manual, usando-se folhas previamente cortadas em finas tiras. O homogeneizador de vidro consiste de um pistão rotativo, que fricciona o material contra as paredes de um tubo de vidro mantido em banho de gelo. O triturador Polytron possui lâminas rotativas protegidas por um envólucro metálico. Para a trituração no Polytron, o material foi cortado em pequenas seções e colocado imediatamente em solução-tampão, contida em um tubo de ensaio mantido em banho de gelo.

Testaram-se dois métodos de trituração manual. No primeiro utilizou-se uma placa de acrílico ( $12 \times 12$  cm) com escavações (2 cm de diâmetro e 0,5 cm de profundidade), nas quais as amostras foram trituradas com o auxílio de um bastão de vidro. A placa foi mantida sobre uma barra de gelo. No segundo, o material foi triturado em almofariz de porcelana previamente mantido no congelador ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Após a trituração, o extrato foi filtrado mediante o uso de um pedaço de lenço de papel colocado sobre o macerado. A trituração de plântulas foi feita sempre em placa de acrílico dado o pequeno tamanho desse material. Em todos os métodos o extrato protéico foi absorvido em tiras ( $12 \times 5$  mm) de papel cromatográfico Whatman 5 MM e armazenadas em tubos Eppendorf a  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso posterior (ALFENAS *et alii*, 1990).

## 2.3. Tampões de Extração

Para a extração das enzimas, testaram-se as seguintes soluções, assim denominadas: tampão A (BROWN *et alii*, 1975), tampão B (ARULSEKAR e PARFITT, 1986), tampão C (MARTY *et alii*, 1984), tampão D (PARKS *et alii*, 1983) e tampão E (J. L. HAMRICK, manual de laboratório não publicado). A constituição desses tampões e das demais soluções utilizadas nesse trabalho foram previamente descritas por ALFENAS *et alii* (1990).

## 2.4. Eletroforese

A eletroforese foi conduzida em géis de amido a 13%, preparados com as soluções-tampão próprias para cada sistema. Após a eletroforese, cada gel foi cortado horizontalmente em fatias individuais que foram imersas nas soluções específicas para a revelação de cada enzima (ALFENAS *et alii*, 1990).

### 2.4.1. Seleção de Sistemas-Tampão para a Extração de Enzimal e para a Eletroforese

Realizaram-se teste preliminares avaliando-se a atividade, migração e resolução das enzimas ACP, ADH,  $\alpha$ -EST,  $\beta$ -EST, GDH, GOT, MDH e PGI com os siste-

mas I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX e X. Utilizaram-se os quatro tampões de extração mencionados no item 3. Verificou-se, ainda em que fatia do gel obtém-se a melhor resolução para estas enzimas.

Com base nos resultados dos testes preliminares, passou-se a utilizar o tampão D para a extração das enzimas nos quatro tecidos. Testaram-se, então, nove sistemas eletroforéticos em combinação com 36 enzimas. Os nove sistemas incluíram o I e o IV já mencionados e os sistemas adicionais XI, XII, XIII, XIV, XV e XVI (Tabela 1).

## 3 — RESULTADOS

### 3.1. Métodos de Extração

Dentre os quatro métodos de extração testados, a trituração manual, em almofariz de porcelana, de pólen e folhas obtidas de microcultura, folhas de mudas ou folhas de plantas adultas, preservou melhor a atividade enzimática.

A trituração em almofariz de porcelana requer um volume menor de tampão de extração do que a homogeneização com pistão de vidro ou com o Polytron, e permite obter-se extratos mais concentrados. Além disso, a obtenção do extrato pelos dois métodos mecânicos é mais demorada, pois requer centrifugação para a eliminação de detritos. É possível que a manipulação mais demorada do extrato por esses métodos tenha favorecido a perda de atividade das enzimas. A trituração de folhas e pólen em placa de acrílico e bastão de vidro forneceu resultados comparáveis à trituração em quando se deseja preparar poucas amostras, ou quando o material é por natureza pequeno.

### 3.2. Tampão de Extração

O tampão de extração D (PARKS *et alii*, 1983) foi o que melhor conservou a atividade enzimática em extratos foliares, passando a ser utilizado rotineiramente nos testes posteriores. O tampão C foi superior aos demais para as enzimas MDH e ADH de plântulas. Os tampões A, C e E não serviram para a extração de enzimas de folhas. O tampão B tampão tornou-se mais eficiente quanto à resolução das bandas ao se aumentar o volume utilizado em relação à quantidade de material foliar. Em compensação, a diluição do extrato tornou as bandas menos intensas. O tampão de extração e a posição da fatia do gel influenciaram a resolução de determinadas enzimas (Tabela 2).

### 3.3. Sistemas Eletroforéticos

Os sistemas IV, V e VI não proporcionaram migração suficiente das enzimas no gel para permitir a separação das bandas (Tabela 3), formando-se junto à origem. O sistema II destacou-se como o melhor para ADH,  $\alpha$ -EST,  $\beta$ -EST e PGI nos tecidos em que essas enzimas mostraram atividade. O sistema VIII mostrou bons resultados para GDH e GOT e para ACP, exceto em pólen. Muitas combinações enzima/tecido/sistema eletroforético não proporcionaram a formação de bandas de atividade nos géis; outras geraram bandas de baixa resolução. Os sistemas I e VI foram incluídas no segundo gru-

po de sistemas eletroforéticos testados. Nessa segunda etapa, a extração das enzimas foi feita, manualmente, triturando-se as folhas, as microculturas e o pólen, em almofariz de porcelana, com o tampão D, sobre gelo. Na Tabela 4 encontram-se os resultados dos ensaios com as 36 enzimas. Como os resultados dos ensaios preliminares para  $\beta$ -EST foram em geral inferiores aos obtidos para  $\alpha$ -EST, a primeira não foi incluída nos testes subsequentes. Adotou-se um sistema de notas na descrição dos zimogramas. Para cada enzima escolheram-se os quatro melhores sistemas eletroforéticos, sendo a nota máxima 1. Para as enzimas com mais de quatro sistemas recomendáveis, as notas foram repetidas. Os sistemas que não funcionaram ou que não proporcionaram resolução suficiente estão identificados na Tabela 4 por um asterisco, e os não testados foram assinalados com sinal negativo.

Como nem todas as enzimas foram ativas nos quatro materiais estudados e os sistemas eletroforéticos não foram igualmente apropriados para esses tecidos, serão discutidos, em seguida, os resultados obtidos para cada enzima separadamente.

### 3.4. Enzimas

*Aconitase (ACO — EC 4.2.1.3)*: encontrou-se atividade de aconitase apenas em microcultura. Os sistemas I e III proporcionaram os melhores resultados para esse material.

*Álcool desidrogenase (ADH — EC 1.1.1.1)*: não se detectou atividade de ADH em extratos foliares. Os sistemas XI e XII foram os melhores para descrever a ADH em microcultura e plântulas. Todos os sistemas mostraram atividade de ADH em pólen, mas apenas o sistema IXV separou duas zonas de atividade para estas enzimas, nesse material.

*Aldolase (ALD — EC 4.1.2.13)*: o sistema XII resultou em uma banda forte para microcultura, plântulas e pólen. Os sistemas I e XIV mostraram bandas de baixa intensidade, porém separaram três bandas distintas para microcultura, com melhor resolução no último sistema. Não se encontrou atividade de ALD em folhas.

*Alanina desidrogenase (ALDH — EC 1.4.1.1)*: os sistemas XI e XII mostraram bandas de boa resolução para folhas, microcultura e pólen. O pólen formou bandas de coloração negativa no gel, as quais não foram atribuídas à enzima ALDH.

*Catalase (CAT — EC 1.11.1.6)*: não houve atividade nos tecidos examinados.

*Diaforase (DIA — EC 1.6.4.3)*: houve atividade de DIA detectável em folhas, microcultura e plântulas, sendo mais intensa nas primeiras. A resolução das bandas foi baixa nos sistemas XIV e XVI. Não se formaram zimogramas aproveitáveis pelos demais sistemas. O pólen não formou bandas, mas apresentou atividade de diaforase.

*Endopeptidase (ENP — EC 3.4. .)*: não houve atividade nos tecidos examinados.

*Enzima málica (ME — EC 1.1.1.40)*: a enzima málica pode ser muito útil como marcador genético em

pólen, se for polimórfica. Houve muita atividade e boa resolução em bandas de ME de pólen nos sistemas VI, XI, XII, XIII e XIV. O sistema III mostrou duas bandas de ME em microcultura, as quais não são separadas pelos sistemas XI e XII. Os demais sistemas não formaram bandas para microcultura. Ao se analisar polimorfismo em clones de *E. cloezina* observou-se que alguns não apresentaram atividade de ME em folhas. Para folhas, os melhores resultados foram com o sistema XIII.

*$\alpha$ -Esterase ( $\alpha$ -EST — EC 3.1.1.1)*: a resolução e a atividade nos zimogramas de folhas e microcultura foram ótimas ao se usar o sistema VI. As bandas perderam resolução no sistema XVI e perderam intensidade e migração no sistema I. A resolução foi pobre nos sistemas III e XII.

*Fenil-alanina-prolina peptidase (PEP-PAP — EC 3.4.13)*: obtiveram-se bons resultados com as enzimas PEP-PAP usando os sistemas III e XII. Pouca atividade destas enzimas foi revelada no sistema 6. Não foram testados os sistemas XI, XIII e XV. Os demais sistemas não formaram bandas de PEP-PAP nos géis.

*Fosfatase ácida (ACP — EC 3.1.3.2)*: os sistemas XI e XII ofereceram a melhor atividade e resolução para as bandas de ACP nos quatro materiais examinados. Os sistemas XI, XII e VI são igualmente aconselháveis para microculturas. As plântulas oriundas de sementes apresentaram pouca ou nenhuma atividade de ACP. Quando presentes, as bandas de ACP foram fracas, mas de boa resolução. Com o sistema XI, as plântulas exibiram uma banda adicional marrom e nítida, que não parece ser atribuível a pigmentos. O extrato de pólen originou uma banda intensa e uma outra difusa com menor migração.

*Fosfatase alcalina (ALP — EC 3.1.3.1)*: não houve atividade nos tecidos examinados.

*Fosfoglucoisomerase (PGI — EC 5.3.1.9)*: o sistema XIII mostrou três bandas fortes e uma mais fraca na amostra de pólen examinada. Os demais sistemas modificaram esse padrão de bandas em número ou mobilidade. Nos sistemas I, XIV e XV detectaram-se duas regiões de atividade para extratos de folhas, microcultura e plântulas, as quais não são separadas nos outros sistemas. Os sistemas I e III não mostraram a atividade de PGI em plântulas. Nos sistemas III, XI, XII e XV, extratos de pólen formaram bandas secundárias, de menor migração, repetindo o padrão das bandas principais. Estas bandas podem representar artefatos ou modificações induzidas a estas isoenzimas por esses sistemas.

*Fosfogluconato desidrogenase (6-PGDH — EC 1.1.1.44)*: os sistemas I e XII mostraram atividade de 6-PGDH em folhas, microcultura e pólen. Microcultura apresentou atividade mais alta. Os sistemas VI, XIV e XVI não proporcionaram a formação de bandas. O sistema I separou duas bandas distintas para microcultura e pólen, o que os outros sistemas não fizeram.

*Fosfoglucomutase (PGM — EC 2.7.5.1)*: os sistemas XIV e XV foram eficientes para demonstrar PGM

de folhas, microculturas e pólen. Formaram-se duas regiões de atividade. Somente os sistemas XI e XII mostraram atividade de PGM em plântulas. Os sistemas VI, XIII e XVI apresentaram atividade somente para pólen. As bandas de PGM colapsam em uma única região nos sistemas III, XI e XII, apesar de migrarem bastante. Bandas secundárias foram observadas para pólen nos sistemas XI e XII.

*Fumarase (FUM — EC 4.2.1.2)*: microcultura e pólen formaram duas bandas bem separadas e de boa resolução nos sistemas XI e XII. Os sistemas VI e XIII mostraram baixa atividade e resolução nesses dois tecidos. Os demais sistemas não serviram. As folhas e as plântulas não apresentaram atividade de fumarase.

*Galactose desidrogenase (GLDH — EC 1.1.1.48)*: as folhas e o pólen mostraram atividade de GLDH com os sistemas III, XI e XII, e muito fracamente, também, com sistema XIII. Nos sistemas I, XV e XIV houve formação de banda somente para o pólen. Os zimogramas mostraram apenas uma zona de atividade. Não se encontrou atividade de GLDH ao se usarem os sistemas VI e XVI.

*$\alpha$ -Glicerofosfato desidrogenase ( $\alpha$ -GPDH — EC 1.2.1.8)*: o sistema XII proporcionou uma banda com boa resolução em microcultura e pólen. Os sistemas I e XIV mostraram uma banda com baixíssima atividade para microcultura. Os demais tecidos ou sistemas não demonstraram atividade desta enzima.

*Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (G3PDH — EC 1.2.1.12)*: esta enzima pode ser utilizada para microcultura (sistemas VI e XII) e pólen (sistema XII). Os demais tecidos apresentaram fraquíssima ou nenhuma atividade de G3PDH. Não foi detectada atividade desta enzima em folhas e plântulas.

*Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH — EC 1.1.1.49)*: nenhum dos nove sistemas testados revelou atividade de G6PDH em plântulas. Para folhas e microcultura, os sistemas III, XI e XII mostraram boa atividade. Para pólen, os sistemas III, VI, XI e XII tiveram boa migração e atividade. Encontrou-se apenas uma zona de atividade para essa enzima em todos os tecidos.

*Glucoquinase (GK — EC 2.7.1.2)*: formaram-se duas zonas de atividade de GK em extratos de folhas, microcultura e pólen ao se usar o sistema XIV. As bandas de microcultura foram mais intensas do que às dos outros tecidos. Somente microcultura formou bandas com o sistema XVI e suas posições relativas ficaram modificadas, comparadas ao sistema XIV. Os demais sistemas não revelaram atividades de GK em quaisquer dos tecidos examinados.

*Glicose desidrogenase (GLUDH — EC 1.1.1.47)*: microcultura formou uma banda com os sistemas I, III, VI e XII, sendo fraca nesses dois últimos. No sistema XII, folhas e pólen também formaram bandas, a mais intensa sendo a de microcultura. Não houve bandas com os demais sistemas.

*$\beta$ -Glucosidase ( $\beta$ -GLU — EC 3.2.1.21)*: apenas microcultura, com os sistemas XI e XII, formou uma banda. Os sistemas VI, XIII e XVI resultaram em géis de cor azul-escuro após a revelação, o que os diferenciou dos demais sistemas. No sistema VI pode-se distinguir a banda formada por microcultura, embora esta contraste pouco com a cor do gel. Os sistemas I, III, XV e XVI não mostraram bandas.

*Glutamato desidrogenase (GDH — EC 1.4.1.2)*: bandas de atividade de GDH foram formadas com os sistemas XI e XII para microcultura e pólen. Bandas muito fracas foram detectadas, também, para folhas e plântulas. As folhas e o pólen apresentaram duas zonas de atividade de GDH ao se usarem esses dois sistemas. A zona de atividade com menor migração no zimograma de pólen não aparece quando se usa o sistema I. Os sistemas I, III, XIII, XIV e XV também mostraram atividade de GDH em pólen, porém com menor resolução.

*Glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT — EC 2.6.1.1)*: os sistemas I, XIV e XV não são aconselháveis para esta enzima. Os sistemas III, VI, XI, XII e XVI foram comparáveis em seus padrões de bandas. Os sistemas XI e XII destacaram-se para microcultura e plântulas, com duas regiões de atividade e boa resolução. Os sistemas I e XVI mostraram-se superiores em intensidade e resolução de bandas em extratos de pólen. Há duas regiões eletroforéticas distintas para GOT em microcultura, plântulas e pólen. Extratos de folhas mostraram uma só região de atividade e uma faixa mais móvel de pigmento.

*Hexoquinase (HK — EC 2.7.1.1)*: não funcionou nos tecidos examinados.

*Isocitrato desidrogenase (IDH — EC 1.1.1.42)*: todos os tecidos mostraram atividade de IDH quando se usaram os sistemas XI e XII. A resolução das bandas de IDH foi baixa em todos os sistemas. Somente os sistemas XI e XII revelaram atividade de IDH em plântulas. Para pólen, obtiveram-se duas regiões se confundem com as dos sistemas XI e XII. O sistema I não proporcionou migração.

*Lactato desidrogenase (LDH — EC 1.1.1.27)*: os resultados dos testes para LDH foram ruins com todos os nove sistemas testados. Observaram-se bandas fracas e difusas para os extratos de folhas e ainda mais fracas para os de pólen com os sistemas I, XI e XII. Bandas não atribuíveis à LDH formam-se próximas à origem, no zimograma de folhas.

*Leucina aminopeptidase (LAP — EC 3.4.11.1)*: o sistema XIII resultou em alta atividade de LAP para folhas e microcultura. Este sistema separou muito bem os pigmentos foliares (marrom) e as bandas de LAP (azuis). Não se detectou banda de pigmento nos zimogramas de microcultura. Os extratos de pólen e de plântulas mostraram uma faixa de pigmento alaranjado após a eletroforese com os sistemas III, XI e XII. Este pigmento não interfere nas bandas de LAP. Os sistemas XI, XII e XIII foram os que melhor preservaram a atividade de LAP de plântulas. Formaram-se três bandas distintas de LAP

para pólen com o sistema XIV e duas de maior intensidade nos sistemas XI e XII. Os demais formaram uma banda intensa de LAP para pólen.

*Manitol desidrogenase (MADH — EC 1.1.1.67)*: não houve atividade nos tecidos examinados.

*Malato desidrogenase (MDH — EC 1.1.1.37)*: foi encontrada atividade de MDH nos quatro materiais e com os nove sistemas testados. Os melhores sistemas foram o XIV e o XV. Oito bandas, distribuídas em duas regiões de atividade, foram observadas no zimograma de folhas da planta de *E. cloeziana* testada. Aparentemente, há três loci gênicos controlando esta enzima nesse material. Comparando-se zimogramas obtidos nos outros sistemas, pôde-se notar a sobreposição de bandas, o que dificulta a interpretação destes.

*Peroxidase (PO — EC 1.11.1.7)*: somente microcultura produziu bandas de PO. Os sistemas mais adequados foram o XI e o XII, com três de atividade, compreendendo quatro bandas no total. Os sistemas I, XIV e XV não favoreceram a migração das enzimas e as bandas, difusas, concentraram-se próximas à origem. Os sistemas III, VI, XIII e XVI resultaram em baixa atividade, não havendo formação de banda.

*Polifenol oxidase (PPO — EC 1.14.18.1)*: somente microcultura mostrou atividade de PPO. Os sistemas XIII e XVI formaram uma banda com migração aceitável para este material. Os sistemas XI e XII proporcionaram pouca migração da enzima no gel.

*Shiquimato desidrogenase (SKDH — EC 1.1.1.25)*: os sistemas XIV e XV mostraram boa atividade de SKDH em folhas e microcultura. Obtiveram-se duas bandas para microcultura, as quais não foram separadas pelos demais sistemas. Extratos de plântulas mostraram atividade de SKDH nos sistemas XI, XII e XVI e bandas muito fracas nos outros sistemas.

*Sorbitol desidrogenase (SDH — EC 1.1.1.14)*: não funcionou nos tecidos examinados.

*Superóxido dismutase (SOD — EC 1.15.1.1)*: não funcionou nos tecidos examinados.

#### 4 — DISCUSSÃO

A eficiência de cada combinação de tampões gel/eletrodo quanto à migração, à atividade e à resolução nos zimogramas depende da enzima e do tecido testados. Frequentemente observou-se que determinado tecido apresenta atividade enzimática e boa resolução quando ensaiado com um tampão, mas não apresenta com outro. A migração das bandas, no entanto, parece independente do tecido, isto é, quando não há migração adequada, as bandas formam-se próximas à origem, nos quatro materiais estudados. Quando isso acontece há sobreposição de bandas e os zimogramas não são interpretáveis. Isto ocorreu com a enzima MDH, por exemplo, que é bem resolvida pelos sistemas XIV e XV, mas não é interpretável no sistema VI.

A atividade das enzimas diferiu consideravelmente entre os materiais vegetais aqui estudados. Como é de se esperar, nem todos os genes que controlam as enzi-

mas em questão são ativos nos diversos estádios do desenvolvimento da planta ou nos seus diferentes órgãos. Outra razão para as diferenças de atividade entre esses materiais consiste na adequação da solução-tampão de extração e da combinação de soluções-tampões gel/eletrodo. Folhas, por exemplo, podem conter fenóis que precipitam as enzimas durante a extração. Os mesmos fenóis parecem não estar presentes nas sementes e no pólen e parecem estar presentes em baixa concentração nas plântulas e em microcultura.

Os sistemas eletroforéticos XI e XII (HAMRICK, 1986) e XIV foram os que mais destacaram quanto ao número de enzimas que resolvem. Dentre as 37 enzimas testadas, sete não produziram bandas em todos os quatro materiais. Resultados satisfatórios foram obtidos com 19 enzimas em folhas, 30 em plântulas sob microcultura, 14 em plântulas obtidas de sementes e 22 em pólen. As plântulas obtidas por micropropagação de brotações epicórmicas são um excelente material para o exame de isoenzimas em *Eucalyptus*, embora de difícil obtenção na prática. Apresentaram o maior número de enzimas ativas e melhor resolução de zimograma. Sabe-se, entretanto, que o processo de micropropagação pode induzir modificações deste material para análise genéticas.

Para a maioria das finalidades práticas, usam-se plântulas obtidas de sementes. De modo a facilitar os trabalhos de laboratório, podem-se combinar 19 enzimas ativas em plântulas e três sistemas-tampão gel-eletrodo:

Sistema XI: ACP, ADH, ALDH, GDH, GOT, IDH, PGM.

Sistema XII: ADH, ALD, ALDH, GOT, G3PDH, LAP, PEP-PAP, PGM.

Sistema XIV: DIA, MDH, PG..

Cada gel comporta em média 20 amostras e pode ser cortado horizontalmente, proporcionando três ou quatro fatias de boa qualidade. Desse modo, são necessários cinco géis de amido para a análise de 20 amostras e 19 enzimas. Outros sistemas devem ser escolhidos ao se combinarem enzimas para os demais materiais.

TABELA 1

SISTEMAS-TAMPÃO PARA ELETROFORESE.  
AS RECEITAS PARA ESSES SISTEMAS  
FORAM DESCRITAS POR ALFENAS *et alii* (1990)

Sistema	Autor(es)	Sistema	Autor(es)
I	Brown <i>et alii</i> , 1975	IX	Ridgeway <i>et alii</i> , 1970
II	Hakim-Elahi, 1980	X	Selander e Tang, 1969
III	Hakim-Elahi, 1980	XI e	Hamrick e
IV	Cheliak, 1985	XII	Lovelles, 1986
V	Cheliak e Pitel, 1984	XIII	Scandalios (1969)
VI	Moran e Bell, 1985	XIV	Cayton e Tretiak (1977)
VII	Faulhaber, 1965	XV	Alfenas <i>et alii</i> (1990)
VIII	Markert e Faulhaber, 1965	XVI	Phillips e Brow (1977)

TABELA 2

EFEITO DO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO E DA POSIÇÃO DA FATIA NO GEL, SOBRE A ATIVIDADE E A RESOLUÇÃO DE ENZIMAS EMPREGADAS NOS TESTES PRELIMINARES EM *EUCALYPTUS*

Enzimas	Sistemas							
	I				VI			
	ADH	MDH	$\alpha$ -EST	$\beta$ -EST	GOT	PGI	GDH	ACP
Posição	Tampão de Extração B							
1	0	0	+	+	+	+	+	0
2	0	0	+	+	+	+	+	0
3	0	0	-	-	+	+	+	0
4	0	0	-	-	+	-	+	0
	Tampão de Extração D							
1	-	+	0	0	0	-	0	-
2	-	+	0	0	0	-	0	-
3	+	-	0	0	0	-	0	+
4	+	-	0	0	0	-	0	+

+ = atividade e resolução aceitáveis;  
- = atividade aceitável, mas resolução baixa;

0 = sem atividade;  
sistemas: I (BROWN *et alii*, 1975); VI (MORAN & BELL, 1983).

TABELA 3

RESILUÇÃO E ATIVIDADE DE ENZIMAS EM DIFERENTES SISTEMAS ELETROFORÉTICOS E TECIDOS DE *EUCALYPTUS*

Enzima	Material Vegetal	Sistema Gel/eletrodo								
		I	II	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
ACP	Fl	-	-	N	N	*	N	*	N	N
	Mc	2	-	-	N	*	N	*	1	N
	Pl	2	-	*	N	*	N	*	1	N
	Po	*	*	N	N	*	N	*	*	N
ADH	Fl	-	1	N	*	*	N	-	*	*
	Mc	2	1	N	N	2	N	-	*	-
	Pl	*	1	*	N	*	N	*	*	*
	Po	*	1	N	N	2	N	2	-	-
$\alpha$ -EST	Fl	*	1	N	N	-	N	-	-	-
	Mc	3	1	N	N	2	N	-	-	-
	Pl	*	-	*	N	*	N	-	1	*
	Po	1	*	N	N	*	N	-	*	*
$\beta$ -EST	Fl	*	1	*	*	-	N	-	2	*
	Mc	2	1	*	N	2	N	-	2	-
	Pl	*	1	*	N	*	*	-	*	*
	Po	1	*	*	N	*	*	*	*	*
GDH	Fl	-	*	*	*	*	N	1	-	*
	Mc	*	*	*	*	2	N	1	2	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	*	1	*
	Po	-	-	*	N	*	N	1	-	2
GOT	Fl	-	-	*	*	-	N	1	2	-
	Mc	-	-	N	*	-	N	1	2	-
	Pl	*	2	*	*	-	N	2	1	-
	Po	-	-	N	N	*	*	1	2	*
GPI	Fl	-	-	N	N	1	N	-	-	-
	Mc	2	-	N	N	2	N	2	-	1
	Pl	2	1	N	N	2	N	2	-	2
	Po	-	1	N	N	-	N	1	-	1
MDH	Fl	*	*	N	*	-	N	-	*	-
	Mc	1	*	N	2	-	N	-	*	-
	Pl	1	*	N	2	-	N	-	*	-
	Po	1	-	N	2	-	*	-	-	-

N = não houve migração (bandas muito próximas à origem).

\* = Não houve atividade suficiente para interpretação.

- = Sistema com má resolução.

1, 2 ou 3 = Sistemas aceitáveis para cada material, em ordem de prioridade.

Fl = Folha; Mc = microcultura; Pl = plântula e Po = pólen.

TABELA 4

RESOLUÇÃO E ATIVIDADES DE ENZIMAS SEPARADAS POR ELETROFORESE EM DIFERENTES SISTEMAS-TAMPÃO PARA GEL E ELETRODOS

Enzima	Material Vegetal	Sistema Gel/eletrodo								
		I	III	VI	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
ACO	Fl	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Mc	2	1	*	—	*	—	*	—	3
	Pl	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Po	*	*	*	—	*	—	*	—	*
ACP	Fl	*	3	2	1	2	4	*	*	*
	Mc	*	3	1	1	1	3	*	*	2
	Pl	*	*	*	1	2	*	*	*	*
	Po	*	2	*	1	1	*	*	*	*
ADH	Fl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Mc	*	*	*	2	1	*	*	*	*
	Pl	4	*	*	1	1	*	3	*	*
	Po	*	3	*	2	2	*	1	*	2
LD	Fl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Mc	4	4	3	*	2	*	1	*	3
	Pl	2	*	*	*	1	*	2	*	*
	Po	3	*	*	*	1	*	2	*	*
ALDH	Fl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Mc	*	*	*	1	1	*	*	*	*
	Pl	*	*	*	1	1	*	*	*	*
	Po	*	*	*	1	1	*	*	*	*
ALP	Fl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Mc	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Po	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CAT	Fl	*	*	—	—	*	—	*	—	*
	Mc	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Pl	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Po	*	*	*	—	*	—	*	—	*
DIA	Fl	*	*	*	—	*	—	1	—	2
	Mc	*	*	*	—	*	—	1	—	2
	Pl	*	*	*	—	*	—	1	—	2
	Po	*	*	*	—	*	—	1	—	2
ENP	Fl	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Mc	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Pl	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Po	*	*	*	—	*	—	*	—	*
$\alpha$ -EST	Fl	3	*	1	—	*	—	*	—	2
	Mc	3	*	1	—	*	—	*	—	2
	Pl	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Po	*	*	*	—	*	—	*	—	*
FUM	Fl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Mc	*	*	*	1	1	*	*	*	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Po	*	*	*	1	1	*	*	*	*
GDH	Fl	*	3	*	1	2	*	*	*	*
	Mc	*	3	*	1	2	*	*	4	*
	Pl	*	*	*	1	2	2	*	*	*
	Po	*	4	*	1	2	3	*	*	*
GK	Fl	*	*	*	—	*	—	1	—	*
	Mc	*	*	*	—	*	—	1	—	2
	Pl	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Po	*	*	*	—	*	—	1	—	*
$\beta$ -GLU	Fl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Mc	*	*	*	1	1	*	*	*	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Po	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GLUDH	Fl	*	*	*	*	1	*	*	*	*
	Mc	3	2	2	*	1	*	*	*	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Po	*	*	*	*	1	*	*	*	*

CONTINUAÇÃO DA TABELA 4

Enzima	Material Vegetal	Sistema Gel/eletrodo								
		I	III	VI	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
GLDH	Fl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Mc	*	2	*	1	1	*	*	*	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Po	*	2	*	1	1	*	*	*	*
GOT	Fl	*	*	1	1	2	*	*	*	*
	Mc	*	*	2	1	1	*	*	*	3
	Pl	*	*	1	1	1	*	*	*	2
	Po	*	*	3	2	3	*	*	*	2
$\alpha$ -GPDH	Fl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Mc	*	*	*	*	1	*	*	*	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Po	*	*	*	*	1	*	*	*	*
G3PDH	Fl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Mc	*	3	2	*	1	*	*	*	*
	Pl	*	*	*	*	1	*	*	*	*
	Po	*	*	*	*	1	*	*	*	*
G6PDH	Fl	*	1	*	3	2	*	*	*	*
	Mc	*	2	3	1	3	*	*	*	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Po	*	1	1	2	2	2	*	*	*
HK	Fl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Mc	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Po	*	*	*	*	*	*	*	*	*
IDH	Fl	2	*	*	1	1	*	*	*	*
	Mc	2	*	*	1	1	*	*	*	*
	Pl	*	*	*	1	2	*	*	*	*
	Po	*	*	*	3	3	*	1	2	*
LDH	Fl	1	*	*	1	1	*	*	*	*
	Mc	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Po	*	*	*	*	*	*	*	*	*
LAP	Fl	3	3	*	4	4	1	*	*	2
	Mc	3	3	*	2	2	1	*	*	4
	Pl	2	2	*	1	1	1	*	*	*
	Po	*	*	*	2	2	4	1	*	*
MADH	Fl	*	*	*	—	*	—	—	*	—
	Mc	*	*	*	—	*	—	—	*	—
	Pl	*	*	*	—	*	—	—	*	—
	Po	*	*	*	—	*	—	—	*	—
ME	Fl	*	*	*	*	*	1	*	*	*
	Mc	*	1	*	2	3	*	*	*	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Po	*	*	*	2	3	1	*	*	4
MDH	Fl	*	*	*	*	*	*	1	2	*
	Mc	*	*	*	*	*	*	1	2	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	1	2	*
	Po	*	*	*	*	*	*	1	*	*
PEP-PAP	Fl	*	2	3	—	1	*	*	—	*
	Mc	*	2	3	—	1	*	*	—	*
	Pl	*	2	3	—	1	*	*	—	*
	Po	*	2	3	—	1	*	*	—	*
PO	Fl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Mc	*	*	*	1	1	*	*	*	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Po	*	*	*	*	*	*	*	*	*
6PGDH	Fl	2	*	*	—	1	—	*	—	*
	Mc	1	2	*	—	3	—	*	—	*
	Pl	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Po	*	*	*	—	*	—	*	—	*
PGI	Fl	3	*	4	*	*	3	1	2	4
	Mc	3	*	4	*	*	3	1	2	4
	Pl	*	*	2	3	3	2	2	*	1
	Po	*	*	2	*	*	1	4	3	*

## CONTINUAÇÃO DA TABELA 4

Enzima	Material Vegetal	Sistema Gel/eletrodo								
		I	III	VI	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
PGM	Fl	3	*	*	*	*	*	1	2	*
	Mc	3	*	*	*	*	*	1	2	*
	Pl	*	*	*	1	1	*	*	*	*
	Po	*	*	*	*	*	*	2	1	*
PPO	Fl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Mc	*	*	1	*	*	2	*	*	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Po	*	*	*	*	*	*	*	*	*
SDH	Fl	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Mc	2	*	2	—	1	—	*	—	*
	Pl	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Po	1	*	*	—	1	—	*	—	*
SKDH	Fl	3	*	*	*	*	*	1	2	*
	Mc	3	*	*	*	*	*	1	2	*
	Pl	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Po	*	*	*	*	*	*	2	1	*
SOD	Fl	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Mc	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Pl	*	*	*	—	*	—	*	—	*
	Po	*	*	*	—	*	—	*	—	*

Fl.: Folha; Mc: Microcultura; Pl: Plântulas; Po: Pólen.

Notas 1 a 4: Classificação dos sistemas eletroforéticos.

A nota 1 corresponde ao melhor dos 9 sistemas em cada caso.

\*: indica atividade e/ou resolução insuficientes.

## 5 — LITERATURA CITADA

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W. & PASSADOR, G.C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. SIF/UFV, Viçosa, MG 1990. (no prelo).
- ARULSEKAR, S. & D.E. PARFITT 1986. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almonds, grape, walnut, pistachie, and fig. Hort. Sci. 21:928-933.
- BOYLE, T.J.B. & E.K. MORGENSTERN 1985. Inheritance and linkage relationships of some isozymes of black spruce in New Brunswick. Can. J. For. Res. 15:992-996.
- BROWN, A.H.D. & C.F. MORAN 1981. Isozymes and the genetic resources of forest trees. In: M.T. Conkle In: M.T. Conkle (Tech. Coord.). Proc. Symp. Isozymes of North America Trees and Forest Insects. July 27, 1979. Berkeley, CA. USDA Forest Serv. Gen. Tech. Rep. PSW-48.
- BROWN, A.H.D., A.C. MATHESON & K.G. ELDRIDGE 1975. Estimation of the mating system of *Eucalyptus obliqua* L'Hérit. by using allozyme polymorphisms. Aust. J. Bot. 23:931-949.
- BURGESS, I.P. & J.C. BELL 1985. The identify of trees currently known as *Eucalyptus grandis* in the Republic of South Africa based on isozyme frequencies. South Afr. For. J. 135:24-30.
- CHELIAK, W.M. e PITEL, J.A. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Information Report PI-x42. Patawawa National Forestry Institute, Canadian Forest Service. 49 p. 1984.
- COPEs, D.L. & R.C. BECKWITH 1977. Isoenzyme identification of *Picea glauca*, *P. sitchensis* and *P. lutzii* populations. Bot. Gaz. 138:512-521.
- FRIPP, Y.J., A.R. GRIFFIN & G.F. MORAN 1987. Variation in allele frequencies in the outcross pollen of *Eucalyptus regnans* throughout a flowering season. Heredity. 59: 161-171.
- FRYER, J.H. 1987. Agreement between patterns of morphological variability and isozyme band phenotypes in Pitch Pine. Sieva Genetica. 36:199-206.
- GURIES, R.P. & F.T. LEDIG 1981. Genetic Structure of populations and differentiation in forest trees. In: M.T. Conkle In: M.T. Conkle (Tech. Coord.). Proc. Symp. Isozymes of North America Trees and Forest Insects. July 27, 1979. Berkeley, CA. USDA Forest Serv. Gen. Tech. Rep. PSW-48.
- HAKIM-ELAHI, A. 1980. Temporal changes in population structure of the slender wild oat (*Avena barbata*) as measured by allozyme polymorphisms Ph.D. Dissertation. University of California, Davis. 124 p.
- HAMRICK, J.L., M.D. LOVELESS 1986. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. Biotropica. 18:201-207.
- LINHART, Y.B., J.B. MITTON, K.B. STURGEON & M.L. DAVIS 1981. An analysis of genetic architecture in populations of ponderosa pine. In: M.T. Conkle (Tech. Coord.). Proc. Symp. Isozymes of North America Trees and Forest insects. July 27, 1979. Berkeley, CA. USDA Forest Serv. Gen. Tech. Rep. PSW-48.
- MARKERT, C.L. & FAULHABER, I. Lactate dehydrogenase Isozyme patterns of fish. J. Exp. Zoology. 159:319-332. 1965.
- MARTY, T.L.; O'MALEY, D.M. & GURIES, R.P.A. Manual for starch gel electrophoresis: new microwave edition. Staff paper series N.º 120. University of Wisconsin. 24 p. 1984.
- MITTON, J.B.; LINHART, Y.B.; STURGEON, K.B. & HAMRICK, J.L. Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. J. Hered. 70:86-89. 1979.
- MORAN, G.F. & C. BELL 1983. *Eucalyptus*. In: S.D. Tanksley & T.J. Orton (Eds) Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part B. Elsevier, Amsterdam. p. 423-441.
- NEALE, D.B., J.C. WEBER & ADAMS 1984. Inheritance of needle tissue isozymes in Douglas-fir. Can. J. Genet. Cytol. 26:459-468.
- PARKS, C.R., G. MILLER, J.F. WENDEL & K.M. McDOUDAL 1983. Genetic divergence within the genus *Liriodendron* (Magnoliaceae). Ann. Missouri Bot. Gard. 70:658-666.
- PHILIPS, M.A. & BROWN, A.H.D. Mating system and hybridity in *Eucalyptus paniciflora*. Aust. J. Biol. Sci. 30:337-344. 1987.



- RIDGWAY, G.J.; SHELBURNE, S.W. & LEWIS, R.D. Polymorphisms in the esterases of atlantic herring. Transaction of the American Fisheries Society. 99:147-151. 1970.
- SELANDER, R.K. & YANG, S.Y. Protein polymorphisms and genetic heterozygosity in a wild population of the house mouse (*Mus musculus*). Genetics. 63:653-667. 1969.
- YEH, F.C., M.A.K. KHALIL, Y.A. EL-KASSABY & D.C. TRUST 1986. Allozyme variation in *Pinus mariana* from Newfoundland: genetic diversity, population structure, and analysis of differentiation. Can. J. For. Res. 16:713-720.
- YEH, F.C. & J.T. ARNOTT 1986. Electrophoretic and morphological differentiation of *Picea sitchensis*, *Picea glauca* and their hybrids. Can. J. For. Res. 16:791-798.