

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Bacharelado em Ciências Biológicas



Trabalho de Conclusão de Curso

Isoenzimas e marcadores moleculares em plantas

Thairize da Silva Gonzalez

Pelotas, 2009
THAIRIZE DA SILVA GONZALEZ

Isoenzimas e marcadores moleculares em plantas

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Deuner

Co-orientadora: Prof. Dr^a: Beatriz Helena Gomes Rocha

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

G643i Gonzalez Thairize da Silva

**Isoenzimas e marcadores moleculares em plantas /
Thairize da Silva Gonzalez; orientador Sidnei Deuner; co-
orientador Beatriz Helena Gomes Rocha. – Pelotas, 2009. –
54f. – Monografia (Conclusão de curso). Instituto de
Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2009.**

**1. Biologia. 2. Fisiologia vegetal. 3. Eletroforese. 4.
Marcadores enzimáticos. 5. Marcadores morfológicos.
I.Deuner, Sidnei. II. Rocha, Beatriz Helena Gomes. III. Título.**

CDD:

581.19127

Banca examinadora:

Dr. Sidnei Deuner (Orientador)

Dr. Luciano do Amarante

Dr^a. Luciana Bicca Dode

Dr^a. Ilisandra Zanandrea (Suplente)

Aos meus pais
Dedico

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e da inteligência. Pela presença constante em minha vida, orientando meus passados e meus pensamentos, iluminando o meu caminho, colocando pessoas especiais em minha vida e me mostrando que sempre há porque e no que crer.

Aos meus avós, Noely e Antônio, e minha tia, Roselete, que mesmo no silêncio foram força e incentivo, sempre entendendo a minha ausência.

À minha mãe, Margarete, minha fortaleza, meu porto seguro. Pela dedicação, carinho, esforço, abraços e consolo nas horas mais difíceis. Pela alegria de sempre e por ter me proporcionado meios pra que eu chegasse até aqui. Por ter sempre acreditado em mim.

À todos os meus amigos, que me incentivaram, apoiaram e rezaram por mim durante este processo. Aos meus amigos de fé, de vida e de faculdade.

Ao meu Orientador Dr. Sidnei Deuner, pelo apoio e incentivo, disponibilidade e dedicação. Por ter aceitado a difícil tarefa de me orientar em um curto espaço de tempo.

À minha co-orientadora Dr^a. Beatriz Rocha, que além de todo apoio e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho, sempre me ajudou e orientou desde o primeiro ano de faculdade. Entendendo e me ajudando a resolver todos os obstáculos que surgiram nesta caminhada, que não foram poucos.

Resumo

GONZALEZ SILVA, Thairize da. **Isoenzimas como marcadores genéticos e a associação com marcadores moleculares em plantas**. 2009. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A existência de um grande número de espécies sem controle genealógico gera dúvidas sobre a diversidade genética e a representatividade de diferentes ecossistemas. Quando é lançada uma cultivar pelo melhorista, esta deve ser comparada com as já existentes, a fim de ressaltar características que possam facilitar sua identificação mais rápida e eficiente. O interesse pela caracterização de cultivares tem aumentado significativamente no mundo nas últimas décadas, sendo o motivo principal a crescente necessidade da proteção de cultivares comerciais em mercados econômicos cada vez mais competitivos. Para tal, o uso de descritores confiáveis e da natureza genética constitui um instrumento valioso na identificação de cultivares. O estudo dos padrões eletroforéticos de isoenzimas tem sido amplamente utilizado para a caracterização destas espécies, identificando acessos duplicados, auxiliando no estabelecimento de coleções e eliminando desperdícios, pela acurada identificação de duplicações antes da incorporação de acessos a etapas complementares do processo de avaliação. A natureza co-dominante das bandas e os custos relativamente baixos da técnica tornaram as isoenzimas atraentes e úteis neste tipo de pesquisa. Estudos recentes mostram que os resultados obtidos pelos marcadores enzimáticos superam os demonstrados pelos marcadores morfológicos e que podem ser aliados aos oriundos dos marcadores moleculares, proporcionando assim uma maior eficiência na caracterização da variabilidade genética das espécies estudadas.

Palavras-chave: eletroforese, marcadores enzimáticos, marcadores morfológicos.

Abstract

GONZALEZ SILVA, Thairize da. **Isozymes as genetic markers and a association with molecular markers in plants**. 2009. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The existence of a large number of species without control herd raises doubts about the genetic diversity and representation of different ecosystems. When a cultivar is released by the breeder, this should be compared with existing ones in order to highlight features that may facilitate identification, faster and more efficient. Interest in the characterization of cultivars has increased significantly worldwide in recent decades and is the main reason for the increasing need for protection of commercial cultivars in economic markets, increasingly competitive. To this end, the use of descriptors and reliable genetic nature is a valuable tool for cultivar identification. The study of electrophoretic patterns of isoenzymes has been widely used to characterize these species, identifying duplicate accessions, assisting in the establishment of collections and eliminating waste, by the accurate identification of duplicates before addition of access to additional steps in the evaluation process. The co-dominant bands and the relatively low cost of technique make isozymes attractive and useful in this type of research. Recent studies show that the results obtained by enzymatic markers outweigh demonstrated by morphological markers and can be combined with the coming of molecular markers, thus providing greater efficiency in the characterization of the genetic variability of the species studied.

Key-words: electrophoresis, enzyme markers, morphological markers.

Lista de abreviaturas e siglas

ACP – Fosfatase ácida

ADH – Álcool desidrogenase

AFLP – Polimorfismo de comprimentos de fragmentos amplificados

EST – Esterase

GOT – Glutamato oxalacetato transaminase

MDH – Malato desidrogenase

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PRX - Peroxidade

RAPD – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

RFLP – Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição

SOD – Superóxido dismutase

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Revisão de literatura.....	13
2.1 Proteínas e enzimas.....	13
2.2 Eletroforese em gel.....	15
2.3 Sistemas isoenzimáticos.....	16
2.3.1 Malato desidrogenase.....	18
2.3.2 Fosfatase ácida.....	18
2.3.3 Álcool desidrogenase.....	19
2.3.4 Superóxido dismutase.....	19
2.3.5 Peroxidase.....	20
2.3.6 Esterase.....	21
2.3.7 Glutamato oxalacetato transaminase.....	22
2.4 Marcadores de DNA.....	22
2.4.1 RAPD.....	22
2.4.2 RFLP.....	23
2.4.3 AFLP.....	23
2.4.4 Microssatélites.....	24
2.5 Interpretação de resultados.....	24
2.6 Caracterização e diferenciação de espécies.....	26
3 Metodologia.....	28
4 Resultados e discussão.....	30
4.1 Malato desidrogenase.....	30
4.2 Fosfatase ácida.....	31
4.3 Álcool desidrogenase.....	31
4.4 Superóxido dismutase.....	32
4.5 Peroxidase.....	33
4.6 Esterase.....	34
4.7 Glutamato oxalacetato transaminase.....	36
4.8 Caracterização e diferenciação isoenzimática.....	37
4.9 Marcadores isoenzimáticos associados a marcadores de DNA.....	39
5 Conclusão.....	41
Referências bibliográficas.....	42

1 Introdução

O interesse pela caracterização de cultivares tem aumentado nos últimos anos (BONOW et al., 2001), por conta da crescente preocupação em se obter espécies livres de contaminação genética, visando mercados econômicos cada vez mais exigentes, e da identificação e organização dos acessos em bancos de germoplasma (BONOW et al., 2001). A caracterização de plantas para fins de melhoramento genético (FACHINELLO et al., 2000), as pesquisas sobre o sistema de cruzamentos entre espécies (BOTREL; CARVALHO, 2004) e as investigações empregadas no melhoramento, manejo e conservação de espécies florestais, para a estimativa da diversidade genética, também tem se destacado nos últimos anos (PINTO; CARVALHO, 2004).

Entre as técnicas empregadas para tais estudos, a primeira utilizada foi a de marcadores morfológicos. A morfologia tem sido muito utilizada na caracterização de germoplasma e na estimativa da variabilidade genética, tão essenciais em qualquer projeto que envolva recursos genéticos (YANACA et al., 2005). Um número variável de marcadores morfológicos existe para as diferentes espécies de plantas, mas esses marcadores frequentemente são afetados pelo ambiente (YANACA et al., 2005) pelas condições de fertilidade do solo, do clima do local de sua produção, da época de colheita e do período de armazenamento das sementes (MARTINS et al., 2007). O uso desses marcadores é muitas vezes demorado, dispendioso e incerto, principalmente quando a espécie em estudo é resultado de cruzamentos de outras espécies morfológicamente semelhantes (KLASS, 1998).

Desta forma, a técnica de eletroforese de isoenzimas tem sido utilizada com sucesso em diferentes linhas de pesquisa, pois detecta, de forma indireta, polimorfismo em sequências de DNA e na carga elétrica de proteínas com função enzimática, gerado por mutações na sequência gênica (BOTREL; CARVALHO, 2004).

A natureza co-dominante das bandas e os custos relativamente baixos da técnica tornaram a análise de isoenzimas atraente e útil na pesquisa. São especialmente utilizadas para a comparação de diversos táxons, acessos ou indivíduos (KLASS, 1998). Além disso, constituem a maneira mais direta e rápida de avaliar genotipicamente muitos locos num grande número de indivíduos (FARALDO et al., 2003).

Isoenzimas são importantes ferramentas para os evolucionistas, geneticistas e melhoristas, e embora novas técnicas moleculares tenham surgido, estes marcadores ainda são amplamente utilizados em estudos genéticos (SOUZA, 2000) de espécies como feijão (VIEIRA, 2000), plantas frutíferas (FACHINELLO et al., 2000), espécies arbóreas (SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN, 2004), espécies medicinais (LOPES et al., 2003), entre outras.

Com o objetivo de aumentar a eficiência na seleção e caracterização de germoplasma e a maximização dos ganhos genéticos, novas técnicas como a dos marcadores de DNA ou moleculares, vem sendo cada vez mais utilizados em programas de melhoramento, permitindo aos melhoristas o acesso e a seleção da variabilidade em nível de DNA (MOREIRA, 2002). Atualmente, há inúmeros tipos de marcadores moleculares, diferenciando-se quanto à habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Entre os mais utilizados estão o RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), AFLP (Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos Amplificados) e Microssatélites.

Os marcadores bioquímicos (isoenzimas) têm sido utilizados com sucesso em diferentes linhas de pesquisa, porém, há alguns autores que relatam que estes devem ser suprimidos pelo uso de marcadores moleculares, por estes fornecerem uma avaliação mais ampla do genoma do organismo em estudo e alto poder de detecção da variabilidade genética, como há também estudos que mostram que avaliações utilizando-se de marcadores bioquímicos e moleculares geram respostas semelhantes, podendo assim o uso de isoenzimas como marcadores genéticos ser empregado de forma isolada ou em associação com os marcadores moleculares (MALONE; ZIMMER, 2005; MALONE, 2007).

Outro fato que pode comprometer o uso de isoenzimas é que se deve ter um conhecimento prévio sobre o tipo de tecido que deverá ser utilizado, o estágio de desenvolvimento em que este tecido deve se apresentar e também quais tipos de

sistemas enzimáticos deverão ser usados, para que obtenha-se respostas satisfatórias (ALFENAS et al., 2006). Por estas razões, esta revisão bibliográfica tem por objetivo reunir informações sobre a utilização de isoenzimas como marcadores genéticos em plantas, visando ainda, sua eventual associação com os marcadores moleculares.

2 Revisão de Literatura

2.1 Proteínas e enzimas

Proteínas são as macromoléculas mais abundantes, ocorrem em todas as células e em todas as partes destas, exibindo uma grande variedade de funções biológicas, são os meios moleculares onde a informação genética é expressa (NELSON; COX, 2006).

Todas as proteínas são constituídas inicialmente do mesmo conjunto de 20 aminoácidos, ligados covalentemente em sequências lineares características. Cada aminoácido tem uma cadeia lateral distintiva, que determina suas propriedades químicas. As células podem produzir proteínas com propriedades e atividades distintas pela reunião dos mesmos 20 aminoácidos em muitas combinações e sequências diferentes. Cada tipo de proteína possui uma estrutura tridimensional característica que lhe confere uma função específica. As proteínas com funções distintas sempre possuem diferentes sequências de aminoácidos e desse modo, se a estrutura primária se altera, a função da proteína também se altera. A partir disto, os organismos podem sintetizar produtos diferentes entre si, como enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, etc. Entre os produtos protéicos, as enzimas são os que apresentam maior variedade e especialização (NELSON; COX, 2006).

Todas as enzimas são proteínas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam propriedades catalíticas. A atividade catalítica das enzimas depende da integridade e conformação protéica nativa, assim as estruturas protéicas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas são essenciais para a sua atividade (NELSON; COX, 2006).

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas.

Receptores enzimáticos possuem um domínio de ligação a um ligante na

superfície extracelular da membrana plasmática e um sítio ativo de uma enzima no lado citosólico, com os dois domínios conectados por um único segmento transmembrana (VOET, D.; VOET, J.; PRATT, 2008).

O fluxo de metabólitos através de uma via bioquímica depende da atividade das enzimas que catalisam cada reação. O fluxo por meio deste passo é essencialmente limitado pelo substrato, e determinado pela concentração instantânea do substrato (VOET, D.; VOET, J.; PRATT, 2008).

Um dos principais problemas encontrados quando se deseja trabalhar com proteínas e enzimas ocorre na extração, pela presença de compostos fenólicos liberados durante a maceração do tecido. Estes fenóis, quando descompartmentalizados, são oxidados a quinonas por enzimas da própria planta. Tanto os compostos fenólicos não oxidados quanto as quinonas reagem com as proteínas e inativam ou alteram sua mobilidade, o que resulta em artefatos no gel (ALFENAS et al., 2006).

Para prevenir tal situação, a extração deve ser desenvolvida de modo a separar proteínas e fenóis, além de ser efetuada à baixa temperatura e com adição, ao macerado e ao tampão de extração, de substâncias que evitem a oxidação e que se complexem com fenóis. Entre a gama de produtos químicos eficientes neste processo, pode-se citar o ácido ascórbico, cuja função é reduzir quinonas com a regeneração de fenóis; o cianato, que precipita fenóis e inibe polifenoloxidasas; e cisteínas, que se associam aos fenóis, entre outros (ALFENAS et al., 2006).

Uma segunda restrição seria quanto ao número de “formas” observadas no gel. As moléculas compostas e não covalentemente ligadas umas às outras não se separariam durante a eletroforese. Como solução foi testada uma mistura protéica na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) (ANDREWS, 1988). O SDS, um detergente anfipático, liga-se às regiões hidrofóbicas das moléculas, promovendo assim a dissociação das mesmas em suas subunidades componentes. O SDS também pode ligar-se a regiões carregadas negativamente de polipeptídeos desnaturados e enovelados ao acaso, desmascarando cargas que normalmente estariam presentes na sua ausência (ANDREWS, 1988).

Além dos cuidados que se deve ter com os compostos fenólicos e a ligação não covalente entre moléculas, a escolha do tipo de material vegetal em que a extração será realizada, objetivando priorizar a obtenção de amostras com atividade enzimática satisfatória, o modo e o tempo de armazenamento adequados dos

tecidos, evitam a atividade reduzida dos sistemas e a baixa definição dos zimogramas (ALFENAS et al., 2006).

Segundo Peirce; Brewbaker (1973), a intensidade das bandas e o perfil isoenzimático são específicos para uma determinada parte da planta, tecido e estágio de desenvolvimento.

De acordo com Alfenas et al. (2006), folhas (em angiospermas) e acículas (em gimnospermas) são altamente vantajosas para a análise das isoenzimas. Esses materiais vegetais podem ser obtidos em qualquer época do ano e a partir de mudas ou plantas adultas. Estes permitem ainda a amostragem não destrutiva de todos os indivíduos da população. Folhas novas e brotações são geralmente mais ricas em proteínas do que folhas maduras, bem como folhas novas completamente expandidas de mudas tendem a fornecer extratos de maior atividade enzimática que folhas novas de plantas adultas recém coletadas (ALFENAS et al., 2006).

2.2 Eletroforese em gel

As enzimas podem ser separadas em diferentes formas moleculares através de vários métodos bioquímicos, tais como: cromatografia, sedimentação, sorologia e eletroforese em gel, sendo esta última, provavelmente a mais versátil e aplicável ao estudo de variações individuais em vegetais.

Esta técnica de separação foi desenvolvida em 1930 pelo químico Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, em sua tese de doutorado, com o título de "The moving-boundary method of studying the eletrophoresis of proteins", publicada em Nova Acta Regiae Societis Scientiarum Upsaliensis, neste mesmo ano. Por este trabalho, Tiselius ganhou o Prêmio Nobel em 1948 (NOBELPRIZE, 2009).

A eletroforese foi descrita, inicialmente, como um procedimento simplificado em filtro de papel, com misturas artificiais de proteínas altamente purificadas, separadas, e os componentes isolados. Sendo utilizada para separação de proteínas em solução (KUNKEL; TISELIUS, 1951).

Boulter et al. (1967) foram pioneiros ao analisar as globulinas de sementes de leguminosas através da eletroforese de disco, caracterizando 12 tribos e subdividindo as espécies estudadas dentro de cada grupo (ALMEIDA; CRÓCOMO, 1994).

A eletroforese é uma técnica relativamente simples e de alto valor informativo e sua aplicação engloba as mais diversas possibilidades. Ela consiste na migração de moléculas ionizadas num campo elétrico, de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares. Como cada molécula possui carga e tamanho característico, ela irá se deslocar sempre a uma determinada distância e num espaço de tempo (MANDARINO; VIDAURRE, 1995). Macromoléculas como DNA, RNA, proteínas e outras, possuem carga elétrica e são capazes de se movimentar quando submetidas a um campo elétrico.

Ela pode ser realizada em géis de poliacrilamida ou amido, sendo os géis de poliacrilamida os mais amplamente utilizados pela maioria dos pesquisadores.

Quanto à composição, o sistema pode ser vertical ou horizontal, não havendo diferenças ou interferências nos resultados devido ao sistema utilizado.

Após a eletroforese, os géis são corados em soluções apropriadas para revelação de bandas de proteínas totais ou enzimas específicas, visando uma reação que permita distinguir definidas enzimas de demais componentes do gel e diante de quaisquer outras proteínas. Para tanto, são empregados diferentes sistemas de tampões e de coloração, como os descritos por Scandalios (1969), Shields; Orton; Stubel (1983), Vallejos (1983), Ayala et al. (1972), entre outros..

2.3 Sistemas isoenzimáticos

O termo isoenzimas foi primeiro introduzido por Market; Moller (1959) para referirem-se as múltiplas formas de uma enzima com especificidade similar ou idêntica por um substrato, ocorrendo dentro do mesmo organismo.

Formas variadas de uma mesma enzima geralmente diferem nas suas propriedades cinéticas ou reguladoras, no tipo de co-fator (componente químico adicional necessário para a atividade de alguma enzima) ou na sua distribuição celular. As isoenzimas comumente têm sequências de aminoácidos similares e em muitos casos elas compartilham a mesma origem evolucionária. Cada isoenzima é produto de um único loci gênico, o qual apresenta níveis máximos de expressão em idades, órgãos vegetais, estádios do desenvolvimento e ambientes diferentes (MALONE et al., 2006).

Quando essas isoenzimas são controladas por alelos de um único loco, elas são chamadas de aloenzimas, as quais representam a consequência bioquímica da

substituição, deleção ou adição de um ou mais aminoácidos no polipeptídeo, afetando a sua carga elétrica e, conseqüentemente, a sua mobilidade durante a eletroforese (GOTTLIEB, 1981).

Uma das primeiras enzimas que demonstrou possuir formas variadas foi a Lactato desidrogenase (LDH). Está presente em grande variedade em vegetais e animais, onde ocorre nos tecidos dos vertebrados em pelo menos cinco formas isozímicas separáveis por eletroforese (GOTTLIEB, 1981).

Foi elaborada por Scandalios (1974) uma revisão sobre isoenzimas em plantas, mostrando alterações em padrões isoenzimáticos no desenvolvimento e na diferenciação de tecidos. Alguns fatos em comum das isoenzimas encontrados em grande número de organismos, com respeito a determinado sistema enzimático, são: a) ocorrência de isoenzimas distintas em diferentes tecidos de um dado organismo; b) presença de algumas isoenzimas em certo estágio de desenvolvimento e ausência em outros; c) presença de isoenzimas geneticamente idênticas em diferentes tecidos, mas em quantidades variáveis.

O autor acima citado salienta ainda que o aparecimento de uma nova atividade enzimática ou seu aumento no organismo em desenvolvimento pode ser o resultado da síntese de nova molécula enzimática, ou a ativação de um precursor pré-existente da enzima.

Assim que uma diferenciação celular progride, levando a um desenvolvimento morfológico e uma especialização funcional, há uma contínua síntese e/ou degradação de enzimas específicas e proteínas estruturais. Um fator comum em desenvolvimento e diferenciação celular é a habilidade das células em perder ou adquirir características bioquímicas específicas (ALMEIDA; CRÓCOMO, 1994).

Shannon (1968) comprovou que, quando células de diferentes órgãos foram crescidas em cultura *in vitro* e expostas a idênticas condições, elas desenvolveram um padrão enzimático uniforme. Assim, o meio citoplasmático deve controlar uma atividade diferencial dos genes e deste modo regular os padrões isoenzimáticos específicos dos tecidos. Este mesmo autor demonstrou que em plantas, o padrão isoenzimático pode ser influenciado pela presença ou ausência de fitorreguladores.

As isoenzimas surgem por mecanismos genéticos ou epigenéticos. No primeiro caso, o gene que codifica a enzima é duplicado (o que ocorre ao longo da evolução) e, posteriormente, esse gene duplicado, por mutações de ponto, acaba

por divergir do original, produzindo outra enzima. Nos mecanismos ditos epigenéticos, as alterações ocorrem após a tradução dos peptídeos, sendo responsável pelo surgimento das chamadas isoenzimas secundárias (ACCQUAAH, 1982).

A maioria dos sistemas isoenzimáticos localiza-se no citosol, em solução ou ligado às membranas celulares. A variação isoenzimática pode ocorrer dentro de um compartimento celular, nos diferentes compartimentos de uma célula, em células de um tecido, nos diversos estádios ontogenéticos e em diferentes tecidos (PINTO et al., 2001).

2.3.1 Malato desidrogenase

Segundo Taiz; Zeiger (2002) o sistema malato desidrogenase (MDH), constituído em sua grande maioria por enzimas dímeras, desempenha papel significativo no Ciclo de Krebs, uma vez que catalisa a conversão de malato a oxalacetato, produzindo NADH, que é um produto fundamental na produção de ATP e de compostos intermediários essenciais ao funcionamento das células. Portanto, esta enzima pode ser um eficiente marcador da respiração aeróbica das sementes durante a maturação. Vidigal et al. (2009), utilizando-se desta enzima para verificar alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta, obtiveram como resultado do perfil enzimático ausência de qualquer alteração no número e intensidade de bandas que pudesse ser associada ao estágio de maturação e à qualidade das sementes. Portanto, para estes autores, esta enzima poderia se constituir em eficiente marcador da respiração aeróbica das sementes durante a maturação.

2.3.2 Fosfatase ácida

A função da enzima fosfatase ácida (ACP) é hidrolisar os fosfomonoésteres de um grande número de reações bioquímicas vegetais, entre elas, a formação de sacarose durante a fotossíntese (TANKSLEY, 1983). Esta enzima está envolvida também na manutenção do fosfato celular e sua atividade pode afetar o metabolismo do fosfato em sementes, como os níveis de ATP e nucleotídeos.

Ela tem sua atividade aumentada em plantas que apresentam deficiência de

fósforo. O incremento nesta atividade, sob baixas concentrações de fósforo, tem sido reportado para um grande número de espécies e órgãos vegetais. Desta forma, espera-se que a intensidade da expressão da enzima fosfatase ácida aumente conforme o conteúdo de fósforo do solo decresce e quando os requerimentos nutricionais das plântulas maiores aumentar (CAMARGO et al., 2000).

2.3.3 Álcool desidrogenase

A álcool desidrogenase (ADH) é de vital função durante a degradação da glicose em condições anaeróbicas, pela reciclagem do NAD^+ , reduzindo o piruvato para etanol (SACHS; FREELING, 1978). O processo de acúmulo de etanol envolve a oxidação de NADH e resulta na produção de pequenas quantidades de ATP, fundamental para a sobrevivência de várias espécies sob condições de anoxia (KENNEDY; RUMPHO; FOZ, 1992).

Esta enzima está relacionada à respiração anaeróbica, promovendo redução do acetaldeído a etanol (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2005). O acetaldeído acelera a deterioração das sementes (ZHANG et al., 1994) portanto, com o aumento da atividade da ADH, as sementes ficam mais protegidas contra a ação deletéria deste composto.

Segundo Pasteur, N.; Pasteur, G.; Bonhome (1988), as desidrogenases são enzimas diméricas, que podem apresentar mobilidade eletroforética muito próxima, com moléculas nos extremos e a forma heterozigota representada pelas bandas intermediárias, que frequentemente são mais intensamente coloridas do que as outras bandas.

2.3.4 Superóxido dismutase

Superóxido dismutase (SOD) atua na linha de defesa contra formas reativas de oxigênio, uma vez que esta enzima anula a ação dos superóxidos (O_2^-), catalisando reações de transferência de dois elétrons para produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (McDONALD, 1999).

A SOD foi inicialmente isolada por Mann; Keilin, em 1938, de sangue bovino, como uma proteína verde cuja função biológica foi creditada a estocagem de Cu. Ao

longo dos anos a enzima teve referências variadas (SCANDALIOS, 1993).

A função catalítica da SOD foi descoberta por McCord; Fridovich, em 1969, com uma proteína Cu/Zn com atividade de SOD onde foram isoladas subsequentemente várias fontes eucarióticas. Proteínas contendo Mn com atividade de SOD foram encontradas em procariotos e na mitocôndria de eucariotos e depois, proteínas com Fe de *Escherichia coli* e algas demonstraram possuir atividade de SOD (OLMOS et al., 2003). Recentemente, uma classe completamente distinta de SOD que contém Ni foi descoberta em *Streptomyces* e cianobactéria (BARONDEAU et al., 2004).

Três classes de SOD foram reportadas em plantas e foram classificadas de acordo com seu co-fator, manganês (Mn), cobre/zinco (Cu/Zn) ou ferro (Fe) (AZEVEDO et al., 1998). A Mn-SOD é localizada na mitocôndria, apesar de ter sido reportada nos cloroplastos de algumas plantas (AZEVEDO et al., 1998), enquanto a Fe-SOD, apesar de observada em um número mais limitado de espécies vegetais, é associada aos cloroplastos (VITORIA; LEA; AZEVEDO, 2001). Já as abundantes Cu/Zn-SODs são geralmente encontradas no citosol de células eucarióticas e cloroplastos (AZEVEDO et al., 1998). A SOD cloroplastídica é geralmente a SOD mais abundante nas folhas verdes, ao mesmo tempo em que em plântulas e material estiolado, as SODs citoplasmáticas e mitocôndriais prevalecem. Esta distribuição presumivelmente reflete mudanças ocorridas nos locais subcelulares de formação dos oxirradicais. A presença das isoformas Mn-SOD e Cu/Zn-SOD em peroxissomos vegetais isolados foram reportadas em *Pisum sativum* (ervilha) e outras espécies (DEL RIO et al., 2002).

O número de isoenzimas de cada tipo de SOD varia muito de planta para planta, assim como a abundância relativa de cada uma.

2.3.5 Peroxidase

A peroxidase (PRX) desempenha um papel crítico no metabolismo das sementes, por utilizar peróxidos como aceptor de hidrogênio, podendo contribuir para o aumento dos mecanismos de defesa e prevenção de perda da qualidade (USHIMARU et al., 2001). De acordo com Bewley; Black (1994), a redução da atividade dessa enzima proporciona maior exposição dos sistemas de membranas aos efeitos do O₂. Com isso, em decorrência do nível de danos das membranas, o

oxigênio atua de forma mais intensa promovendo oxidação dos compostos. Plantas com altos níveis de antioxidantes, constitutivos ou induzidos, são reportadas como mais tolerantes a danos oxidativos, com isso, variações nos padrões dos sistemas isoenzimáticos da PRX são frequentes em plantas submetidas a estresses abióticos (DIONÍSIO-SESE; TOBITA, 1998; SREENIVASULU et al., 1999; ULISSES et al., 2002).

Esta enzima tem importante função metabólica na regulação iônica, ajuste osmótico e produção de NADPH, participa da fotorrespiração e atua na fixação de CO₂, sendo cada função dependente da localização da enzima na planta (mitocôndrias, peroxissomos ou cloroplastos) (ALFENAS et al., 2006).

A enzima PRX possui múltiplos substratos e essa multiplicidade possibilita a expressão de diferentes produtos (ALFENAS et al., 1991). Em estudo realizado em palmeiras, por Sawazaki et al. (1998), a PRX apresentou fraca atividade observada em gariroba e no dendê Hermes, confirmando a hipótese de que os locus podem ser produtos de genes estruturalmente não relacionados, próprio de enzimas com múltiplos substratos.

2.3.6 Esterase

O sistema enzimático esterase (EST) é constituído por um complexo e heterogêneo grupo de enzimas reativas com uma ampla gama de substratos específicos (SCANDALIOS, 1969). As variantes destas proteínas são geralmente monoméricas ou dímeras com um alto nível de variabilidade. Esterase é um dos sistemas enzimáticos mais polimórficos em plantas (GILLESPIE; LANGLEY, 1974; WEEDEN; WENDEL, 1990).

É uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios como os fosfolipídios totais de membrana.

A classificação das esterase, em α - esterase ou β - esterase, é feita de acordo com suas afinidades para a naftil-acetato, sua mobilidade em gel e sua sequência de nucleotídeos (SANTOS; MENEZES; VILELLA, 2005).

Segundo Endo; Morishima (1983), até o início da década de 1980 este sistema era o mais estudado em arroz. Wu et al. (1997), analisando isoenzimas de esterase em 848 acessos de arroz, concluíram que a maioria deles apresentava de

duas a quatro bandas eletroforéticas, fato também observado por Gonçalves; Cury; Crócomo (1981) que relatam ter este sistema, um padrão eletroforético específico para cada cultivar estudado, o qual apresenta-se constante para uma mesma cultivar. Os mesmos autores observaram que o padrão eletroforético para esterase, se mantém em plantas com idades fisiológicas distintas, desde que crescidas em ambiente controlado.

2.3.7 Glutamato oxalacetato transaminase

Esta isoenzima tem uma importante participação em reações de transaminação, durante a eliminação do nitrogênio dos aminoácidos e na formação de grupos α -cetoácidos para o Ciclo de Krebs e gluconeogênese (TANKSLEY, 1983). Em função da glutamato oxalacetato (GOT) estar diretamente envolvida no metabolismo do nitrogênio, é possível que variações ocorram à medida que acontece a síntese e degradação de aminoácidos durante o processo de germinação. Sem dúvida, esta enzima tem participação fundamental no metabolismo protéico, não somente durante a germinação, mas durante todo o ciclo de vida da planta (MALONE, 2007).

2.4 Marcadores de DNA

O desenvolvimento de marcadores moleculares abriu a possibilidade de obtenção de estimativas da diversidade genética, acessos com perfis de DNA mais distintos em relação às linhagens e cultivares comerciais, e a identificação de novos alelos de genes relacionados a características de interesse. Este tipo de marcador pode revelar diferenças entre os genótipos de forma mais eficiente, pois atuam diretamente sobre o genoma do organismo (MALONE; ZIMMER, 2005).

2.4.1 RAPD

A técnica RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), consiste na amplificação de segmentos de DNA ao acaso, utilizando um único primer, com 10 pares de bases de extensão, cuja sequência nucleotídica é arbitrária. Quando comparada às demais técnicas moleculares, é considerada simples, rápida, com

custo relativamente baixo e geradora de um número ilimitado de marcadores, com alto nível de polimorfismo. As principais limitações consistem na baixa reprodutibilidade dos resultados e uma restrita informação genética por loco, devido à sua expressão dominante (não distinguindo heterozigotos de homozigotos), não permitindo estimar, precisamente, diversos parâmetros que influenciam a estrutura genética das populações (WILLIAMS et al., 1990; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

2.4.2 RFLP

Na técnica RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), o DNA é digerido com enzimas de restrição, que clivam a fita dupla de DNA em sequências específicas, gerando um grande número de fragmentos de diferentes tamanhos. Os mesmos são separados por eletroforese, posteriormente desnaturados e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (processo denominado *Southern blot*). A membrana é exposta a uma solução contendo sonda radioativa, que hibridiza com a região homóloga de DNA, permitindo a visualização destes fragmentos através do processo de autoradiografia. O polimorfismo ocorre devido à variação na distribuição dos sítios de restrição na fita de DNA, gerando fragmentos de diferentes tamanhos, que resultam em diferenças na posição das bandas no gel (MALONE; ZIMMER, 2005).

Os marcadores RFLP têm a vantagem de cobrir, potencialmente, todo o genoma. Possuem expressão co-dominante, permitindo identificar genótipos heterozigotos e homozigotos; o número de marcadores é praticamente ilimitado; e apresentam alta consistência e repetibilidade dos resultados. Entretanto, a técnica é laboriosa, exige disponibilidade de biblioteca de sondas, utiliza material radioativo e o custo é bastante elevado (FORREST, 1994; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

2.4.3 AFLP

Na técnica AFLP (Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos Amplificados), o DNA genômico é clivado com duas enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte frequente e, posteriormente, ligado a adaptadores específicos que possuem terminais complementares às extremidades resultantes da

clivagem pelas enzimas de restrição. Em seguida, é realizada a reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a amplificação seletiva de fragmentos com primers específicos que contém a sequência complementar aos adaptadores e ainda um a três nucleotídeos adicionais na extremidade três. Por último, é feita a separação dos fragmentos por eletroforese em gel de poliacrilamida (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998 COSTA et al., 2000).

O AFLP têm como vantagens o grande número de marcadores analisados em um único gel, com alto poder de detecção de variabilidade genética; não requer informação prévia de sequência de DNA; e há a possibilidade de robustez dos resultados, quando comparados com a técnica RAPD. Entretanto, a principal limitação dos marcadores AFLP, é o baixo conteúdo de informação genética por loco, pois, assim como os marcadores RAPD, são de natureza dominante. Além disso, a análise AFLP envolve um maior número de etapas, necessitando de maior quantidade de reagentes e equipamentos, incrementando o custo das análises (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; HOEZEL; GREEN, 1998; ZHIVOTOVSKY, 1999; COSTA et al., 2000).

2.4.4 Microssatélites

Os microssatélites são marcadores baseados na amplificação de DNA por PCR e têm sido muito utilizados principalmente por apresentar um custo/benefício elevado e, dependendo da espécie, um grande número de microssatélites pode ser obtido. Comparado com as demais técnicas, é altamente polimórfico e apresenta elevada capacidade para detectar polimorfismo entre os diferentes acessos, espécies ou indivíduos de uma mesma população (MALONE, 2007).

Este tipo de marcador, assim como os marcadores isoenzimáticos, é um marcador co-dominante, o que possibilita a identificação de todos os alelos para um mesmo gene - locus. Isso é de fundamental importância em estudos de estruturação genética de populações e análises de paternidade (MALONE, 2007).

2.5 Interpretação de resultados

Os marcadores bioquímicos e moleculares oferecem inúmeras aplicações em estudos de genética e no melhoramento genético de plantas. Eles permitem

gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética e os relacionamentos filogenéticos nas espécies utilizadas pelos pesquisadores (ROCHA, 2000).

Quando o trabalho objetiva a estimativa da similaridade genética entre espécies, as diferenças genéticas entre os genótipos podem ser medidas por distâncias genéticas e estas serem empregadas em análises de agrupamento, sendo os dendrogramas um dos métodos mais usados. Faz-se primeiramente a codificação dos resultados, onde se atribui os valores 1, para a presença e 0, para a ausência de bandas eletroforéticas, obtendo-se uma matriz binária. Quando dois genótipos são comparados, ocorrem as seguintes situações: a= 1,1; b= 1,0; c= 0,1; e d=0; 0. Esses coeficientes são utilizados para a construção dos dendrogramas, adotando-se como critério de agrupamento o método do UPGMA (Unwughted Pair-Group Method of Arithmetic Averages).

Uma vez obtida a matriz de dados, os genótipos podem ser analisados com o auxílio do programa NTSYS Pc, com sua última versão melhorada por Rohlf (2001).

Um segundo tipo de resultado, que pode ser obtido pelo processo eletroforético das isoenzimas, é a mobilidade relativa (Rf) das bandas, a qual é calculada pela fórmula descrita por Alfenas et al. (2006), onde divide-se a distância percorrida pela molécula protéica, desde o ponto de aplicação da amostra até a linha de frente, sendo o resultado multiplicado por 100. Onde se pode agrupar os resultados (bandas) pela distância/tempo percorridos.

Quando o objetivo do estudo é a preservação de germoplasma, o conhecimento do tamanho efetivo populacional (N_e) é imprescindível, já que mede a representatividade genética dos indivíduos amostrados na população em relação a uma população panmítica ideal (BOTREL; CARVALHO, 2004). Moraes et al. (1997) ressaltam que as estimativas dos tamanhos efetivos populacionais são indicadores instantâneos da representatividade genética das amostras. Com isso, fatores dinâmicos que afetam a distribuição das frequências alélicas devem ser levados em consideração, como flutuações do tamanho populacional entre gerações, variação de fertilidade entre os indivíduos, estrutura de idades, sobreposição de gerações e tamanho de vizinhança (FRANKEL; BROWN; BURDON, 1998).

Para a estimativa do tamanho efetivo populacional, utiliza-se o método proposto por Vencovesky (1997) em duas situações diferentes. A primeira estimativa

para indivíduos adultos de uma simples população, e a segunda estimativa do N_c para várias populações.

Pode-se também, estudar a estrutura genética de populações. Neste caso, a interpretação de zimogramas permite a determinação dos genótipos de cada indivíduo em uma população, possibilitando estimar vários parâmetros que caracterizam a variabilidade genética entre e dentro das populações, a sua estrutura genética, o fluxo gênico e o tamanho efetivo das populações (PINTO; CARVALHO, 2004).

Este zimograma é o padrão de bandas isoenzimáticas, que resulta da catalisação de uma reação química pela isoenzima presente no gel. Os zimogramas são interpretados geneticamente considerando-se a estrutura molecular de cada enzima (monomérica, dímica, tetramérica, etc.), os locos e os alelos presentes (LIENGSIKI; PIEWLUANG; BOYLE, 1990; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

As frequências alélicas descrevem a variação para um loco e são estimadas pela contagem direta do número de alelos por loco, dividido pelo número total de alelos no loco. A partir das frequências alélicas, pode-se estimar os índices de diversidade genética, como heterogosidade média observada, heterogosidade média esperada, número médio de alelos por loco e porcentagem de locos polimórficos. Estas estimativas são obtidas a partir do programa BIOSYS-2 (SWOFFORD; SELANDER, 1989).

Para a realização de todos estes delineamentos, de acordo com a União Internacional para a Proteção de Obtenções Vegetais (UPOV), somente bandas nítidas e com repetibilidade devem ser utilizadas (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 1992).

A escolha do coeficiente deve ser baseada em determinados critérios, pois mesmo poucas alterações estruturais nos grupos mais diferenciados podem modificar o relacionamento entre cultivares com alta similaridade genética (ROCHA, 2000).

2.6 Caracterização e diferenciação de espécies

A existência de um grande número de acessos sem controle genealógico, originário de um único programa de melhoramento, gera dúvidas sobre a diversidade

genética e a representatividade de diferentes ecossistemas (FREITAS et al., 2000).

Quando é lançada uma cultivar pelo melhorista, esta deve ser comparada com as já existentes, a fim de ressaltar características que possam facilitar sua identificação, mais rápida e eficiente no campo, na indústria e nos laboratórios (BONOW et al., 2001). O interesse pela caracterização de cultivares tem aumentado significativamente no mundo nas últimas décadas, sendo o motivo principal a crescente necessidade da proteção de cultivares comerciais em mercados econômicos cada vez mais competitivos (BONOW et al., 2001). Para tal, o uso de descritores confiáveis e de natureza genética constitui um instrumento valioso na identificação de cultivares (BONOW et al., 2001).

Na Europa e Estados Unidos, os órgãos responsáveis pelo registro de novas linhagens e cultivares incluíram oficialmente os padrões eletroforéticos de proteínas em seus critérios de avaliação (TANSKLEY; ORTON, 1983). No Brasil também há esta preocupação e, visando tal proteção, foi aprovada a Lei de Proteção de Cultivares (Lei nº 9.456), a qual foi sancionada em 25 de abril de 1997 (MENEZES et al., 2008).

A heterogeneidade de formas presentes na maioria dos sistemas enzimáticos despertou o interesse dos pesquisadores em utilizá-los como marcadores em várias áreas da biologia, principalmente em estudos de Genética. A leitura dos fenótipos eletroforéticos permite avaliar a estrutura genética com base nas estimativas das frequências alélicas e genotípicas, levando a conclusões sobre a magnitude e a distribuição da variabilidade entre e dentro das populações (PINTO et al., 2001).

Os marcadores isoenzimáticos são de caráter co-dominante, possibilitando a separação de genótipos homozigotos e heterozigotos, o que é de grande utilidade nos testes de certificação da pureza genética (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Também têm sido amplamente utilizados na caracterização de espécies, cultivares e de acessos de bancos de germoplasma, permitindo a identificação de acessos duplicados, o estabelecimento de coleções nucleares e a identificação dos modos de reprodução predominantes nos acessos e ainda, evidenciando possibilidades de grande eliminação de desperdício, pela acurada identificação de duplicações antes da incorporação de acessos a etapas complementares do processo de avaliação (AMAN, 1997; AUGUSTIN; VALLS, 1988; GARCIA; GOMES, 2000).

Outro aspecto é a possibilidade de averiguar as interferências sobre a

maneira como ocorrem os cruzamentos, o que pode ser feito a partir da distribuição de marcadores genéticos nas famílias, de maneira especial os co-dominantes. Estes marcadores permitem a análise ainda no estágio de plântula e por serem as populações de plantas, em geral, polimórficas para vários locos isoenzimáticos, é possível a identificação de genótipo homozigoto ou heterozigoto, sem a necessidade de testes de progênes. Em geral, analisando-se um maior número de locos podem-se atingir estimativas mais precisas. Além disso, é possível obter e comparar taxas de cruzamento verificadas a partir de locos individuais e de locos múltiplos (BROWN; ALLARD, 1970; LOPES, R.; BRUCKNER; LOPES, M., 2002).

Inúmeras investigações empregadas no melhoramento, manejo e conservação de espécies florestais, têm utilizado as isoenzimas para estimar os níveis de variabilidade genética de populações naturais, estudar o fluxo gênico entre populações, a dispersão de espécies, tamanho efetivo da população e taxas de cruzamento (PINTO; CARVALHO, 2004). Segundo Robinson (1998), os marcadores isoenzimáticos, complementam os métodos tradicionalmente empregados para tais investigações.

Considerando-se que no papel de reconstrução de florestas é importante que se mantenha o nível de variabilidade genética encontrado nas populações naturais, torna-se necessário, para a realização de um manejo florestal, estudos dos padrões de distribuição da variabilidade genética que ocorrem nos fragmentos florestais. Uma ferramenta para esse tipo de estudo é a eletroforese de isoenzimas, com a qual é possível se quantificar a variabilidade genética em populações naturais (BOTREL; CARVALHO, 2004). Elas apresentam diversas aplicações na conservação dos recursos genéticos e melhoramento florestal, pois permitem caracterizar os sistemas de cruzamento, realizar análise de paternidade, estimar as taxas de fluxo gênico e migração, avaliar a eficiência do pomar, de sementes, caracterizar a estrutura genética de populações, estudar a filogenia e a taxonomia das espécies e auxiliar no mapeamento genético de características de interesse (GLAUBITZ; MORAN, 2000).

É sabido também, que a mobilidade das bandas isoenzimáticas reveladas no gel está condicionada ao tamanho da molécula, constituindo os resultados obtidos pela distância percorrida, através da eletroforese, um critério importante para identificação de diferenças e similaridades de isolados dentro de uma mesma espécie (ALFENAS et al., 2006). Entretanto, este critério não significa igualdade

genética entre os isolados, pois existem outros fatores a ser considerados, como a densidade de concentração da enzima, condições nucleares, nível de ploidia e da constituição genética do organismo, além de outros fatores (RIOS et al., 2004).

3 Metodologia

O referencial teórico é a base que sustenta qualquer pesquisa científica. Antes de avançar no assunto é necessário conhecer o que já foi desenvolvido por outros pesquisadores. Assim, o estudo da literatura, contribui para a definição dos objetivos do trabalho, construções teóricas, planejamento da pesquisa, comparações e validação (FURASTÉ, 2008). A realização desta revisão bibliográfica, sobre a utilização de isoenzimas como marcadores genéticos foi fundamentada em conceitos técnicos de como deve ser realizado o procedimento de sua confecção, bem como dados obtidos a partir de pesquisas realizadas pelos mais diversos autores e áreas de pesquisa.

Com a escolha do tema, os objetivos, justificativas e hipóteses bem fundamentadas, o passo seguinte foi a realização do embasamento teórico sobre o assunto escolhido. A pesquisa bibliográfica foi realizada em sites especializados para pesquisas, como o portal de periódicos Capes, onde são disponibilizadas diversas bases de dados em diferentes áreas de conhecimento. A principal base de dados utilizada foi o Biological Abstract. Após esta etapa, a pesquisa foi direcionada para o conhecimento sobre o que são proteínas, enzimas, isoenzimas e em quais áreas eram empregados os conhecimentos sobre as mesmas.

A pesquisa bibliográfica baseou-se fundamentalmente nas obras literárias impressas dos autores Alfenas et al. 2006; Lehninger, 2006; Tanskley; Orton, 1983; Voet, D.; Voet, J.; Pratt, 2008 e diversos artigos das áreas de fisiologia vegetal e botânica, publicados em revistas nacionais e internacionais, como Revista Brasileira de Fruticultura, Elsevier Science Publishers, Genetics, Biochemistry, Pesquisa agropecuária brasileira, Ciência e agrotecnologia e outras, os quais foram os mais largamente utilizados.

A leitura dos artigos e livros foi acompanhada da extração das informações sobre caracterização e diferenciação de acessos, linhagens, cultivares e bancos de germoplasma, e as anotações sobre os pontos mais relevantes que poderiam servir como citação sobre o emprego das isoenzimas como marcadores genéticos; a

escolha do tecido e estágio de desenvolvimento mais adequados para a realização da extração de proteínas e enzimas, bem como os cuidados que devem ser tomados ao se realizar este tipo de extração; os resultados obtidos por estes autores, utilizando-se apenas de isoenzimas e aqueles em que foi realizada uma associação ou contraposição do uso de isoenzimas como marcadores genéticos; e ainda o tipo de análise realizada e os resultados encontrados em cada trabalho. Dados estes, acompanhados da exata transcrição sobre o autor, obra, ano e página em que cada um se inseria, para que pudessem ser apresentados nas referências bibliográficas.

Realizado o primeiro contato com os textos, a pesquisa foi direcionada para a comparação das linhas de pensamento dos diversos autores, analisando-as, criticando-as e realizando uma linha de pensamento próprio, para posterior elaboração textual.

4 Resultados e discussão

4.1 Malato desidrogenase

Em experimento realizado, visando a identificação do estágio adequado para a realização de análises isoenzimáticas na caracterização de cultivares de arroz, Malone et al. (2006) observaram expressão intensa de MDH, até o quarto dia de germinação, sendo que a partir dos seis dias, a intensidade na expressão decresceu consideravelmente a ponto de comprometer a definição das bandas, sugerindo que a análise deste sistema enzimático, seja realizada até os quatro dias de germinação das sementes. Os mesmos autores evidenciaram variação na expressão de dois alelos identificados.

Santos; Menezes; Villela (2005) observaram que sementes das cultivares de feijão mais vigorosas tiveram atividade da MDH estável ou diminuída quando armazenadas. Já as cultivares menos vigorosas apresentaram maior influência das variantes ambientais durante o armazenamento. De acordo com Macedo; Groth; Soalo (1999), em arroz a umidade relativa do ar e a temperatura são fatores importantes na longevidade das sementes, por manterem o embrião em maior ou menor atividade metabólica.

Rios et al. (2004), caracterizando isolados de pepino, verificaram menor polimorfismo da MDH em relação a outros sistemas como esterase e fosfatase ácida

e, segundo Gottlieb (1981) isto se deve ao fato desta enzima possuir locos gênicos que codificam diferentes formas moleculares.

Segundo Lopes et al. (2003), em estudo de caracterização de oito acessos de erva-de-bicho, para MDH foram detectadas nove bandas polimórficas reunidas praticamente na mesma região de atividade, resultando em quatro padrões isoenzimáticos. Estes autores evidenciaram um grau de parentesco muito próximo dos acessos com padrões um e quatro, uma vez que apresentaram semelhanças.

Também no sistema MDH, Malone et al. (2006) caracterizando cultivares de arroz, evidenciaram variação na expressão dos dois alelos identificados. O número de alelos foi similar ao encontrado por Lizhi et al. (2002), que analisando 149 acessos de arroz selvagem, onde identificaram três alelos para esta enzima. Até os quatro dias de germinação a expressão foi intensa, sendo que a partir dos seis dias a intensidade na expressão decresceu consideravelmente, a ponto de comprometer a definição das bandas. Os autores sugerem que a análise deste sistema seja realizada até os quatro dias de germinação das sementes, como já citado.

4.2 Fosfatase ácida

Malone et al. (2006) caracterizando cultivares de arroz, identificaram de três a quatro alelos nas cultivares avaliadas. Este número de alelos é inferior ao encontrado por Bonow et al. (2001); Guidolin (1993) que estudando os padrões isoenzimáticos em plântulas de arroz com oito dias de idade, identificaram sete alelos para ACP. Esta diferença ocorreu provavelmente em função de terem analisado acessos de arroz preto e vermelho, o que acrescenta maior variabilidade genética ao estudo. A expressão do sistema ACP mostrou-se mais uniforme ao longo de todas as extrações de proteínas analisadas, porém, segundo os autores, esta deverá ser realizada preferencialmente até os 10 dias, quando os quatro alelos são expressos.

Santos; Menezes; Villela (2005) observaram que sementes das cultivares de feijão mantiveram a atividade constante para esta enzima durante o armazenamento. Já as cultivares mais sensíveis sofreram redução de vigor mais rapidamente e mostraram aumento na atividade enzimática, ao longo do armazenamento. Segundo Roberts (1973), enzimas hidrolíticas têm sua atividade

incrementada com a perda da viabilidade das sementes.

4.3 Álcool desidrogenase

Vidigal et al. (2009) observaram maior atividade nas sementes obtidas de frutos de pimenta colhidos em estádios mais avançados de maturação. Padrão semelhante para a atividade da ADH foi encontrado por Brandão Jr. et al. (2002) em sementes de café, cujos frutos colhidos no estágio maduro, possuindo maior intensidade de bandas do que aqueles colhidos em estágio imaturo. Com isso, concluíram que a via fermentativa é fundamental para a manutenção da viabilidade de sementes de café após secagem.

Para Fajardo et al. (2009) este sistema apresentou ótima atividade e resolução das bandas passíveis de interpretação para os estudos de genética de populações da espécie *Protium spruceanum* (Almisco). Neste trabalho, os autores objetivavam estabelecer um protocolo para os sistemas enzimáticos a serem utilizados nos estudos de diversidade genética em populações naturais de *Protium spruceanum*.

Na caracterização e diversidade genética do capim-elefante e seus híbridos com milheto, Freitas et al. (2000), não observaram atividade isoenzimática da ADH nas cultivares estudadas. Todavia, Ozias-Alkins; Ferl; Vasil (1986) observaram atividade ao estudarem híbridos de *Pennisetum americanum* (milheto) e *Panicum maximum* Jacq. (capim-colonião), aos 14 dias após o cultivo *in vitro*. Algumas hipóteses podem justificar esses resultados divergentes, tais como a interação e a contribuição diferencial do patrimônio genético de *P. maximum*, no híbrido analisado pelos autores; variações resultantes do próprio processo do cultivo *in vitro* e a não correspondência entre 14 dias de cultivo *in vitro* e 28 dias após o corte de uniformização.

4.4 Superóxido dismutase

Estresses abióticos, como por exemplo, o déficit hídrico pode induzir uma maior atividade da SOD, que determina a concentração de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , sendo central nos mecanismos de defesa requeridos para prevenir a formação do radical OH^{\bullet} (GRATÃO et al., 2005).

Gomes (2006), estudando as respostas do cafeeiro ao cádmio, observou pela revelação da atividade da SOD em PAGE não desnaturante a existência de diversas isoenzimas em células de café, incluindo seis Mn-SODs e três Fe-SODs, mas nenhuma isoenzima Cu/Zn-SOD. Das isoenzimas Mn-SODs, duas principais exibiram aumento na atividade em decorrência à exposição ao cádmio. As isoenzimas Fe-SODs não foram afetadas por qualquer concentração de cádmio durante todo o período avaliado.

Silva (2006), trabalhando com o desenvolvimento de sementes de soja, observou que a atividade da superóxido dismutase foi intensa durante todos os estádios de maturação avaliados. Vidigal et al. (2009) trabalhando com a mesma enzima, observaram um pequeno aumento na intensidade de bandas obtidas de frutos colhidos com 50 dias após a antese (abertura das flores, quando um de seus órgãos sexuais ou todos, amadurece e o perianto abre-se, iniciando o ciclo reprodutivo das flores).

4.5 Peroxidase

Vidigal et al. (2009) utilizando PRX, não conseguiram estabelecer associação entre a atividade desta enzima e o estágio de maturação de sementes de pimenta. Já McDaniel, 1970; Smith; Goodman; Stuber (1985); Lopes et al. (2003); mostraram que a PRX foi efetiva em caracterizar acessos de diferentes espécies.

Em estudo realizado com clones de bananeira nanicão, submetidos à pressão de seleção *in vitro*, Ulisses et al. (2002), identificaram a PRX como o sistema enzimático mais sensível às variações decorrentes desta seleção, evidenciando que este sistema enzimático, pode ser utilizado também como indicador fisiológico de plantas estressadas por fatores bióticos ou abióticos.

Ainda relatando o estudo citado acima, os autores observaram também, que a PRX apresentou-se como o sistema onde obteve-se a melhor resolução de bandas, permitindo distinção entre diferentes grupos genômicos e entre as cultivares de bananeira. Resultado semelhante foi encontrado também por Freitas et al. (2000), que caracterizando geneticamente capim-elefante, concluíram ser este sistema útil para a análise do grau de similaridade genética.

Para Almeida; Crócomo (1994), a PRX permitiu o agrupamento de espécies de cana-de-açúcar, apresentando-se estável para uma mesma cultivar.

Martins et al. (2007), utilizando-se de oito sistemas enzimáticos, em diferentes tecidos e diversas fases do desenvolvimento, verificaram que fosfoglucomutase, fosfoglucoisomerase e PRX foram eficientes na avaliação da pureza genética e na diferenciação inequívoca de sementes das três espécies de *Euterpe* (palmeiras).

O sistema PRX, analisado em oito acessos de erva-de-bicho, apresentou atividades anódica e catódica, enquanto que os demais sistemas somente mostraram atividade anódica. Foi detectado neste sistema grande polimorfismo, que permitiu a separação de seis padrões isoenzimáticos (LOPES et al., 2003). Estes resultados confirmam os estudos feitos em outras espécies, em que a PRX foi efetiva em caracterizar a maioria dos acessos (McDANIEL, 1970; SMITH; GOODMAN; STUBER, 1985).

PRX apresentou atividade em todas as amostras analisadas de clones de bananeira nanicão submetidos à salinidade, por Ulisses et al. (2002), fenômeno também constatado por Bhat, V.; Bhat, S.; Chandel (1992b) em bananeira triplóide cultivada *in vitro*. Jarret; Litz (1986) também apontaram o sistema PRX como aquele de melhor resolução, permitindo distinguir entre diferentes grupos genômicos e entre cultivares de bananeira. Neste mesmo trabalho, a presença de bandas de mobilidade catódica (PRX 1 e PRX 2) foi detectada exclusivamente nos somaclones selecionados *in vitro* como tolerantes ao NaCl. A expressão específica de uma banda de PRX em genótipo tolerante à salinidade também foi constatada em *Setaria italica* (capim-de-cabra) (SREENIVASULU et al., 1999).

Além da presença de bandas de PRX exclusivas, é frequente observar o aumento da atividade das PRXs em cultivares tolerantes, como relatado para *Morus alba* (amoreira-branca) (SUDHAKAR et al., 2004). Trabalhos realizados com suspensões celulares de *Lycopersicon esculentum* (tomate) adaptadas ao NaCl registraram o aumento da atividade das PRXs inclusive no meio de cultura. O incremento da atividade dessas enzimas é fundamental no controle da ação de espécies de oxigênio reativas, comuns em condições de estresse salino (YOSHIMURA et al., 2000).

Para Rocha (2000), o polimorfismo de peroxidase, esterase, fosfoglucomutase, isocitrato desidrogenase e aspartato transaminase, em folhas e tubérculos de *Solanum tuberosum* (batata) L., permite a caracterização e a diferenciação de genótipos.

4.6 Esterase

Wu et al., em 1997, analisando isoenzimas de esterase em 848 acessos de arroz, concluíram que a maioria apresentava de duas a quatro bandas eletroforéticas, fato também observado por Gonçalves; Cury; Crócomo (1981) que relatam ter este sistema, um padrão eletroforético específico para cada cultivar estudada, o qual apresenta-se constante para uma mesma cultivar. Os mesmos autores observaram que o padrão eletroforético para esterase se mantém em plantas com idades fisiológicas distintas, desde que crescidas em ambiente controlado.

Este sistema também apresentou elevado polimorfismo em plantas como cevada, alfafa e erva-de-bicho. Este grande polimorfismo permitiu a separação mais precisa destes acessos em padrões enzimáticos (McDANIEL, 1970; QUIRÓS, 1991; LOPES, 2003).

Para Almeida; Crócomo (1994), o modelo enzimático de esterase em um mesmo tecido de cana-de-açúcar é específico para cada clone, diferindo qualitativa e quantitativamente um do outro, com poucas exceções. Segundo Barreto; Simon (1982), variedades de cana-de-açúcar foram diferenciadas pelos zimogramas deste sistema, devido à variação intervarietal existente, de maneira a ser recomendado seu uso na determinação de variedades nesta espécie estudada (BARRETO; SIMON, 1982; ALMEIDA; CRÓCOMO, 1994).

Segundo Martins et al. (2007), os sistemas α e β - esterase foram discriminativos e podem ser utilizados na identificação e diferenciação das espécies de palmeiras *E. edulis* e *E. olarecea*. O poder discriminativo de esterase para estas duas espécies, já havia sido relatado por Sawazaki et al. (1998), utilizando folhas de plântulas dessas palmeiras.

De acordo com Amaral; Casali; Brasileiro (2007), o sistema esterase foi útil como marcador para demonstrar a ocorrência de hibridação em alfavaca. Já os demais sistemas não foram eficientes na caracterização e diferenciação de outros acessos e seus respectivos híbridos.

Em experimentos conduzidos por Hudina et al. (1996), em pereiras, a

esterase se mostrou mais favorável na identificação de cultivares. Segundo Fachinello et al. (2000), com a enzima esterase foi possível diferenciar todos os genótipos estudados de pereira, independentemente dos tecidos utilizados.

Na caracterização de cultivares de pêsego, utilizando a extração de enzimas de folhas, Altube et al. (2001) tiveram como resultados as isoenzimas ACP e EST com a maior variabilidade, resultados concordantes com os obtidos por Messeguer; Arús; Carrera (1987); Sansavine; Rancaldi (1994). Sendo as EST as que apresentaram maior polimorfismo e permitiram caracterizar duas cultivares.

Para Ulisses et al. (2002), caracterizando clones de bananeira nanicação submetidos à salinidade, o sistema EST revelou-se com baixa intensidade de coloração, comportamento que conflita com os resultados de Bhat, V.; Bhat, S.; Chandel (1992a) que observaram adequada resolução desse sistema em cultivares triplóides de bananeira, provenientes do cultivo *in vitro*, em ausência de NaCl. Esses resultados divergentes podem estar relacionados a variações do próprio processo de cultivo *in vitro*, fato também relatado por Freitas (1997).

Nas corridas eletroforéticas realizadas por Martins et al. (2007), para diferenciar sementes de três espécies do gênero *Euterpe*, foram detectadas bandas com α - EST e β - EST, ambas as enzimas exibiram padrões similares de bandas, sendo essas bandas discriminativas e podem ser utilizadas na identificação e diferenciação das sementes de duas das espécies estudadas. O poder discriminativo das ESTs para identificação destas duas espécies já havia sido relatado anteriormente por Sawazaki et al. (1998), utilizando folhas de plântulas dessas palmeiras.

4.7 Glutamato oxalacetato transaminase

Sawazaki et al. (1998), analisando a diversidade genética em palmeiras, identificaram no zimograma uma região mais lenta para GOT que corresponde à região codificada pelo loco denominado GOT-1. TORRES; TISSRAT, 1980 estudando genótipos de dendê, observaram o sistema dímero e dois alelos, F e S, neste estudo e a presença de uma a três bandas e seis possíveis alelos (SAWAZAKI et al., 1998). GOT apresentou-se de acordo com a literatura como dímero e codificado por dois locos, tendo sido observadas de uma a três bandas em duas regiões com nove velocidades de migração.

Na caracterização da variabilidade genética, realizada por Sawazaki; Nagai; Sodek (1997), em couve-manteiga, o sistema GOT não apresentou muito polimorfismo. Segundo Arús; Shields (1983), este sistema é codificado por três locus, sendo o mais próximo à origem, assim o fenótipo de cinco bandas apresentado por uma das espécies de palmeiras, no trabalho realizado por Sawazaki; Nagai; Sodeck, (1997) pode provavelmente estar indicando o genótipo heterozigoto.

Embora com diferença nos níveis de intensidade, Malone et al. (2006) observaram a manifestação fenotípica dos dois alelos identificados no zimograma da GOT que foi uniforme em todos os estádios avaliados na caracterização de cultivares de arroz. Isso permite que o sistema GOT possa ser utilizado em combinação com outros sistemas isoenzimáticos sem influir consideravelmente na velocidade dos resultados.

Em relação ao sistema GOT, na caracterização genética do capim-elefante e seus híbridos com milho, Freitas et al. (2000) visualizaram apenas três bandas das quais uma foi revelada fortemente em todos os materiais. Daher (1993), ao contrário, observou oito diferentes bandas para o mesmo sistema.

Na caracterização de acessos de pimenta-do-reino realizada por Gaia et al. (2007), no sistema GOT foram observadas 18 enzimas com diferentes migrações, sendo o sistema que apresentou maior variabilidade de bandas. Foram visualizadas duas zonas de atividade enzimática, correspondendo, provavelmente, a dois locus gênicos. A primeira zona, da enzima GOT12 à GOT17, é provavelmente condicionada por quatro alelos e a segunda zona, da enzima GOT8 à GOT13, possivelmente por três, sendo que ambos os locos codificaram enzimas com estrutura dimérica.

4.8 Caracterização e diferenciação isoenzimática

A maioria das pesquisas sobre o sistema de cruzamento em espécies arbóreas tem sido realizada em populações naturais. Diversas espécies já foram estudadas, utilizando marcadores isoenzimáticos, como *Tectona grandis* (teca) (KERTADIKARA; PRAT, 2004), *Austrocedrus chilensis* (cipres da Cordilheira) (PASTORINO, 2000), *Acacia aroma* e *A. macracantha* (acácia) (CASIVA et al., 2004), dentre outras. No Brasil, já foram pesquisadas *Genipa americana* (jenipapo)

(SEBBENN; KAGEYAMA; VENCOSVKY, 2000), *Esenbeckia leiocarpa* (guarantã) (SEOANE; SEBBENN, 2004), *Chorisia speciosa* (paineira-rosa) (SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN, 2004) e *Senna multijuga* (canafístula) (RIBEIRO; LOVATO, 2004).

Marcadores enzimáticos têm sido utilizados na caracterização de cultivares de várias espécies como feijão (VIEIRA, 2000), milho (SALGADO, 2001) e soja (AGUERO, 2002). As técnicas enzimáticas têm sido também de grande importância como auxiliares na identificação de espécies medicinais (LOPES et al., 2003).

A caracterização de plantas frutíferas lenhosas mediante o uso de marcadores genéticos é uma prática de uso comum para fins de melhoramento genético e identificação varietal (FACHINELLO et al., 2000). Isoenzimas têm sido utilizadas em espécies frutíferas para identificação e caracterização de variedades, como indicador da diversidade genética, em estudos de mapeamento genético e para obtenção de estimativas de taxas de cruzamento natural. Padrões isoenzimáticos foram utilizados na identificação e caracterização de genótipos de manga (DEGANI; EL-BATSRI, 1990), kiwi (MESSINA; TESTOLEN; MORGANTE, 1991), caqui (PARFITT et al., 1991), uva (ALTUBE et al., 2001), maçã (MANGANARIS et al., 1994), acerola (LOPES, R.; BRUCKNER; LOPES, M., 2002) e figo (ELISÁRIO; JUSTO; LEITÃO, 1998) assim como muitas outras espécies.

Estudos do sistema de cruzamento baseados em dados isoenzimáticos foram realizados em diversas espécies perenes, como *Eucalyptus urophylla* (eucalipto) (HOUSE; BELL, 1994), *Acacia nilotica* (acácia) (MANDAL; ENNOS, 1995), *Fagus sylvatica* (faia) (ROSSI; VENDRAMIM; GIANNINI, 1996), *Pinus sylvestris* (pinheiro) (BUREZYK, 1998), *Dryobalanops aromatica* (cânfora) (LEE, 2000) e *Eucalyptus marginata* (eucalipto) (MILLAR et al., 2000), e também em inúmeras espécies anuais.

Com o advento dos marcadores bioquímicos (isoenzimas) as taxas de cruzamento puderam ser estimadas mais efetivamente (BAWA, 1976) do que pelos métodos tradicionais, que se baseiam na observação de cruzamentos e do comportamento dos agentes polinizadores, no exame da morfologia floral e de resultados de experimentos de polinização controlada (PAIVA; KAGEYAMA; VENCOSVSKY, 1994).

Lopes et al. (2003), realizando a caracterização de erva-de-bicho, obtiveram amplo polimorfismo, podendo supor que a utilização de vários sistemas enzimáticos contribui para evidenciar polimorfismo, demonstrando o potencial das isoenzimas como marcadores genéticos. Os mesmos autores observaram na maioria dos

sistemas enzimáticos estudados grande variação no número, intensidade e espessura das bandas. Tal variação pode estar relacionada com o grau de ploidia da espécie em estudo. Segundo Gottlieb (1981), a diferença no grau de ploidia pode ser observada no gel, pela presença de um número maior de bandas. Por sua vez, Messina; Testolen; Morgante (1991), afirmaram que essa diferença pode ser averiguada pelo aumento da intensidade e da espessura das bandas causado pela variação na dose de alelos presentes.

Uma característica importante deste tipo de estudo, utilizando-se isoenzimas como parâmetro, é o fato de que estes marcadores são considerados neutros do ponto de vista evolutivo (SUNNUCKS, 2000), sendo este um pressuposto básico em algumas análises e divergência entre populações, apesar da controvérsia existente sobre a neutralidade de alguns sistemas enzimáticos (GRAY, 1996).

Estudos como estes são importantes para o melhoramento genético, uma vez que a pré-seleção pode reduzir o número de plantas a serem cultivadas. A determinação da divergência possibilita a identificação de combinações híbridas de maior efeito heterótico de modo que, nas gerações segregantes seja possível recuperar os genótipos superiores (CRUZ; REGAZZI, 1994). O conhecimento prévio do potencial de uma população pode incrementar a eficiência de um programa de melhoramento, permitindo a eliminação de populações não promissoras (BARROSO et al., 2003).

4.9 Marcadores isoenzimáticos associados a marcadores moleculares

Yanaca et al. (2005), identificando a variabilidade genética em populações naturais de *Bromus auleticus* (cevadilha vacariana) (Trin. Ex Ness), utilizaram com sucesso isoenzimas na determinação da diversidade genética e das relações filogenéticas em espécies de *Bromus*. Os mesmo autores, comparando os resultados obtidos pelas isoenzimas e pelos marcadores RAPD, obtiveram resultados semelhantes, concluindo que, os dois tipos de marcadores são eficientes na caracterização da variabilidade genética das espécies estudadas.

Para Lima et al. (2003), a análise isoenzimática pode ser utilizada como método auxiliar na caracterização de cultivares de pessegueiro. Mas a diferença nos resultados obtidos pela análise isoenzimática e análise por RAPD, tendo os autores considerado que na segunda análise os resultados foram mais satisfatórios, deve-se

ao fato de cultivares de pêsego possuírem um nível baixo de variação isoenzimática.

Sawazaki et al. (1998) realizaram estudo sobre a diversidade genética em palmeiras. Para tal, utilizaram-se de isoenzimas e marcadores RAPD. Os autores observaram que o polimorfismo enzimático e de RAPD observado em palmeiras possibilitou a diferenciação entre gêneros, espécies, ecótipos e híbridos. Pelos zimogramas, foram observadas várias bandas não relatadas por trabalhos anteriores; os dendrogramas produzidos pelas bandas das isoenzimas e marcadores RAPD, foram bastante semelhantes.

Rocha (2000), caracterizando genótipos de batata através de marcadores bioquímicos e moleculares, concluiu que é possível identificar genótipos de batata através da análise de isoenzimas em folhas de plantas cultivadas *in vitro* e em telado e que, a técnica RAPD deve ser empregada quando a diferenciação de genótipos não for possível através de marcadores isoenzimáticos.

Além da caracterização, esses autores relataram que as metodologias utilizadas contribuem para os programas de melhoramento, pelo aumento dos dados existentes acerca da variabilidade genética em palmeiras.

Malone (2007), analisando relações bioquímicas e moleculares da germinação e emergência em arroz, detectou elevado grau de polimorfismo na população analisada, no entanto, a composição genotípica obtida foi diferente para os marcadores genéticos testados (isoenzimas e microssatélites). Isto é, provavelmente, decorrente da variação nas regiões genômicas acessadas por cada técnica. Enquanto microssatélites revelam o polimorfismo com base em sequências repetitivas (geralmente correspondem a regiões do genoma que não codificam para proteínas), as isoenzimas revelam o produto direto da expressão gênica. Contudo, ambas as técnicas se mostraram eficientes na diferenciação dos genótipos.

No arroz, centenas de lócus microssatélite têm sido sequenciados e disponibilizados publicamente (CHEN; ISSHIKI; MIYAZAKI, 1997; TEMNYKH et al., 2000), e vários trabalhos manifestam a sua utilidade e aplicabilidade nessa espécie (TANSKLEY; ORTON, 1983; AKAGI et al., 1997; WU, 1997).

Malone (2007), ao analisar a variabilidade genética em uma coleção de ecótipos de arroz vermelho utilizando marcadores bioquímicos e moleculares, observou que ambos os sistemas de detecção de polimorfismo revelaram elevado

grau de polimorfismo na população de arroz vermelho analisada. No entanto, o número e a composição genotípica de cada agrupamento obtido foram diferentes para ambos os tipos de marcadores genéticos. O autor atribuiu esta variação pelas regiões genômicas acessadas por cada técnica, pois enquanto os microssatélites revelam o polimorfismo com base em sequências repetitivas (geralmente correspondentes a regiões do genoma que não codificam para proteínas), as isoenzimas revelam o produto direto da expressão gênica. Contudo, ambas as técnicas foram eficientes na diferenciação dos genótipos, mostrando que a escolha pela associação das duas se mostra uma boa estratégia.

5 Conclusão

A maioria dos tecidos vivos pode ser utilizado para a análise eletroforética de isoenzimas. A escolha do material vegetal deve priorizar a obtenção de amostras com atividade enzimática satisfatória. Para tanto, o ideal é que o estudo seja realizado em diferentes partes da planta e também em diferentes estádios de desenvolvimento da mesma, pois a atividade das isoenzimas varia nas diferentes frações subcelulares, durante o desenvolvimento. Outro aspecto importante é a idade da planta, pois esta faz variar a intensidade de expressão das isoenzimas.

Após determinado o tipo, parte e idade da planta que será utilizada, a escolha dos sistemas que serão analisados também é importante, para maximizar as respostas obtidas. Para esta escolha, os autores se baseiam no grau de polimorfismo de cada sistema, no seu poder discriminativo e na comparação de resultados obtidos por outros estudos, com a mesma espécie vegetal ou espécies que possuem metabolismo e características semelhantes.

Diversos autores citam o uso de marcadores morfológicos (os primeiros a serem utilizados) como insuficiente para a diferenciação de espécies. Estes mesmos autores relatam que novos caracteres morfológicos devem ser empregados para a discriminação das espécies, ou então, que estes sejam substituídos pelos marcadores enzimáticos e/ou moleculares.

Mesmo com a disponibilidade das técnicas de biologia molecular, diversos pesquisadores ainda utilizam-se das isoenzimas para a realização de seus experimentos. Em diversas análises comparativas, entre os marcadores enzimáticos e moleculares, as isoenzimas mostraram-se eficientes, indicando os mesmos resultados. Isto demonstra que estas podem ser utilizadas em diversas frentes de estudo ou então, combinadas, como complemento daqueles realizados com marcadores moleculares, onde a técnica do RAPD tem sido a mais utilizada, com sucesso.

Referências Bibliográficas

ACCQUAAH, G. Pratical protein electrophoresis for genetic research. **Discorides Press**, p.130, 1982.

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. **UFV**, p.67-87, 1991.

ALFENAS, A.C.; DUSI, A.; JÚNIOR, F.M.Z.; ROBINSON, I.P.; MICALES, J.A.; OLIVEIRA, J.R. de.; DIAS, L.A.S. Dos.; SCORTICHINI, M.; PEREIRA, M.C.B.; BONDE, M.R.; ALONSO, S.K. de.; JUNGHANS, T.G. Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. **UFV**, p.55-203, 2006.

AGUERO, C.O.P. **Padrões eletroforéticos de cultivares de soja** (*Glycine max* (L.) Merrill). 2002. Tese (mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

AKAGI, H.; YOKOZEKI Y.; INAGAKI, A.; FUJIMURA T. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. **Theoretical Applicate Genetics**, v.94, p.61–67, 1997.

ALMEIDA, M. de.; CRÓCOMO, O.J. Caracterização bioquímica de cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.): isoenzimas, proteína solúvel e valor brix. **Sociedade de Agricultura**, v.51, n.3, p.422-429, 1994

ALTUBE, H.A; URQUIZA, M.O; RIVATA, R.S; TABORDA, R.J. Utilizacion de isoenzimas de extractos de hojas em la caracterizacion de cultivares de durazno (*Prunus persica* (L) Batsch). **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo, v.23, n.2, p.345-349, 2001.

AMAN, R.A.A. Comparative assessment of molecular techniques employed in genetic diversity studies (and their suitability in resource-limited settings). **IPGRI**, p.119-127, 1997.

AMARAL, C.L.F.; CASALI, V.W.D.; BRASILEIRO, B.P. Produção de híbridos em alfavaca (*Ocimum selloi* Benth): uma planta aromática, condimentar e medicinal. **Diálogos & Ciência**, n.11, p.1-7, 2007.

ANDREWS, A.T. Electrophoresis: theory, techniques and biochemical and clinical applications. **Clarendon Press**, Oxford, p.452, 1988.

ARÚS, P.; SHIELDS, C.R. Cole Crops (*Brassica oleracea* L.). Isozymes in Plant Genetics and Breeding. **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, p.339-350, 1983.

AUGUSTIN, E.; GARCIA, A.; GOMES ROCHA, B.H. Caracterização de variedades de batata doce (*Ipomoea batatas* L.) através de descritores morfológicos e isoenzimáticos. **Ciência rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.49-53, 2000.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiological Plantarum**, Copenhagen, v.104, p.280-292, 1998.

AYALA, F.J.; POWELL, J.R.; TRACEY, M.L.; MOURÃO, A.C.; PÉREZ-SALAS, S. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. **Genetics**, Bethesda, v.70, p.113-139, 1972.

BARRETO, S.; SIMON, J.P. Identificación de progenies y progenitores por el análisis del número cromosómico em *Saccharum*. Turrialba, San Jose, v.32, n.3, p.321-327, 1982.

BARONDEAU, D.P.; KASSMANN, C.J.; BRUNS, C.K.; TAINER, J.A.; GETZOFF, E.D. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. **Biochemistry**, Washington, v.43, p.8038-8047, 2004.

BARROSO, P.A.A.; GERALDI, I.O.; VIEIRA, M.L.C. Predicting performance of soybeans using genetic distances estimated with RAPD markers. **Genetic Molecular Biology**, v.26, p.343-348, 2003.

BAWA, K.S. Breeding of tropical hardwoods: an evaluation of underlying bases, current status and future prospects. Tropical trees: variation, breeding and conservation. **Academic Press**, London, p.43-59, 1976.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seed: physiology of development and germination, **Plenum Press**, New York, p.445, 1994.

BHAT, K.V.; BHAT, S.R.; CHANDEL, K.P.S. Survey of isoenzyme polymorphism for clonal identification in *Musa*. I Esterase, acid phosphatase and catalase. **Journal of Horticultural Science**, Ashford Kent, v.67, p.501-507, 1992.

BONOW, S.; AUGUSTIN, E.; FRANCO, D.F.; PETERS, J.A.; TERRES, A.L.S. da. Caracterização isoenzimática de genótipos de arroz. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.36, n.2, p.291-300, 2001.

BOTREL, M.C.G.; CARVALHO, D. de. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.27, n.4, p.621-627, 2004.

BRANDÃO JR.D.S.; VIEIRA, M.G.G.C.; HILHORST, H.W.M. Aquisição da tolerância à dessecação nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.4, p.673-681, 2002.

BROWN, A.H.D.; ALLARD, R.W. Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. **Genetics**, Baltimore, v.66, p.133-

145, 1970.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. Biochemistry & Molecular Biology of plants. **American Society of Plant Physiology**, p.1367, 2005.

BUREZYK, J. Mating system variation in a Scots pine clonal seed orchard. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.47, p.155-158, 1998.

CAMARGO, M.L.P.; MORI, E.S.; MELLO, E.J.; ODA, S.; LIMA, G.P. Atividade enzimática em plântulas de *Eucalyptus grandis* provenientes de sementes envelhecidas artificialmente e naturalmente. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.10, n.2, p.113-122, 2000.

CASIVA, P.V.; VILARDI, J.C.; CIALDELLA, A.M.; SAIDMAN, B. Mating system and population structure of *Acacia aroma* and *A. macracantha* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v.91, n.1, p.58-64, 2004.

CHEN, L.; ISSHIKI, S.; MIYAZAKI, S. Biochemical affinities between *Cocumis hystrix* Chra. and two cultivated cucumis species (*C. sativus* L. and *C. melo* L.) based on isozyme analysis. **Euphytica**, v.97, p.139-141, 1997.

COSTA, P.; POT, D.; DUBOS, C.; FRIGERIO, J.M.; PIONNEAU, C.; BODENES, C.; BERTOCCHI, E.; CERVERA, M.T.; RMINGTON, D.L.; PLOMION, C. A genetic map of Maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.38-48, 2000.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. **UFV** [da] Imprensa Universitária, Viçosa, p.390, 1994.

DAHER, R.F. **Diversidade morfológica e isoenzimática em capim-elefante** (*Pennisetum purpureum* Schum.). 1993. 110f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Viçosa.

DEGANI, C.; EL-BATSRI, R. Enzyme polymorphism in mango. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, p.844-847, 1990.

DEL RIO, L.A.; PASTORI, G.M.; PALMA, J.M.; SANDALIO, L.M.; SEVILLA, F.; CORPAS, F.J.; JIMENEZ, A.; LOPEZ-HUERTAS, E.; HERNANDEZ, J.A. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, p.1195-1200, 2002.

DIONÍSIO-SESE, M.L.; TOBITA, S. Antioxidant responses of rice seedlings salinity stress. **Plant Science**, Strasbourg, v.135, p.1-9, 1998.

ELISÁRIO, P.J.; JUSTO, E.M.; LEITÃO, J.M. Isozyme and RAPD characterization of a collection of fig tree (*Ficus carica* L.) traditional varieties. **Acta Horticulturae**, Lueven, n.480, p.149-154, 1998.

ENDO, T.; MORISHIMA, H. Rice. Isozymes in plant genetics and breeding. **Elsevier**, Amsterdam, p.129-146, 1983.

- FACHINELLO, J.C.; MUSACCHI, S.; ZUCCHERELLI, S.; SANSAVINI, S. Polimorfismo enzimático nos tecidos de pereira. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.35, n.7, p.1427-1432, 2000.
- FAJARDO, C.G.; VIEIRA, F.A. de.; MORAIS, V.M. de.; MARACAJÁ, P.B.; CARVALHO, D. de. Polimorfismo de isoenzimas em *Protium sprucianum* (Benth) Engler (*Bursiraceae*) como base para estudos de diversidade genética. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, v.4, n.4, p.27-32, 2009.
- FARALDO, M.I.F.; SILVA, R.M. da.; VEASEY, A.A.; VEASEY, E.A. Marcadores moleculares em mandioca. **Agricultura Tuberosas Amiláceas Latino Americano**, v.2, p.101-117, 2003.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. In: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, Brasília. **Anais do...** Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. p.220.
- FREITAS, N.S.A. **Avaliação de *Pennisetum purpureum* Schum. e seus híbridos com *P. amaricanum* (L.) Leeke, mediante padrões isoenzimáticos e variáveis morfológicas**. 1997. Tese (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- FREITAS, N.S.A. de; FALCÃO, T.M.M.A. de; BURITY, H.A.; TABOSA, J.N; SILVA, M.V. de. Caracterização e diversidade genética do capim-elefante e seus híbridos com milheto mediante padrões isoenzimáticos. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.6, p.1125-1133, 2000.
- FORREST, G.I. Biochemical markers in tree improvement programmes. **Forestry Abstracts**, v.55, p.123-153, 1994.
- FRANKEL, O.H.; BROWN, H.D.; BURDON, J.J. The conservation of plant biodiversity. **Cambridge University Press**, Cambridge, p.299, 1998.
- FURASTÉ, P.A. Normas técnicas para o trabalho científico – elaboração e formatação. 14.ed. **Editora Dáctilo-Plus**, 2008. p.33-34.
- GAIA, J.M.D.; MOTA, M.G.C.; DERBYSHIRE, M.T.T.V.C.; OLIVEIRA, V.R.; COSTA, M.R.; MARTINS, C.S. da.; POLTRONIERI, M.C. Caracterização de acessos de pimenta-do-reino com base em sistemas enzimáticos. **Horticultura Brasileira**, v.25, n.3, 2007.
- GILLESPIE, J. H., LANGLEY, C. H. A general model to account for enzyme variation in natural populations. **Genetics**, Pittsburgh, v.76, p.837-887, 1974.
- GLAUBITZ, J.C.; MORAN, G.F. Genetic tools: the use biochemical and molecular markers. **Forest Conservation Genetics: Principles and Proctice**, p.39-59, 2000.
- GOMES-JUNIOR, R.A. **Resposta antioxidativa de células in vitro de café (*Coffea arabica*) submetidas aos metais pesados cádmio (Cd) e níquel (Ni)**. 2006. 135f. Tese (doutorado em Genética e Melhoramento de plantas) – Escola Superior de

Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GONÇALVES, C.H.R.P.; CURY, J.A.; CRÓCOMO, O.J. Isoenzimas na identificação e seleção de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). In: Congresso Da Sociedade De Técnicos Açucareiros Do Brasil, 1981, Minas Gerais. **Anais do ...** Minas Gerais: Sociedade Brasileira De Técnicos Açucareiros, 1981. p.329-340.

GOTTLIEB, L.D. Gene number in species of asterease that have different chromossome numbers. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA, v.78, n.6, p.3726-3729, 1981.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Sidney, v.32, p.481-494, 2005.

GRAY, A. Genetic diversity and its conservation in natural populations of plants. **Biodiversity Letters**, v.3, p.71-80, 1996.

GUIDOLIN, A.F. **Caracterização de genótipos de arroz irrigado por técnicas eletroforéticas**. 1993. 92f. Tese (mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

HOEZEL, A.R.; GREEN, A. Molecular genetic analysis of populations – A practical approach. **Oxford, University Press**, New York, p.201-235, 1998.

HOUSE, A.P.N.; BELL, J.C. Isozyme variation and mating system in *Eucalyptus urophylla* ST Blake. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.43, n.2, p.167-179, 1994.

HUDINA, M.; STAMPAR, F.; VIRSCER-MAKN, M.; SMOLE, J. Identification of pear (*Pyrus communis* L) and quince (*Cydonea oblonga* (Mill.) cultivars based on isoenzyme variability in various tissues. **University of Ljubljana Biotechnical Faculty Research Reports**, Ljubljana, v.67, p.173-182, 1996.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (Zurich, Suíça). **Handbook of variety testing**, Zurich, p.44, 1992.

JARRET, R.L.; LITZ, R.E. Isoenzymes as genetic markers in bananas and plantains. **Euphytica**, Dordrecht, v.35, p.539-549, 1986.

KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E.; FOX, T.C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, p.1-6, 1992.

KERTADIKARA, A.W.S.; PRAT, D. Isozyme variation among teak (*Tectona grandis* Lf) provenances. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.803-810, 2004.

KLASS, M. Applications and impact of molecular markers on evolutionary and diversity studies in *Allium*. **Plant Breeding**, v.117, p.297-308, 1998.

KUNKEL, H.G; TISELIUS, A. Electrophoresis of proteins on filter paper. **The Journal of General Physiology**, v.35, p.89-118, 1951.

LIENGSIRI, C.; PIEWLUANG, C.; BOYLE, T.J.B. Starch gel eletrophoresis of tropical trees. **A Manual**, p.51, 1990.

LIMA, M.R.; AUGUSTIN, E.; CHOER, E.; RASEIRA, M.C.B. Caracterização de cultivares de pessegueiro e de nectarineira por marcadores moleculares. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.38, n.3, p.349-355, 2003.

LIZHI, G.; SONG, G.; DEYUAN, H.; RUSHUN, L.; GUODA, T.; ZAIFU, X. Allozyme variation and conservation genetics of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in Yunnan, China. **Euphytica**, Netherlands, v. 124, n.3, p. 273–281, 2002.

LEE, S.L. Mating system parameters of *Dryobalanops aromatica* Gaertn. F. (*Dipterocarpaceae*). **Heredity**, Oxford, v.85, n.4, p.338-345, 2000.

LOPES, R.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, M.T.G. Estimação da taxa de cruzamento da aceroleira com base em dados isoenzimáticos. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.3, p.321-327, 2002.

LOPES, R.C.; CASALI, V.W de.; BARBOSA, L.C.A.; CECON, P.R.; Caracterização isoenzimática de oito acessos de Erva-de-bicho. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.3, 2003.

MACEDO, E.C.; GROTH, D.; SOAVE, J. Influência da embalagem e do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, n.1, p.65-75, 1999.

MALONE, G.; ZIMMER, P.D . Marcadores Moleculares. Ferramentas da Biotecnologia no Melhoramento Genético Vegetal. **Editora e Gráfica Universitária (UFPEI)**, Pelotas, p.77-113, 2005.

MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; CASTRO, M.A.S.; CARVALHO, I.; MENEGUELLO, G. E.; TEICHERTPESKE, S. Identificação do estágio adequado para realização de análises isoenzimáticas na caracterização de cultivares de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.2, p.193-200, 2006.

MALONE, G. **Relações bioquímicas e moleculares da germinação e emergência em arroz**. 2007. 76f. Tese (doutorado em ciências) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MANDAL, A.K.; ENNOS, E.A. Mating system analysis in a natural population of *Acacia nilotica* subespecies *Kraussiana*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.79, n.3, p.235-240, 1995.

MANDARINO, J.M.; VIDAURRE, T. Técnicas eletroforéticas. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA**, Londrina, p.8-34, 1995.

MANGANARIS, A.G.; ALISTON, F.H.; WEEDEN, N.F.; ALDWINCKLE, H.S.; GUSTAFSON, H.L.; BROWN, S.K. Isozyme locus Pgm-1 is tigestly linked to a gene (V-f) for scob resistance in apple. **Journal of the American Society for**

Horticultural Science, Alexandria, v.119, n.6, p.1286-1288, 1994.

MARTINS, C.C.; BOVI, M.L.A.; MORI, E.S.; NAKAGAWA, J. Isoenzimas na diferenciação de sementes de três espécies do gênero *Euterpe*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.31, n.1, p.51-57, 2007.

MARKET, C.; MOLLER, F. Multiple forms of isozymes: Tissue, autogene and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.45, p.753-763, 1959.

MARTINS, C.C.; BOVI, M.L.A.; MORI, E.S.; NAKAGAWA, J. Isoenzimas na diferenciação de sementes de três espécies do gênero *Euterpe*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.31, n.1, p.51-57, 2007.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.244, p.6049-6050, 1969.

McDANIEL, R.G. Electrophoretic characterization of proteins in *Hordeum*. **Journal of Heredity**, v.61, p.243-247, 1970.

McDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v.22, n.3, p.531-539, 1999.

MENEZES, M. de.; PINHO, E.V. de.; PEREIRA, A.M.A.R.; OLIVEIRA, J.A. de. Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e proteínas resistentes ao calor. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.2, p.111-122, 2008.

MESSEGUER, R.; ARÚS, P.; CARRERA, M. Identification of peach cultivars with pollen isozymes. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 31, p. 107-117, 1987.

MESSINA, R.; TESTOLIN, R.; MORGANTE, M. Isozymes for cultivar identification in Kiwifruit. **HortScience**, v.26, p.899-902, 1991.

MILLACH, S.C.K. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. **UFV**, Viçosa, p.182, 1998.

MILLAR, M.A.; BYRNE, M.; COATES, D.J.; STUKELY, M.J.C.; McCOMB, J.A. Mating system studies in jarrah, *Eucalyptus marginata* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v.48, n.4, p.475-479, 2000.

MORAES, P.L.R. **Estrutura genética de população de *Cryptocarya moschata* Ness e *Martius ex Ness* (Lauraceae)**. 1997. 103f. Tese (doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de São Paulo “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro.

MOREIRA, R.F.C. **Marcadores bioquímicos e de DNA: importantes ferramentas no melhoramento genético em frutíferas**. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br>>. Acesso em 20 dez. 2009.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Estrutura e catálise. In: _____ . **Lehninger Princípios de Bioquímica**. Editora Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, 2006, p.89-431.

NOBELPRIZEI. Disponível em: <<http://www.nobelprize.org>>. Acesso em 31 out. 2009.

OLMOS, E.; MARTINEZ-SOLANO, J.R.; PIQUERAS, S.A.; HELLIN, E. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2line). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.54, p.291-301, 2003.

OZIAS-ALKINS, P.; FERL, R.J.; VASIL, I.K. Somatic hybridization in the gramineae: *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. (Pearl millet) – *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass). **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.203, p.365-370, 1986.

PAIVA, J.R.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOSKY, R. Genetics of rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. de Juss.) Müll. Arg.) 2. Mating system. **Silvae Genetica**, v.43, p.373-376, 1994.

PARFITT, D.E.; YONEMORI, R.; RYUGO, K.; SOGIUKA, A. Isozyme identification of Japanese persimmons (*Diospyros roki* L.): comparisons of cultivars in California and Japan. **Fruit Varietis Journal**, v.45, p.107-113, 1991.

PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOME, F. Practical isozyme genetics. **Halsted**, New York, p.255, 1988.

PASTORINO, M.J. **Genetic variation and reproduction system of *Austrocedrus chilensis* (D. Don). Florin et Boutelje, a cypress endemic to the Andean-Patagonian Forest**. 2000. Tese (doutorado) – University of Göttingen, Göttingen.

PIERCE, L.C.; BREWBAKER, J.L. Application of isozyme analysis horticultural science. **HortScience**, St. Joseph, v.8, n.1, p.17-22, 1973.

PINTO, L.R.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P.; JUNIOR, C.L.S. de. Isoenzimas e microssatélites em plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.2, p.16-19, 2001.

PINTO, S.I.C. do; CARVALHO, D. de. Estrutura genética de populações de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Sprengel) por isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.3, p.597-605, 2004.

QUIRÓS, C.F. Isoenzimas como marcadores genéticos para identificar híbridos em el cultivo de tejidos. Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos y aplicaciones. **CIAT**, p.857-876, 1991.

RIBEIRO, R.A.; LOVATO, M.B. Matting system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n.3, p.418-424, 2004.

RIOS, P.R.P.; SILVEIRA, E.B.; MARTINS, L.S.S.; NETO, E.B.S.; GOMES, A.M.A. Caracterização de isolados de *Colletotrichum lagenarium* de pepino com base em

marcadores isoenzimáticos. **Horticultura brasileira**, v.22, n.4, 2004.

ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. **UFV**, Viçosa, p.329-380, 1998.

ROBERTS, E.H. Loss of viability, ultrastructural and physiological aspects. **Seed Science and Technology**, v.1, p.529-545, 1973.

ROCHA, B.H.G. **Caracterização de genótipos e análise de pureza varietal em sementes de batata através de marcadores moleculares**. 2000. 54f. Tese (doutorado em Ciências) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ROHLF, J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. **Exeter Software**, p.21-23, 2001.

ROSSI, P.; VENDRAMIN, G.G.; GIANNINI, R. Estimation of mating system parameters in two Italian natural populations of *Fagus sylvatica*. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.26, n.7, p.1187-1192, 1996.

SACHS, M.M.; FREELING, M. Selective synthesis of alcohol dehydrogenase during anaerobic treatment of maize. **Molecular and General Genetics**, Göteborg, v.161, p.111-115, 1978.

SALGADO, K.C.C. de. **Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. 2001. 67f. Tese (mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANSAVINI, S.; PANCALDI, M. Ruolo delle biotecnologie molecolari nella identificazione, moltiplicazione e diffusione di materiale in frutticoltura. Convegno de Tecnologie avanzate per l'identificazione varietale e il controllo genetico-sanitario nel vivaismo fruttivolo. **Agro-Bio-Frut**, Cesena, 1994.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILELLA, E.A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.27, p.104-114, 2005.

SAWAZAKI, H.E.; NAGAI, H.; SODECK, L. Caracterização da variabilidade genética em couve-manteiga utilizando isoenzima e RAPD. **Bragantia**, v.56, n.1, p.9-19, 1997.

SAWAZAKI, H.E.; BOVI, M.L.A.; SODEK, L.; COLOMBO, C.A. Diversidade genética em palmeiras através de isoenzimas e RAPD. **Revista Brasileira de Biologia**, v.58, n.4, p.681-691, 1998.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v.3, p.37-39, 1969.

SCANDALIOS, J.G. Isozymes in development and differentiation. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v.25, p.255-258, 1974.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.7-12, 1993.

SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; ZANATTO, A.C.S. Mating system in populations of *Cariniana legallis* Mart. O. Ktze: implications for genetic conservation and improvement. **Scientia Florestalis**, n.58, p.25-40, 2000.

SEOANE, C.E.S.; SEBBENN, A.M. Herança genética e desequilíbrio de ligação em isoenzimas de *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**, v.16, n.1, p.57-63, 2004.

SHANNON, M.L. Plant isozymes. **Annual Review Plant Physiology**, Stanford, v.19, p.187-210, 1968.

SHIELDS, C.R.; ORTON, T.J.; STUBBER, C.W. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. **Elsevier**, Amsterdam, p.443-468, 1983.

SILVA, P.A. **Estudo da qualidade fisiológica, bioquímica e ultra-estrutural durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja**. 2006. 55f. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras

SMITH, J.C.S.; GOODMAN, M.M.; STUBER, C.N. Genetic variability within maize germoplasm. II Widely used inbred lines 1970 to 1979. **Crop Science**, v.25, p.681-685, 1985.

SOUZA, V.A. **Population genetic studies in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. 2000, 161f. Tese (doutorado em Science Forestry) – Universidade de Göttingen, Göttingen.

SOUZA, L.M.F.I.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Genetic structure in fragmented populations *Chorisia speciosa* St. Hil. **Scientia Florestalis**, n.65, p.70-79, 2004.

SREENIVASUTU, N; RAMANJULU, S.; RAMACHANDRA-KINI, K.; PRAKASH, H.S.; SHEKAR-SHETTY, H.; SAVITHRI, H.S.; SUDHAKAR, C. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. **Plant Science**, Strasbourg, v.141, p.1-9, 1999.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v.15, p.199-200, 2000.

SWOFFORD, D.L.; SELANDER, R.B. BYOSYS-1: A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1.7. **Natural History Survey**, Illinois, p.1-9, 1989.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3.ed. **Cummings**, Califórnia, p.719, 2004.

TANSKLEY, S.D; ORTON, T.J. Isozymes in plant genetics and breeding. **Elsevier Science**, p.156, 1983.

- TEMNYKH, S.; PARK, W.D.; AYRES, N.; CARTINHO, S.; HAUCK, N.; LIPOVICH, L.; CHO, Y.G.; ISHII, T.; MCCOUCH S.R. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical Application Genetics**, v.100, p.697–712, 2000.
- TORRES, A. M.; TISSERAT, B. Leaf Isozymes as genetic markers in date palms. **American Journal Botanical**, n.67, p.162-167, 1980.
- ULISSES, C.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C.C.; MARTINS, L.S.S.; FREITAS, N.S.A. Caracterização isoenzimática de clones de bananeira nanica submetidos à salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.6, n.2, p.358-361, 2002.
- USHIMARU, T.; KANEMATSU, S.; KATAYAMA, M.; TSUJI, H. Antioxidative enzymes in seedling of *Nelumbo nucifera* germinated under water. **Physiology Plantarum**, v.112, n.1, p.39-46, 2001.
- VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. **Elsevier**, Amsterdam, p.469-515, 1983.
- VALLS, J.F.M. Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal, 1988, Jaboticabal. **Anais do...** Jaboticabal: FCAV, 1998, p.233-234.
- VENCOVSKY, R. Biometrical approaches for molecular markers estimation of effective population size. In: Proceedings of the International Workshop on Agricultural Biotechnology, 1997, Piracicaba. **Anais do...** Piracicaba: Esalq/USP, 1997. p.233-234.
- VENCOVSKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L., através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia Forestalis**, n.53, p.15-30.
- VIDIGAL, D.S. de.; DIAS, D.C.F.S.; VON-PINHO, E.V.R. de.; DIAS, L.A.S. dos. Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.129-136, 2009.
- VIEIRA, E.S.N. **Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando a certificação da pureza genética**. 2000. 84f. Tese (mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.
- VITORIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, Oxford, v.57, p.701-710, 2001.
- VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. Fundamentos de bioquímica – a vida em nível molecular. 2.ed. Editora Artmed, p.313-316, 2008.
- WEEDEN, N.F.; WENDEL, J.F. Genetics of plant isozymes. **Isozymes in plant biology**, p.46-72, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.6531-6535, 1990.

WU, K.S.; TANSKLEY, S.D. Genetic and physical mapping of telomers and macrosatellites of rice. **Plant Molecular Biological**, v.22, p.861-872, 1993.

YANAKA, F.Y.; DALLAGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DIAS, P.M.B.D.; GOMES, K.E. Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Bromus auleticus* Trin. Ex Ness (Poaceae) com Base em Isoenzimas e Marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.34, n.6, p.1897-1904, 2005.

YOSHIMURA, K.; YABUTA, Y.; ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. Expreition of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. **Plant Physiology**, Rockville, v.123. p.223-233, 2000.

ZHIVOTOVSKY, L.A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. **Molecular Ecology**, v.8, p.907-913, 1999.

ZHANG, M.; MAEDA, Y.; FUTIHATA, Y.; NORAMURA, Y.I; ESASHI, Y. Amachanism of seed deterioration to volatile compounds evoked by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, v.4. n.1, p.49-56, 1994.