

VARIABILIDADE GENÉTICA EM

Hordeum euclaston L. (GRAMINEAE)

CARLOS ALEXANDRE SANCHEZ FERREIRA,

Dissertação apresentada ao
Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas
- ênfase Genética da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Dr^a SUZANA CAVALLI MOLINA

1992

28 8 2

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Relatório: FALTO

Nº Orla: 300

Data: 10/01/92

Nº Câmara: 1003

28-01-500

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Suzana Cavalli-Molina pela paciência, compreensão e incansável dedicação dispensadas durante os dois anos e dois meses em que estive sob sua orientação (qualidades sem as quais teria levado outros dois anos e dois meses para terminar esta Dissertação; obrigado mesmo, chefe!).

- Agradeço a Angelica Francesca Maris, apesar de tudo que ela aprontou, pela amizade, companheirismo e discussões (e pela afilhada), os quais nunca saberei como retribuir.

- Agradeço à laboratorista Martina da Silva pelo competente e dedicado trabalho realizado durante a parte prática desta Dissertação.

- Agradeço a minha família pelo apoio durante todo esse tempo de bacharelado, e pela paciência de agüentar as incontáveis separatas organizadamente espalhadas por todos os cantos do apartamento.

- Agradeço a Mozart da Silva Lauxen pelas discussões sobre *Hordeum euclaston*, pelo mapa, pela companhia de canha e amizade sincera.

- Agradeço a Sérgio Lineu de Souza Kazmierczak, apesar de ser abstêmio, pelas discussões sobre *Hordeum euclaston*, pelos favores prestados e pela incondicional amizade.

- Agradeço ao Alípio e ao Elmo pelo fim-de-semana e madrugadas de digitação.

- Agradeço a todos os colegas do laboratório pelas discussões e companheirismo que sempre estiveram presentes.

- Agradeço à laboratorista Martina e ao Prof. Crosa pela ajuda no "sarro" que nós tirávamos da cara do Victor Hugo.

Ah que nunca a verdade definida
Mate a alma, que vive de não tê-la!

Talvez que nunca, ó negra esperança/linda/!,
A alma encontre o horror definitivo
Da verdade absoluta, onde se acabe
Que ser, que ter, que procurar.

Cada Deus seja falso e, onde é, supremo;
Sol centro dum sistema de verdades
E sistemas solares de ilusão
No espaço da verdade sem limite
/E sem definição/ - inexistente
Para quanto é o sujeito.

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Hordeum euclaston</i>	1
1.2 Melhoramento genético.....	3
1.3 Isoenzimas e eletroforese.....	5
1.4 Objetivos do estudo.....	8
2. MATERIAL E MEÉTODOS.....	9
2.1 Material.....	9
2.2 Métodos.....	11
2.2.1 Coleta do material e a semeadura para a obtenção de plântulas.....	11
2.2.3 Análise eletroforética.....	15
2.2.3.1 Géis.....	15
2.2.3.1.1 Esterases.....	16
2.2.3.1.2 Superóxidos dismutases e malato desidrogenases..	17
2.2.3.1.3 Glutamato oxalacetato transaminases.....	17
2.2.3.2 Preparação das amostras.....	18
2.2.3.3 Aplicação das amostras nos géis.....	18
2.2.3.4 Migração das amostras.....	19
2.2.3.5 Coloração.....	20
2.2.3.5.1 Esterases.....	20
2.2.3.5.2 Superóxido dismutases.....	21
2.2.3.5.3 Malato desidrogenases.....	22
2.2.3.5.4 Glutamato oxalacetato transaminases.....	22
2.2.4 Fixação dos géis.....	23
2.2.5 Análise dos géis.....	23
2.2.6 Testes de progênie.....	24
2.2.7 Avaliação dos resultados.....	24
2.2.7.1 Diversidade intrapopulacional.....	24
2.2.7.2 Divergência interpopulacional.....	26
3. RESULTADOS.....	28
3.1 Germinação de <i>Hordeum euclaston</i>	28
3.2 Modo de reprodução.....	32
3.3 Critérios utilizados na determinação do controle genético.....	33
3.4 MDH.....	35
3.5 GOT.....	42
3.6 EST.....	53
3.7 SOD.....	85

3.8 Variabilidade populacional	105
3.8.1 Variabilidade intrapopulacional.....	105
3.8.2 Divergência interpopulacional.....	107
3.9 Variações regulatórias dentro da linhagem.....	108
4. DISCUSSÃO.....	110
4.1 Modo de reprodução.....	110
4.2 Sistemas isoenzimáticos e variabilidade genética.....	114
4.2.1 Malato desidrogenases.....	114
4.2.2 Glutamato oxalacetato transaminases.....	119
4.2.3 Esterases.....	124
4.2.4 Superóxido dismutases.....	129
4.3 Variabilidade populacional.....	132
4.4 Diferenças regulatórias.....	138
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	151
6. SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	155
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	159

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Hordeum euclaston*

Hordeum euclaston é uma gramínea selvagem do mesmo gênero da cevada cultivada (*H. vulgare*). É uma das espécies participantes das formações campestres do Rio Grande do Sul (EGGERS & BOLDRINI, 1988), possuindo uma distribuição geográfica que inclui também o Uruguai e a Argentina (VON BOTHMER e cols., 1982; VON BOTHMER & JACOBSEN, 1985). No Rio Grande do Sul é a espécie nativa de maior distribuição do gênero, ocorrendo nas regiões fisiográficas dos Campos de Cima da Serra, Planalto Médio, Missões, Litoral, Depressão Central, Campanha, Serra do Sudeste e Encosta do Sudeste. A espécie é mais freqüente na região da Campanha, e muito escassa nos Campos de Cima da Serra e no Planalto Médio (EGGERS & BOLDRINI, 1988).

As plantas são anuais, diplóides com $2n=14$ e apresentam uma ampla variação com relação ao hábito e tamanho das partes vegetativas, tamanho e forma das partes

florais e pubescência (VON BOTHMER e cols., 1982; VON BOTHMER & JACOBSEN, 1985; EGGERS & BOLDRINI, 1988; M. DA S. LAUXEN, comunicação pessoal).

O habitat da espécie se constitui em pastagens, estepes arenosas, em solos mais ou menos abertos, junto a valos e charcos, em comunidades ruderais e como invasora em áreas cultivadas, aparecendo freqüentemente junto com *H. stenostachys* e *H. flexuosum* (VON BOTHMER e cols., 1982; BONT BOTHMER & JACOBSEN, 1985). No Rio Grande do Sul a única associação confirmada é com *H. stenostachys* (EGGERS & BOLDRINI, 1988). Com relação à associação entre *H. euclaston* e *H. flexuosum*, VON BOTHMER e cols. (1982) sugerem que seja uma consequência das perturbações decorrentes da atividade humana, que em condições naturais não ocorreria.

EGGERS & BOLDRINI (1988) identificaram duas figuras ecológicas bastante distintas. Uma forma possui porte pequeno e está associada a solos rasos e pedregosos. A outra forma é, de um modo geral, mais vigorosa, predominando em solos mais profundos. Os representantes da Patagônia possuem um crescimento muito pequeno, algumas vezes somente de alguns centímetros, com as partes florais também pequenas (VON BOTHMER, 1982; VON BOTHMER & JACOBSEN, 1985). No norte da Patagônia *H. euclaston* é encontrada em ambientes salinos (VON BOTHMER & JACOBSEN, 1980).

1.2 Melhoramento genético

Uma das maneiras de aumentar a produtividade na agricultura é melhorar as características de resistência, adaptação e valor nutritivo das cultivares utilizadas. Para isto são necessários recursos genéticos, ou seja, precisa-se de diversidade genética para produzir uma cultivar com melhor performance. Entretanto, atualmente a maioria das espécies cultivadas possui uma base genética estreita e, em muitos casos, uma uniformidade quase total (RICK, 1976; HANKES, 1991; FORD-LLOYD & JACKSON, 1991). Para remediar esta situação e tornar possível o melhoramento genético, deve-se, portanto, adicionar variabilidade genética, a qual, em geral, pode provir de três fontes:

- de cultivares, primitivas ou não, que ainda conservem variabilidade genética;
- da indução de mutações;
- de espécies evolutivamente próximas das espécies cultivadas (BROWN e cols., 1978).

No caso da cevada, um dos aspectos de maior relevância para o melhoramento genético são as patologias. Dentre estas há um grande número de doenças fúngicas, tais como as causadas por *Erysiphe graminis*, *Goemannomyces graminis*, *Pseudocercospora herpotrichoides* e *Puccinia striiformis*, o que torna obrigatória a aplicação de

fungicidas para se obter uma alta produtividade. Também podem ocorrer problemas com doenças bacterianas (*Pseudomonas* e *Xanthomonas*) e com os vírus do mosaico estriado da cevada, amarelo da cevada e do nanismo amarelo da cevada (DUNWELL, 1986).

Também são alvos do melhoramento genético, a qualidade dos grãos e a grande adaptação a ambientes inóspitos. O maior problema das sementes de cevada, em seu uso como alimento, é a pequena proporção de aminoácidos básicos, especialmente lisina, em relação ao total de proteína, sendo, portanto, de baixo valor nutritivo (GILES & VON BOTHMER, 1985). Tem-se procurado, também, produzir cultivares que possam ser utilizadas com boa produtividade mesmo em áreas de baixa fertilidade, como solos salinos e/ou ricos em alumínio. Espécies selvagens, por sua vez, possuem maior tolerância ao sal do que as espécies cultivadas, o que não é surpresa se considerarmos que as cultivares de cevada, por exemplo, têm sido selecionadas por séculos em solos férteis (FORSTER e cols., 1990).

Por estes motivos, a avaliação do germoplasma das espécies relacionadas à cevada cultivada (*H. vulgare*) se torna de grande importância, e nesse sentido foi iniciado um estudo para estimar os recursos genéticos de *Hordeum euclaston*. Para isso a variação isoenzimática revelada por eletroforese se destaca como uma eficiente maneira de medir a diversidade genética em populações (RICK e cols., 1977;

BROWN e cols., 1978). A análise isoenzimática é amplamente utilizada devido à detecção e análise de produtos diretos do DNA, com baixo custo e rapidez, particularmente em estudos de variabilidade intra-específica (RICK, 1976; KEPHART, 1990). Além disso, as isoenzimas podem ser utilizadas como marcas para outras características de interesse, como genes de resistência (FEVERSTEIN e cols., 1990).

Estimativas de parâmetros do sistema de reprodução são reconhecidamente cruciais para o entendimento da evolução de populações de plantas (ALLARD, 1975; RICK, 1976), sendo indispensável uma estimativa da taxa de fecundação cruzada da espécie, a qual influencia o fluxo e a recombinação gênica (GOVINDARAJU, 1988a; ALLARD, 1975). A autofecundação, como sistema de cruzamento, causa redução na heterozigosidade e no efeito aleatório da recombinação (ALLARD, 1975).

1.3 Isoenzimas e eletroforese

Isoenzimas, em definições, incluem eletromorfos gerados por diferentes locos (isoenzimas *sensu stricto*), diferentes alelos do mesmo loco (alozimas), e modificações pós-síntese das enzimas (isoenzimas secundárias). Deve-se sempre considerar que as isoenzimas secundárias podem ter sua origem nas condições de análise. A maioria das enzimas analisadas eletroforéticamente existem como monômeros, dímeros ou tetrâmeros (termos indicando o número de

polipeptídeos), podendo haver a formação de isoenzimas híbridas (KEPHART, 1990).

Em plantas, o número de isoenzimas de determinadas enzimas freqüentemente reflete o número de compartimentos subcelulares nos quais a mesma reação catalítica é necessária. Conseqüentemente, o número mínimo e a localização subcelular destas isoenzimas são conservados em plantas superiores. Além disso, o aumento no número de isoenzimas em espécies diplóides normalmente resulta da duplicação de locos estruturais, seguido de subseqüentes mutações (SCANDALIOS, 1974; GOTTLIEB, 1982). Em espécies poliplóides é decorrente da adição de genomas homeólogos (GOTTLIEB, 1982). Números menores do que os esperados podem ser causados por procedimentos de análise que causem degradação enzimática (KEPHART, 1990). Entretanto, as enzimas analisadas com substratos artificiais não encontrados na planta (esterases e peroxidases, por exemplo) são bem mais variáveis com relação ao número e localização (GOTTLIEB, 1982).

Deve-se sempre lembrar que a eletroforese pode não identificar todas as variantes proteicas, e sim somente aquelas que possuem alterações de carga, tamanho e conformação que alterem a sua velocidade de migração. Também, em alguns sistemas enzimáticos e sob certas condições experimentais, certas bandas extras "fantasmas" que sombreiam bandas primárias estão presentes. Estas bandas

secundárias parecem ser resultado de aspectos técnicos como estocagem (congelamento), tampão de extração inadequado, condições não-fisiológicas, tecidos velhos ou aquecimento dos géis durante as migrações (KEPHART, 1990). As vezes também se torna difícil identificar a causa da falta de uma banda, havendo normalmente a dúvida sobre a presença de um alelo nulo (um alelo cuja proteína decorrente não apresenta atividade enzimática), uma alteração regulatória (ontogenética ou não) ou um problema técnico.

Uma questão muito discutida quando se fala de variantes isoenzimáticas é se elas sofrem ou não pressão de forças seletivas significativamente importantes. KIMURA (1983) sugere que a taxa de evolução molecular difere da fenotípica, podendo ser considerada como praticamente neutra em relação a forças seletivas externas. Ou seja, afirma-se que as isoenzimas representam somente uma pequena parcela do genótipo, representativa somente dos genes estruturais envolvidos em reações enzimáticas simples, e não do genoma como um todo, podendo cada parcela do genoma possuir um comportamento evolutivo diferente (PIGLIUCCI e cols., 1991). Contribui para esta hipótese o fato da variabilidade isoenzimática aparentemente não apresentar correspondência com a variabilidade fenotípica (BROWN & MUNDAY, 1982; PIGLIUCCI e cols., 1991). Entretanto, deve-se lembrar que é encontrada correspondência entre a variabilidade isoenzimática e fatores ambientais (BROWN & MUNDAY, 1982;

NEVO e cols., 1988), e que padrões aloenzimáticos estruturados de acordo com a heterogeneidade ecológica do ambiente parece ser um fato inconsistente com a hipótese da diversidade aloenzimática ser neutra (NEVO e cols., 1988).

A variabilidade isoenzimática é, com certeza, um excelente método de estudo aplicável, entre outras possibilidades, à análise da variabilidade genética, filogenia, ligação gênica e fluxo gênico.

1.4 Objetivos do estudo

- Determinar a variação isoenzimática de três diferentes populações de *H. euclaston*;
- Verificar o grau de divergência isoenzimática entre as populações;
- Analisar o sistema de cruzamento através de testes de progênie, usando polimorfismos isoenzimáticos;
- Obter dados do ciclo biológico como taxa de velocidade de germinação das sementes e velocidade de crescimento das plântulas;
- Estudar os padrões de regulação gênica tissular, na plântula, para os genes que controlam as isoenzimas analisadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Foram coletadas amostras de nove populações de *H. euclaston*, das quais três foram escolhidas para a análise eletroforética. Estas três populações foram coletadas na zona de campos na região da Campanha do Estado do Rio Grande do Sul.

Locais de coleta (ver Figura 1):

População 5 - Próximo à cidade de Alegrete, junto à ponte sobre o rio Inhanduí.

População 6 - Em uma estrada de terra entre a BR290 e a estrada Alegrete-Quaraí, cerca de 1 km após a entrada (município de Alegrete).

População 8 - Junto à estrada Quaraí-Santana do Livramento, próximo ao arroio Sarandi IV (município de Quaraí).

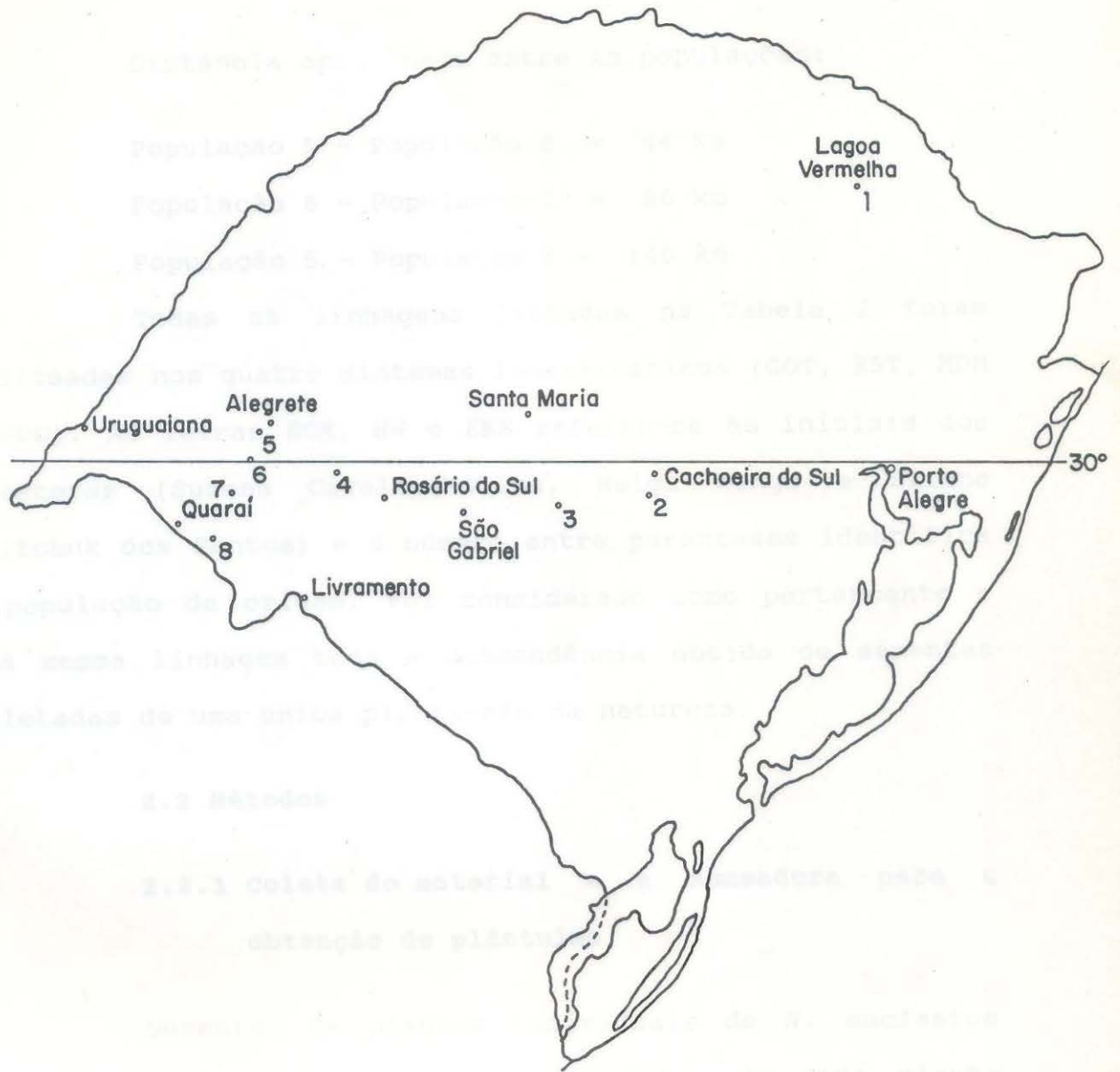


Figura 1: Mapa do estado do Rio Grande do Sul, onde são indicadas oito populações de *Hordeum euclaston* em que foram feitas coletas. Neste trabalho foram utilizadas sementes coletadas das populações 5, 6 e 8.

Distância aproximada entre as populações:

População 5 - População 6 = 44 km

População 6 - População 8 = 96 km

População 5 - População 8 = 140 km

Todas as linhagens listadas na Tabela I foram analisadas nos quatro sistemas isoenzimáticos (GOT, EST, MDH e SOD). As letras SCM, HW e EKS referem-se às iniciais dos coletores (Suzana Cavalli-Molina, Helga Winge e Eliane Kaltchuk dos Santos) e o número entre parênteses identifica a população de origem. Foi considerado como pertencente a uma mesma linhagem toda a descendência obtida de sementes coletadas de uma única planta-mãe da natureza.

2.2 Métodos

2.2.1 Coleta do material e a semeadura para a obtenção de plântulas

Sementes de plantas individuais de *H. euclaston* foram coletadas na natureza. As sementes de cada planta foram colocadas em sacos de papel manteiga, onde foi anotado o número do coletor precedido por suas iniciais, o local e a data da coleta. As sementes foram estocadas em local seco, a temperatura ambiente.

As sementes foram tratadas com o antifúngico Pakin (solução de hipoclorito de sódio a 0,4% de cloro ativo) por 40 minutos antes da sua semeadura em placa de petri forradas

TABELA 1: Relação das linhagens analisadas de *Hordeum euclaston*. As linhagens estão listadas em ordem de proximidade. O local de cada população é dado no texto.

População	- Linhagem	Data de Coleta
Pop. 5	HW3078 (5)	18.11.1989
	HW3080 (5)	18.11.1989
	HW3081 (5)	18.11.1989
	HW3082 (5)	18.11.1989
	HW3083 (5)	18.11.1989
	HW3086 (5)	18.11.1989
	HW3087 (5)	18.11.1989
	HW3088 (5)	18.11.1989
	HW3089 (5)	18.11.1989
	HW3152 (5)	11.12.1989
	HW3154 (5)	11.12.1989
	HW3156 (5)	11.12.1989
	HW3158 (5)	11.12.1989
	HW3159 (5)	11.12.1989
	HW3160 (5)	11.12.1989
	HW3162 (5)	11.12.1989
	HW3163 (5)	11.12.1989
	HW3164 (5)	11.12.1989
	HW3165 (5)	11.12.1989
	SCM1017 (5)	11.12.1989
	SCM1019 (5)	11.12.1989
	SCM1021 (5)	11.12.1989
	SCM1023 (5)	11.12.1989
	SCM1026 (5)	11.12.1989
	SCM1028 (5)	11.12.1989
	SCM1029 (5)	11.12.1989
	SCM1031 (5)	11.12.1989
	SCM1032 (5)	11.12.1989
	SCM1034 (5)	11.12.1989
	SCM1037 (5)	11.12.1989
SCM1017 (5)	11.12.1989	
SCM1017 (5)	11.12.1989	
Pop. 6	HW3095 (6)	19.11.1989
	HW3099 (6)	19.11.1989
	HW3101 (6)	19.11.1989
	HW3102 (6)	19.11.1989
	HW3104 (6)	19.11.1989
	HW3105 (6)	19.11.1989
	HW3171 (6)	12.12.1989
	HW3172 (6)	12.12.1989
	HW3173 (6)	12.12.1989
	HW3174 (6)	12.12.1989
	HW3175 (6)	12.12.1989
	HW3176 (6)	12.12.1989
	HW3177 (6)	12.12.1989
	HW3179 (6)	12.12.1989
	HW3180 (6)	12.12.1989
HW3182 (6)	12.12.1989	

continua

População	-	Linhagem	Data de Coleta
		HW3183 (6)	12.12.1989
		HW3188 (6)	12.12.1989
		HW3190 (6)	12.12.1989
		HW3191 (6)	12.12.1989
		HW3193 (6)	12.12.1989
		SCM1038 (6)	12.12.1989
		SCM1040 (6)	12.12.1989
		SCM1042 (6)	12.12.1989
		SCM1043 (6)	12.12.1989
		SCM1045 (6)	12.12.1989
		SCM1048 (6)	12.12.1989
		SCM1050 (6)	12.12.1989
		SCM1051 (6)	12.12.1989
		SCM1052 (6)	12.12.1989
		SCM1053 (6)	12.12.1989
		SCM1055 (6)	12.12.1989
Pop. 8		HW3121 (8)	20.11.1989
		HW3128 (8)	20.11.1989
		HW3130 (8)	20.11.1989
		HW3132 (8)	20.11.1989
		HW3133 (8)	20.11.1989
		HW3134 (8)	20.11.1989
		HW3136 (8)	20.11.1989
		HW3139 (8)	20.11.1989
		HW3238 (8)	13.12.1989
		HW3240 (8)	13.12.1989
		HW3244 (8)	13.12.1989
		HW3246 (8)	13.12.1989
		HW3249 (8)	13.12.1989
		HW3253 (8)	13.12.1989
		HW3256 (8)	13.12.1989
		HW3258 (8)	13.12.1989
		HW3259 (8)	13.12.1989
		HW3282 (8)	13.12.1989
		HW3297 (8)	13.12.1989
		HW3298 (8)	13.12.1989
		SCM1104 (8)	13.12.1989
		SCM1105 (8)	13.12.1989
		SCM1107 (8)	13.12.1989
		SCM1111 (8)	13.12.1989
		SCM1112 (8)	13.12.1989
		SCM1113 (8)	13.12.1989
		SCM1115 (8)	13.12.1989
		SCM1119 (8)	13.12.1989
		SCM1122 (8)	13.12.1989
		SCM1125 (8)	13.12.1989
		SCM1126 (8)	13.12.1989
		EKS3B (8)	20.11.1989
		EKS3H (8)	20.11.1989

com papel filtro e algodão previamente autoclavados. As sementes foram colocadas a germinar nessas placas com o algodão embebido em água, mantidos em incubadoras a uma temperatura de 20°C com iluminação constante. Para fins de controle da germinação, o papel filtro foi dividido em pequenos quadrados individualizados por letras e números.

Foi definido como marcador ontogenético do estágio de análise das plântulas o comprimento do coleóptilo, tendo-se utilizado indivíduos com um tamanho médio de 1,2 cm, cuja variação máxima foi entre 0,8 cm e 1,7 cm. Após terem chegado ao estágio desejado, as plântulas foram congeladas ou diretamente submetidas a análise eletroforética.

Acompanha-se o desenvolvimento de todas as plântulas, tendo-se anotado sempre a data de germinação, o comprimento do coleóptilo no momento do congelamento e a data do congelamento, além de qualquer característica apresentada fora do comum (plântulas fungadas, por exemplo).

2.2.2 Sistemas isoenzimáticos estudados

Foram feitos testes com determinados sistemas isoenzimáticos a fim de se escolher aqueles que apresentassem melhores condições de análise. Os sistemas que apresentaram os melhores resultados tanto quanto a atividade quanto a separação das bandas foram as esterases (EST), superóxido dismutases (SOD), glutamato oxaloacetato transaminases (GOT) e malato-desidrogenases (MDH). Os outros

sistemas testados e não incluídos na análise do presente trabalho forma as glutamato-desidrogenases (GDH), fosfatases ácidas (ACP), leucina-aminopeptidases (LAP), amilases (AMI) e peroxidases (PER). Os testes consistiram em submeter as plântulas a diferentes condições de migração e coloração, analisando-se a possibilidade de uma análise segura das bandas em nível populacional.

2.2.3 Análise eletroforética

A análise eletroforética, considerando-se a análise da variabilidade gênica e os testes de progênie, consistiu em um total de 168 géis com 3.444 aplicações, tendo-se utilizado 398 plântulas.

Três dos quatro sistemas escolhidos (EST, SOD e MDH) foram analisados em duas condições de migração diferentes, a fim de otimizar a distinção entre as bandas. Para GOT, utilizamos apenas uma condição de migração, pois os testes iniciais não mostraram diferenças que justificassem o uso de duas condições distintas.

2.2.3.1 Géis

A análise dos quatro sistemas utilizados foi feita por eletroforese em gel, migração horizontal. Em todos os quatro sistemas enzimáticos analisados, foram utilizados géis de poliacrilamida de 1 mm de espessura.

2.2.3.1.1 Esterases

Para este sistema foram utilizados géis de poliacrilamida nas concentrações de 6% e 8%. Os tampões utilizados foram os tampões A e B de SCANDALIOS (1969), na proporção de 1A:9B.

Tampão de SCANDALIOS (1969):

Tampão A: pH 8,3

hidróxido de lítio - 1,2 g/l

ácido bórico - 11,89 g/l

H₂O destilada

Tampão B: pH 8,3

tris - 6,2 g/l

ácido cítrico (hidratado) - 1,74 g/l

H₂O destilada

2.2.3.1.2 Superóxido dismutases e malato-desidrogenases

Para estes dois sistemas foram utilizados géis de poliacrilamida nas concentrações de 6% e 7%. O tampão utilizado foi o de ROOSE & GOTTLIEB (1976).

Tampão de ROOSE & GOTTLIEB (1976):

histidina 0,005M - 0,7758 g/l

pH 8,0 ajustado com NaOH

2.2.3.1.3 Glutamato Oxalacetato Transaminases

Para este sistema foram utilizados géis de poliacrilamida na concentração de 7%. Os tampões utilizados foram os tampões 1 e 2 de BROWN (1983), na proporção de 94% do 2 : 6% do 1.

Tampões de BROWN (1983):

Tampão 1: hidróxido de lítio 0,075 M - 1,7962 g/l

ácido bórico até ph = 8,5 (~13,2 g/l)

H₂O destilada

Tampão 2: tris 0,065M - 7,8715 g/l

ácido cítrico (hidratado) 0,0091M - 1,9122 g/l

2.2.3.1.4 Polimerização dos géis

A preparação dos géis foi feita com os tampões descritos para cada sistema enzimático, conforme é mostrado a seguir para cada concentração do gel:

	6%	7%	8%
Tampão	75 ml	75 ml	75 ml
acrilamida	4,275g	4,987g	5,7g
bisacrilamida	0,225g	0,260g	0,3g
TEMED	0,075 ml	0,075 ml	0,075 ml
Persulfato de amônia (10%)	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml

Uma vez misturada a solução do gel, a mesma era colocada em uma canaleta de vidro com dimensões 17,0 cm x 15,0 cm x 0,1 cm, a qual era então coberta com uma placa de

vidro revestida na sua superfície interna com graxa de silicone. A solução era mantida a temperatura ambiente por 20 minutos e posteriormente transferida para uma câmara fria a 4°C por, no mínimo, uma hora.

2.2.3.2 Preparação das amostras

Os tecidos utilizados na análise foram o coleóptilo e a raiz nos quatro sistemas estudados, além do endosperma em EST.

Os tecidos eram primeiramente separados e colocados dentro de sulcos arredondados de uma placa de acrílico, onde se adicionava também 0,005 ml do tampão 1A:9B de SCANDALIOS (ver 2.2.3.1.1). Os tecidos eram homogeneizados com o auxílio de um bastão de vidro esmerilhado arredondado na ponta. Os homogenados eram então absorvidos em papel Whatman 3MM com dimensões de 4,0 mm x 1,0 mm. Em cada homogenado geralmente eram colocados quatro desses papéis. Sobre os controles era também colocado um papel-filtro entre os homogenados e os papéis para absorção, estes normalmente em número maior (de 6 a 8). Durante todo o procedimento as placas de acrílico foram mantidas sobre o gelo.

2.2.3.3 Aplicação das amostras nos géis

O primeiro passo para a aplicação das amostras era retirar a placa de vidro que cobria a canaleta que contém o

gel. Em seguida era inserido um "pente" de 11, 20 ou 26 "dentes" (na grande maioria das vezes 20), o qual produzia os orifícios onde eram colocados os papéis embebidos com o homogenado.

As amostras eram aplicadas a 4 cm da ponte catódica em SOD (por possuir bandas catódicas) e a 1 cm nos demais sistemas.

Em todos os géis, foram colocados de três a seis (normalmente cinco ou seis) amostras controle (*H. vulgare*, cultivar MN 599), colocadas nas extremidades e no centro do gel. No sistema das superóxido-dismutases, utilizaram-se as raízes de *H. vulgare* como controle, enquanto que nos demais sistemas utilizou-se o coleóptilo.

2.2.3.4 Migração das amostras

Os géis foram submetidos a uma diferença de potencial de 10 V/cm em cubas horizontais, colocadas em um balcão refrigerado a 4°C. Durante a migração, os géis eram mantidos cobertos com plástico para evitar a evaporação. Era sempre mantida uma distância de 12 cm entre as pontes catódica e anódica. A linha de frente da migração foi estabelecida pela migração do azul de bromofenol, o qual era adicionado a alguns dos papéis (normalmente controles) antes da aplicação nos géis. Em todos os sistemas a migração era interrompida quando a linha de frente atingia 8 cm de distância em relação ao ponto de aplicação.

O tampão utilizado nas cubas variou com o sistema enzimático:

EST: tampão A de SCANDALIOS (1969) (ver 2.2.3.1.1)

SOD e MDH: tampão de ROOSE & GOTTLIEB (1976)

pH ~ 8,84

citrato de sódio 0,4M - 117,64 g/l

H₂O destilada

GOT: tampão 1 de BROWN (1983) (ver 2.2.3.1.3)

2.2.3.5 Coloração

2.2.3.5.1 Esterases

Os géis de EST foram corados segundo SCANDALIOS (1969) modificado:

H ₂ O destilada.....	40 ml
alfa-naftil acetato.....	3 ml
beta-naftil acetato.....	3 ml
Fast Blue BB Salt.....	0,04 g
tampão C:.....	50 ml
tampão D.....	10 ml

Tampão C: fosfato de sódio monobásico 0,2 M 27,598 g/l

H₂O destilada

Tampão D: fosfato de sódio dibásico 0,2 M 28,4 g/l

H₂O destilada

alfa-naftil acetato: solução a 1% dissolvido em H₂O e acetona 1:1

beta-naftil acetato: solução a 1% dissolvido em H₂O e acetona 1:1

Os géis com a solução de coloração foram incubados a 37°C por aproximadamente 1h30min.

2.2.3.5.2 Superóxido Dismutases

Os géis de SOD foram corados segundo BREWER (1970) modificado:

Tampão.....100 ml

NAD 0,0015M.....0,04g

NBT 0,00043M.....0,02g

PMS 0,000163M.....0,014g

Tampão: fosfato de sódio dibásico 0,125M, ph 9,0 - 17,75 g/l

ácido glutâmico 0,25M - 42,25 g/l

H₂O

pH 8,2 ajustado com NaOH 1N

Os géis com a solução de coloração foram mantidos por 30 minutos no escuro a 37°C, mais 40 minutos a uma hora a temperatura ambiente com iluminação artificial direta.

2.2.3.5.3 Malato Desidrogenases

Os géis de MDH foram corados segundo BREWER (1970):

Tampão + substrato.....100 ml
 NAD 0,0015M.....0,066g
 PMS 0,000163M.....0,005g
 NBT 0,00043M.....0,035g

Tampão + substrato: ácido DL málico.....26,82g/l
 tris.....6,06 g/l
 H₂O destilada
 pH 7,0 ajustado com NaOH 4N

Os géis com a solução de coloração foram mantidos no escuro a 37°C por aproximadamente três horas.

2.2.3.5.4 Glutamato Oxalocetato Transaminases

Os géis de GOT foram corados segundo VALLEJOS (1983) modificado:

Tampão Tris HCl pH 8,5.....100 ml
 ácido alfa-cetoglutárico.....0,1 g
 ácido aspártico.....0,2 g
 Fast Blue BB Salt.....0,15 g

Tampão Tris HCl pH 8,5: tris.....15,14 g/l
 H₂O destilada
 pH corrigido com HCl

Os géis foram mantidos com a solução de coloração a 37°C por aproximadamente uma hora, mas este período variou bastante de acordo com o tempo de estocagem das plântulas.

2.2.4 Fixação dos géis

Após o término da coloração, os géis eram lavados em água e fixados. O fixador consistia em água, álcool metílico e ácido acético na proporção 5:5:1. Os géis permaneciam na solução de fixação por, no mínimo, 20 minutos, sendo, então, lavados e fotografados. Todos os géis foram individualizados por um número precedido por uma letra localizada no canto superior direito do gel. Os géis foram envoltos em plástico e guardados em câmara fria a 4°C.

2.2.5 Análise dos géis

A análise dos géis foi feita através de esquemas dos padrões isoenzimáticos observados anotando-se a intensidade da banda e a distância absoluta de cada banda em relação ao ponto de aplicação.

A MR (migração relativa) foi calculada para cada banda a partir da sua comparação com uma banda do controle. Esta banda do controle recebeu um valor de $MR = 1$, enquanto que todas as demais bandas possuem um MR igual a sua distância migrada dividida pela distância migrada por esta banda. Como a MR varia de acordo com a concentração do gel, no presente trabalho, juntamente com o valor do MR, é indicada a concentração do gel em que ela foi calculada ($MR_{6\%} = 1$, por exemplo).

A homologia das bandas foi definida analisando-se as diferentes condições de migração (exceto em GOT, o qual foi analisado em somente uma condição), sempre utilizando-se o controle como comparação.

Sempre que possível, quando restavam dúvidas sobre a homologia e separação das bandas, era feita uma repetição da análise dos indivíduos.

2.2.6 Testes de progênie

Os testes de progênie consistem na análise de indivíduos-irmãs a fim de verificar a ocorrência de segregação. Na Tabela II estão listadas todas as linhagens submetidas aos testes, com o respectivo número de indivíduos e tecidos utilizados para cada sistema enzimático.

2.2.7 Avaliação dos resultados

2.2.7 1 Diversidade intrapopulacional

Foram feitas três medidas de variabilidade dentro de cada população, que foram:

A = número médio de alelos por loco;

P = proporção de locos polimórficos por população;

H = heterozigose média esperada por indivíduo.

O A (número médio de alelos por loco) foi calculado dividindo-se o número total de alelos encontrados em cada população pelo número total de locos.

TABELA II: Relação das linhagens utilizadas em testes de progênie. São indicados o número de indivíduos-irmãos analisados (N) para cada linhagem, além do primeiro indivíduo analisado no estudo da variabilidade genética, o número de indivíduos analisados em cada sistema enzimático e os tecidos utilizados (c=coleóptilo; r=raiz; e=endosperma).

LINHAGEM	SISTEMAS ENZIMÁTICOS				N
	MDH	GOT	SOD	EST	
HW3253 (8)			3 (c, r)		3
HW3121 (8)	8 (c, r)		8 (c, r, e)	8 (c, r, e)	8
SCM1112 (8)	8 (c, r)	8 (c, r)	8 (c, r)	8 (c)	16
HW3136 (8)			3 (c, r)		3
SCM1125 (8)			2 (c, r)		2
HW3258 (8)			2 (c)	2 (c)	4
SCM1113 (8)			6 (c, r)		6
SCM1122 (8)			2 (c, r)		2
EKS3H (8)			14 (c, r)	14 (c, r)	14
SCM1104 (8)			6 (c)		6
HW3282 (8)			1 (c)		1
SCM1126 (8)			1 (c)		1
HW3246 (8)				1 (c, e)	1
HW3238 (8)				1 (c, e)	1
HW3130 (8)				5 (c, r, e)	5
HW3128 (8)				13 (c, e)	13
HW3297 (8)				8 (c, r)	8
SCM1115 (8)				1 (c, r)	1
SCM1111 (8)				1 (c, r)	1
			Pop.8 - Total		88
HW3080 (5)		2 (c, r)		1 (c, e)	3
HW3082 (5)		4 (c, r)			4
SCM1031 (5)			2 (c, r)		2
SCM1026 (5)			1 (c)		1
HW3154 (5)			1 (c)		1
SCM1019 (5)				1 (c, e)	1
HW3159 (5)				1 (c, e)	1
SCM1028 (5)				1 (c, e)	1
HW3152 (5)				7 (c, e)	1
			Pop.5 - Total		21
SCM1042 (6)		8 (c)			8
HW3173 (6)		1 (c)			1
SCM1053 (6)			2 (c, r)		2
HW3104 (6)			2 (c, r)		2
SCM1052 (6)			1 (c)		1
HW3188 (6)			1 (c)		1
HW3171 (6)				15 (c, r)	15
SCM1055 (6)				1 (c, e)	1
HW3105 (6)				1 (c, e)	1
Hw3249 (6)				1 (c, r)	1
			Pop.6 - Total		33
			Total Geral		142

O P (proporção de locos polimórficos por população) foi calculado dividindo-se o número total de locos polimórficos encontrados em cada população pelo número total de locos.

O H (heterozigose média esperada) foi calculado como a média dos graus de heterozigose esperada de cada loco (h). O h foi calculado, por sua vez, como $h = 1 - \sum x_i^2$, onde x_i é a frequência do iésimo alelo.

2.2.7.2 Divergências interpopulacionais

Para estimar o grau de similaridade entre as populações, foi utilizado o índice de similaridade normalizada de genes de NEI (1972). A comparação entre as populações se dá aos pares e se baseia nas frequências alélicas dos locos homólogos. O I (índice de similaridade genética) é definido por:

$$I = j_{xy} / j_x \cdot j_y$$

sendo x e y duas populações distintas. j_x e j_y são a média aritmética do somatório das frequências alélicas elevadas ao quadrado, por loco, em cada população. j_{xy} é a média aritmética do somatório das frequências gênicas homólogas de cada população multiplicados entre si, para cada loco.

O valor de I pode variar de 0 a 1, sendo igual a 1 quando todas as frequências gênicas de ambas as populações forem iguais.

A partir da identidade genética de diferentes populações obtém-se a distância genética (D) entre as mesmas:

$$D = -\log_e I.$$

3.1 Germinação de sementes encistadas

As sementes encistadas em placas de Petri foram acompanhadas individualmente para obtenção de dados referentes à taxa de germinação e à velocidade de germinação das linhagens estudadas das três populações.

No Anexo 11 estão listados os dados obtidos para a taxa de germinação de cada linhagem, os valores médios para cada população e para a espécie, bem como o número de dias necessários para iniciar a germinação (média, moda e desvio).

A taxa média de germinação da espécie foi de 87,51, com limites por planta de 30,00 e 100,00. Todas as três populações apresentaram taxas de germinação igualmente altas: 85,51 na população 1, 87,83 na população 2 e 84,21 na população 3. Em relação à velocidade de germinação, observou-se que o tempo de germinação ocorreu, em média, no 10º dia após a semeadura, com limites de 3 a 51 dias por semente. Como o número de placas em que foi feita a semeadura é

3. RESULTADOS

3.1 Germinação de *Hordeum euclaston*

As sementes semeadas em placas de Petri foram acompanhadas individualmente para obtenção de dados referentes à taxa (%) e velocidade de germinação das linhagens estudadas das três populações.

Na Tabela III estão listados os dados obtidos para a taxa de germinação de cada linhagem, os valores médios para cada população e para a espécie, bem como o número de dias necessários para iniciar a germinação (média, moda e limites).

A média geral de germinação da espécie foi de 82,5%, com limites por planta de 33,0% e 100,0%. Todas as três populações apresentaram taxas de germinação igualmente altas: 79,5% na população 6, 83,8% na população 5 e 84,2% na população 8. Em relação à velocidade de germinação, observa-se que o início da germinação ocorreu, em média, no 10º dia após a semeadura, com limites de 4 a 51 dias por semente. Como o número de placas em que foi feita a semeadura e,

TABELA III: Germinação das sementes de *H. euclaston* em placas de Petry. Para cada linhagem é indicado o número de sementes semeadas (N), a taxa de germinação (%), o número médio de dias da semeadura até a germinação (X), a moda (Mo) e limites (por semente dentro de cada linhagem; limites das médias das linhagens dentro de cada população e limites das médias das populações no total da espécie), o número de placas e o número de dias em que as mesmas foram acompanhadas.

Linhagem	N	Germinação % (limites)	Velocidade de Germinação			Número Placas	Número Dias
			X	Mo	Limites		
HW3190(6)	10	100,0	8,7	8	9-14	1	17
HW3180(6)	10	90,0	11,7	8	8-18	1	35
HW3171(6)	49	77,6	10,7	9	6-21	1	45
HW3105(6)	10	80,0	11,1	9	8-20	1	35
HW3101(6)	10	60,0	9,3	9	6-9	1	12
HW3095(6)	10	90,0	8,6	7 e 9	5-12	1	35
SCM1038(6)	16	63,0	13,6	6	6-35	2	45 e 27
SCM1043(6)	18	94,0	12,4	6	6-20	2	35 e 21
SCM1055(6)	49	79,6	8,6	8	4-14	1	35
HW3104(6)	13	69,2	11,1	8,9 e 15	7-29	1	80
HW3188(6)	10	70,0	13,9	14	10-19	1	80
SCM1053(6)	20	95,0	8,8	8	6-19	2	80 e 23
HW3171(6)	15	87,0	8,5	6,7,8,9 11 e 12	5-12	1	18
HW3193(6)	16	63,0	8,5	6,7,8 e 12	6-12	1	18
HW3182(6)	15	93,0	7,8	11	5-11	1	18
SCM1050(6)	16	80,0	9,6	8	7-18	1	20
SCM1045(6)	16	94,0	6,3	8	4-8	1	17
HW3177(6)	20	80,0	7,1	8	4-22	1	27
HW3099(6)	16	56,0	8,6	7	6-12	1	22
SCM1048(6)	15	73,0	7,1	5	5-13	1	19
SCM1040(6)	16	69,0	11,2	13	5-15	1	17
HW3183(6)	15	93,0	6,5	6	4-12	1	19
HW3173(6)	13	85,0	8,2	6 e 9	5-13	2	19 e 19
HW3175(6)	35	97,0	8,8	7	7-15	2	19 e 21
SCM1051(6)	16	81,0	10,0	7	6-22	1	25
SCM1042(6)	42	76,0	9,4	9,10 e 11	6-20	2	23 e 21
HW3102(6)	16	38,0	12,0	12	9-15	1	25
SCM1052(6)	16	90,0	10,1	8	8-14	1	16
HW3191(6)	16	69,0	7,3	5	5-15	1	19
HW3176(6)	16	90,0	8,8	8	5-15	1	20
HW3179(6)	17	82,0	15,3	8	8-33	1	38
HW3172(6)	16	80,0	7,7	6 e 7	5-10	1	19
Totais Pop.6	588	79,5 (38,0-100,0)	9,6	-	6,3-15,3	-	-

continua

continuação

Linhagem	N	Germinação % (limites)	Velocidade de Germinação			Número Placas	Número Dias
			X	Mo	Limites		
HW3121(8)	16	81,3	9,1	8	7-13	2	35 e 80
HW3238(8)	10	100,0	6,4	6	5-9	1	12
HW3128(8)	53	87,0	14,8	12	8-43	2	45 e 19
HW3246(8)	10	100,0	8,0	10	5-10	1	13
HW3256(8)	10	100,0	6,9	9	5-9	1	13
HW3298(8)	10	100,0	10,0	10	6-15	1	17
EKS3H(8)	62	33,9	9,3	8	7-13	2	35 e 38
SCM1122(8)	10	100,0	10,5	10	9-13	1	15
SCM1113(8)	10	100,0	9,0	6	5-14	1	18
HW3136(8)	22	86,0	10,6	9	8-14	1	20
SCM1107(8)	20	80,0	6,5	6	5-9	1	20
SCM1125(8)	21	95,0	7,0	6 e 7	6-9	1	20
EKS3B(8)	11	100,0	9,8	8	6-15	1	19
HW3253(8)	11	82,0	6,0	6	5-8	1	24
HW3240(8)	7	100,0	7,0	6 e 8	6-8	1	12
HW3130(8)	11	91,0	6,9	6	6-13	1	17
SCM1119(8)	16	94,0	7,3	10	5-18	1	18
HW3259(8)	31	87,0	7,3	8	5-18	2	18 e 24
HW3132(8)	15	80,0	7,7	7	7-11	1	18
SCM1104(8)	17	53,0	8,0	9	5-12	1	23
HW3240(8)	14	79,0	6,9	5	5-18	1	23
HW3133(8)	17	65,0	9,5	15	5-15	1	24
HW3139(8)	16	75,0	9,8	10	7-16	1	23
SCM1115(8)	17	82,0	8,3	6	6-13	1	23
SCM1111(8)	17	100,0	9,8	10	7-15	1	23
HW3249(8)	16	44,0	12,0	11	6-22	1	25
SCM1105(8)	16	90,0	6,0	6	5-9	1	14
SCM1126(8)	16	90,0	8,6	11	5-14	1	16
HW3297(8)	16	69,0	5,9	5	5-8	1	20
HW3282(8)	16	95,0	6,0	6	5-8	1	14
HW3134(8)	16	90,0	8,6	7	6-13	1	19
HW3258(8)	18	78,0	10,1	5 e 8	5-28	1	32
SCM1112(8)	31	71,0	11,0	9	6-28	2	10 e 19
Totais							
Pop.8	599	84,2 (33,9-100,0)	8,5	-	5,9-14,8	-	-
HW3080(5)	13	92,0	9,3	8	6-14	2	18 e 27
HW3152(5)	16	94,0	10,8	7	5-32	2	35 e 15
HW3159(5)	10	100,0	29,1	14 e 37	8-51	1	55
HW3165(5)	10	100,0	17,1	14	6-41	1	80
SCM1019(5)	10	80,0	16,4	7	7-35	1	80
SCM1028(5)	10	100,0	25,6	38	6-38	1	45

continua

continuação

Linhagem	N	Germinação	Velocidade de Germinação			Número Placas	Número Dias
		% (limites)	X	Mo	Limites		
SCM1037(5)	11	91,0	15,8	5,6 e 14	5-38	1	80
HW3082(5)	29	79,0	9,1	7	6-21	2	20 e 23
SCM1031(5)	20	70,0	9,7	8	7-13	1	27
HW3162(5)	20	95,0	11,0	9	6-23	1	27
HW3154(5)	17	76,0	10,9	7,8,10 e 16	5-17	1	27
SCM1026(5)	11	82,0	14,1	8,9,13 e 22	8-20	1	23
SCM1021(5)	21	33,0	12,5	13	7-15	2	31 e 27
HW3088(5)	26	88,0	8,4	9	6-16	2	14 e 18
SCM1023(5)	14	50,0	5,8	5 e 6	5-7	1	27
HW3156(5)	11	91,0	5,8	6	4-7	1	22
HW3086(5)	13	100,0	7,8	8	6-10	1	17
SCM1034(5)	11	100,0	12,8	13	8-15	1	21
SCM1017(5)	12	42,0	11,2	7	7-19	1	23
SCM1032(5)	14	100,0	15,4	17	9-26	1	30
HW3163(5)	14	100,0	12,5	9 e 18	9-23	1	29
HW3078(5)	13	100,0	12,1	11	7-18	1	23
SCM1029(5)	16	69,0	14,0	18	7-18	1	28
HW3160(5)	13	77,0	9,9	12	6-12	1	24
HW3081(5)	15	80,0	9,3	10	7-11	1	23
HW3158(5)	16	90,0	9,7	8	8-12	1	17
HW3087(5)	16	95,0	9,7	7,10 e 13	7-13	1	19
HW3083(5)	16	90,0	8,2	7	6-20	1	25
HW3164(5)	11	91,0	13,1	13	6-30	1	38
HW3089(5)	12	58,0	10,9	10	8-13	1	27
Totais							
Pop. 5	441	83,8 (33,0-100,0)	12,3	-	5,8-29,1	-	-
Totais H.							
euclaston 1628		82,5 (79,5-84,2)	10,1	-	8,5-12,3	-	-

principalmente, o número de dias em que as sementes semeadas foram acompanhadas variou consideravelmente de planta para planta, não podemos ter certeza de ter obtido o limite máximo de dias para germinação de todas as linhagens. Esses valores são informados na Tabela III Também para esse parâmetro ontogenético, as três populações mostraram valores muito similares. A população 8 é a que, em média, germinou mais rápido ($x = 8,5$ dias), com variações médias entre as linhagens de 5,9 a 14,8; a população 6 apresentou uma média intermediária de 9,6 dias para germinar, com limites também intermediários de 6,3 a 15,3 dias, enquanto a população 5 apresentou uma velocidade de germinação um pouco mais lenta ($x = 12,3$ dias), variando de 5,8 a 29,1 entre as médias das linhagens.

Em resumo, o que se verificou é uma taxa de germinação bastante alta para a espécie e um tempo curto necessário para o início da mesma. Também se pode salientar a quase inexistência de sementes contaminadas por fungos, quando as mesmas eram tratadas com líquido de Dakin por 40 minutos, o que certamente contribuiu para essa alta taxa de germinação.

3.2 Modo de reprodução

Foram realizados testes de progênie pela análise dos padrões isoenzimáticos de plântulas-irmãs para os quatro sistemas enzimáticos. No total foram analisados 142 indivíduos F_1 pertencentes a 37 linhagens das três

populações, com os quais foram realizados 46 testes de progênie, sendo dois para MDH, cinco para GOT, 19 para SOD e 20 para EST. As linhagens analisadas nesses testes de progênie estão listadas na Tabela II do Material e Métodos. Não foi observado nenhum tipo de segregação alélica para locos estruturais, nem mesmo para padrões raros entre indivíduos-irmãos. Nas Figuras 4 e 7 (ver adiante) são mostrados dois géis, nos quais são analisadas plântulas-irmãs de duas diferentes linhagens e onde pode-se comprovar a total uniformidade dos padrões isoenzimáticos das mesmas. Também não foi observado em nenhuma linhagem um padrão que pudesse corresponder a um heterozigoto. Estes resultados sugerem um sistema de reprodução predominantemente por autofecundação e uma taxa de fecundação cruzada, se existente, muito pequena.

3.3 Critérios utilizados na determinação do controle genético

O melhor procedimento para a determinação dos locos que controlam as isoenzimas de um sistema enzimático é a análise da segregação das bandas em descendentes de cruzamentos controlados. Como ainda não foi possível fazer esses cruzamentos em *H. euclaston* devido ao pequeno tamanho das flores que necessitam ser manipuladas sob lupa, foram utilizados determinados critérios na análise dos padrões obtidos a fim de determinar o controle genético das isoenzimas analisadas:

1 - Identificação das bandas

Todas as bandas detectadas foram identificadas por sua migração relativa (MR), sendo considerada idênticas as bandas que apresentaram a mesma MR em todas as condições de migração. As MR foram determinadas através de comparações com o controle (*H. vulgare*, cultivar MN 599).

2 - Bandas principais e secundárias

Foram observadas bandas de ocorrência simultânea, relacionadas em distância de migração e intensidade. As bandas secundárias foram definidas como "dependentes" da banda principal tanto quanto à presença como quanto à intensidade, além de apresentarem diferenças de migração constantes entre a banda principal e outras possíveis secundárias, diferenças estas que se mantêm constantes em cada condição de migração. Na ocorrência de aloenzimas diferentes, as bandas secundárias "acompanham" a migração da banda principal.

3 - Prováveis locos e alelos

- Foram definidas como possíveis aloenzimas as bandas que não foram encontradas juntas na mesma linhagem, visto que os indivíduos desta espécie possuem, via de regra, seus locos em homozigose. Testes de progênie foram utilizados para confirmar a homozigose dos locos estudados. Conseqüentemente, diferentes bandas principais que nunca

ocorreram juntas num mesmo indivíduo são representadas como alelos distintos em homozigose.

- Sempre que duas bandas ocorreram juntas no mesmo tecido, em poucas linhagens, sugerindo a ocorrência de heterozigose para um determinado loco, foram realizados testes de progênies, a fim de analisar essa possibilidade.

- Bandas de tecidos diferentes com a mesma MR foram consideradas como produtos do mesmo loco, excetuando-se os casos em que se comprove que as mesmas sejam governadas por sistemas de regulação diferentes ou que seja detectado um outro alelo (de MR diferente) em apenas um dos tecidos.

- Excluindo os casos de modificações pós-síntese em enzimas de um determinado tecido, todas as bandas de tecidos diferentes com MR distintos não foram consideradas como aloenzimas. Todas as bandas não classificadas como aloenzimas foram consideradas controladas por locos independentes.

3.4 M D H (EC 1.1.1.37)

Para o sistema das malato desidrogenases (MDH) foi detectado um total de 7 bandas anódicas. Na Figura 2 estão representados os padrões isoenzimáticos (PI) encontrados em cada uma das três populações analisadas de *Hordeum euclaston*. Abaixo de cada padrão é indicado, por população,

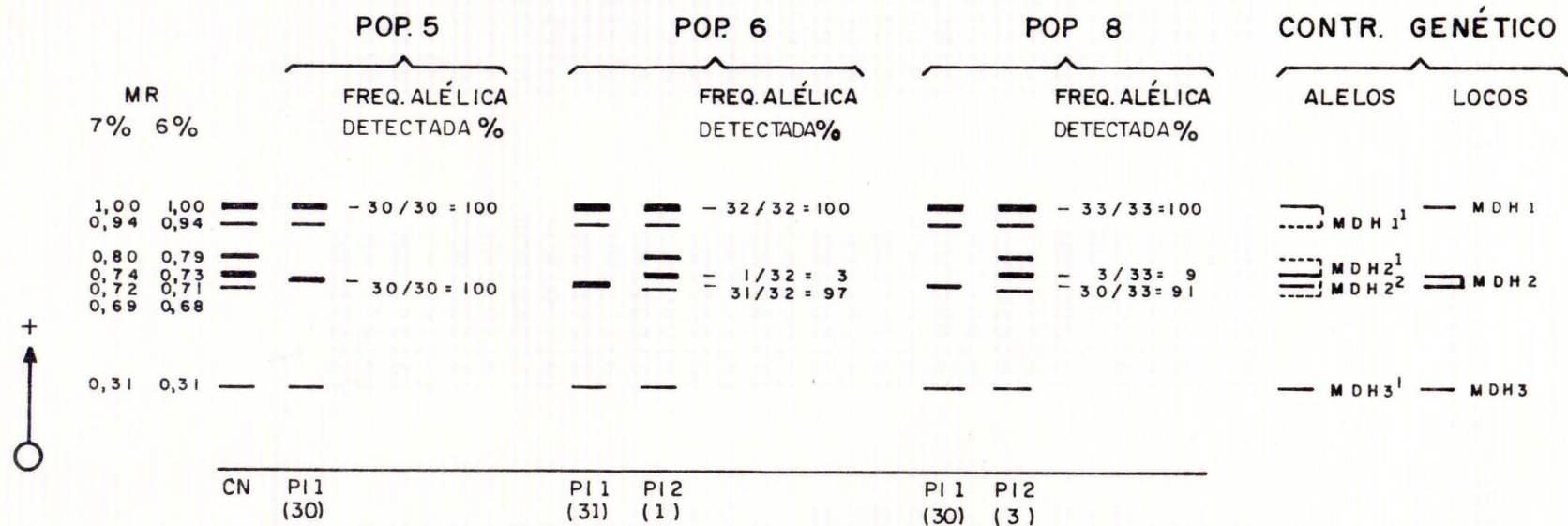


Figura 2: Padrões isoenzimáticos de malato desidrogenase dos coleóptilos e raízes das linhagens das três populações de *H. euclaston*. Abaixo de cada padrão (PI) é indicado, por população, o número de indivíduos que o apresentaram. A esquerda é dada a migração relativa de cada banda nas duas condições de migração em que a análise foi feita. A direita, o provável controle genético das isoenzimas com os alelos de cada loco ligados por linhas cheias e as bandas secundárias ligadas à principal por linhas tracejadas. Também é dada a frequência alélica em cada população e o padrão do controle (CN: cultivar MN 599 de *H. vulgare*).

TABELA IV: Listagem das linhagens analisadas pelo padrão isoenzimático (PI) apresentado no sistema MDH.

PI1	PI1	PI1	PI2
HW3246 (8)	SCM1055 (6)	HW3080 (5)	HW3121 (8)
HW3256 (8)	HW3171 (6)	HW3165 (5)	HW3136 (8)
SCM1122 (8)	HW3256 (6)	HW3159 (5)	HW3134 (8)
HW3258 (8)	HW3095 (6)	HW3152 (5)	SCM1048 (6)
HW3298 (8)	HW3190 (6)	SCM1019 (5)	
SCM1113 (8)	HW3101 (6)	SCM1028 (5)	
HW3128 (8)	HW3105 (6)	SCM1037 (5)	
EKS3H (8)	SCM1038 (6)	HW3082 (5)	
SCM1107 (8)	SCM1043 (6)	SCM1031 (5)	
SCM1125 (8)	HW3104 (6)	HW3162 (5)	
EKS3B (8)	HW3188 (6)	HW3154 (5)	
HW3253 (8)	SCM1053 (6)	SCM1026 (5)	
HW3240 (8)	HW3171 (6)	SCM1021 (5)	
HW3130 (8)	HW3193 (6)	HW3088 (5)	
SCM1119 (8)	HW3182 (6)	SCM1023 (5)	
HW3259 (8)	SCM1050 (6)	HW3156 (5)	
HW3132 (8)	SCM1045 (6)	HW3086 (5)	
SCM1104 (8)	HW3177 (6)	SCM1034 (5)	
HW3244 (8)	HW3099 (6)	SCM1017 (5)	
HW3133 (8)	SCM1040 (6)	SCM1032 (5)	
HW3139 (8)	HW3183 (6)	HW3163 (5)	
SCM1115 (8)	HW3173 (6)	HW3078 (5)	
SCM1111 (8)	HW3175 (6)	SCM1029 (5)	
HW3249 (8)	SCM1057 (6)	HW3160 (5)	
SCM1105 (8)	SCM1042 (6)	HW3081 (5)	
SCM1126 (8)	HW3102 (6)	HW3158 (5)	
HW3297 (8)	SCM1052 (6)	HW3087 (5)	
HW3282 (8)	HW3191 (6)	HW3083 (5)	
HW3258 (8)	HW3176 (6)	HW3164 (5)	
SCM1112 (8)	HW3179 (6)	HW3089 (5)	
	HW3172 (6)		

o número de indivíduos que o apresentaram. Informa-se, também, a migração relativa de cada banda nas duas condições de migração em que a análise foi realizada. Na Tabela IV estão listadas as linhagens pelo PI apresentado na Figura 2.

A análise do comportamento das bandas nas plantas estudadas permitiu a determinação de 4 bandas principais e 3 possíveis secundárias (ver determinação das principais e secundárias), as quais possivelmente representam 3 locos distintos para o sistema de MDH em *H. euclaston*. Esses locos com seus alelos, ligados por linhas cheias, e as bandas secundárias, ligadas a principal por linhas tracejadas, são indicadas na Figura 2. É indicado, também, a frequência de cada alelo nas diferentes populações.

Não foi detectada variação no padrão de bandas entre os tecidos analisados (coleóptilo e raiz) de um mesmo indivíduo, conforme é mostrado na Figura 3. Entretanto, a raiz sempre apresentou o padrão total de bandas menos intenso que o padrão do coleóptilo. Em testes iniciais não detectou-se atividade de MDH no endosperma. Por este motivo este tecido não foi incluído nas análises eletroforéticas subsequentes.

O loco MDH1, o qual controla a banda mais anódica, mostrou-se monomórfico, com um padrão de bandas idêntico ao do controle (cultivar MN599 de *H. vulgare*). Além da banda principal ($MR_6\% = 1,00$), há uma provável banda secundária de

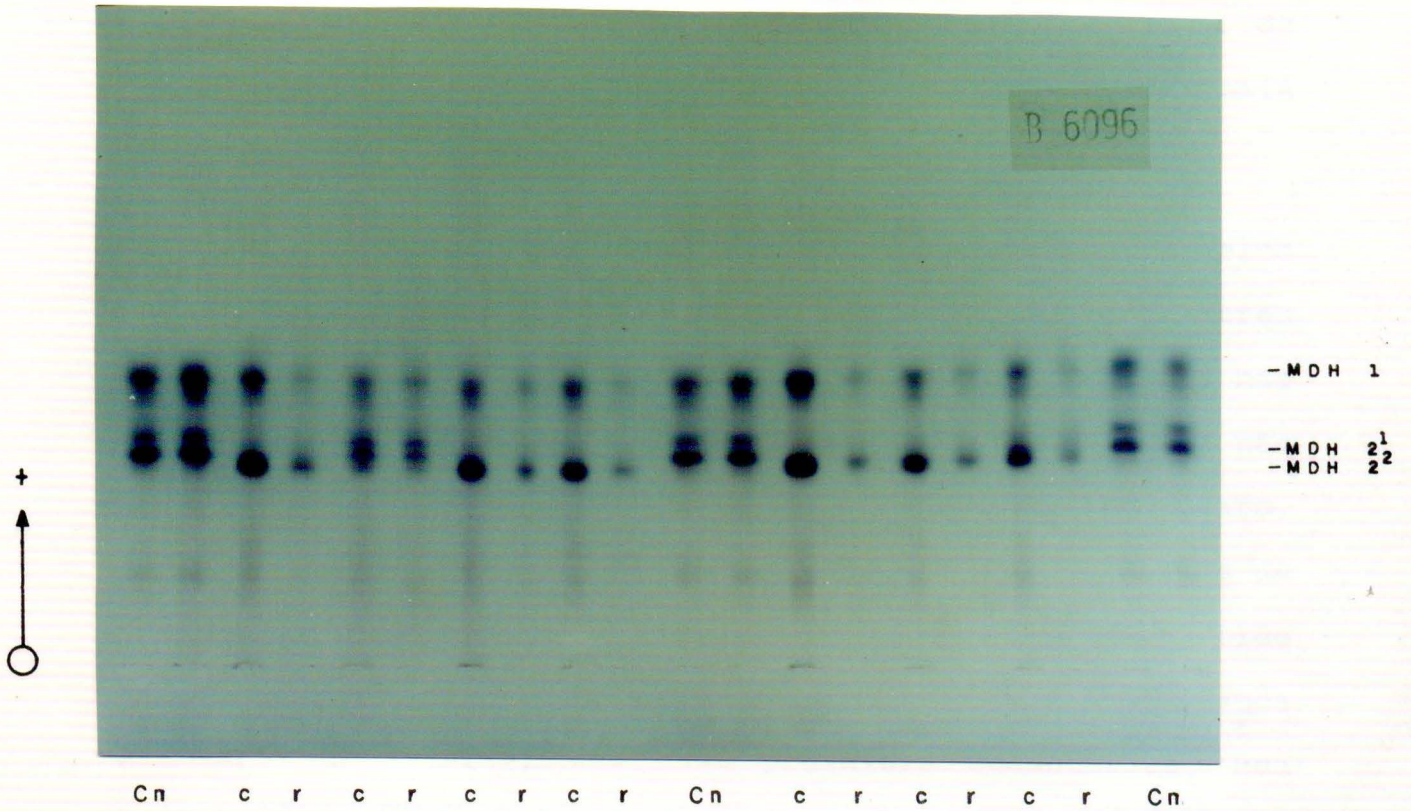


Figura 3: Padrões isoenzimáticos das malato desidrogenases (MDH) dos coleóptilos (c) e raízes (r) de sete linhagens. As linhagens utilizadas, listadas da esquerda para a direita, são: HW3164(5), HW3134(8), HW3089(5), HW3258(8), HW3179(6), SCM1112(8) e HW3172(6). A direita é indicado o provável controle genético das bandas. Aplicações controle (Cn): coleóptilos da cultivar MN599 de *H. vulgare*. Concentração do gel: 6%.

migração um pouco mais lenta ($MR6\%=0,93$). Concluiu-se tratar de uma banda secundária pelo fato de sua presença e intensidade ser sempre relativa a intensidade da banda de $MR6\%=1,00$, que, por sua vez, apresentou-se sempre mais forte.

O loco MDH2 é polimórfico, com dois alelos presentes. O MDH2² ($MR6\%=0,71$) é o mais freqüente nas três populações, ocorrendo com freqüências de 100%, 97% e 91% nas populações 5, 6 e 8, respectivamente. Este alelo não apresenta bandas secundárias. O alelo MDH2¹ é bem mais raro, tendo sido detectado nas populações 6 e 8 com freqüências de 3% e 9%, respectivamente. O padrão do alelo MDH2¹ é idêntico ao apresentado pelo controle, com a presença de uma banda principal ($MR6\%=0,73$) com duas prováveis secundárias, uma mais anódica ($MR6\%=0,79$) e uma mais lenta ($MR6\%=0,68$).

A possibilidade dos indivíduos com o padrão isoenzimático de 3 bandas para o loco MDH2 corresponder ao padrão de heterozigotos para uma enzima dimérica, foi analisada por um teste de progênie. O resultado deste teste é mostrado na Figura 4, onde pode se verificar que todos os indivíduos-irmãos descendentes da planta HW3121(8) apresentaram o mesmo padrão, eliminando a possibilidade de tratar-se de um heterozigoto.

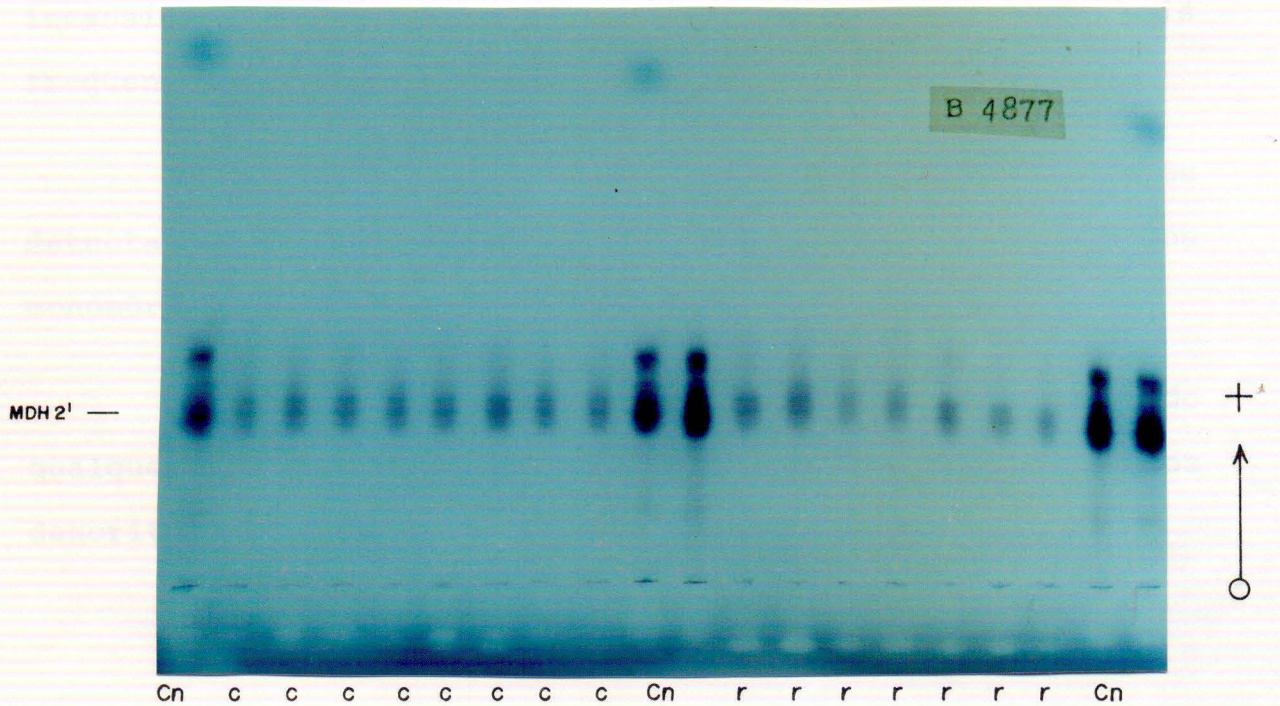


Figura 4: Padrões isoenzimáticos das malato desidrogenases (MDH) dos coleóptilos (c) e raízes (r) de oito indivíduos da linhagem HW3121(8). Um dos indivíduos não apresentou raízes suficientemente desenvolvidas para a análise. A esquerda é indicada a posição da banda principal do alelo MDH2¹, presente em todas as aplicações. Aplicações controle (Cn): coleóptilos de plântulas da cultivar MN599 de *H. vulgare*. Concentração do gel: 7%.

O terceiro loco, MDH3, determina uma banda de atividade muito fraca, aparentemente homóloga a banda do controle. Essa banda foi detectada em poucos géis, no coleóptilo de indivíduos das três populações, tendo um dos indivíduos apresentado a banda também na raiz, mas com pouca intensidade. No controle essa banda aparece mais freqüentemente.

Na Figura 3 pode-se visualizar os dois alelos detectados no loco MDH2, bem como os dois outros locos monomórficos.

Em nenhum dos indivíduos analisados foi encontrado qualquer indício de que algum dos padrões isoenzimáticos descritos corresponda a um heterozigoto.

3.5 G O T (EC 2.6.1.1)

Para o sistema das glutamato oxalacetato transaminases (GOT) foram detectados um total de 8 bandas anódicas. Na Figura 5 estão representados os padrões isoenzimáticos (PI) encontrados em cada uma das três populações analisadas de *Hordeum euclaston*. Abaixo de cada padrão é indicado, por população, o número de indivíduos que o apresentaram. Informa-se, também, a migração relativa (MR) de cada banda. Na Tabela V estão listadas as linhagens pelo PI apresentado na Figura 5.

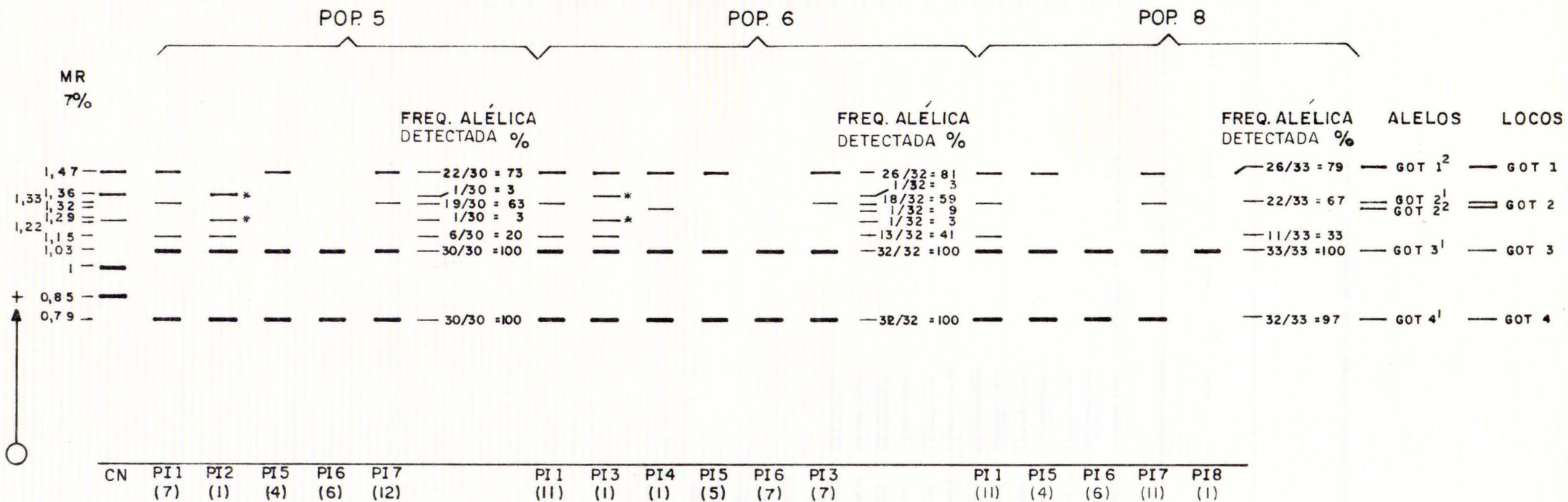


Figura 5: Padrões isoenzimáticos (PI) das glutamato oxalacetato transaminases (GOT) dos coleóptilos e raízes das linhagens das três populações de *Hordeum euclaston*. Abaixo de cada padrão é indicado, por população, o número de indivíduos que o apresentaram. É dada a migração relativa (MR) de cada banda e a frequência alélica detectada em cada população. É apresentado o provável controle genético das bandas mais frequentes, com indicação dos locos e seus respectivos alelos. *= bandas que parecem ser resultados da ativação de outros locos não comuns nesse estágio do desenvolvimento (ver texto). Também é representado o padrão do controle (CN): coleóptilos da cultivar MN599 de *H. vulgare*.

Tabela V: Listagem das linhagens analisadas pelo padrão isoenzimático (PI) apresentado no sistema GOT.

PI1	PI2	PI3	PI4	PI5	PI6	PI7	PI8
SCM1034(5)	HW3080(5)	HW3173(6)	SCM1042(6)	HW3165(5)	SCM1037(5)	HW3159(5)	HW3121(8)
SCM1017(5)				SCM1023(5)	HW3082(5)	HW3152(5)	
SCM1029(5)				HW3086(5)	SCM1031(5)	SCM1019(5)	
HW3160(5)				HW3087(5)	HW3162(5)	SCM1028(5)	
HW3081(5)				HW3190(6)	HW3154(5)	SCM1026(5)	
HW3158(5)				SCM1038(6)	HW3164(5)	SCM1021(5)	
HW3089(5)				SCM1043(6)	HW3101(6)	HW3088(5)	
HW3104(6)				SCM1045(6)	SCM1053(6)	HW3156(5)	
HW3188(6)				HW3177(6)	HW3171(6)	SCM1032(5)	
SCM1040(6)				HW3238(8)	HW3193(6)	HW3163(5)	
HW3083(6)				HW3298(8)	HW3182(6)	HW3078(5)	
SCM1051(6)				HW3128(8)	SCM1050(6)	HW3083(5)	
HW3102(6)				HW3244(8)	SCM1048(6)	SCM1055(6)	
SCM1052(6)					HW3136(8)	HW3171(6)	
HW3191(6)					SCM1107(8)	HW3180(6)	
HW3176(6)					SCM1125(8)	HW3095(6)	
HW3179(6)					EKS3H(8)	HW3105(6)	
HW3172(6)					SCM1119(8)	HW3099(6)	
SCM1104(8)					HW3132(8)	HW3175(6)	
SCM1115(8)						HW3246(8)	
SCM1111(8)						HW3256(8)	
HW3249(8)						SCM1122(8)	
HW3134(8)						SCM1113(8)	
HW3258(8)						EKS3B(8)	
SCM1112(8)						HW3253(8)	
SCM1105(8)						HW3240(8)	
SCM1126(8)						HW3130(8)	
HW3297(8)						HW3259(8)	
HW3282(8)						HW3133(8)	
						HW3139(8)	

Com a análise dos padrões de bandas apresentados pelos indivíduos estudados pode-se identificar pelo menos 7 bandas, aparentemente, principais. A banda de $MR7\%=1,15$ talvez represente uma secundária da banda de $MR7\%=1,07$. Ao que tudo indica existem pelo menos 4 locos estruturais envolvidos nos padrões isoenzimáticos de GOT. Esses locos e seus alelos, representados por linhas cheias, são indicados na Figura 5. Somente são indicadas as bandas cujo controle genético é claro. É também mostrada a frequência de cada alelo nas diferentes populações.

Não foi observada variação tissular qualitativa nos padrões de bandas dos dois tecidos analisados, entretanto a raiz normalmente apresenta o padrão inteiro um pouco mais fraco que o coleóptilo, conforme pode ser visto na Figura 6. Além disso, a intensidade relativa das bandas dos locos GOT3 e GOT4 parece diferir entre os dois tecidos. Na maioria dos indivíduos a banda do loco GOT3 aparece mais intensa no coleóptilo do que a de GOT4, que por sua vez aparece mais intensa ou com a mesma intensidade que a banda de GOT3 na raiz (ver Figura 6).

Em testes iniciais não foi detectada atividade de GOT no endosperma. Por este motivo este tecido não foi incluído nas análises eletroforéticas subsequentes.

Todas as isoenzimas de GOT perdem atividade com estocagem a -16°C . Excetuando-se as isoenzimas de GOT3 e

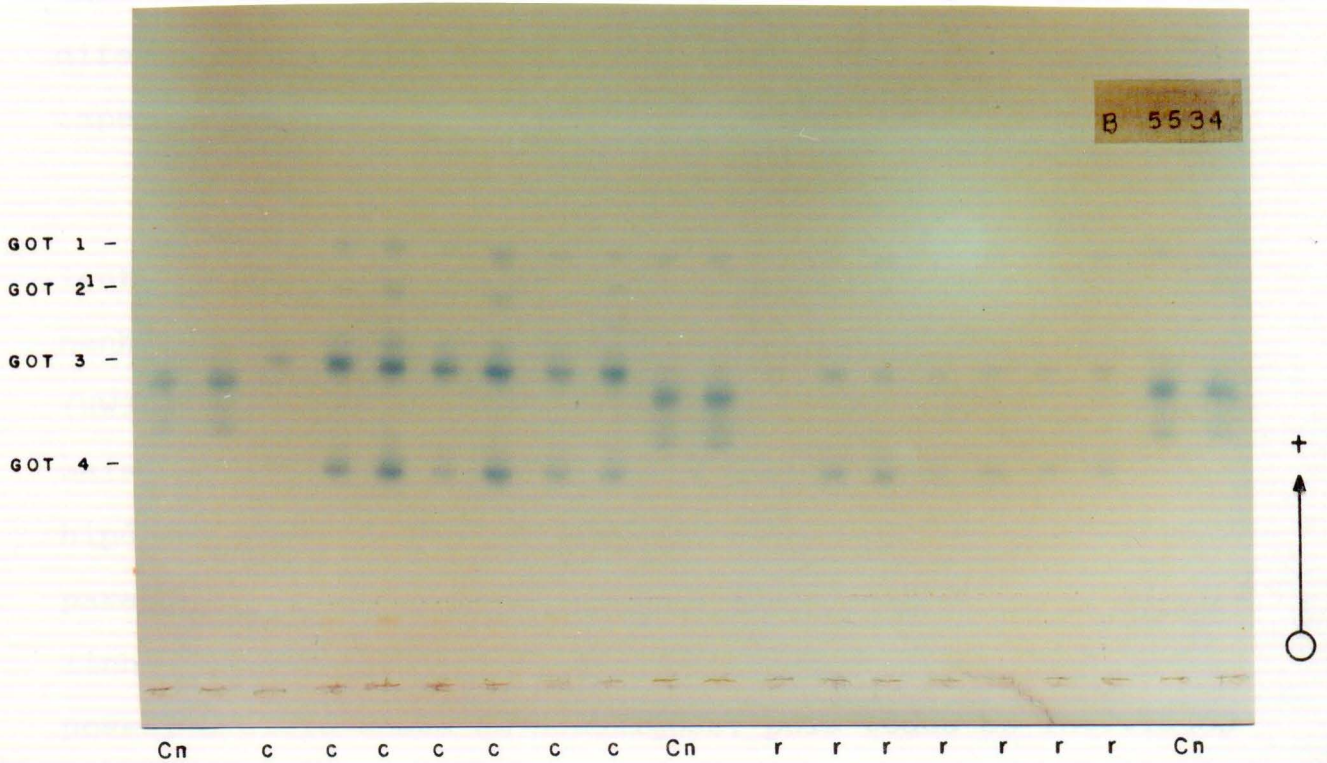


Figura 6: Padrões isoenzimáticos das glutamato oxalacetato transaminases (GOT) dos coleótilos (c) e raízes (r) de sete linhagens. As linhagens utilizadas, listadas da esquerda para a direita, são: SCM 1048(6), SCM1034(5), SCM1040(6), SCM1017(5), HW3183(6), HW3088(5) e HW3173(6). A esquerda é indicado o provável controle genético das bandas mais frequentes. Aplicações controle (Cn): coleótilos da cultivar MN599 de *H. vulgare*. Concentração do gel: 7%.

GOT4, que resistem a estocagem por mais de uma semana, todas as outras perdem a atividade em poucos dias. Por este motivo não foi possível obter o padrão completo de todos os indivíduos, pois o desenvolvimento das plântulas das diferentes linhagens poucas vezes foi concomitante, impedindo a análise de todas as plântulas sem estocagem.

O loco GOT4, o qual é representado pela banda mais lenta do padrão ($MR7\%=0,79$) aparentemente não apresentou nenhum tipo de variação. Entretanto, dois indivíduos (HW3082(5) e HW3121(8)), os quais possuíam o padrão inteiro mais fraco, não apresentaram a banda. A fim de verificar a hipótese destes dois indivíduos apresentarem um alelo nulo para o loco GOT4 foi realizado um teste de progênie da linhagem HW3082(5), o qual demonstrou que esta linhagem possui o alelo comum em homozigose, pois todos os indivíduos (submetidos por um tempo menor a estocagem) apresentaram a banda. O mesmo não foi realizado para a linhagem HW3121(8) devido a falta de sementes, mas, considerando-se que os padrões dos dois indivíduos que não apresentaram a banda de $MR7\%=0,79$ eram praticamente idênticos, consideramos que ela possua o mesmo genótipo da linhagem HW3082(5). Entretanto não pode ser excluído a possibilidade da linhagem HW3121(8) possuir um alelo nulo (em homozigose) para o loco GOT4.

O loco GOT1 foi também bastante constante. Entretanto o indivíduo analisado da linhagem HW3080(5) (ver PI2 da Figura 5) não apresentou a banda de GOT1 ($MR7\%=1,47$),

apesar desta ser uma banda de intensidade relativamente forte e mais resistente a estocagem que a de GOT2, sugerindo a ocorrência de um alelo nulo neste indivíduo ou de diferenças regulatórias.

O loco GOT2, ao contrário dos anteriores, é polimórfico na população 6. Teste de progênie da linhagem SCM1042(6) (ver Figura 7), onde foram analisados os coleóptilos de oito indivíduos não submetidos a estocagem, comprovou que essa linhagem possui um alelo raro em homozigose (PI4 da Figura 5), cuja banda ($MR7\%=1,32$) possui uma velocidade de migração um pouco mais lenta que a banda do alelo comum ($MR7\%=1,33$). Neste teste foram analisados coleóptilos cujos comprimentos variaram entre 0,4 cm e 3,0 cm, eliminando a possibilidade de tratar-se de uma variação ontogenética. Como controle foi utilizada a linhagem HW3175(6) (também *H. euclaston*) cujos indivíduos, também não submetidos a estocagem, apresentaram a banda do alelo comum.

Além disso, os indivíduos das linhagens HW3080(5) (PI2 da Figura 5) e HW3173(6) (PI3 da Figura 5) apresentaram um padrão diferente dos demais, com duas bandas (bandas marcadas com um * na Figura 5 e presentes na Figura 7), uma mais lenta ($MR7\%=1,24$) e outra mais rápida ($MR7\%=1,36$) que a banda comum (ver Figura 6). A migração relativa (MR) da banda rápida é idêntica a de uma banda presente no controle (*H. vulgare*, cultivar MN599), enquanto que a mais lenta difere um pouco ($MR7\%=1,24$) de outra banda do controle

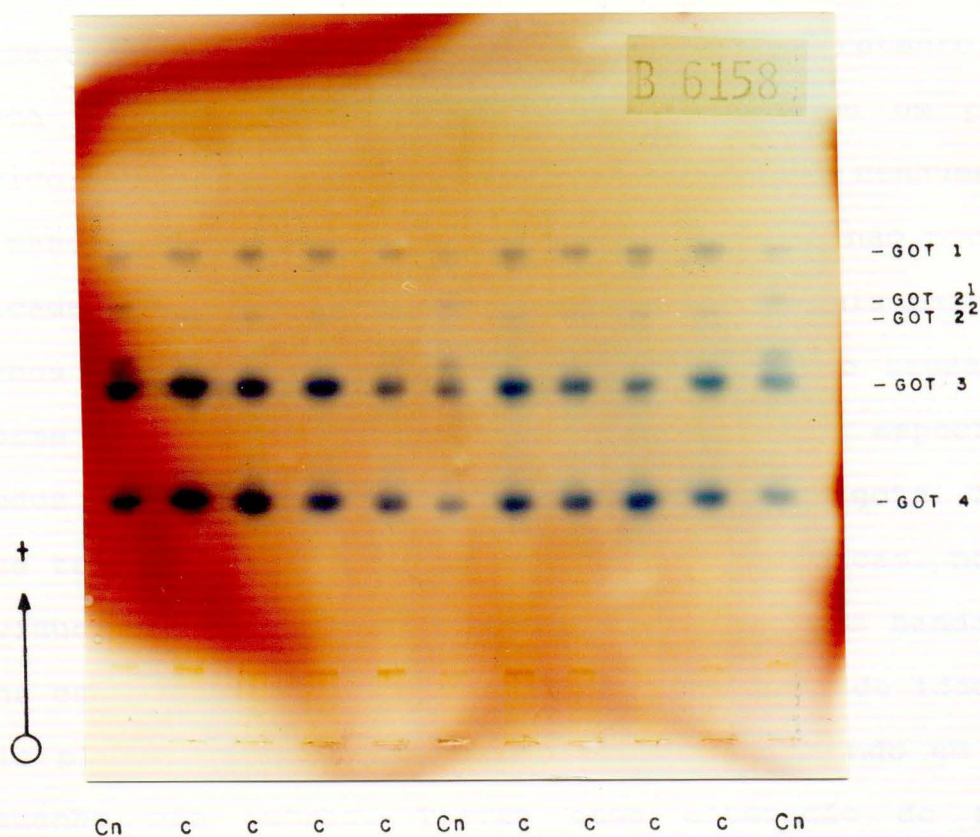


Figura 7: Padrões isoenzimáticos das glutamato oxalacetato transaminases (GOT) dos coleóptilos (c) de indivíduos pertencentes a linhagem SCM1042(6). O comprimento do coleóptilo das plântulas utilizadas variou entre 0,4cm e 3cm e a idade entre dois e sete dias após a germinação. A direita é indicado o provável controle genético das bandas mais frequentes. Aplicações controle (Cn): coleóptilos de indivíduos da linhagem HW3175(6) de *H. euclaston*. Concentração do gel: 7%.

(MR7%=1,22). Testes de progênie com vários indivíduos decada uma dessas linhagens não foram possíveis devido ao pequeno número de sementes disponíveis e a perda de atividade com a estocagem dos indivíduos. Entretanto, uma segunda plântula da linhagem HW3173(6) mostrou um padrão idêntico ao comum, sem apresentar, portanto, nenhuma das duas bandas de sua plântula-irmã. Essa variação não pode ser explicada por segregação mendeliana clássica, pois para isso teríamos que supor vários eventos de fecundação cruzada, e conforme os resultados obtidos indicam essa espécie se reproduz por autofecundação e é altamente homozigota. Também não se trata de mudanças regulatórias ontogenéticas, pois os indivíduos que apresentaram o padrão com as duas bandas não comuns estão dentro da mesma faixa de tamanho e de idade das demais plântulas analisadas, inclusive coincidindo em idade e tamanho com outras. Talvez essa alteração do padrão corresponda a ativação e desativação de locos promovida por elementos de transposição. Contudo, uma avaliação mais precisa da magnitude desta variação somente seria possível com um maior número de testes de progênie com indivíduos não submetidos a estocagem. Além disso, a ocorrência da banda de MR7%=1,36, presente em *H. vulgare*, também em *H. euclaston* parece mostrar que os genomas das duas espécies, devido a diferenças regulatórias, podem possuir um grau de similaridade maior do que o observado por simples comparações dos padrões isoenzimáticos nesse estágio do desenvolvimento.

A banda principal do loco GOT3 ($MR7\%=1,07$) não apresentou nenhuma variação aparente, estando presente em todos os indivíduos analisados. Entretanto há uma dúvida se a banda mais próxima ($MR7\%=1,15$) é uma secundária de GOT3 ou se representa um loco independente (ver Figura 5). Em um teste de progênie da linhagem SCM1042(6) (ver Figura 7), já mencionado, constatou-se que todos os indivíduos, não submetidos a estocagem, não apresentaram a banda de $MR7\%=1,15$, apesar de terem a banda de $MR7\%=1,07$ muito intensa. Conseqüentemente chega-se a conclusão de que há variação nesta banda. Uma possível explicação para esta variação, considerando-se que a banda represente uma secundária, seria a presença de um alelo raro em GOT3, cuja diferença estrutural de sua proteína, em relação a proteína do alelo comum, resulta em uma banda com a mesma velocidade de migração, sem, no entanto, apresentar a banda secundária. Também pode-se supor que haja polimorfismo em um loco modificador, responsável pela síntese da substância que altera a enzima primária. Deve-se ressaltar que, caso a banda de $MR7\%=1,15$ realmente corresponda a uma secundária de GOT3, a modificação pós-síntese não deve ocorrer "in vitro", durante a estocagem, pois enquanto a banda de $MR7\%=1,07$ é a mais resistente a estocagem, a sua possível secundária é a mais sensível de todas. Pode-se assim supor uma modificação "in vivo".

Uma outra explicação para a variação na banda de $MR7\%=1,15$, agora considerando que ela represente um loco independente de GOT3, seria a presença de um alelo nulo na linhagem SCM1042(6). É também possível que esta variação seja decorrente de diferenças regulatórias não-ontogenéticas.

Nenhuma das hipóteses pode ser descartada, necessitando-se de maiores informações para uma conclusão clara a respeito das mesmas.

Comparando-se as freqüências dos padrões isoenzimáticos das populações (Figura 5) nota-se que todas as variações apresentadas em GOT restringem-se as populações 5 e 6, tendo a população 8 mantido o mesmo padrão em todas as plântulas submetidas a análise.

Nos testes de progênie e indivíduos analisados de todas as linhagens não foi encontrado qualquer indício de que algum dos padrões descritos corresponda a um heterozigoto para locos estruturais.

Além dos padrões de bandas já mencionados, os géis corados para GOT apresentaram, nos coleóptilos de quase todos os indivíduos, bandas amareladas bem lentas que, aparentemente, não constituem isoenzimas de GOT (ver Figuras 6 e 7).

3.6 E S T (EC 3.1.1.1)

Para o sistema das esterases (EST) foram detectadas um total de 38 bandas, sendo 9 com atividade beta-esterásica (utilizam beta-naftilfosfato como substrato), 27 bandas com atividade alfa-esterásica (utilizam alfa-naftilfosfato como substrato) e 2 bandas com ambas as atividades. As bandas com atividade beta coram em um tom avermelhado enquanto que as bandas com atividade alfa coram acinzentado. As bandas com ambas as atividades possuem uma mistura das duas tonalidades (ver Figuras 9, 10 e 11).

Na Figura 8 estão representadas os padrões isoenzimáticos de todos os indivíduos analisados separados por população. São também indicadas a migração relativa (MR) das bandas, os alelos e locos e a frequência alélica.

Algumas das bandas indicadas foram observadas no limiar de detecção, não aparecendo em todos os indivíduos analisados. Algumas outras aparecem com mais frequência quando a coloração se apresenta mais intensa, sugerindo que a técnica de coloração pode ter subestimado a presença ou intensidade destas bandas em determinados géis. Uma série de outras bandas não foram consideradas pois, além de serem muito fracas, apareceram em poucos géis e/ou apresentaram-se muito difusas. Uma análise satisfatória dessas bandas somente seria possível com alterações nas condições de migração e na técnica de coloração.

Entre as bandas cujo controle genético é claro foram determinados onze locos, com 13 bandas principais e 9 bandas secundárias. Dois destes locos são polimórficos e há nítidas diferenças entre os padrões dos três tecidos analisados (coleóptilo, raiz e endosperma; ver Figuras 9 e 10).

Todas as bandas estudadas são anódicas. Entretanto foi detectada uma banda catódica nos endospermas de alguns géis que, por aparecer eventualmente e muito difusa não foi considerada.

As bandas mais anódicas ($MR_8\%=1,38$ e $MR_8\%=1,24$) possuem atividade alfa-esterásica e somente são observadas nos géis a 8%. A banda de $MR_8\%=1,24$ sobrepõe-se a alfa-beta em 6%, havendo dúvida se a banda de $MR_8\%=1,38$ aparece muito difusa ou também se sobrepõe. Como estas duas bandas foram detectadas em poucos indivíduos, não foi estudado o seu controle genético. Entretanto o indivíduo HW3297(8) (ver Figura 8) mostra uma alteração no padrão que provavelmente represente um polimorfismo, pois a banda de $MR_8\%=1,38$ é substituída por uma de $MR_8\%=1,29$.

A banda com atividade alfa-beta de $MR_6\%=1,13$, restrita ao coleóptilo e raiz, aparentemente é derivada da sobreposição de enzimas com atividade alfa e beta. Como já foi mencionado, os géis a 8% revelam duas bandas alfa ($MR_8\%=1,24$ e $MR_8\%=1,38$) que não estão presentes nos géis a 6%. Conseqüentemente pode-se concluir que há mais de uma

enzima com atividade alfa presente na banda alfa-beta nos géis a 6%. Como alguns indivíduos (HW3160(5), por exemplo; ver Figura 8) apresentam uma banda alfa de $MR_{6\%}=1,13$ no endosperma, e outras (SCM1032(5) e HW3163(5)) uma banda beta de mesmo MR, pode-se supor que a banda alfa-beta detectada no géis a 8% continua sendo uma sobreposição de pelo menos duas enzimas de atividades diferentes. Não havendo nenhuma evidência em contrário supõe-se que haja somente uma enzima com atividade beta. O loco da enzima beta foi denominado EST1 (ver Figura 8), não tendo sido detectado nenhum tipo de polimorfismo estrutural. Entretanto, como já citado, os indivíduos SCM1032(5) e HW3163(5) apresentaram EST1 ativo também no endosperma, representado por bandas beta pouco intensas (ver Figura 8). Além disso, indivíduos de três linhagens não apresentaram a banda alfa-beta ($MR_{6\%}=1,13$) na raiz (ver Figura 8: HW3182(6), HW3159(5) e HW3132(8)). A raiz do indivíduo da linhagem HW3159(5), inclusive, não apresentou qualquer tipo de atividade esterásica, provavelmente por problemas de estocagem ou manuseio, apesar de ter, aparentemente, sofrido um tratamento idêntico ao das raízes das outras plântulas. Alguns indivíduos apresentaram uma banda alfa pouco intensa no endosperma também com $MR_{6\%}=1,13$ (ver Figura 8: HW3160(5), por exemplo), que deve ser produto de outro loco não analisado.

Os locos EST2 e EST3 são representados por bandas beta cujos $MR_{6\%}$ são respectivamente 1,1 e 1,05 e reúnem-se

em uma única banda de $MR8\%=1,03$ nos géis a 8%. Estas bandas são restritas ao coleóptilo e não aparecem nos indivíduos de todas as linhagens. As bandas sempre aparecem juntas, sendo a única exceção o indivíduo da linhagem HW3132(8) (ver Figura 8) que somente apresentou a banda de EST2 muito fraca. A intensidade das duas bandas normalmente é similar, podendo, em alguns indivíduos, a banda de EST2 aparecer mais intensa. Foi feito um estudo ontogenético e um teste de progênie com a linhagem HW3171(6), a qual possui EST2 e EST3 ativos. No teste de progênie todos os indivíduos-irmãos apresentaram o mesmo padrão, com as duas bandas de EST2 e EST3 (com exceção de uma única planta que estava com fungos e que mostrou um padrão diferente, sem essas duas bandas beta e outras alterações nas bandas dos locos EST9 e EST10), indicando não tratar-se de indivíduos heterozigotos para um mesmo loco estrutural. No estudo ontogenético, onde foram utilizados indivíduos cujos comprimentos dos coleóptilos variaram entre 0,85 cm e 2,35 cm, não foram observadas diferenças entre os mesmos. Este resultado permite concluir que as diferenças de presença e ausência de bandas entre linhagens distintas não são devidas a diferenças ontogenéticas, mas sim a diferenças regulatórias num mesmo estágio do desenvolvimento.

Entretanto esta constância não é uma característica de todas as linhagens. Um teste de progênie da linhagem SCM1112(8) (ver Figura 11) mostrou cinco

indivíduos que não apresentavam o padrão com as duas bandas beta e três indivíduos que o apresentavam, além de outras diferenças. Estas variações serão analisadas em detalhe mais adiante.

O número de linhagens que apresentaram as duas bandas beta variou bastante entre as populações, indo de $19/32=59\%$ na população 6 a $6/33=18\%$ na população 8. A frequência de ocorrência das duas bandas na população 5 foi de $16/30=53\%$.

Além das bandas beta já descritas há uma banda alfa, também de $MR6\%=1,1$, que, portanto, se sobrepõe a banda beta mais lenta nos géis a 6%. O resultado da sobreposição é uma banda alfa-beta, a qual foi verificada nas linhagens HW3173(6), HW3191(6), HW3158(5) e parte dos indivíduos da linhagem SCM1112(8) (ver Figuras 8 e 11). Nos géis a 8% ambas as bandas beta se sobrepõem a banda alfa formando também uma banda alfa-beta. Esta banda alfa foi considerada sob controle do loco EST4. Na maioria das linhagens em que a banda aparece ela se restringe ao coleóptilo, mas algumas vezes também é detectada na raiz. Assim como EST2 e EST3, EST4 também não está ativo em todas as linhagens estudadas. Além disso EST4 também não apresentou o mesmo padrão de atividade em todos os indivíduos-irmãos analisados no teste de progênie da linhagem SCM1112(8) (já mencionado, ver Figura 11).

As bandas de EST2 e EST3 foram consideradas produtos de locos diferentes por não apresentarem características de secundárias, entretanto não pode ser descartada a hipótese de uma das bandas corresponder a uma secundária. Com certeza, caso as bandas beta realmente correspondam a locos distintos, EST2 e EST3 são ativados e desativados em conjunto, o que significa que ambos compartilham da mesma "via" de regulação.

O loco EST5 é representado por uma banda alfa de $MR6\%=0,98$ que aparece nos coleóptilos de quase todas as linhagens e nas raízes de algumas. Não foi detectado nenhum tipo de polimorfismo estrutural para EST5, porém o teste de progênie da linhagem SCM1112(8), (ver Figura 11) mostrou diferenças de intensidade entre indivíduos-irmãos, um comportamento muito semelhante ao de EST4, que certamente não podem ser explicados por diferenças ontogenéticas. Nos demais testes de progênie realizados (19 linhagens) não foi detectada qualquer variação dentro da mesma linhagem.

Alguns indivíduos apresentaram uma banda alfa de $MR6\%=0,95$ (ver Figura 8), muito fraca e restrita ao coleóptilo, com exceção do indivíduo SCM1048(6) que também apresentou a banda na raiz (ver Figura 8). Esta banda é, aparentemente, monomórfica. Como a banda sempre se apresentou muito fraca e foi detectada em poucos indivíduos não foi determinado o seu controle genético. Semelhante a ela foi detectada outra banda alfa de $MR6\%=0,83$, a qual

apresentou as mesmas características. Elas foram, inclusive, encontradas associadas na maioria dos poucos indivíduos em que foram detectadas.

A banda beta de $MR6\%=0,91$, cujo loco foi denominado EST6, é restrita ao coleóptilo e raiz, estando normalmente presente nos dois tecidos. EST6 não apresentou nenhum tipo de polimorfismo estrutural, mas também não está presente em todas as linhagens. Entretanto o padrão dentro da mesma linhagem manteve-se constante em todos os vinte testes de progênie realizados.

Foram encontrados, nos indivíduos de algumas linhagens, um conjunto de bandas beta cujos $MR6\%$ foram 0,86, 0,82, 0,77 e 0,73. São restritas ao coleóptilo e raiz, sendo encontradas predominantemente no coleóptilo. As quatro bandas somente foram encontradas juntas na linhagem HW3179(6) (ver Figura 8). As bandas mais freqüentes são as duas intermediárias ($MR6\%=0,82$ e $MR6\%=0,77$). Nenhuma das bandas apresentou qualquer característica de banda secundária, entretanto, como as bandas foram detectadas em poucos indivíduos não foi determinado o seu controle genético. A fim de verificar se o padrão apresentado pelo indivíduo da linhagem HW3132(8) (ver Figura 8) correspondia ou não a um heterozigoto foi realizado um teste de progênie. Cada indivíduo-irmão apresentou um padrão distinto, com as bandas variando em intensidade e número de acordo com a intensidade do padrão geral, não caracterizando segregação

de dois alelos de um único loco. Conseqüentemente conclui-se que o(s) loco(s) responsáveis pelo padrão estão em homozigose e talvez respondendo a diferentes padrões de ativação gênica. Em todos os testes de protilis realizados

EST7 não demonstrou qualquer tipo de alteração do padrão. Além das bandas beta anteriormente descritas há pelo menos mais uma banda beta ($MR6\%=0,56$) que aparece individualizada somente no coleóptilo do indivíduo da linhagem HW3179(6) (ver Figura 8). As linhagens SCM1115(8) e HW3249(8) também parecem apresentar esta banda, entretanto nestas linhagens ela aparece na raiz, difusa e sobreposta a banda principal do alelo rápido do loco EST7 (EST7¹). Um teste de progênie na linhagem confirmou que este padrão se mantém nos indivíduos-irmãos.

O loco EST7 é polimórfico, apresentando dois alelos (EST7¹ e EST7²) que são representados por duas bandas alfa principais, cada uma com sua secundária. Os $MR6\%$ das bandas principal e secundária de EST7¹ são, respectivamente, 0,59 e 0,67, enquanto que os $MR6\%$ das bandas de EST7² são 0,52 e 0,59. O indivíduo da linhagem HW3164(5) foi o único no qual não foi possível se identificar qual alelo estava presente, pois o gel se apresentou com as bandas muito difusas e não foi possível realizar uma repetição pela falta de sementes. EST7 é o único loco ativo nos três tecidos analisados, sendo que a banda do endosperma muitas vezes se apresenta fraca e/ou difusa. Alguns poucos indivíduos não apresentaram atividade ou apresentaram as bandas difusas ou

no coleóptilo ou na raiz. A frequência dos dois alelos nas populações variou consideravelmente. EST7¹ apresentou uma frequência de 100% na população 8, 69% na população 6 e 48% na população 5. Em todos os testes de progênie realizados EST7 não demonstrou qualquer tipo de alteração do padrão dentro de uma mesma linhagem.

O indivíduo da linhagem SCM1017(5) apresentou uma banda alfa de $MR6\%=0,45$ (ver Figura 8), restrita ao coleóptilo e endosperma que não foi encontrada em nenhuma outra linhagem. Não foi possível realizar um teste de progênie devido a falta de sementes.

O loco EST11 é polimórfico, representado por bandas alfa e restrito ao endosperma e raiz. As bandas possuem velocidades de migração diferentes nos dois tecidos, o que sugere que ocorra uma modificação pós-síntese das proteínas deste loco em um destes tecidos. Há dois alelos presentes denominados EST11¹ e EST11². No endosperma a banda principal de EST11¹ possui um $MR6\%=0,26$ com a presença de uma a duas secundárias de $MR6\%=0,35$ e $MR6\%=0,43$. Na raiz a banda principal possui um $MR6\%=0,23$, podendo aparecer uma secundária de $MR6\%=0,30$ (ver Figuras 9 e 10). Já o alelo EST11² possui no endosperma uma banda principal de $MR6\%=0,12$ e de uma a três secundárias de $MR6\%=0,20$, $MR6\%=0,27$ e $MR6\%=0,33$. Na raiz a banda principal possui um $MR6\%=0,11$ e normalmente há uma secundária de $MR6\%=0,18$ (ver Figuras 9 e 10). O número de secundárias presentes variou em decorrência

da intensidade dos padrões. EST11¹ teve uma frequência pequena nas três populações, variando de 3% na população 5 a 15% na população 8, não tendo sido detectado na população 6. Não foi detectada qualquer tipo de alteração no padrão de EST11 dentro de uma mesma linhagem.

O loco EST8 não apresentou polimorfismo, sendo representado por uma banda alfa de $MR6\%=0,26$ (ver Figura 9) restrita ao coleóptilo. Entretanto o indivíduo SCM1042(6) (ver Figuras 8 e 9) apresentou uma banda alfa de $MR6\%=0,26$ na raiz, o que talvez indique que este loco também esteja ativo neste tecido. EST8 não está ativo em todas as linhagens e também não apresentou variações dentro da mesma linhagem.

O loco EST9 é representado por uma banda alfa de $MR6\%=0,18$ que, aparentemente, restringe-se ao coleóptilo, mas que talvez sobreponha-se as secundárias de EST11² na raiz e endosperma. O indivíduo da linhagem HW3130(8) (ver Figura 8), o qual possui o alelo EST11¹, possui uma banda muito fraca com os mesmos MR de EST9, sugerindo que EST9 esteja ativo no endosperma, embora em menor intensidade. Entretanto, nos indivíduos das outras linhagens que possuem o alelo EST11¹ não conseguimos detectar esta banda. EST9 parece possuir polimorfismo, porém de difícil detecção, apresentando bandas aparentemente diferentes com alturas muito semelhantes, difusas e/ou muito fracas. Somente com alterações nas condições de migração e coloração seria

possível uma avaliação do aparente polimorfismo existente. Por isso o loco EST9 foi representado na Figura 8 como monomórfico. Não foram observadas variações neste loco dentro da mesma linhagem.

O loco EST10 é representado por uma banda alfa de $MR_6\% = 0,12$, não apresenta polimorfismo estrutural e, assim como EST9, aparentemente restringe-se ao coleóptilo, com a possibilidade de haver uma sobreposição de EST10 com as bandas principais de EST11 na raiz e endosperma. O indivíduo da linhagem HW3130(8), assim como para EST9, apresentou, no endosperma, uma banda muito fraca com os mesmos MR de EST10. Também neste caso nenhum outro indivíduo com o alelo EST11¹ apresentou a banda.

Logo abaixo da banda de EST10 foi encontrado nos coleóptilos dos indivíduos da linhagens HW3099(6) e SCM1112(8) uma banda alfa de $MR_6\% = 0,06$ (ver Figura 8). A fim de verificar se este padrão correspondia a um heterozigoto foi feito um teste de progênie com a linhagem SCM1112(8) (já mencionado, ver Figura 11), o qual mostrou que diferentes indivíduos da linhagem apresentavam diferentes padrões na zona da banda de EST10, não correspondendo a nenhum tipo de segregação mendeliana. Assim como para este loco, também os padrões de ativação e desativação gênica observados para os locos EST2, EST3, EST4 e EST5 não podem ser explicados nem por segregação gênica, nem por diferenças ontogenéticas. Uma possível explicação seria a atuação de elementos de

transposição, que sabidamente podem causar alterações regulatórias e mutações em alta frequência.

Os locos EST9 e EST10 possuem diferentes regulações do seu grau de atividade em cada linhagem. Comparando-se a intensidade das bandas destes dois locos pode-se notar indivíduos que apresentam a banda de EST9 mais intensa (HW3191(6), ver Figura 8), indivíduos que apresentam a banda de EST10 mais intensa (HW3176(6), ver Figura 8) e indivíduos que apresentam as bandas com intensidades semelhantes (HW3105(6), ver Figura 8). Esse padrão de atividade permaneceu constante em todos os testes de progênie realizados, entretanto, no teste de progênie da linhagem HW3171(6) (já mencionado) um indivíduo que estava coberto por fungos apresentou o padrão EST9/EST10 alterado, além de não apresentar as bandas de EST2 e EST3 detectadas em todos os outros indivíduos da linhagem. Conseqüentemente pode-se sugerir que a infecção por fungos foi a responsável pelas alterações regulatórias observadas no indivíduo, talvez ativando o mesmo mecanismo causador das diferenças regulatórias observadas na linhagem SCM1112(8).

Nos teste de progênie e indivíduos analisados de todas as linhagens não foi encontrado qualquer indício de que algum dos padrões descritos corresponda a um heterozigoto para locos estruturais.

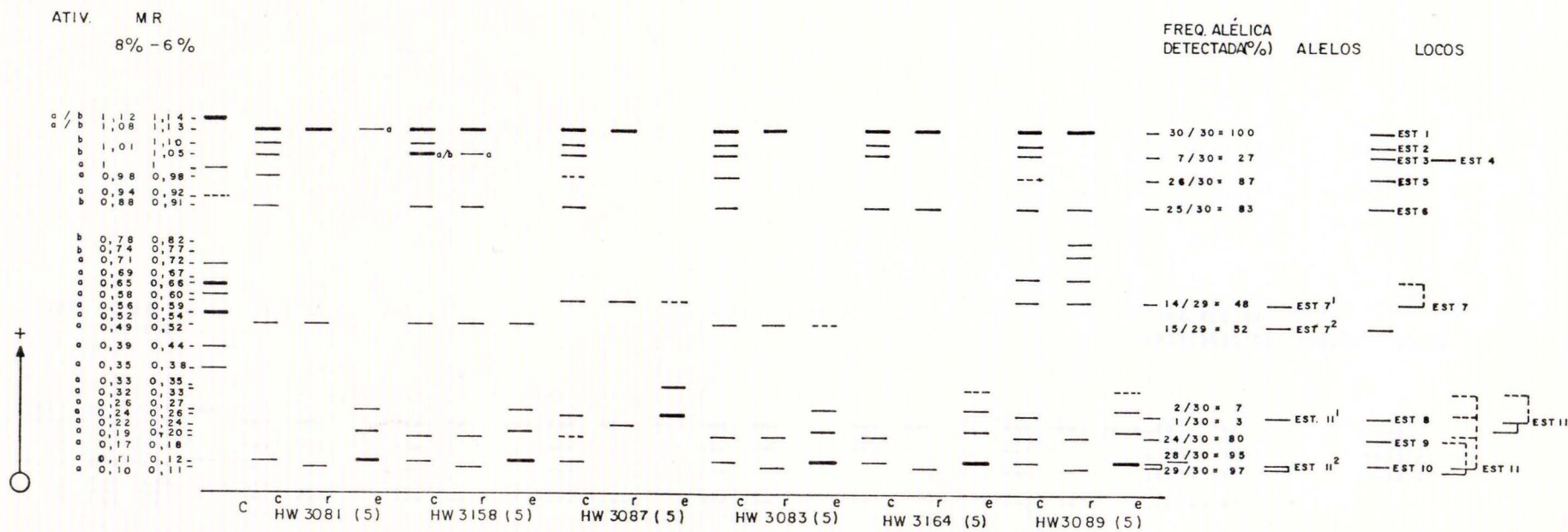


Figura 8: Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) dos coleóptilos (c), raízes (r) e endospermas (e) de *H. euclaston*. A. Linhagens da população 5. A direita são indicados a frequência alélica detectada no total da população e o provável controle genético das isoenzimas. As bandas principais são representadas por linhas cheias e as bandas secundárias, por linhas tracejadas ligadas à principal. Devido a sobreposição, total ou parcial, de alguns locos, a frequência alélica dos locos EST 8 e EST 10 é dada acima do traço indicador de suas posições. A esquerda é dada a migração relativa (MR) de cada banda nas duas condições de migração em que a análise foi feita, e a atividade predominante de cada uma (a= alfa-esterásica; b= beta-esterásica; a/b= alfa-beta-esterásica), baseada na sua coloração. Algumas bandas específicas possuem a atividade indicada a sua direita. Também é representado o padrão do controle (C): coleóptilos de plântulas da cultivar MN599 de *H. vulgare*.

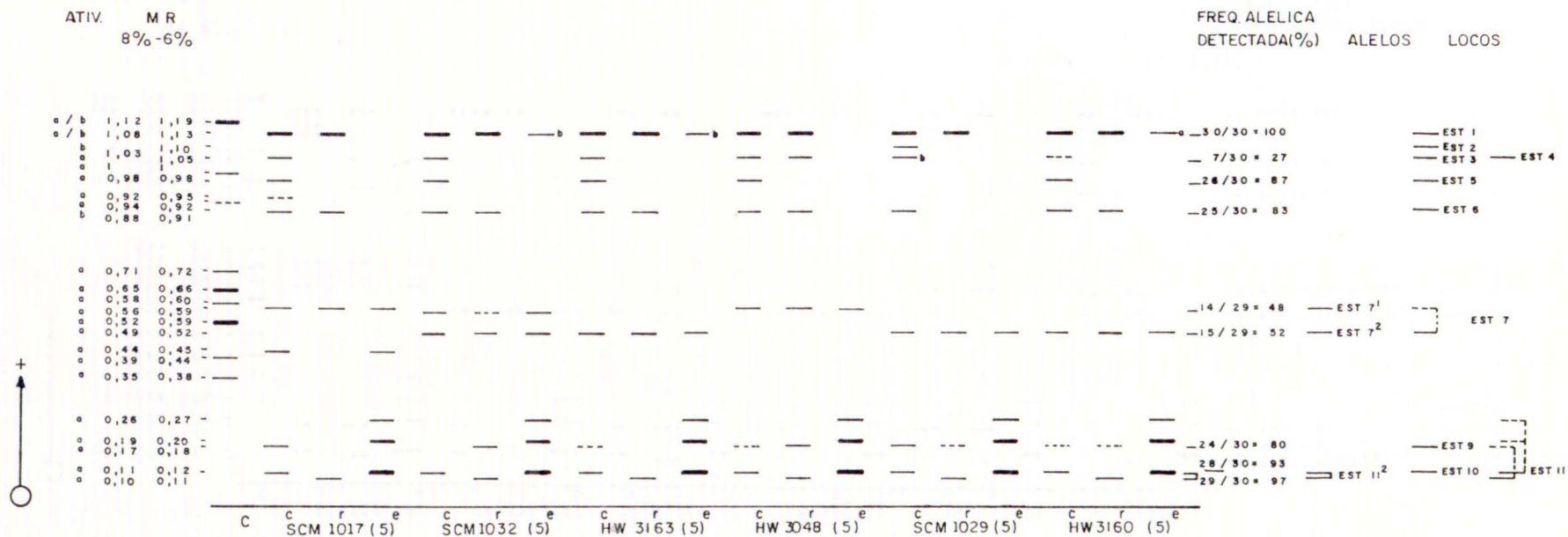


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*.
 A. Linhagens da população 5. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

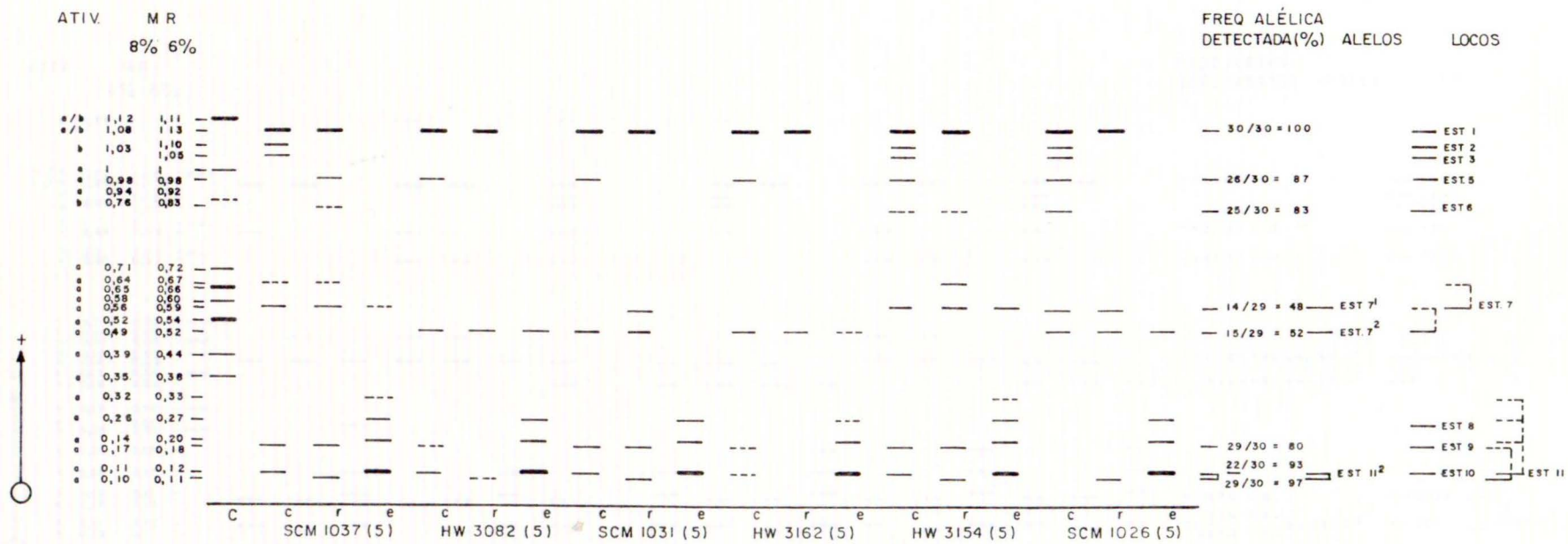


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*.
 A. Linhagens da população 5. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

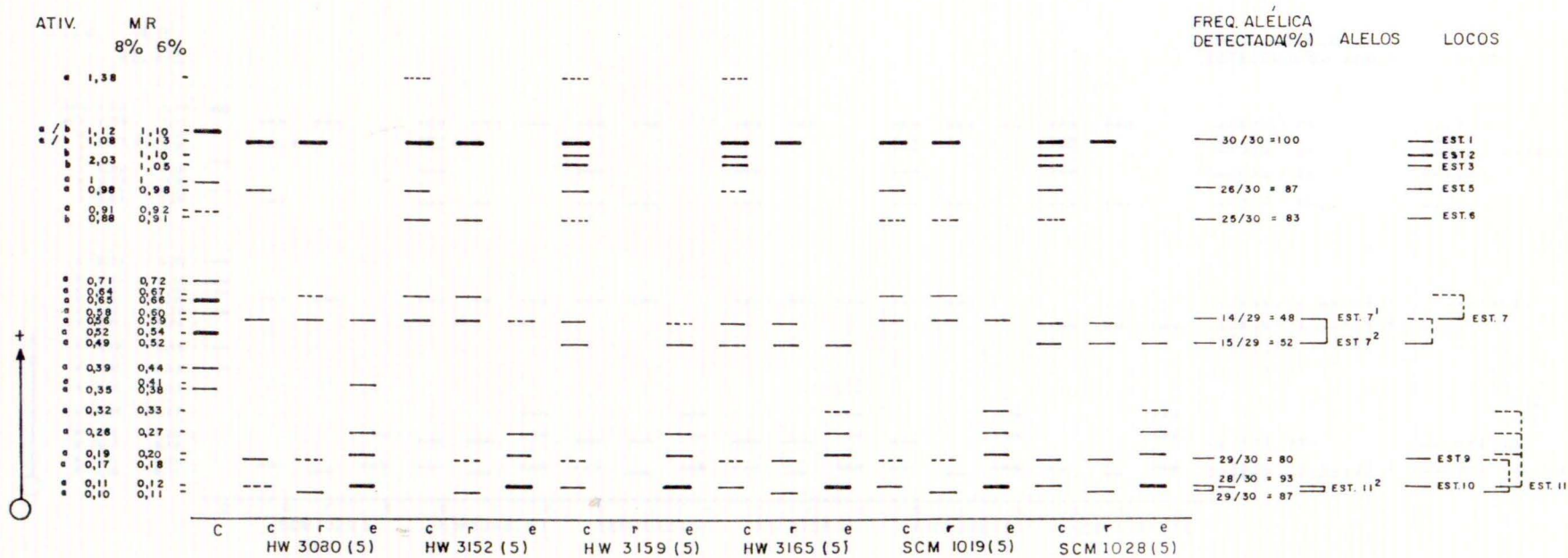


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*.
 A. Linhagens da população 5. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

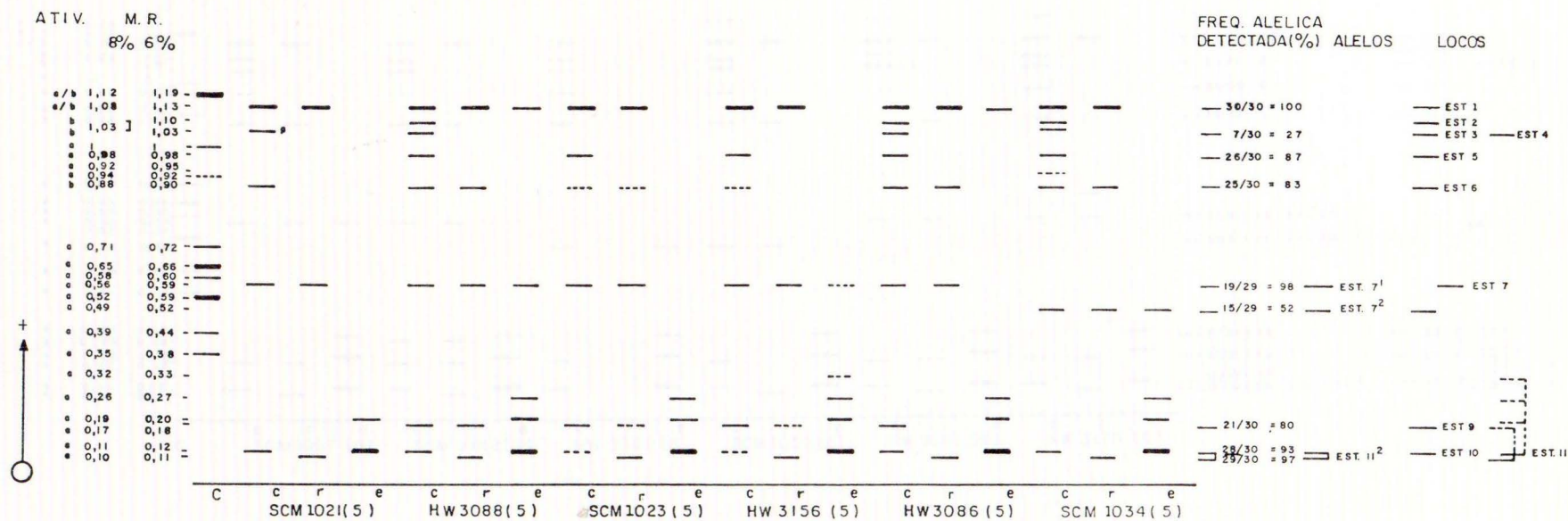


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*.
 A. Linhagens da população 5. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

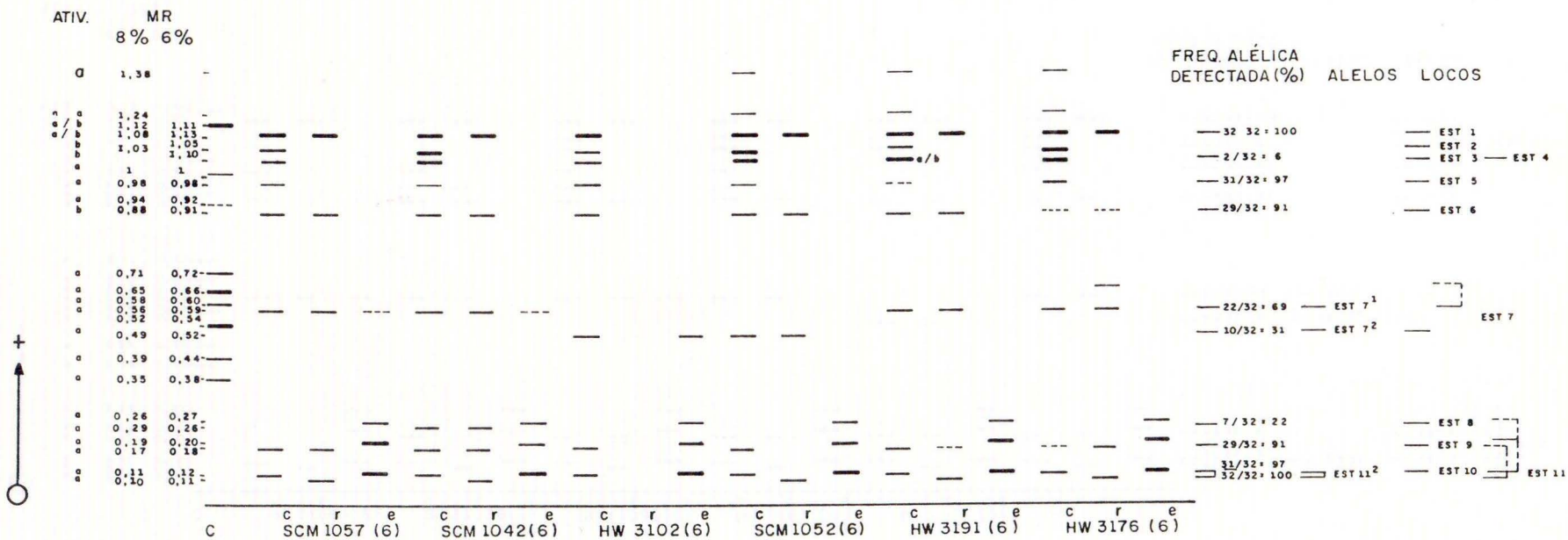


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*.
 B. Linhagens da população 6. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

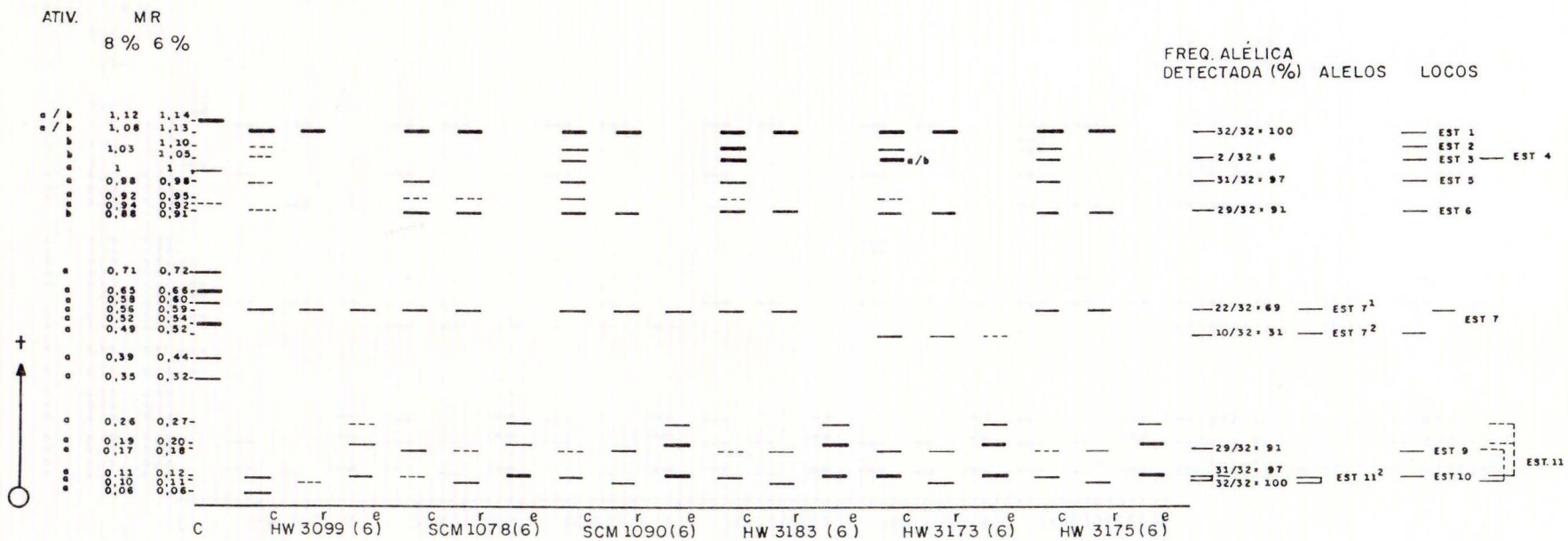


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*.
 B. Linhagens da população 6. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

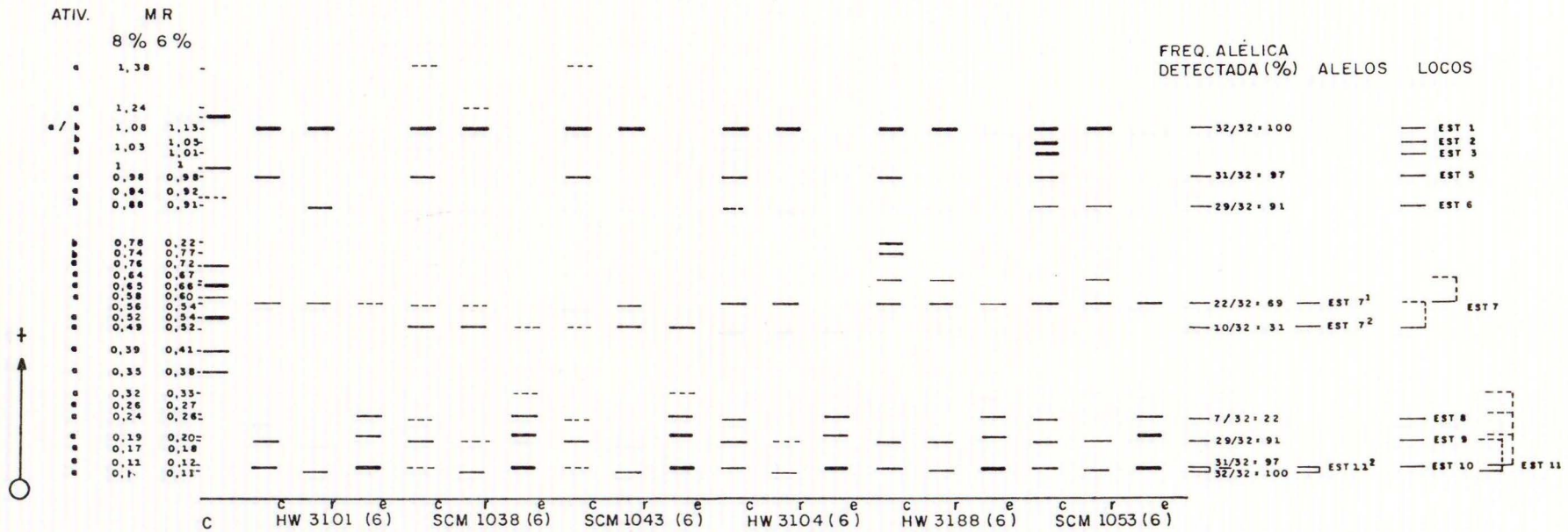


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*. B. Linhagens da população 6. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

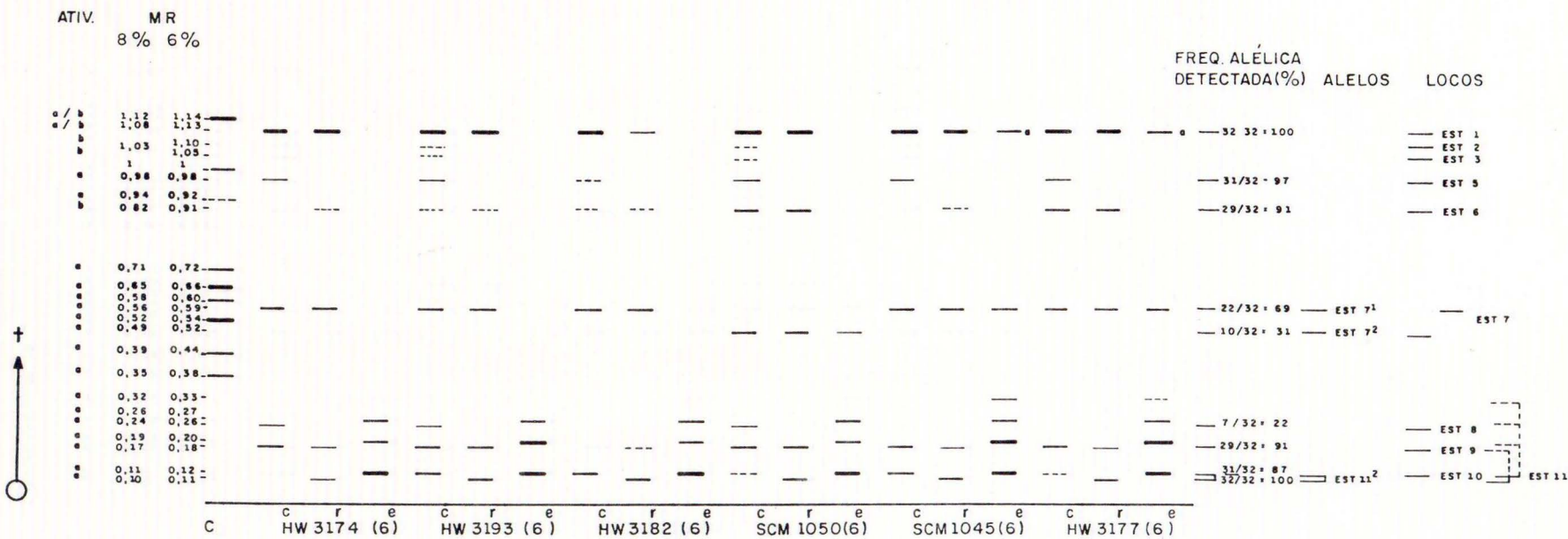


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*.
 B. Linhagens da população 6. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

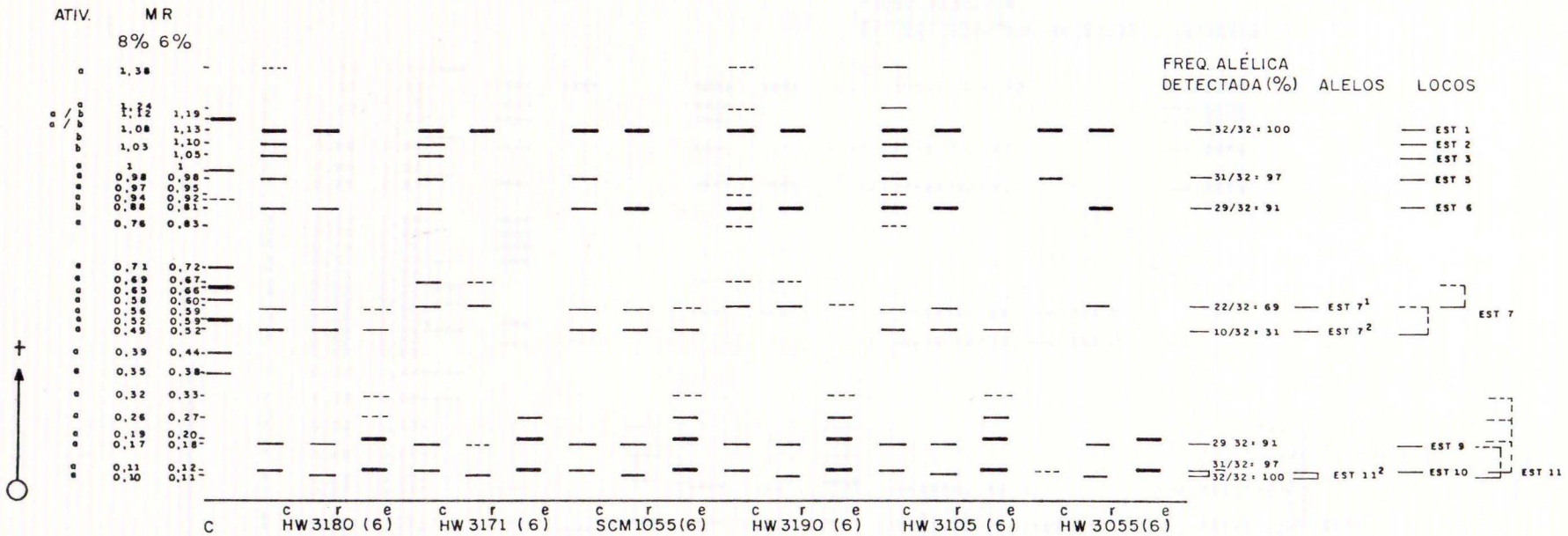


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*. B. Linhagens da população 6. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

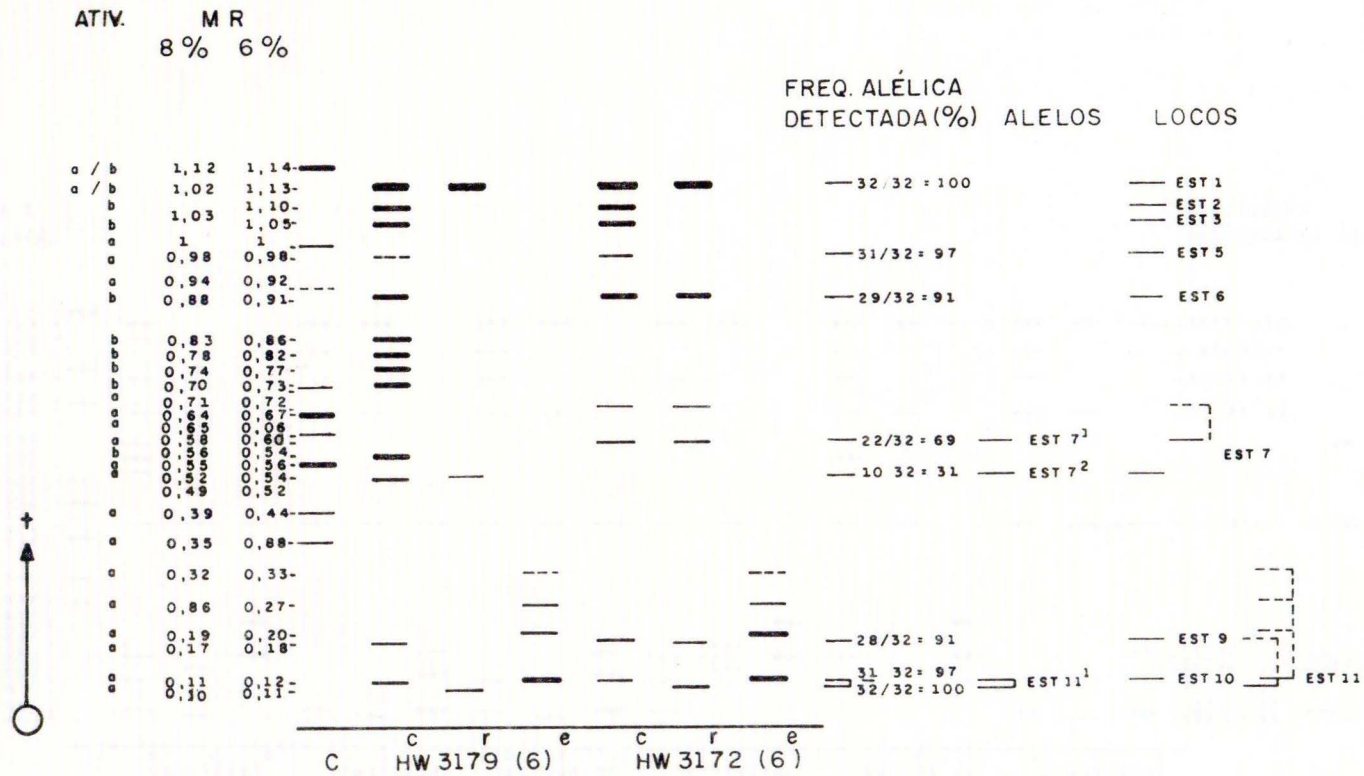


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*.
 B. Linhagens da população 6. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

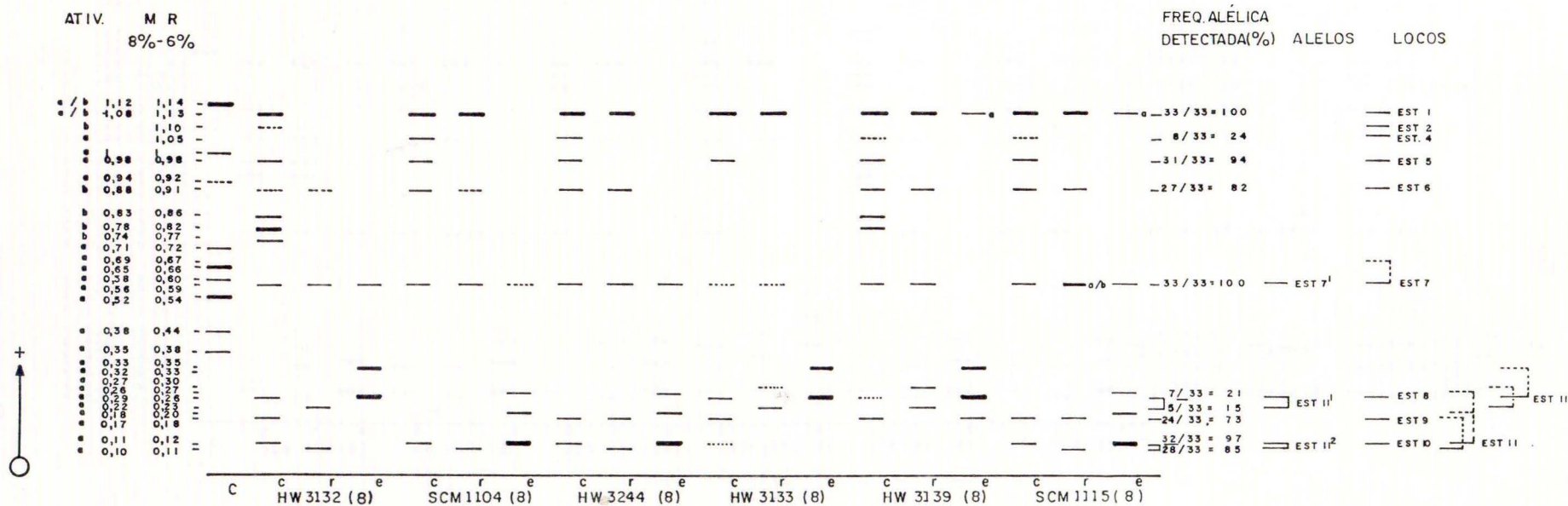


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*.
C. Linhagens da população 8. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

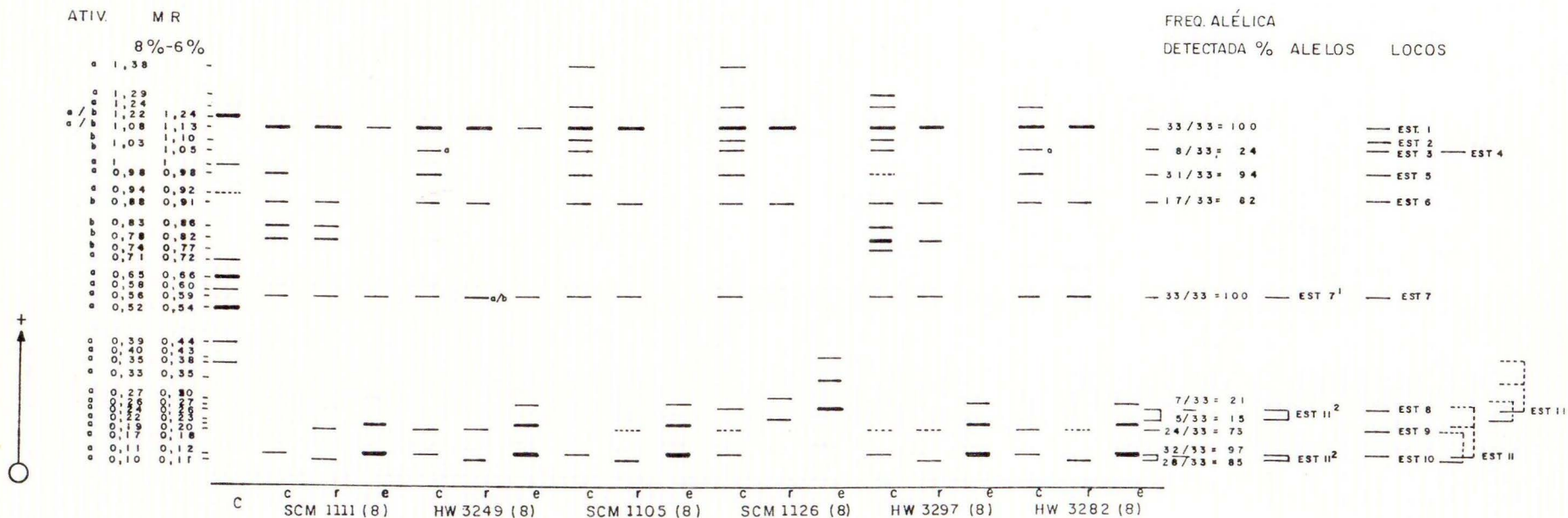


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*.
C. Linhagens da população 8. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

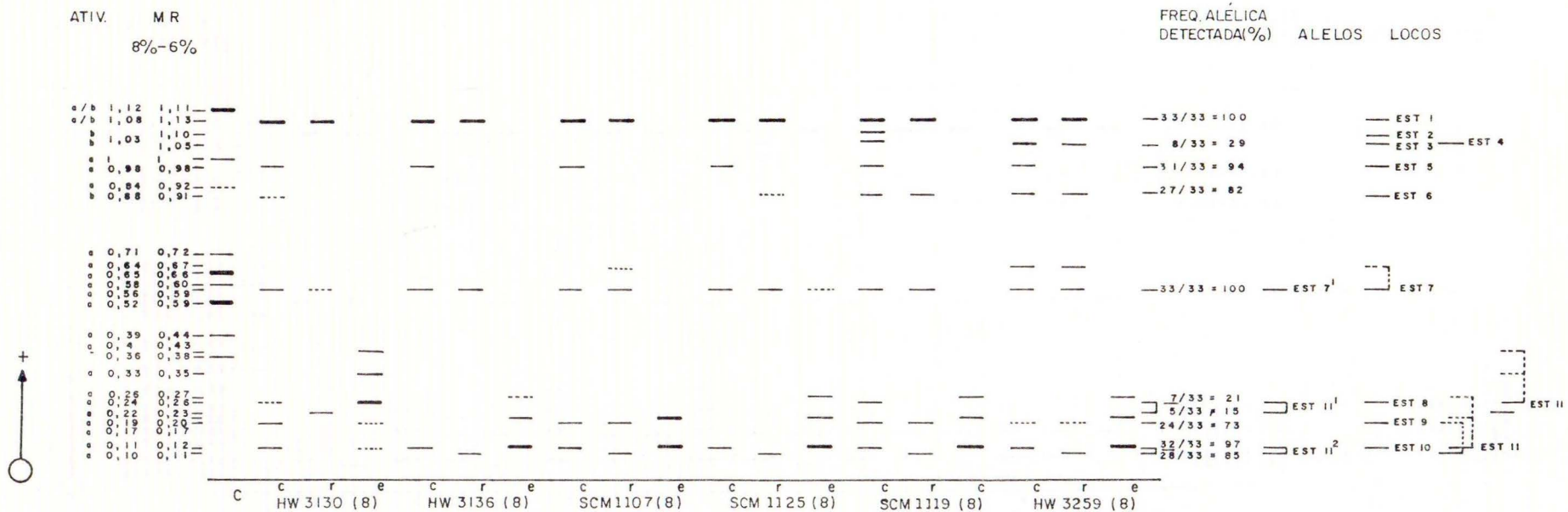


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*.
 C. Linhagens da população 8. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

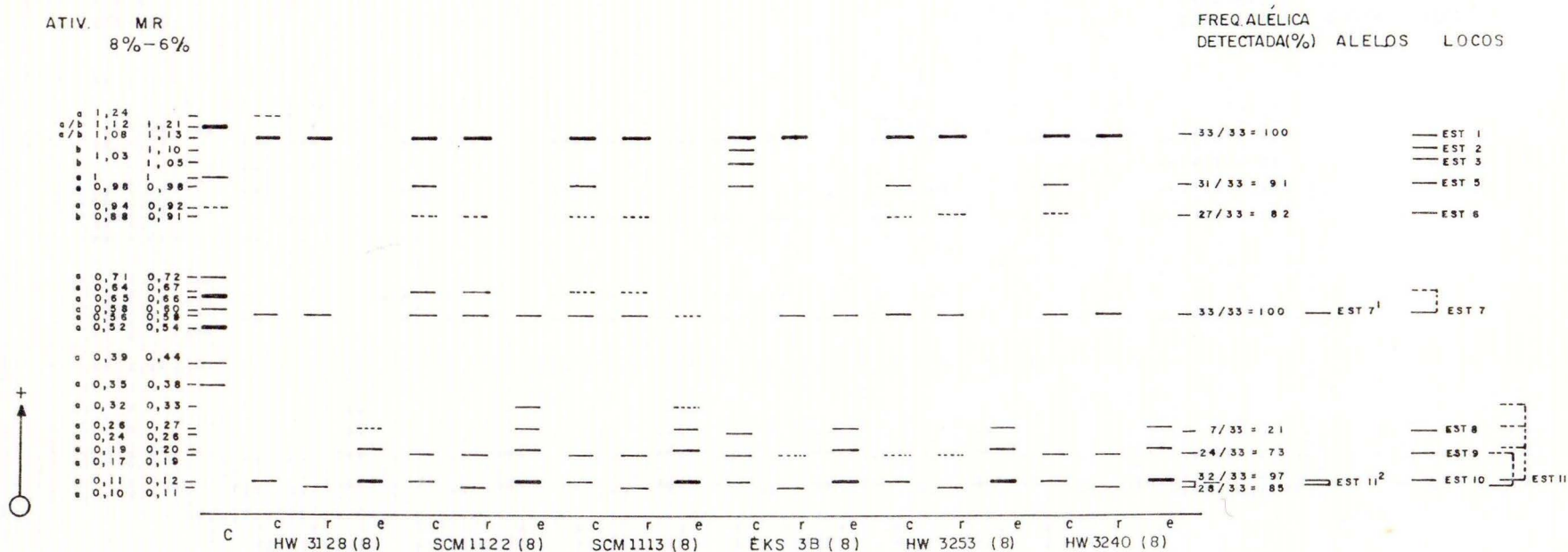


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*.
C. Linhagens da população 8. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

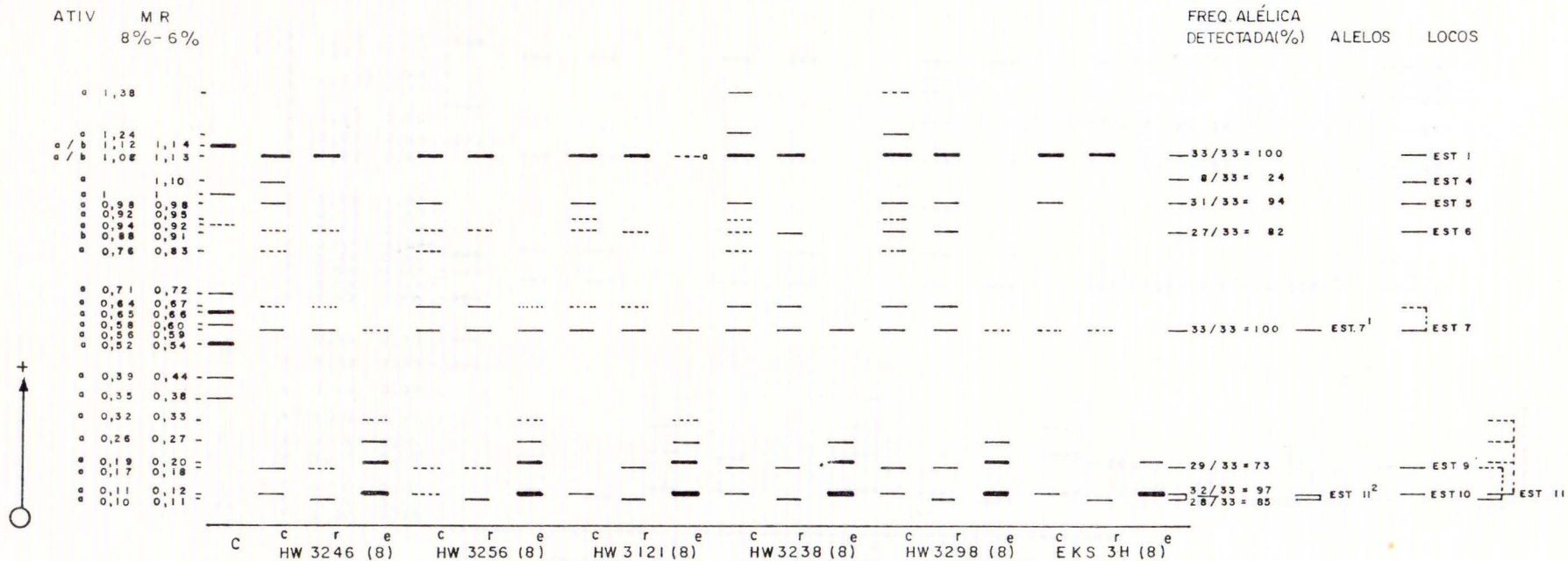


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*.
C. Linhagens da população 8. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 66).

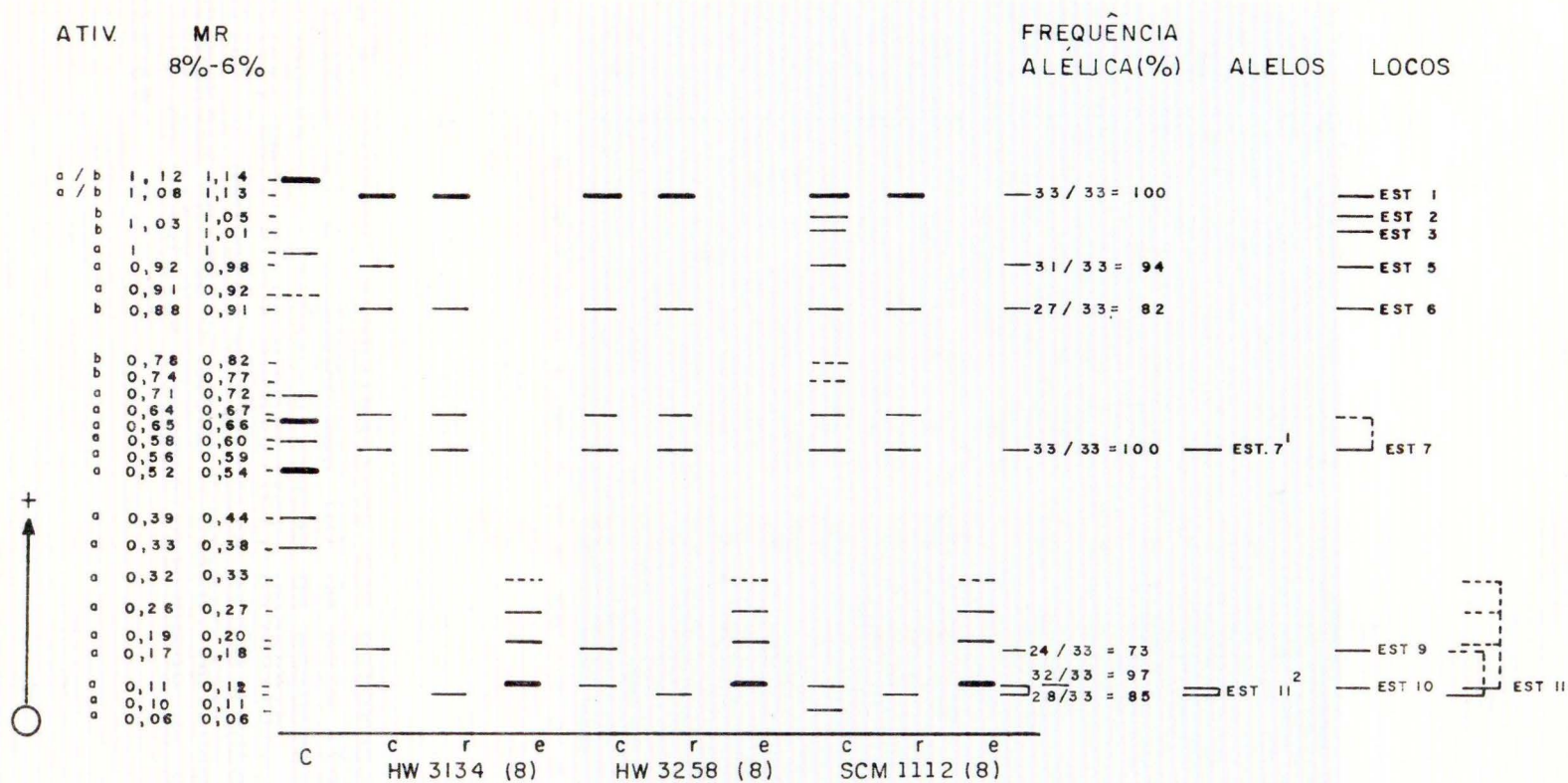


Figura 8 (continuação): Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) de *H. euclaston*. C. Linhagens da população 8. (Detalhes: ver legenda da Figura na pág.66).

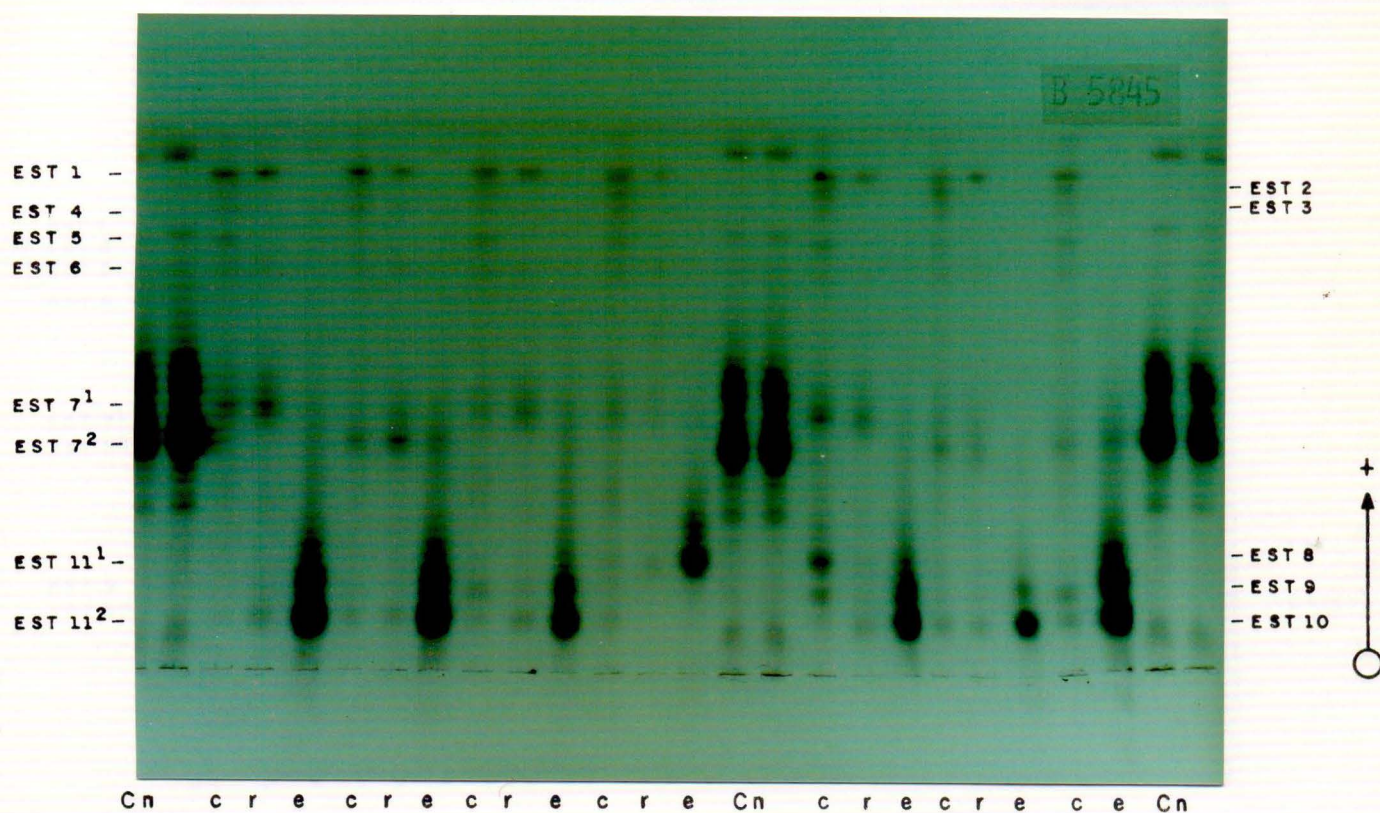


Figura 9: Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) dos coleóptilos (c), raízes (r) e endospermas (e) de sete linhagens de *H. euclaston*. As linhagens utilizadas, listadas da esquerda para a direita, são: HW3175(6), HW3158(5), SCM1057(6), HW3087(5), SCM1042(6), HW3083(5), HW3102(6). A esquerda e a direita estão indicados o controle genético das bandas em que o mesmo é claro. Aplicações controle (Cn): coleóptilos de plântulas da cultivar MN599 de *H. vulgare*. Concentração do gel: 6%.

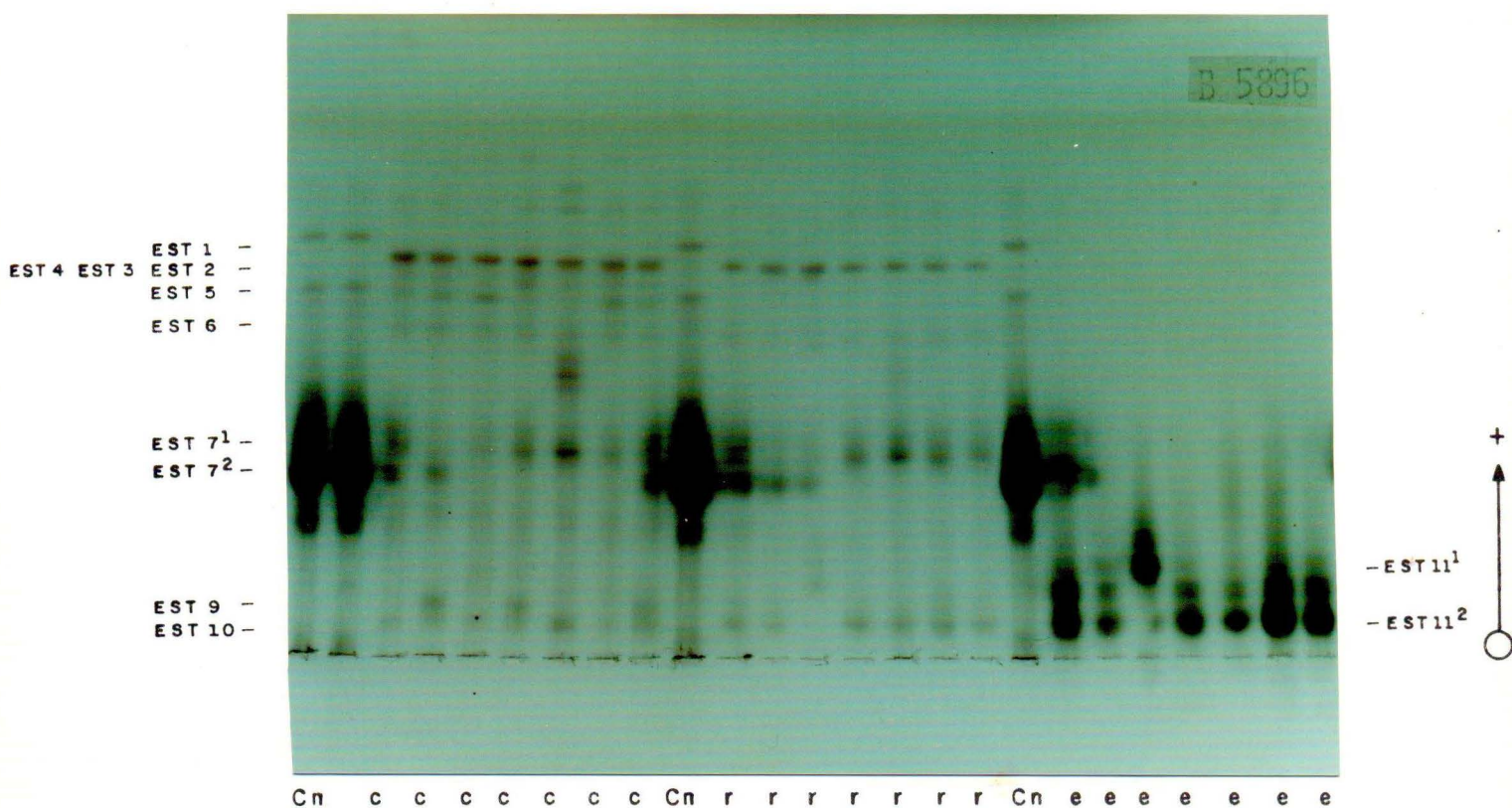


Figura 10: Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) dos coleóptilos (c), raízes (r) e endospermas (e) de sete linhagens de *H. euclaston*. As linhagens utilizadas, listadas da esquerda para a direita, são: SCM1105(8), SCM1052(6), SCM1126(8), HW3191(6), HW3297(8), HW3176(6) e HW3282(8). A esquerda e a direita estão indicados o controle genético das bandas em que o mesmo é claro. Aplicações controle (Cn): co leóptilos de plântulas da cultivar MN599 de *H. vulgare*. Concentração do gel: 8%.

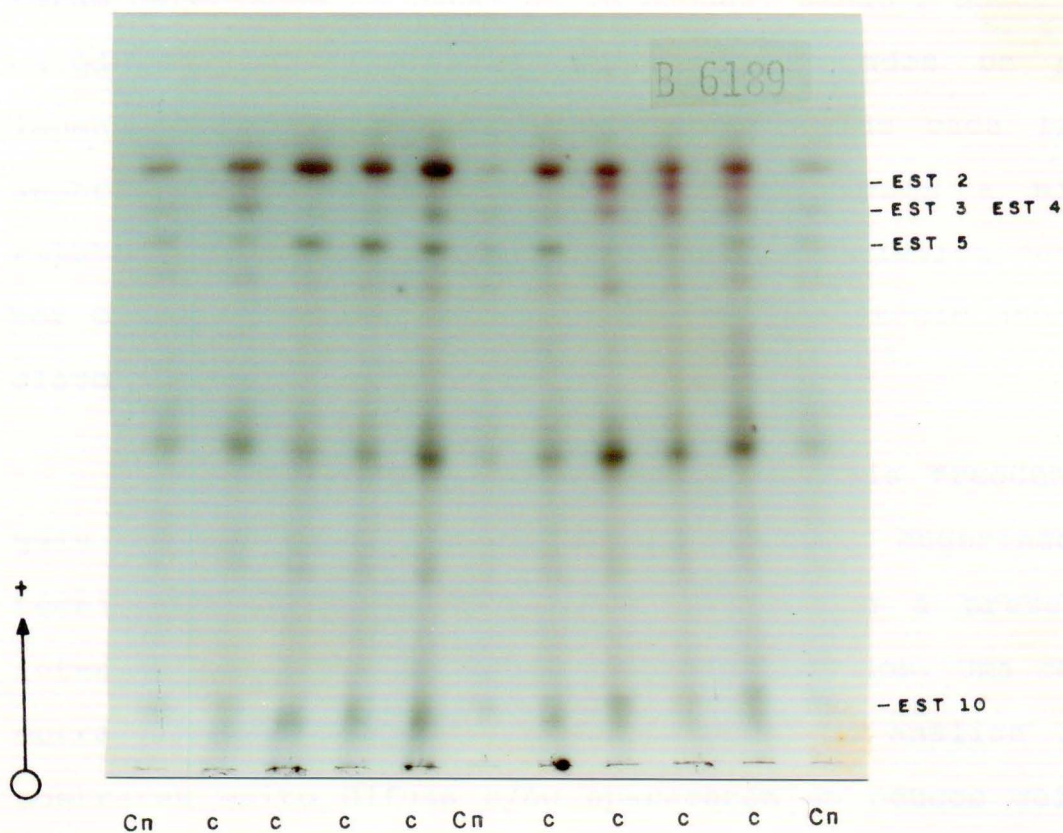


Figura 11: Padrões isoenzimáticos das esterases (EST) dos coleóptilos de oito indivíduos da linhagem SCM1112(8). São indicados a direita os locos que apresentam variações entre os indivíduos dessa linhagem. O padrão do primeiro indivíduo analisado, para uma possível comparação, pode ser visto na figura 8. Comprovadamente as diferenças não são de origem ontogenética (ver texto). Aplicações controle (Cn): coleóptilos de plântulas da linhagem HW3258(8). Concentração do gel: 6%.

3.7 S O D (EC 1.15.1.1)

Para o sistema das Superóxido Dismutases (SOD) foram detectadas um total de 18 bandas, sendo 9 anódicas e 9 catódicas. Na Figura 12 estão representados os padrões isoenzimáticos dos indivíduos analisados de cada linhagem separados por população. É informado também a migração relativa (MR) de cada banda, a frequência alélica detectada por população, e os alelos e locos cujo controle genético é claro.

Algumas bandas apareceram com mais frequência em géis cuja coloração se mostrou mais intensa, sugerindo que a técnica de coloração pode ter subestimado a presença ou intensidade destas bandas em alguns indivíduos. Uma série de outras bandas não foram consideradas na análise por se mostrarem muito difusa e/ou aparecerem em poucos géis. Uma análise satisfatória destas bandas somente seria possível com alterações nas condições de migração e na técnica de coloração.

Analisando as bandas cujo controle genético é claro foram determinados nove locos, codificando 13 bandas principais e 3 secundárias. Pelo menos dois locos são polimórficos, havendo dúvida sobre um terceiro. Os padrões dos dois tecidos analisados (coleóptilo e raiz) apresentam nítidas diferenças. O endosperma foi analisado em vários indivíduos, tendo apresentado atividade em poucas linhagens.

Além disso, como as bandas que aparecem no endosperma foram as mesmas apresentadas pelos outros tecidos, ele foi excluído da análise. Como controle foram utilizadas as raízes de plântulas da cultivar MN599 de *Hordeum vulgare*.

O loco SOD1 é representado pela banda mais anódica ($MR_6\%=1,00$, ver Figura 12), a qual é aparentemente idêntica a apresentada pelo controle. SOD1 não foi detectado em todas as linhagens, é monomórfico e, apesar de em alguns indivíduos ter aparecido também na raiz, normalmente restringe-se ao coleóptilo.

As bandas anódicas de $MR_6\%=0,52$ (banda principal) e $MR_6\%=0,62$ (banda secundária) pertencem ao loco SOD3 (ver Figura 12), o qual é monomórfico e restrito ao coleóptilo. O loco SOD4, que é representado pela banda de $MR_6\%=0,35$ (ver Figura 12), possui as mesmas características. Estes dois locos foram encontrados ativos em todos os indivíduos analisados.

O loco SOD5 codifica a banda anódica de $MR_6\%=0,20$ (ver Figura 12), a qual é monomórfica e restrita a raiz. Em alguns indivíduos a banda não foi detectada.

O loco SOD6 é representado pela banda catódica de $MR_6\%=-0,17$, presente no coleóptilo e raiz. A primeira vista parece haver uma diferença de migração entre as bandas dos dois tecidos (ver Figuras 13 e 14), entretanto, aparentemente, esta impressão deve-se somente a intensidade de

cada uma. No coleóptilo a banda de SOD6 aparece mais intensa do que na raiz e pode-se constatar que o crescimento da banda em função da atividade apresentada, se dá em direção ao cátodo. Conseqüentemente esta diferença se deve ao modo de formação das bandas durante a coloração, e não devido a diferenças de migração. SOD6 é, quase com certeza, polimórfico. Porém, como as bandas migraram muito pouco em relação ao ponto de aplicação e possuem um formato expandido, tornou-se muito difícil a identificação dos possíveis alelos. Por este motivo SOD6 foi representado como monomórfico (ver Figura 12). Somente com alterações nas condições de migração seria possível uma análise precisa desse aparente polimorfismo. SOD6 apresentou-se ativo em todas as plântulas analisadas, apesar de não apresentar a banda da raiz em alguns poucos indivíduos.

O loco SOD7 é responsável pela banda de $MR_6\% = -0,40$. Este loco é monomórfico, está ativo na grande maioria dos indivíduos analisados, normalmente restrito a raiz. Entretanto três linhagens, HW3134(8), HW3158(5) e HW3087(5), entretanto, apresentaram uma banda de $MR_6\% = -0,53$ no coleóptilo (ver Figura 12), ao invés da banda comum de $MR_6\% = -0,40$ apresentada na raiz. Supondo-se que esta banda também seja um produto de SOD7, a hipótese da intensidade da banda ter sido responsável pela diferença entre as bandas dos dois tecidos pode ser descartada, pois o indivíduo da linhagem HW3134(8) apresentou a banda do coleóptilo mais

fraca que a da raiz, e nos outros dois indivíduos a intensidade das bandas é equivalente nos dois tecidos. Pode-se considerar a possibilidade de ocorrer uma modificação pós-síntese nas enzimas de SOD7 no coleóptilo dos indivíduos destas linhagens, mas pode também corresponder a um outro loco ativo nesses indivíduos. Certamente não deve tratar-se de uma diferença regulatória ontogenética, pois esses três indivíduos estão dentro dos limites de tamanho e idade analisados, inclusive correspondendo aos de outras plântulas que não apresentaram esta banda.

O loco SOD8 é polimórfico, apresentando quatro alelos representados por bandas catódicas (ver Figura 13). Os MR6% das bandas de cada alelo são -0,79, -0,83, -0,89 e -0,98 (ver Figura 12). Entretanto não foi possível uma avaliação precisa com relação a qual alelo está presente em cada indivíduo. A diferença de migração entre as bandas é muito pequena em relação ao seu formato e intensidade. Além disso as MR obtidas nos vários géis mostraram uma variação contínua, sobrepondo-se entre um alelo e outro (as MR indicadas foram calculadas levando-se em conta somente os indivíduos em que se tinha certeza sobre qual alelo estava presente). Esta variação nas MR pode indicar que na verdade existam outros alelos com velocidade de migração intermediária aos já detectados. Por estas razões foi indicado o provável alelo em cada indivíduo analisado (ver Figura 12), mas este loco não foi incluído nos cálculos de

variabilidade gênica, excetuando-se o P (proporção de locos polimórficos). A banda de SOD8 foi detectada em todos os coleóptilos analisados e em um grande número de raízes foram encontradas bandas mais fracas que aparentemente também são produtos de SOD8, pois normalmente acompanham a migração da banda do coleóptilo. Entretanto nos indivíduos SCM1042(6), HW3172(6) e HW3087(5) as bandas do coleóptilo e raiz apresentaram alturas diferentes (ver Figura 12), o que poderia sugerir tratar-se de locos diferentes. Porém é difícil de imaginar que um outro loco também possua quatro diferentes alelos com as mesmas velocidades de migração dos alelos de SOD8. Outra hipótese remota seria uma modificação pós-síntese das isoenzimas de SOD8 em um dos tecidos somente nestes três indivíduos. Também pode-se sugerir que elementos de transposição possam estar causando alterações em um dos tecidos. Neste caso a transposição teria se dado pós-meiose, em uma fase limítrofe da separação das linhagens celulares embrionárias dos dois tecidos.

Alguns indivíduos apresentaram uma banda de $MR6\% = -1,06$, aparentemente monomórfica. Como ela não apresenta qualquer característica de secundária, deve constituir um loco independente. Entretanto, como foi observada em poucos indivíduos, não foi estudado o seu controle genético.

O loco SOD9 é representado pela banda de $MR6\% = -1,22$, é monomórfico e normalmente se encontra ativo em

ambos os tecidos. A banda da raiz é quase sempre mais intensa e é detectada em praticamente todos os indivíduos enquanto que a banda do coleóptilo, além de mais fraca, nem sempre aparece (ver Figura 12). Esta variação em relação a presença ou não da banda no coleóptilo também é verificada dentro da mesma linhagem. Um teste de progênie da linhagem SCM1113(8) mostrou quatro indivíduos-irmãos com a banda e três sem a banda no coleóptilo, embora sempre presente na raiz. No teste de progênie da linhagem EKS3H(8) foram encontradas alterações semelhantes, porém, além da banda de SOD9, a banda de SOD8 também apresentou variações. A banda de SOD9, que não havia sido detectada no coleóptilo do primeiro indivíduo analisado (ver Figura 12), esteve presente na maioria dos coleóptilos analisados no teste de progênie, porém com grandes alterações de intensidade. A banda de SOD8 também apresentou alterações de intensidade que não foram acompanhadas pelo restante do padrão. Assim, em ambos os casos a causa dessas alterações talvez seja representada por elementos de transposição.

O loco SOD2 é polimórfico, apresentando dois alelos restritos a raiz. Os padrões de ambos os alelos possuem, além da banda principal, uma banda secundária mais lenta (ver Figura 14). As MR6% dos produtos alélicos de SOD2¹ são 0,92 e 0,75, e de SOD2², 0,75 e 0,62 (ver Figura 12). A secundária de SOD2¹ possui a mesma velocidade de migração da banda principal de SOD2² nos géis a 6%, mas

diferem nos géis a 7% (ver Figura 12). Nas populações 5 e 8 SOD2² mostrou-se mais freqüente (61% e 85%, respectivamente) enquanto que na população 6 SOD2¹ apresentou a freqüência mais alta (87%). Não foi possível identificar qual o alelo presente nos indivíduos HW3102(6), HW3159(5) e SCM1028(5). Este último devido a falta de atividade da raiz para o sistema, enquanto que os dois primeiros não apresentaram as raízes com tamanho suficiente para detecção da atividade enzimática.

Não foi encontrado em nenhum dos padrões analisados qualquer indício da existência de heterozigotos.

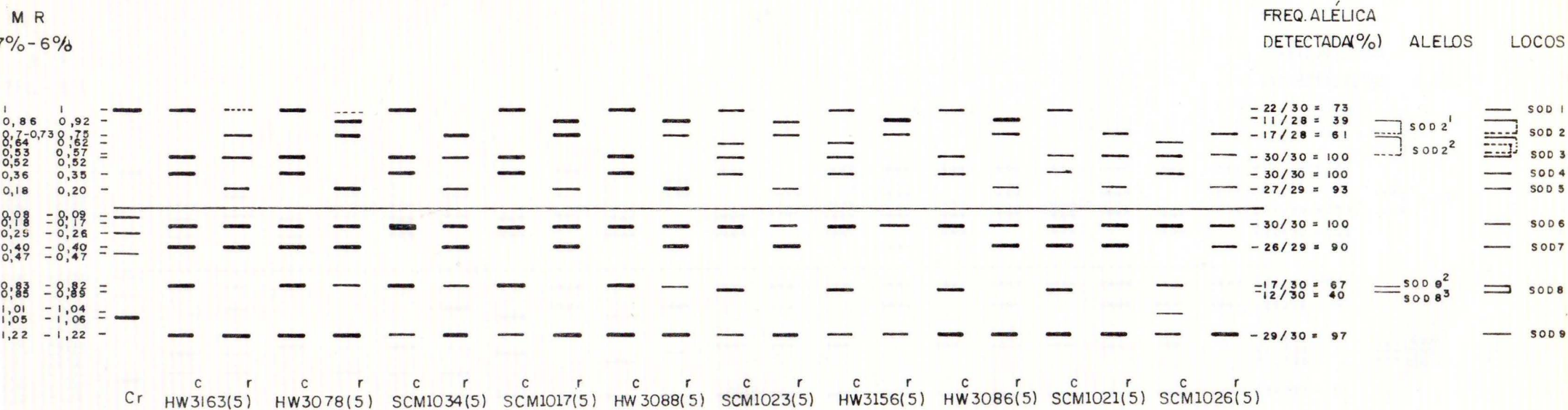


Figura 12: Padrões isoenzimáticos das superóxido dismutases (SOD) dos coleóptilos (c) e raízes (r) de *H. euclaston*. A. Linhagens da população 5. A direita são indicados a frequência alélica detectada na população e o controle genético das bandas em que o mesmo é claro. As bandas principais são indicadas por linhas cheias e as secundárias por linhas tracejadas ligadas a principal. A esquerda é dada a migração relativa (MR) de cada banda nas duas condições de migração em que a análise foi feita. Também é representado o padrão do controle (Cr): raízes da cultivar MN599 de *H. vulgare*.

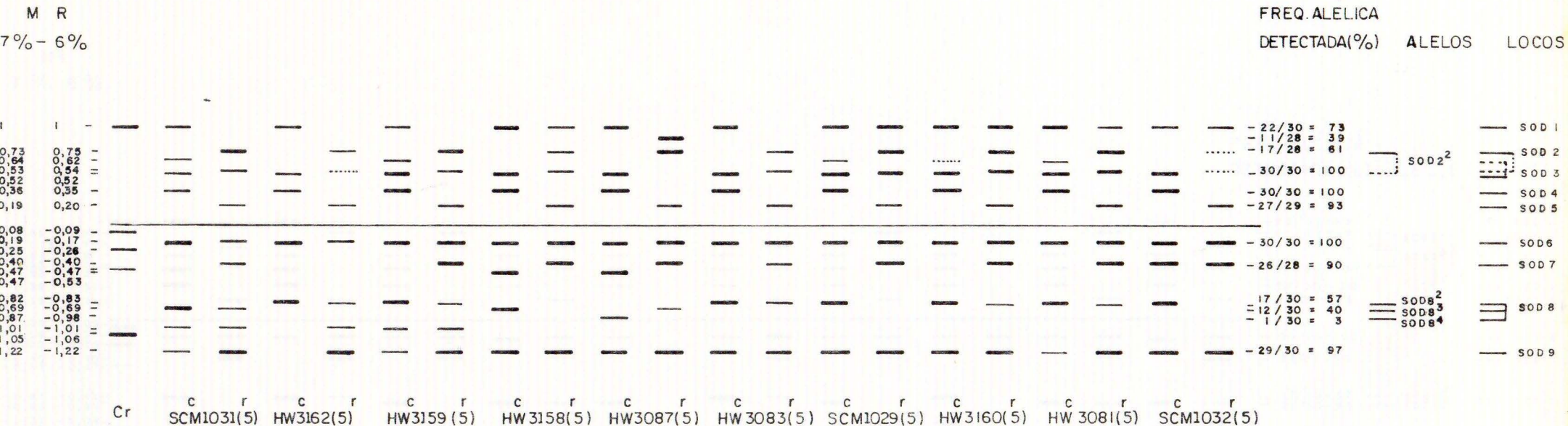


Figura 12 (continuação): Padrões isoenzimáticos das superóxido dismutases (SOD) de *H. euclaston*.
 A. Linhagens da população 5. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 93).

MR

7 % 6 %

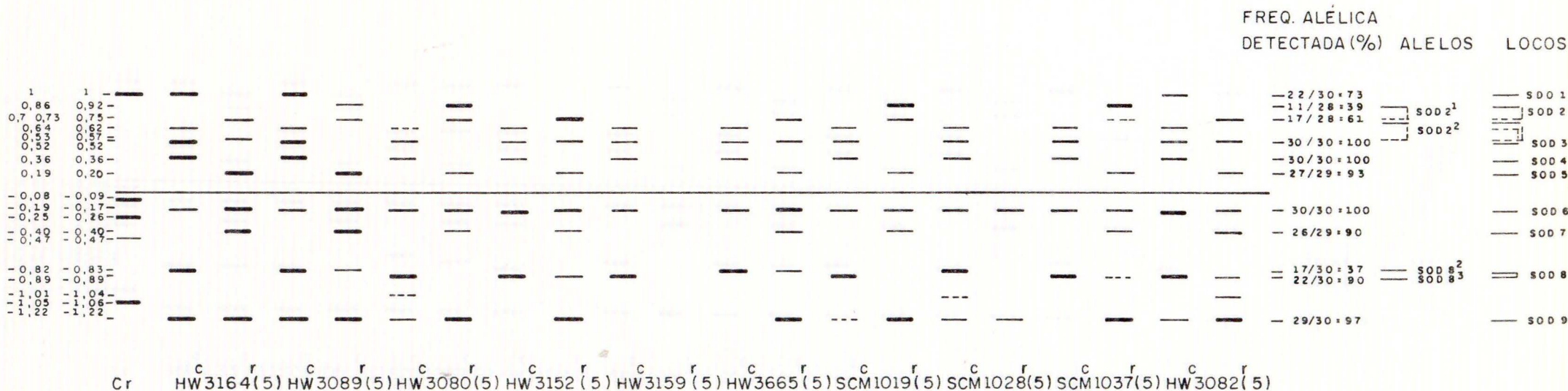


Figura 12 (continuação): Padrões isoenzimáticos das superóxido dismutases (SOD) de *H. euclaston*.
A. Linhagens da população 5. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 93).

MR
7% 6%

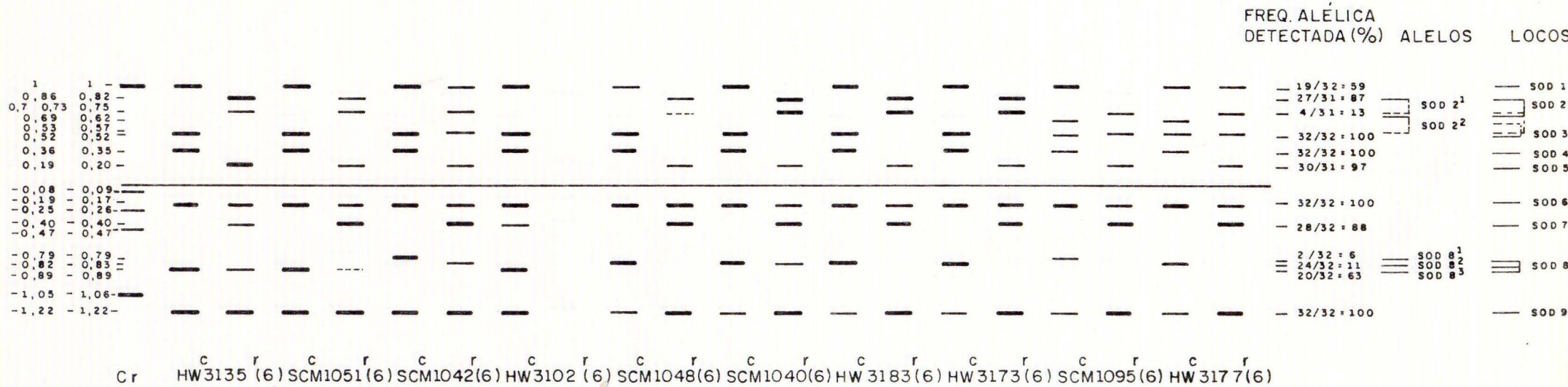


Figura 12 (continuação): Padrões isoenzimáticos das superóxido dismutases (SOD) de *H. euclaston*.
B. Linhagens da população 6. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 93).

MR
7% 6%

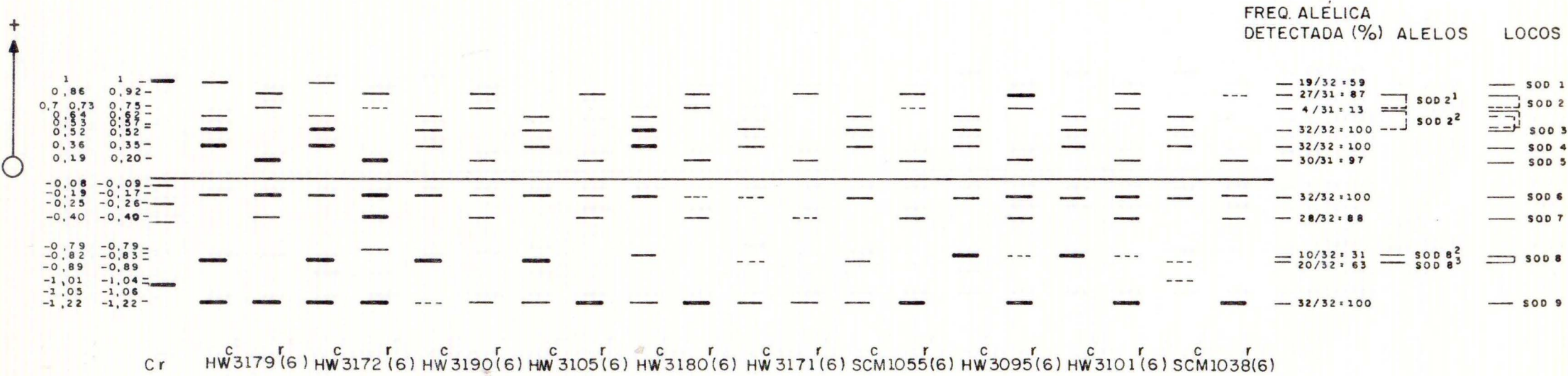


Figura 12 (continuação): Padrões isoenzimáticos das superóxido dismutases (SOD) de *H. euclaston*. B. Linhagens da população 6. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 93).

MR
7 % 6 %

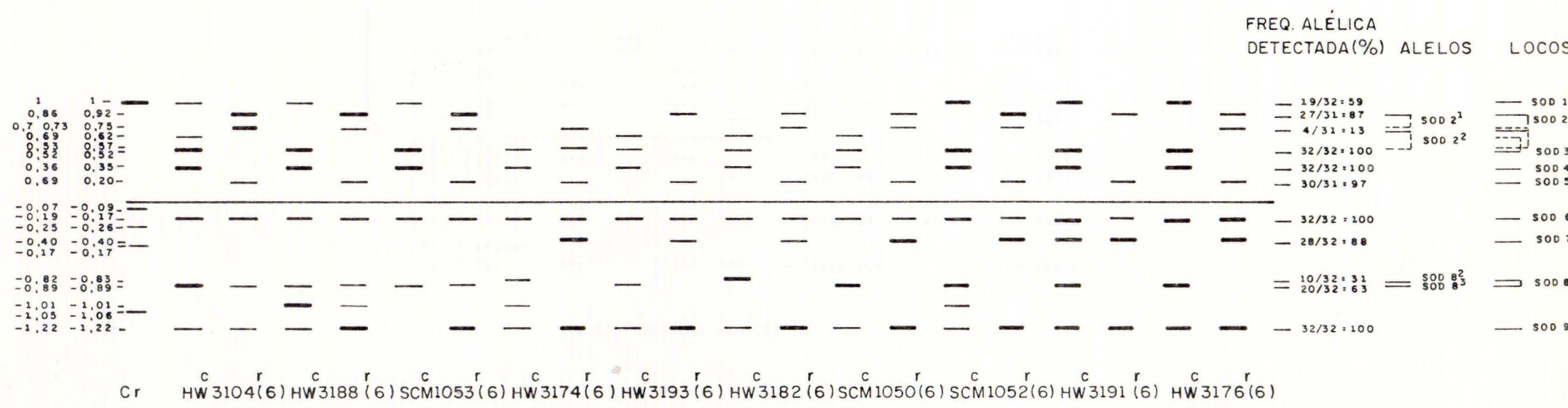


Figura 12 (continuação): Padrões isoenzimáticos das superóxido dismutases (SOD) de *H. euclaston*. B. Linhagens da população 6. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 93).

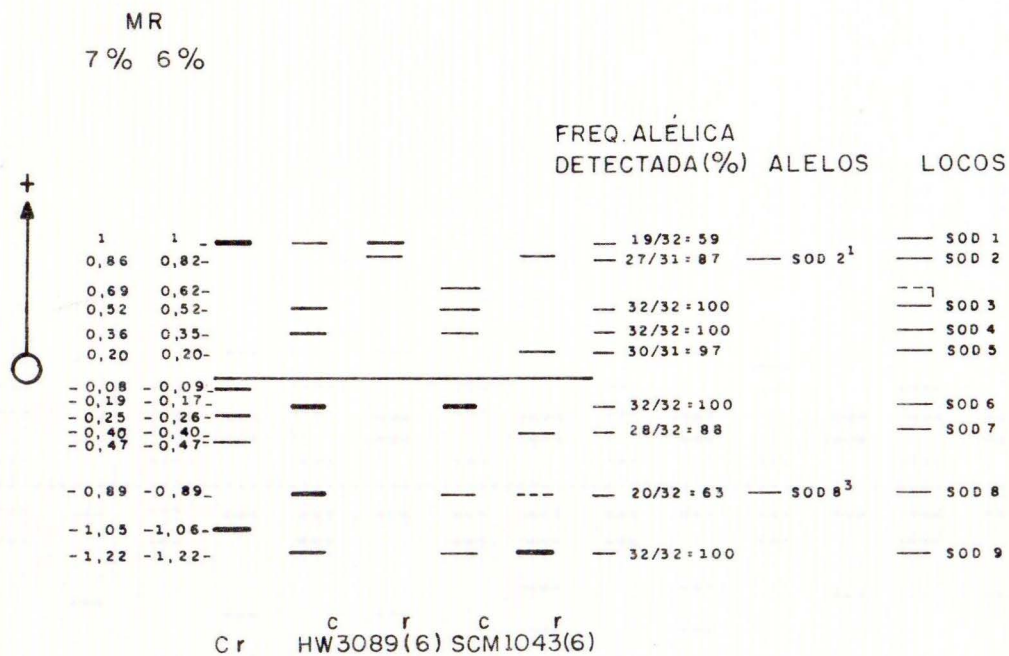


Figura 12 (continuação): Padrões isoenzimáticos das superóxido dismutases (SOD) de *H. euclaston*. B. Linhagens da população 6. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 93).

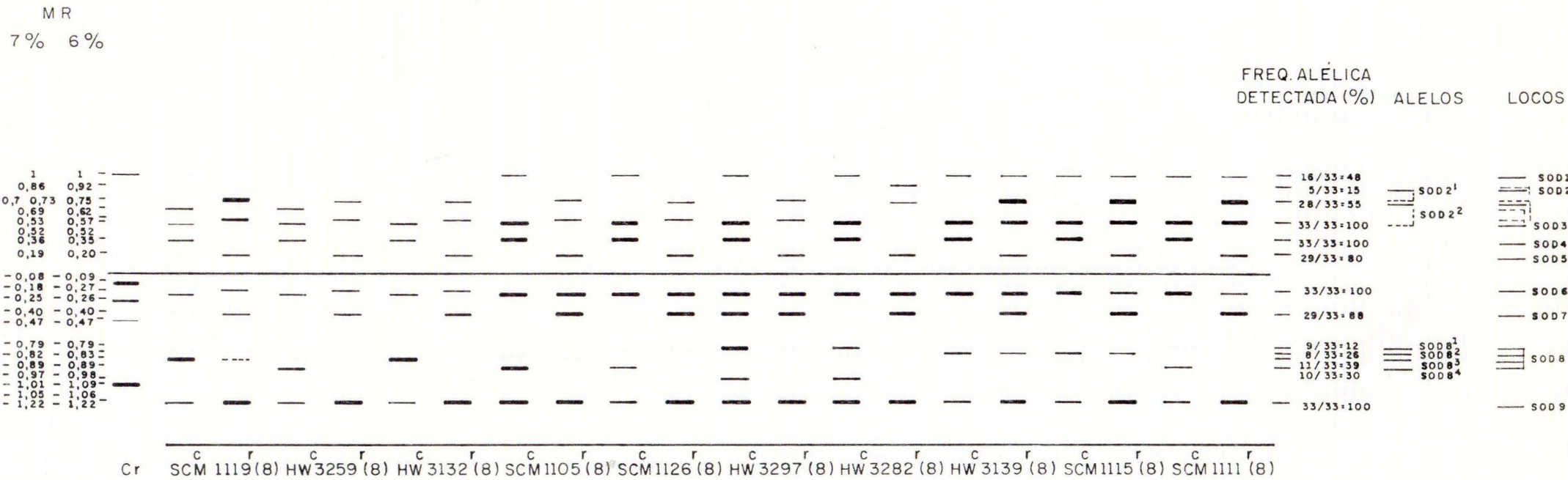


Figura 12 (continuação): Padrões isoenzimáticos das superóxido dismutases (SOD) de *H. euclaston*. C. Linhagens da população 8. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 93).

MR
7% 6%

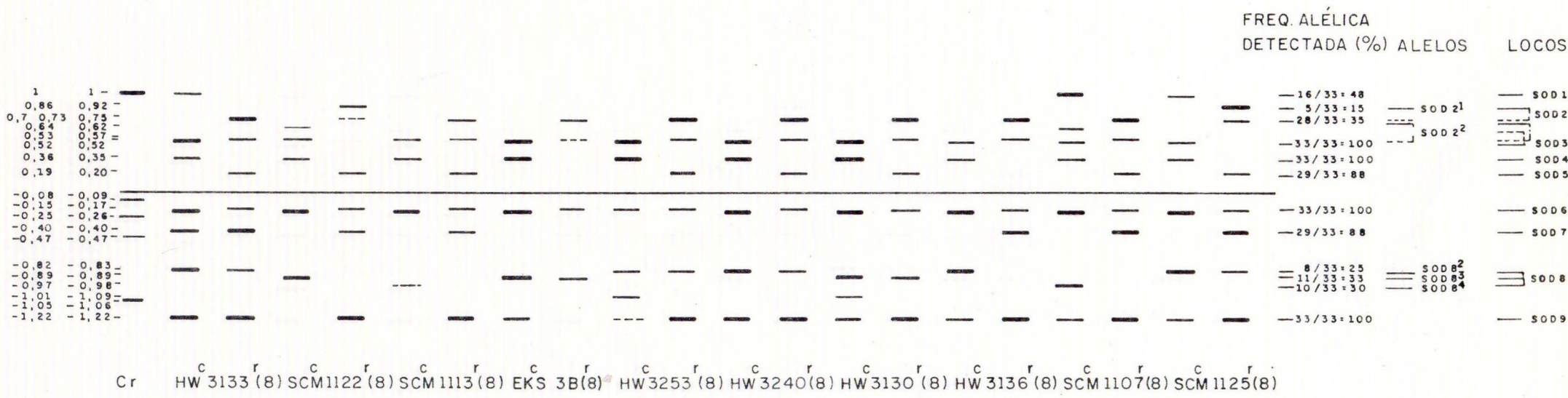


Figura 12 (continuação): Padrões isoenzimáticos das superóxido dismutases (SOD) de *H. euclaston*. C. Linhagens da população 8. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 93).

MR
7% 6%

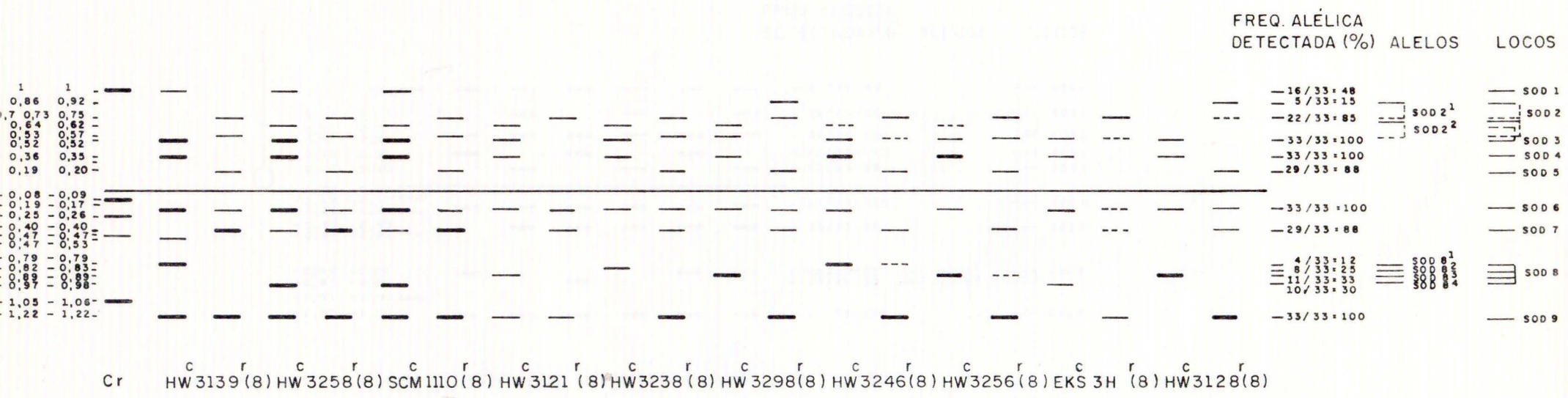


Figura 12 (continuação): Padrões isoenzimáticos das superóxido dismutases (SOD) de *H. euclaston*. C. Linhagens da população 8. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 93).

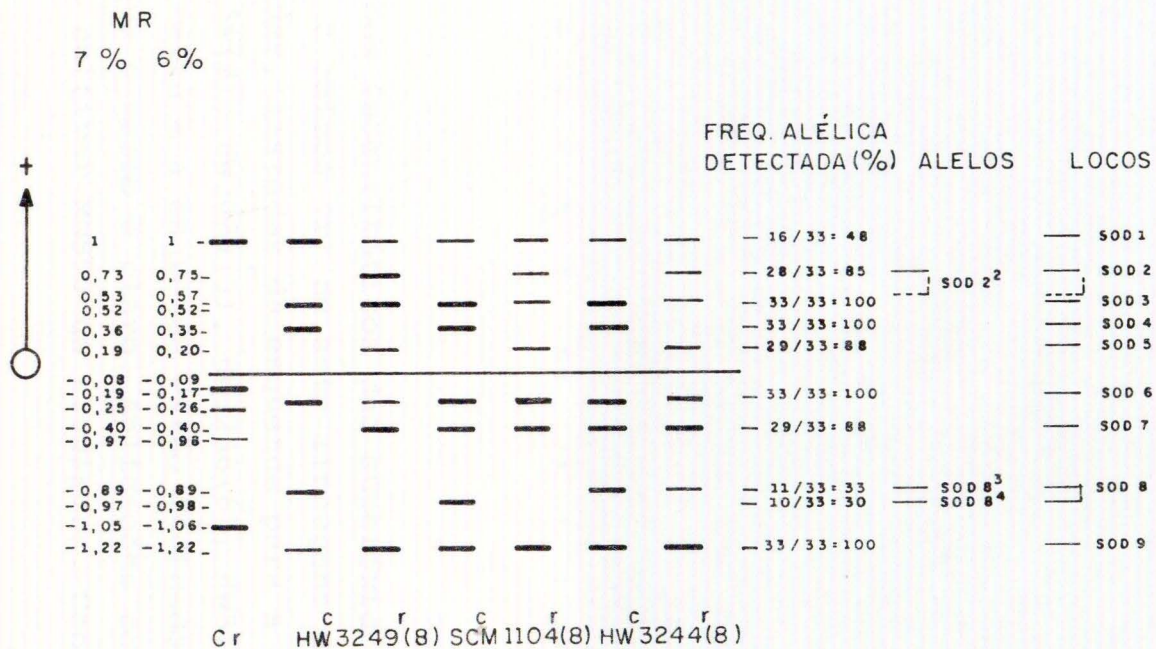


Figura 12 (continuação): Padrões isoenzimáticos das superóxido dismutases (SOD) de *H. euclaston*. C. Linhagens da população 8. (Detalhes na legenda da Figura na pág. 93).

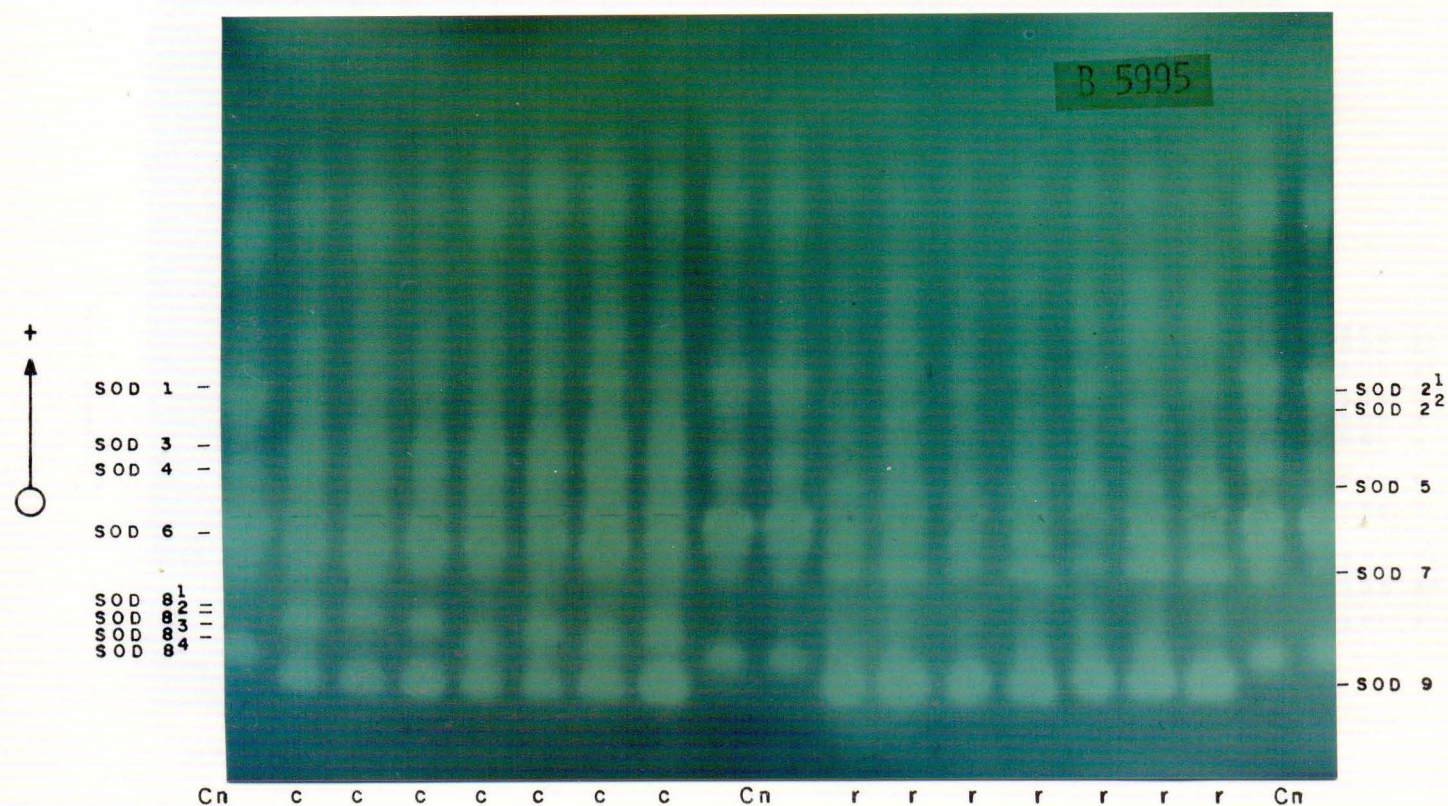


Figura 13: Padrões isoenzimáticos das superóxido dismutases (SOD) dos coleóptilos (c) e raízes (r) de sete linhagens de *H. euclaston*. As linhagens utilizadas, listadas da esquerda para a direita, são: HW3164(5), HW3134(8), HW3089(5), HW3258(8), HW3179(6), SCM1112(8) e HW3172(6). A direita e a esquerda estão indicados o controle genético das bandas em que o mesmo é claro. Aplicações controle (Cn): raízes de plântulas da cultivar MN599 de *H. vulgare*. Concentração do gel: 6%.

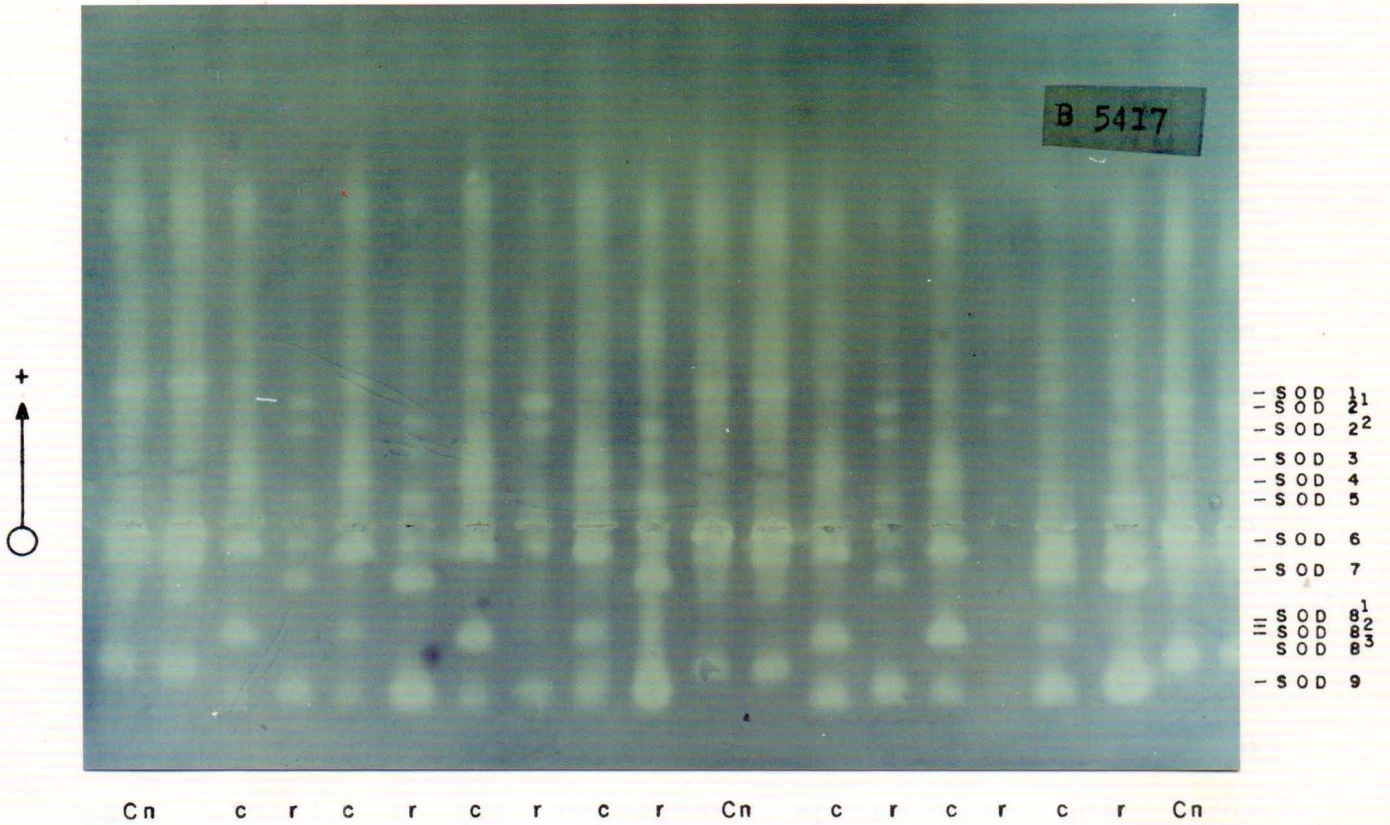


Figura 14: Padrões isoenzimáticos das superóxido dismutases (SOD) dos coleóptilos (c) e raízes (r) de sete linhagens de *H. euclaston*. As linhagens utilizadas, listadas da esquerda para a direita, são: SCM1023(5), SCM1045(6), HW3156(5), HW3177(6), HW3086(5), HW3099(6) e SCM1021(5). A direita é indicado o controle genético das bandas em que o mesmo é claro. Aplicações controle (Cn): raízes de plântulas da cultivar MN599 de *H. vulgare*. Concentração do gel: 7%.

3.8 Variabilidade populacional

3.8.1 Variabilidade intrapopulacional

Considerando os 26 locos estruturais cujo controle genético pode ser estabelecido no presente trabalho, avaliamos a variabilidade gênica das três populações de *Hordeum euclaston*. As freqüências alélicas destes 26 locos estão listadas na Tabela VI. O loco SOD8, um loco claramente polimórfico (ver texto sobre SOD), foi incluído nesta tabela, entretanto como não se pode estabelecer com precisão qual o alelo presente em vários indivíduos, não indicamos na tabela a freqüência de cada alelo.

Como pode ser visto nesta tabela, dos 26 locos estruturais estabelecidos, apenas 6 apresentaram dois ou mais alelos, o que representa apenas 23% dos locos analisados.

A variabilidade intrapopulacional foi estimada por três medidas:

A = número médio de alelos por loco;

P = proporção de locos polimórficos;

H = grau de heterozigose média esperada por indivíduo.

Os resultados dessas análises são apresentados na Tabela VII.

Tabela VI: Locos com controle genético definido utilizados no cálculo dos índices de variabilidade.

Loco	- Alelos	Pop.5 (%)	Pop.6 (%)	Pop.8 (%)
MDH1	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
MDH2	- MDH2 ¹	0/30=0	1/32=3	3/33=9
	MDH2 ²	30/30=100	31/32=97	30/33=91
GOT1	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
GOT2	- GOT2 ¹	19/19=100	19/20=95	22/22=100
	- GOT2 ²	0/19=0	1/20=5	0/22=0
	- *	1/30=3	1/32=3	0/33=0
GOT3	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
GOT4	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
SOD1	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
SOD2	- SOD2 ¹	11/28=39	27/31=87	5/33=15
	- SOD2 ²	17/28=61	4/31=13	28/33=85
SOD3	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
SOD4	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
SOD5	-	29/29=100	31/31=100	33/33=100
SOD6	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
SOD7	-	29/29=100	32/32=100	33/33=100
SOD8	- SOD8 ¹	-	-	-
	- SOD8 ²	-	-	-
	- SOD8 ³	-	-	-
	- SOD8 ⁴	-	-	-
SOD9	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
EST1	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
EST2	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
EST3	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
EST4	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
EST5	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
EST6	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
EST7	- EST7 ¹	14/29=48	22/32=69	33/33=100
	- EST7 ²	15/29=52	10/32=31	0/33=0
EST8	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
EST9	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
EST10	-	30/30=100	32/32=100	33/33=100
EST11	- EST11 ¹	1/30=3	0/32=0	5/33=15
	- EST11 ²	29/30=97	32/32=100	28/33=85

Tabela VII: Medidas de variabilidade gênica nas três populações de *H. euclaston* baseada nas frequências alélicas dos locos estruturais.

	POPULAÇÕES			Média
	5	6	8	
A	1,12	1,16	1,12	1,13
P	0,15	0,19	0,15	0,16
H	0,0412	0,0324	0,0272	0,0336

Para o cálculo de P foi incluído o loco SOD8, mas para A e H, não. *H. euclaston* apresenta um número médio de 1,13 alelos por loco, por população. A média de locos polimórficos ($p^{\text{médio}}$) é de 16%. O grau de heterozigose média esperada ($H^{\text{médio}}$) estimada para as três populações é de 0,03. As diferenças entre as três populações foi muito pequena para as três medidas de variabilidade gênica.

3.8.2 Divergência interpopulacional

A divergência genética entre as três populações de *Hordeum euclaston* foi calculada pela distância genética (D) de NEI (1972), baseado na identidade de genes de diferentes populações, sendo $D = -\text{Log}_e I$, e I é a identidade normalizada de genes de duas populações.

Os cálculos da identidade e divergência genética são apresentados na Tabela VIII, onde também são dados os índices médios de cada população em relação aos demais e o índice médio da espécie como um todo.

Tabela VIII: Identidade e divergência genética entre as três populações de *H. euclaston*. Parte superior da tabela: I = Índice de similaridade genética de NEI (1972). Parte inferior: D = distância genética de NEI (1972).

POP	5	6	8	I Médio Pop.
5	-	0,9859	0,9821	0,9840
6	0,0142	-	0,9736	0,9798
8	0,0181	0,0268	-	0,9779
D Médio Pop.	0,0162	0,0205	0,0225	Isp=0,9806 Dsp=0,0197

O índice médio de similaridade é muito alto, $I_{sp}=0,98$, o que significa que as populações comparadas duas a duas, apresentam em média 98% de identidade em seus genes.

3.9 Variações regulatórias dentro da linhagem

Levando-se em consideração a hipótese da atividade de elementos de transposição nas linhagens SCM1112(8), SCM1113(8), EKS3H(8) e HW3173(6) foi feito um estudo do comportamento destas linhagens nos diferentes sistemas isoenzimáticos. Caso a transposição ocorresse para sítios ao acaso no genoma, provavelmente todos os sistemas apresentariam variações semelhantes. Devido a falta de sementes somente foi realizada esta comparação para as linhagens SCM1112(8) e EKS3H(8). A linhagem SCM1112(8), a qual havia apresentado alterações regulatórias (ver Figura 11), não apresentou qualquer tipo de alteração em MDH, SOD e

GOT. Também a linhagem EKS3H(8), a qual apresentou alterações regulatórias em SOD, não apresentou alterações em EST. Não foi possível comparar com os sistemas MDH e GOT por problemas de estocagem. Conseqüentemente pode-se sugerir que, caso realmente hajam elementos de transposição envolvidos nas alterações regulatórias dentro da mesma linhagem, eles transponham para determinados sítios preferenciais, provavelmente homólogos em seqüência. Os elementos presentes nestas duas linhagens, portanto, possuiriam sítios preferenciais diferentes, ou seja, constituem-se em transposons de famílias diferentes. Deve-se considerar, também, que a freqüência de alterações regulatórias (e presumivelmente também a de transposições) detectada em EST entre os indivíduos de SCM1112(8), e em SOD entre os indivíduos de EKS3H(8), é muito alta para ser acompanhada por todo o genoma e ainda ser mantida a viabilidade do indivíduo.

4. DISCUSSÃO

4.1 Modo de reprodução

Como já citado na introdução, o sistema de cruzamento é um dos fatores determinantes da evolução de plantas superiores. Segundo STEBBINS (1957) pode-se dividir os tipos de sistemas em:

- auto-incompatíveis, equipados para polinização cruzada e com anteras grandes;
- auto-compatíveis, equipados para polinização cruzada, com anteras grandes ou médias e eventualmente autofecundados;
- regularmente autofecundados com anteras pequenas, apresentando raros eventos de fecundação cruzada.

Mas de uma forma geral pode-se dividir os tipos de sistemas de cruzamento simplesmente em fecundação cruzada e autofecundação, característicos, em regra geral, respectivamente, de espécies perenes e anuais (STEBBINS, 1957; MORISHIMA & BARBIER, 1990).

Hordeum euclaston é uma espécie anual (von BOTHMER, 1982; von BOTHMER, 1985; EGGERS & BOLDRINI, 1988), cuja maior característica detectada neste trabalho foi não ter apresentado qualquer indício da presença de heterozigotos e, portanto, de fecundação cruzada. Este fato sugere ser esta uma espécie de autofecundação, possivelmente cleistógama, com uma taxa de fecundação cruzada, se existente, muito pequena. Embora seja considerada anual, algumas plantas de *H. euclaston* mantidas em casa de vegetação permaneceram vivas durante um segundo ano (M. DA S. LAUXEN, comunicação pessoal), sugerindo a existência de linhagens bianuais.

A autofecundação, como sistema de reprodução predominante, possui uma série de conseqüências teóricas, que incluem aumento da homozigose, substituições alélicas mais rápidas (menor número de locos polimórficos e alelos), aumento do número de associações multilocos, otimização do efeito de fundação, diversidade entre colônias, pequeno fluxo de pólen (não necessariamente de fluxo gênico), formação drástica de "microespécies", restrição da recombinação e uma grande economia reprodutiva (JAIN, 1976). A autofecundação também parece aumentar a tendência para uma seleção grupal (GOVINDARAJU, 1988b). Entretanto deve-se ressaltar que a autofecundação não é sinônimo de pequena variabilidade genética, existindo espécies de autofecundação altamente polimórficas (ALLARD e cols., 1968).

No gênero *Hordeum* há várias espécies em que a autofecundação é o sistema de reprodução predominante. *H. spontaneum*, a espécie precursora da cevada cultivada (*H. vulgare*), apresenta uma taxa de fecundação cruzada de somente 1,6%, com pequenas variações aparentemente decorrentes de diferenças ambientais (BROWN e cols., 1978). Outra espécie, *H. jubatum* (tetraplóide), também apresenta pequenas taxas de fecundação cruzada, que variam entre 1% e 3% (BABEL & WAIN, 1977). Estas taxas de fecundação cruzada, mesmo que pequenas, parecem representar uma maneira das espécies evitarem a perda de variabilidade genética e, conseqüentemente, de flexibilidade, ou mesmo de promover o surgimento de novas combinações possivelmente mais favoráveis (STEBBINS, 1957; ALLARD e cols., 1968; JAIN, 1976; BABEL & WAIN, 1977). Há, também, outros mecanismos de manutenção de variabilidade. A heterozigosidade fixada, observada em espécies poliplóides pelo estudo de isoenzimas, como ocorre em *H. jubatum*, ajuda a manter uma alta versatilidade bioquímica (BABEL & WAIN, 1977). Muitas espécies, como *Bromus mollis* e *H. vulgare*, parecem apresentar níveis de fluxo gênico maiores que os inicialmente imaginados, comparáveis aos de coníferas polinizadas pelo vento (GOVINDARAJU, 1989). *H. vulgare*, embora cultivado predominantemente de autofecundação, apresenta uma migração de pólen de mais de 60 metros (WAGNER & ALLARD, 1991), fato que ajuda a explicar seu grande fluxo gênico e que, caso seja verificado também em populações

naturais, reforça a idéia da importância das taxas de fecundação cruzada na manutenção da variabilidade genética.

Como já foi dito, *H. euclaston* não apresentou uma taxa de fecundação cruzada detectável sem, aparentemente, ter perdido sua capacidade adaptativa e/ou flexibilidade, pois encontra-se distribuída por uma ampla série de habitats (ver introdução). Situação mais ou menos semelhante é encontrada na espécie *Relbunium hypocarpium* que, apesar de ser cleistógama, é perene. Nesta espécie foi determinado que a autofecundação é o sistema de cruzamento usual (CAVALLI-MOLINA e cols., 1989), sendo a taxa de fecundação cruzada muito baixa (FREITAS, 1989). A espécie apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocupando habitats distintos (EHRENDORFER, 1955; CAVALLI-MOLINA & WINGE, 1988). É razoável imaginar, portanto, que ambas as espécies possuam mecanismos genéticos alternativos que permitam a manutenção da capacidade adaptativa em um ambiente heterogêneo.

Um dos efeitos da autofecundação, como já foi mencionado, é a diminuição do grau de fecundação efetiva. Entretanto, mesmo com a grande maioria dos seus locos aparentemente em homozigose e a aparente inexistência de fecundação cruzada, *H. euclaston* apresenta um grande número de quiasmas nas células em meiose (M. DA S. LAUXEN, comunicação pessoal). Não é possível afirmar que tal fato seja somente uma herança evolutiva, podendo, de alguma

forma, estar relacionado com a estrutura genética da espécie.

4.2 Sistemas isoenzimáticos e variabilidade genética

4.2.1 Malato desidrogenases

As isoenzimas do sistema das malato desidrogenases (MDH) são responsáveis pela catálise da reação reversível de conversão do malato em oxalacetato, sendo uma das enzimas do ciclo de Krebs. Também transporta equivalentes reduzidos através das membranas mitocondriais, parece participar da fixação do CO₂ em plantas superiores (fotossíntese em C4) e há indícios de que possua uma função no ciclo do glioxilato (SCANDALIOS, 1974; McMILLIN & SCANDALIOS, 1983; KEPHART, 1990). Frequentemente são diméricas, apresentando normalmente três locos em espécies de plantas, com localizações subcelulares correspondendo ao citosol, mitocôndrias e microcorpos (KEPHART, 1990). As MDH podem, entretanto, variar grandemente quanto a estrutura e número de locos de acordo com a espécie. PARKS e cols. (1990) citam como usual o aparecimento de mais de três locos.

WENDEL & WEEDEN (1989) afirmam que as isoenzimas de MDH são frequentemente muito complexas em plantas. Entretanto este não foi o caso para *Hordeum euclaston*. O controle genético das bandas foi facilmente determinado, apresentando aparentemente três locos. O loco MDH1

apresentou-se monomórfico, com um padrão idêntico ao apresentado pelo controle do presente trabalho (cultivar MN599 de *H. vulgare*), possuindo uma banda secundária um pouco mais lenta. O loco MDH1, em cultivares recentes de *H. vulgare*, também não apresenta variação, entretanto cultivares mais primitivas e a espécie *H. spontaneum* apresentam dois alelos para o loco (BROWN & MUNDAY, 1982; BROWN, 1983).

O loco MDH2, ao contrário do primeiro, é polimórfico em *H. euclaston*. Entretanto o alelo menos comum apareceu em baixíssimas frequências e em somente duas populações. Para *H. vulgare* não há polimorfismo em MDH2, enquanto que em *H. spontaneum* estão presentes três alelos (BROWN & MUNDAY, 1982; BROWN, 1983).

O padrão do loco MDH2 do controle utilizado em nosso trabalho corresponde a 3 bandas, uma principal e duas secundárias, sendo uma secundária mais lenta e outra mais rápida que a principal. Este padrão é idêntico ao apresentado pelo alelo raro, MDH2¹, de *H. euclaston*. O alelo comum, MDH2², ao contrário, é um pouco mais lento e não apresenta secundárias. A ocorrência de bandas secundárias decorrentes de modificações pós-síntese da enzima originalmente formada pelo loco estrutural é um fenômeno bastante comum. Essas alterações químicas secundárias, que podem levar a formação de uma ou várias bandas, podem surgir "in vivo", dentro das células, ou "in vitro", durante a

estocagem ou manipulação do material (HOPKINSON, 1974). A causa do surgimento dessas isoenzimas secundárias são muitas: desaminação de resíduos de glutamina ou asparagina na superfície das enzimas, clivagem dos polipeptídeos por proteases, acetilação, metilação, sialização, fosforilação, reação dos grupos sulfidrilas com o glutathion oxidado, adição de cadeias de carboidratos, a polimerização de proteínas e mudanças no arranjo tridimensional da enzima (SINHA & HOPKINSON, 1969; HOPKINSON & HARRIS, 1969; HOPKINSON, 1970, 1974; HARRIS & HOPKINSON, 1977; DREYFUS e cols., 1978; LEBHERZ, 1983). No caso específico de isoenzimas de MDH e outras desidrogenases que requerem NAD ou NADP como coenzima, é comum o surgimento de bandas secundárias devido a saturação com a coenzima (HARRIS & HOPKINSON, 1977).

A situação mais comumente encontrada é que todos os produtos alélicos de um mesmo loco respondam similarmente, ou seja, se o produto de um alelo tem a propriedade de formar isoenzimas secundárias, os demais também têm. Entretanto situações distintas como a encontrada em *H. euclaston* onde apenas o produto de um alelo forma banda secundária e outro não, já foi descrito para a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) por WOLLHEIM (1991), que verificou que de um total de quatro alelos encontrados em um loco de esterase (EST2), um deles não possuía a secundária característica dos outros. Entretanto deve-se considerar que

os padrões apresentados pelos dois possíveis alelos de *H. euclaston* são muito distintos, podendo-se imaginar, apesar de não haverem indícios diretos, que talvez eles representem locos diferentes. Em GOT (ver resultados) há uma situação em que, aparentemente, diferenças regulatórias são as responsáveis por variações entre o padrão comum do loco GOT2 e um padrão muito semelhante ao do controle (cultivar MN599 de *H. vulgare*). Desta maneira pode-se pensar, inclusive, que talvez o padrão de três bandas representem mais de um loco, os quais são ativados juntos (assim como nos locos EST2 e EST3, ver resultados). Entretanto, BROWN & MUNDAY (1982) consideram MDH2 na cevada como um loco, mapeado no cromossomo 3.

O terceiro loco de MDH foi encontrado em poucas linhagens de *H. euclaston* e é normalmente muito fraco. Apesar de ter aparecido um pouco mais forte no controle do presente trabalho, ele não aparece citado por BROWN & MUNDAY (1982) e BROWN (1983), nem na cevada nem em *H. spontaneum*. Talvez esta diferença deva-se a uma maior sensibilidade dos métodos utilizados neste trabalho.

A variação apresentada por MDH indiscutivelmente foi pequena, principalmente se comparada com espécies de fecundação cruzada, como as do gênero *Populus* (ver Tabela IX). Uma das razões deste alto grau de monomorfismo indiscutivelmente é a autofecundação aparentemente obrigatória na espécie, apesar de que outras espécies com

baixa taxa de fecundação cruzada, como o trigo diplóide (*Triticum monococum* var. *boeoticum*) e *H. spontaneum*, também apresentam um grau de variabilidade relativamente maior (ver Tabela IX). Também pode ajudar a explicar o baixo grau de polimorfismo das MDH, para a maioria das espécies, o fato desse sistema utilizar como substrato uma substância naturalmente encontrada na célula, o que normalmente determina o aparecimento de um menor número de isoenzimas do que sistemas que utilizam substratos artificiais (JOHNSON, 1973, 1974; GOTTLIEB, 1982), ou substratos fisiológicos múltiplos que refletem a diversidade do ambiente (GILLESPIE & LANGLEY, 1974).

TABELA IX: Comparação da variabilidade em MDH entre *H. euclaston* e outras espécies de plantas.

Organismo	Nº de Locos	Nº Locos Polimorf.	Nº Alelos dos Locos Polimórf.	
Rimu (Gimnosperma)	2	1	2	a
<i>Sorghum bicolor</i>	3	2	4	b
<i>Bertholetia excelsa</i> (noz brasileira)	4	3	7	c
<i>Populus nigra</i>	6	2	4	d
<i>Populus deltoides</i>	5	3	8	d
<i>Populus maximowizii</i>	5	2	6	d
Uva do monte	2	1	3	e
<i>Triticum monococum</i> var. <i>boeoticum</i>	2	2	5	f
<i>Liriodendron</i> sp.	5	2	-	g
<i>Beta vulgaris</i> (beterraba)	5	-	-	h
<i>Cuphea laminuligera</i>	- 6 bandas	monomórficas		i
<i>Cuphea lutea</i>	- 3 bandas	monomórficas		i
<i>Hordeum vulgare</i> (cultivares recentes)	2	0	0	j
<i>Hordeum vulgare</i> (cultivares antigas)	2	1	2	j
<i>Hordeum spontaneum</i>	2	2	6	j
<i>Hordeum euclaston</i>	2*	1	2	

Referências: a-HAWKINS & SWEET (1989); b-MORDEN e cols. (1989); c-BUCKLEY e cols. (1988); d-RAJORA (1989); e-VORSA e cols. (1988); f-SMITH-HUERTA e cols. (1989); g-PARKS e cols. (1990); h-VAN GEYT e cols. (1990); i-KRUEGER & KNAPP (1990) j-BROWN & MUNDAY (1982); BROWN (1983).

* - O terceiro loco apareceu em poucos indivíduos, não sendo utilizado nesta comparação.

4.2.2 Glutamato oxalacetato transaminases

As glutamato oxalacetato transaminases (GOT), também referidas como aspartato amino transferases, estão envolvidas no metabolismo de aminoácidos dentro da célula. Frequentemente possuem, em plantas, uma estrutura dimérica, com um número de locos que normalmente varia entre dois e quatro. As localizações subcelulares das GOT são as mitocôndrias, plastídeos, citosol e microcorpos (KEPHART, 1990).

As isoenzimas de GOT em *Hordeum euclaston* são controladas por um número mínimo de quatro locos, onde aparentemente somente um é polimórfico. O controle utilizado no presente trabalho (cultivar MN599 de *H. vulgare*), por sua vez, apresentou cinco bandas, conforme é também indicado por BROWN (1983). Outros trabalhos, entretanto, relatam outros padrões isoenzimáticos. UPADHYA & YEE (1968) referem seis bandas monomórficas, ALMGARD & LANDEGREN (1974) quatro bandas monomórficas e KAHLER e cols. (1981) sete isoenzimas, divididas em duas zonas, uma das quais controlada por um loco polimórfico. Uma das razões destas diferenças pode ser uma intensa regulação ontogenética de GOT em *H. vulgare*, pois todos os trabalhos utilizaram indivíduos em estádios diferentes. Em *H. euclaston*, entretanto, não foi detectado qualquer tipo de alteração de origem ontogenética dentro dos limites de variação dos comprimentos de coleóptilo utilizados (parâmetro ontogenético utilizado). O controle

também não apresentou variação dentro desses limites, porém, em um teste realizado observou-se que o padrão diferia em raízes de plântulas muito novas.

O loco GOT1, monomórfico em *H. euclaston*, é também descrito como monomórfico em *H. vulgare* (BROWN, 1983), e pela comparação com o controle do presente trabalho o alelo parece ser o mesmo.

O loco GOT2 representa, possivelmente o único loco polimórfico de *H. euclaston*. Entretanto somente uma linhagem (SCM1042(6)) apresentou o alelo GOT2², apesar de que, devido aos problemas com a estocagem (ver resultados), o número de indivíduos analisados para este loco diminuiu consideravelmente. Dois indivíduos analisados no presente trabalho (HW3080(5) e HW3173(6)) apresentaram, ao invés de uma banda produzida por um dos alelos de GOT2, um padrão de duas bandas muito semelhante ao apresentado pelo controle. Em pelo menos uma destas linhagens este padrão parece ter surgido devido a alterações regulatórias (ver resultados), sugerindo que provavelmente haja uma maior homologia dos genes de GOT das duas espécies do que a observada numa comparação de zimogramas.

Diferenças regulatórias entre espécies relacionadas são esperadas. Trabalhos realizados indicam que o processo de formação de novas espécies requer principalmente mudanças ao nível dos mecanismos de regulação

gênico e nos sistemas poligenéticos coadaptados (HUBBY & THROCKMORTON, 1968; SOULÉ, 1973; WILSON e cols., 1974; CORDEIRO, 1974). Assim, pode-se esperar que grande parte dos genes estruturais estejam realmente presentes na maioria das espécies, mas ativados em momentos diferentes do desenvolvimento. Essa situação foi sugerida para espécies do gênero *Relbunium* por CAVALLI (1976), que descreve que bandas isoenzimáticas, as quais aparentemente distinguem espécies em plantas adultas, na realidade ocorrem em ambas espécies ativas em momentos ontogenéticos diferentes.

A mesma linhagem que apresentou o alelo GOT2² também não apresentou uma banda (MR7%=1,15) que considerava-se inicialmente como secundária de GOT3 (ver resultados). Três possíveis causas podem ser consideradas:

a - A existência em GOT3 de um alelo que não forma a secundária, conforme foi observado em MDH de *H. euclaston* e por WOLLHEIM (1991) em esterases de erva-mate, apesar de no caso de GOT a possível banda principal manter a mesma migração relativa.

b - A existência de polimorfismo em um loco modificador.

c - A existência de outro loco para a banda, possuindo esta linhagem um alelo nulo ou alterações regulatórias.

A ocorrência de genes modificadores causando alteração pós-síntese do produto de genes estruturais são bem documentados na literatura tanto em animais (COCHRANE & RICHMOND, 1979; FINNERTY & JOHNSON, 1979; JOHNSON e cols., 1981) como também em vegetais (MACDONALD & BREWBAKER, 1974; TYSON e cols., 1978; RICK e cols., 1979).

Alelos nulos correspondem a alelos que determinam a síntese de uma cadeia polipeptídica que perdeu total ou parcialmente sua função enzimática a ponto de não ser detectada no zimograma. Alelos nulos têm sido descritos para vários sistemas enzimáticos em vários organismos, normalmente em frequência baixa. GOTTLIEB (1973) descreve, para duas espécies de *Stephanomeria*, apenas um alelo nulo para um total de 24 alelos determinados para dez locos polimórficos. Em espécies de *Lycopersicon* também foram verificados alelos nulos, que embora sejam um número razoavelmente alto, sempre aparecem como variantes raras, a maioria ocorrendo em apenas uma população (RICK & FOBES, 1975; RICK e cols., 1977).

Apesar dos padrões de GOT terem normalmente permanecido altamente constantes, excetuando-se as alterações por estocagem, uma outra linhagem (HW3080(5)) também apresentou duas alterações em relação ao padrão comum. Um indivíduo não apresentou a banda de GOT1 além de apresentar o padrão de duas bandas em GOT2. Em GOT1 pode-se pensar na existência de um alelo nulo, apesar de não ter

vido detectado variação neste loco tanto para *H. vulgare* como para *H. spontaneum* (BROWN, 1983). Uma possível explicação para ambas as variações seriam alterações regulatórias.

A baixa variabilidade genética encontrada em GOT, assim como para MDH, pode ser explicada pela autofecundação aparentemente obrigatória e pelo tipo de substrato utilizado. O sistema parece freqüentemente não apresentar grandes variações, mesmo entre espécies de fecundação cruzada como as do gênero *Populus* (ver Tabela X). Entretanto, comparando-se *H. euclaston* com populações naturais de espécies próximas como *Arrhenatherum elatinus* (gramínea perene) e *H. spontaneum* pode-se notar um menor grau de polimorfismo (ver Tabela X), principalmente se for considerado que somente uma linhagem apresentou o alelo cuja banda diferia do padrão comum.

Deve-se fazer a ressalva, entretanto, que apesar do baixo grau de variabilidade genética, diferenças regulatórias parecem ser responsáveis por uma maior variabilidade do padrão. Inclusive, se for feito uma comparação entre as duas linhagens que apresentaram mais de uma alteração em relação ao padrão comum, pode-se sugerir a possibilidade da existência de uma relação entre as diferenças regulatórias (e suas possíveis causas) e a

TABELA X: Comparação da variabilidade em GOT entre *H. euclaston* e outras espécies de plantas.

Organismo	Nº de Locos	Nº Locos Polimorf.	Nº Alelos dos Locos Polimórf.	
<i>Triticum monococum</i> var. <i>boeoticum</i>	2	0	0	a
<i>Populus nigra</i>	4	0	0	b
<i>Populus deltoides</i>	4	0	0	b
<i>Populus maximowizii</i>	3	1	2	b
<i>Bertholetia excelsa</i> (noz brasileira)	2	1	2	c
<i>Sorghum bicolor</i>	3	1	3	d
<i>Cuphea laminuligera</i>	1	1	2	e
<i>Cuphea lutea</i>	- 2 bandas	monomórficas		e
Rimu (Gimnosperma)	2	1	2	f
<i>Picea mariana</i> (espruce negro)	2	2	6	g
<i>Daucus carota</i> L. ssp. <i>sativus</i>	3	3	6	h
<i>Arrehenatherum elatinus</i>	-	2	12	i
<i>Hordeum vulgare</i> (cultivares recentes)	3	1	2	j
<i>Hordeum vulgare</i> (cultivares antigas)	3	1	2	j
<i>Hordeum spontaneum</i>	3	2	4	j
<i>Hordeum euclaston</i>	4	1	2	

Referências: a-SMITH-HUERTA e cols. (1989); b-RAJORA (1989); c-BUCKLEY e cols. (1988); d-MORDEN e cols. (1989); e-KRUEGER & KNAPP (1990); f-HAWKINS & SWEET (1989); g-BOYLE e cols. (1990); h-WESTPHAL & WRICKE (1989); i-DUCOUSSO e cols. (1990); j-BROWN & MUNDAY (1982); BROWN (1983).

variabilidade genética existente, tópico o qual voltará a ser abordado mais adiante.

4.2.3 Esterases

As esterases (EST) são as enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações éster. Apresentam, normalmente, uma estrutura monomérica ou dimérica e entre dois a sete locos em plantas superiores. A sua localização subcelular normalmente restringe-se ao citosol (KEPHART, 1990). As

esterases são um dos sistemas isoenzimáticos mais variáveis em plantas, tanto quanto ao número de locos e alelos que as controlam quanto aos diferentes padrões isoenzimáticos observados em diferentes órgãos e tecidos. Uma possível relação entre essa diversidade bioquímica de alelos em cada loco e a variação fisiológica parece depender da função bioquímica da enzima e de sua função no metabolismo (KOEHN e cols., 1983; REBORDINOS & VEGA, 1990). Enzimas que utilizam substratos originados do meio ambiente estão sujeitas a uma considerável variação no tipo e concentração de substratos. Uma das "soluções" para esta variação parece ser a ação de múltiplas formas de enzimas apresentando diferentes afinidades ao substrato (JOHNSON, 1974). Essa também pode ser a explicação para o fato de que algumas enzimas com atividade esterásica possam também hidrolisar ligações não-éster (REBORDINOS & VEGA, 1990). Entretanto, apesar dessa aparente inespecificidade geral do sistema, algumas esterases indubitavelmente, ao menos em *Drosophila*, possuem funções metabólicas internas mais restritas (JOHNSON, 1974).

Para *Hordeum euclaston* foram definidos onze locos, responsáveis por treze bandas principais e nove bandas secundárias. Em *H. vulgare* e *H. spontaneum* são inúmeros os trabalhos que relatam zimogramas de esterases, havendo uma considerável variação no número de bandas apresentado (UPADHYA & YEE, 1968; KAHLER & ALLARD, 1970; WIER e cols., 1972; NIELSEN & FRYDENBERG, 1972; FEDAK & RAJHATHY, 1972;

BASSIRI, 1976; HVID & NIELSEN, 1977; BROWN e cols., 1978; NEVO e cols., 1979; KAHLER & ALLARD, 1981; BROWN & MUNDAY, 1982; BEKELE, 1983; BROWN, 1983; A. F. MARIS, comunicação pessoal). Nestes trabalhos foram definidos um máximo de dez locos, sendo que nas cultivares brasileiras, entre elas a utilizada como controle no presente trabalho (MN599), foram definidos pelo menos oito. Entretanto, a maioria dos autores não inclui, na sua análise, bandas fracas de difícil detecção, o que significa que esses valores são uma subestimativa do número real de locos existentes. Alguns trabalhos relatam diferenças tissulares e variações ontogenéticas no grau de atividade de algumas isoenzimas. Segundo BROWN & MUNDAY (1982) e BROWN (1983) todos os dez locos se mostraram polimórficos, alguns com um alto número de alelos, principalmente em *H. spontaneum*. *H. euclaston* também apresentou variações tissulares significativas. Entretanto o grau de polimorfismo para locos estruturais foi muito baixo e não foi detectado qualquer indício de alteração ontogenética do padrão dentro da faixa de idade e tamanho do coleóptilo estudada. Comparando-se especificamente com populações naturais de *H. spontaneum* (NEVO e cols., 1979) pode-se notar que, apesar de ambas apresentarem, em virtude da autofecundação, um grande número de homozigotos, a variabilidade genética de *H. euclaston* é muito menor. Em *H. spontaneum* o número de alelos pode chegar a quinze em um mesmo loco de esterase (BROWN e cols., 1978),

enquanto que em *H. euclaston* ambos os locos polimórficos mostraram apenas dois alelos.

Uma possível explicação para tão grande diferença entre espécies relacionadas e com o mesmo sistema de reprodução talvez seja devida a diferenças na taxa de fecundação cruzada, que é muitíssimo pequena, ou mesmo inexistente em *H. euclaston*, enquanto que em *H. spontaneum* é de 1,6% (BROWN e cols., 1978). Deve-se também considerar, entretanto, que a amostra analisada para *H. spontaneum* foi maior (BROWN e cols., 1978; NEVO e cols., 1979) que a para *H. euclaston*, e que talvez esta seja uma das causas da discrepância dos graus de variabilidade apresentados pelas duas espécies em esterase. As sementes de *H. euclaston*, por outro lado, foram coletadas em uma área de alta densidade da espécie (EGGERS & BOLDRINI, 1988), o que, em princípio, determina um maior grau de variabilidade para estes indivíduos do que para os de populações menores e marginais, conforme foi observado em *H. jubatum* (SHUMAKER & BABBLE, 1980), outra espécie de autofecundação, sendo, portanto, em princípio bastante representativas da variabilidade genética da espécie. BROWN e cols. (1978), entretanto, afirmam, baseados em estudos com *H. spontaneum*, da existência de evidências de que, em plantas, um grande número de alelos tendem a ser localmente comuns, porém raros no geral da espécie. É muito provável que o estudo de um maior número de populações de *H. euclaston* revele uma variabilidade genética

maior do que a detectada no presente trabalho. Entretanto certamente não da mesma magnitude que uma comparação com *H. spontaneum* possa fazer imaginar, pois as populações de *H. spontaneum* mais polimórficas, para esterase, apresentaram um grau de polimorfismo muito maior do que as estudadas em *H. euclaston*, teoricamente as mais polimórficas do Rio Grande do Sul.

Comparando-se os padrões de *H. euclaston* estudados com o do controle (coleóptilo de *H. vulgare*, cultivar MN599) não foi encontrado nenhuma banda homóloga. Entretanto, HVID & NIELSEN (1977) relatam a existência de uma banda catódica em folhas de *H. vulgare*, que também foi detectada, porém não incluída, na análise de A. F. MARIS (comunicação pessoal). Esta banda talvez seja homóloga a uma banda encontrada no endosperma de *H. euclaston*, a qual por apresentar-se normalmente difusa e/ou muito fraca nos indivíduos em que aparece não foi estudada. Isto não significa que muitos dos locos presentes nas duas espécies não sejam homólogos. Inclusive, cultivares brasileiras de *H. vulgare* (entre elas a MN599) apresentaram um loco com modificações pós-síntese semelhantes as do loco EST11 (A. F. MARIS, comunicação pessoal), sugerindo homologia entre esses locos.

Apesar do pequeno grau de polimorfismo genético, o número de padrões isoenzimáticos apresentados por *H. euclaston* foi muito grande, praticamente um por indivíduo.

Este fato parece ser explicado por diferenças regulatórias entre as linhagens (ver item 4.4 da discussão).

4.2.4 Superóxido dismutases

As enzimas do sistema das superóxido dismutases (SOD) são responsáveis pela inativação dos radicais superóxido presentes na célula, os quais, por serem uma das fontes de radicais hidroxila, são altamente tóxicos. As SOD são comumente encontradas sob as formas dimérica e tetramérica. Há três formas diferentes de SOD, denominadas pelos metais encontrados em seus sítios ativos, que são: ferro (FeSOD), manganês (MnSOD) e cobre-zinco (Cu-ZnSOD). As três formas catalisam a mesma reação, sendo a maior diferença entre elas a localização subcelular. A MnSOD é encontrada em mitocôndrias e peroxissomos, a FeSOD no estroma dos cloroplastos e a Cu-ZnSOD nos cloroplastos, citosol e glioxissomos (FRIDOVICH, 1974; DE JESUS, 1989; KEPHART, 1990).

A SOD é normalmente uma enzima muito estável (FRIDOVICH, 1974; ACEVEDO & SCANDALIOS, 1990), fato que é amplamente confirmado em *H. euclaston*. Indivíduos estocados por vários meses à -16 °C não mostraram qualquer tipo de variação no grau de atividade enzimática. *H. euclaston* não apresentou qualquer indício de alteração ontogenética dentro dos estreitos limites de variação do tamanho do coleóptilo (parâmetro ontogenético utilizado) desta análise, no que é

acompanhado pelo milho (*Zea mays*), o qual além disso não apresentou diferenciação tissular (ACEVEDO & SCANDALIOS, 1989). *H. euclaston*, entretanto, apresentou vários locos locos restritos a apenas um dos tecidos analisados (coleóptilo e raiz).

Em uma comparação com o controle (*H. vulgare*, cultivar MN599) pode-se notar que, em princípio, somente para o loco SOD1 é encontrada homologia com o seu alelo. Entretanto há uma banda, não estudada, junto ao ponto de aplicação que também é compartilhada pelos zimogramas de ambas as espécies.

Segundo KEPHART (1990), o número de locos de SOD mais comumente encontrado em plantas superiores varia de um a dois. Em várias espécies estudadas dos gêneros *Populus* e *Liriodendron* realmente o número de locos variou entre um e dois (RAJORA e cols., 1991; PARKS e cols., 1990), porém comparando-se outras espécies parece haver uma grande variação neste número. Em milho foram determinados cinco locos (CANNON & SCANDALIOS, 1989), em *Potamogeton pectinatus* o número de bandas varia entre 3 e 8 (VAN WIJK e cols., 1988) e em espécies de *Citrus* entre 8 e 10 (ALMANSA e cols., 1989). Em *H. euclaston* foram determinados nove locos, cujo número de bandas por padrão e por tecido tende a variar entre 5 e 9, num total de 18 bandas. Deve-se lembrar que este alto número de isoenzimas talvez possa estar incluindo

peroxidases, visto que algumas peroxidases podem ter atividade de superóxido dismutases (RAJORA e cols., 1991).

O grau de polimorfismo de SOD, como nos outros sistemas, não foi muito alto. Somente dois locos (SOD2 e SOD8) mostraram-se claramente polimórficos. SOD6 provavelmente também seja polimórfico, entretanto nas condições utilizadas não foi possível obter-se uma confirmação. SOD8 é, indiscutivelmente, o loco mais polimórfico de *H. euclaston*. Foi detectada a presença de pelo menos quatro alelos que não puderam ser distinguidos em todos os indivíduos. Uma provável causa dessa dificuldade na distinção é a existência de outros alelos cuja migração é intermediária aos já detectados. Caso isto seja confirmado, SOD8 será mais polimórfico que a maioria dos locos de SOD de muitas espécies de fecundação cruzada, como as do gênero *Populus*, que apresentaram um máximo de quatro alelos por loco em SOD (RAJORA e cols., 1991). Uma explicação satisfatória para tão alto grau de polimorfismo em uma espécie de autofecundação aparentemente obrigatória como *H. euclaston* e com um baixo grau de polimorfismo nos demais locos estudados, é difícil de ser encontrada. Uma hipótese seria a existência de uma taxa de mutação muito alta para SOD8, talvez relacionada com a localização subcelular e/ou tipo de enzima (MnSOD, FeSOD ou Cu-ZnSOD), e uma taxa de seleção ou muito fraca, que permite a manutenção de todos os alelos, ou que os diferentes alelos confirmam melhor

adaptação a distintos micro-ambientes. Deve-se considerar também que SOD8 e SOD9 apresentaram diferenças regulatórias, as quais, assim como as de GOT2, não podem ser aparentemente explicadas por segregação mendeliana clássica. Uma possível relação entre a variabilidade genética em SOD8 e GOT2 e as diferenças regulatórias não pode, portanto, ser descartada.

Alguns indivíduos de *H. euclaston* mostraram consideráveis diferenças no número de isoenzimas apresentadas em SOD, semelhante ao que foi encontrado em *Potamogeton pectinatus*, onde o número de bandas variou entre 3 e 8 por população (VAN WIJK e cols., 1988). Entretanto em *P. pectinatus* o número de bandas não variou dentro de uma mesma população (a reprodução é predominantemente vegetativa; VAN WIJK e cols., 1988), enquanto que em *H. euclaston* variou significativamente, indicando que esta espécie possui uma maior freqüência de alterações regulatórias e/ou, então, um maior fluxo gênico entre as populações.

4.3 Variabilidade populacional

A variabilidade intrapopulacional de *Hordeum euclaston* foi estimada, para os vinte e seis locos estruturais cujo controle genético foi definido, através de três medidas: A (número médio de alelos por loco), P (proporção de locos polimórficos) e H (grau de heterozigose média esperada por indivíduo). O loco SOD8 não foi utilizado nos cálculos de A e H.

Os resultados obtidos para estes três parâmetros foram menores que a média encontrada para espécies de autofecundação, ficando, entretanto, dentro dos limites de variação (ver Tabela XI). Embora a autofecundação seja, em princípio, uma das causas determinantes do baixo grau de polimorfismo apresentado dentro das populações, deve-se lembrar que espécies alógamas, como *Antennaria densifolia* (A=1,13; P=0,07; H=0,021; BAYER, 1989), podem possuir um grau de polimorfismo ainda menor, e que outras espécies autógamias, ou mesmo espécies de fecundação assexuada, como *Populus tremuloides* (A=2,3; P=0,92; H=0,42; CHELIAK & DANCIAK, 1982), podem possuir um grau bem maior de polimorfismo. Conseqüentemente pode-se concluir que outros fatores, além do sistema de reprodução, podem contribuir para o grau de variabilidade observado, como efeito de fundação, taxa de mutação, taxa e tipo de seleção, deriva genética, migração, entre outros. Para *H. euclaston* parece ser de grande importância a aparente inexistência de fecundação cruzada, pois em comparação a *H. spontaneum* (A=1,48; P=0,30; H=0,098; NEVO e cols., 1979) a taxa de fecundação cruzada existente nesta espécie, apesar de pequena, parece ser suficiente para manter um polimorfismo significativamente maior que o de *H. euclaston*. Semelhantemente algumas espécies de reprodução assexuada como *Populus tremuloides*, *Trifolium repens* e *Spartina patens* possuem altos graus de variação mantidos, aparentemente, por reproduções sexuais ocasionais (ELLSTRAND & ROOSE, 1987).

Tabela XI: Variabilidade genética estimada para isoenzimas em populações de plantas em relação ao tipo de reprodução (dados de CAVALLI-MOLINA, 1984; reorganizados a partir de HAMRICK, 1979).

Grupos	Nº Pops.	Nº Locos	A	P	H	I
Autógamas:						
média	22,59	15,86	1,31	0,26	0,075	0,930
limites	1-106	4-32	1,00-1,97	0,00-0,97	0,000-0,290	0,715-1,000
n	27	28	20	25	23	17
Alógamas:						
média	8,60	9,92	2,26	0,68	0,230	0,921
limites	1-31	3-27	1,00-4,55	0,00-1,00	0,000-0,446	0,648-1,000
n	25	25	25	24	22	16
<i>H. euclaston</i>	3	25-26	1,13	0,16	0,034	0,981

n = número de espécies estudadas

Apesar do nível de variabilidade genética intra-populacional poder variar nas espécies autógamas, parece que a principal diferença reside na proporção de heterozigotos, que é substancialmente superior entre as alógamas. Em *H. euclaston*, observamos ausência total de heterozigotos nas três populações analisadas.

HAMRICK e cols. (1979) afirmam que a longevidade é outro fator que influencia o nível de variabilidade genética e que espécies com menor tempo de vida freqüentemente possuem menor variabilidade eletroforética). Levando-se em conta o tempo de vida das plantas pode-se notar que os valores de A, P e H de *H. euclaston* se aproximam mais das médias das espécies bianuais do que das médias das espécies anuais (ver tabela XII), apesar de ser consideravelmente menor do que ambas. Uma possível relação disto com o fato de

algumas linhagens serem bianuais (M. DA S. LAUXEN, comunicação pessoal), apesar de improvável, não pode ser descartada.

Analisando ambas as variáveis, tipo de reprodução e tempo médio de vida, WOLFF (1991) comparou três espécies do gênero *Plantago*: *P. major* (anual ou bianual e autógama), *P. coronopus* (anual ou bianual e de reprodução sexual mista) e *P. lanceolata* (perene e de fecundação cruzada). *P. major* apresentou o menor grau de variabilidade enquanto que *P. lanceolata* apresentou o maior. *P. coronopus* apresentou um grau de variabilidade intermediária, o qual segundo o autor aparentemente não foi influenciado pelo seu curto ciclo de vida. Pode-se concluir, portanto, que o sistema de reprodução é mais relevante ao se analisar graus de variabilidade do que a duração do ciclo de vida. MORISHIMA & BARBIER (1990), estudando espécies selvagens de arroz e seus sistemas de reprodução, mostram que esses dois parâmetros tendem a ocorrer associados e que, em grande parte por esta combinação, o tempo médio de vida parece influenciar o grau de variabilidade genética existente.

Espécies de autofecundação teoricamente tendem a possuir um maior grau de distanciamento genético entre as populações, o qual pode ser decorrente tanto de sua origem evolutiva, como de adaptações locais, deriva genética e graus de isolamento. Esta tendência é observada, por exemplo, em três espécies do gênero *Plantago*, onde *P. major*,

Tabela XII: Variabilidade genética estimada para isoenzimas em populações de plantas em relação a sua longevidade (HAMRICK, 1979).

Grupos	Nº Pops.	Nº Locos	A	P	H	I
Árvores e arbustos lenhosos:						
média	8,40	9,60	2,56	0,75	0,354	0,929
limites	1-31	2-27	1,33-4,55	0,40-1,00	0,144-0,446	0,717-0,979
n	12	12	11	11	9	8
Ervas perenes:						
média	13,10	3,70	1,44	0,26	0,116	0,947
limites	1-63	2-27	1,00-2,82	0,00-0,94	0,000-0,336	0,853-1,000
n	15	23	15	21	14	13
Bianuais:						
média	21,80	18,40	1,35	0,22	0,079	0,970
limites	3-106	7-21	1,00-2,12	0,00-0,71	0,000-0,222	0,920-1,000
n	13	13	11	13	11	12
Anuais:						
média	17,30	12,50	1,80	0,46	0,154	0,916
limites	1-149	2-32	1,00-3,75	0,00-1,00	0,000-0,414	0,648-0,992
n	43	49	39	44	39	20
H. euclaston	3	25-26	1,13	0,16	0,034	0,981

n = número de espécies estudadas

autógama, possui o maior grau de diferenciação entre populações, *P. coronopus*, de reprodução mista, apresentou um grau intermediário e *P. lanceolata*, de fecundação cruzada, apresentou o menor grau (WOLFF, 1991). Entretanto, existem variações muito grandes no grau de diferenciação interpopulacional entre espécies e, como pode ser observado na tabela XI, a média de I (identidade genética) entre populações de espécies autógamas é praticamente a mesma que a das alógamas. Como exemplo de situações que não seguem o esperado teórico desta situação pode-se citar duas espécies

do gênero *Hedysarum*, onde *H. capitatum*, de fecundação cruzada, possui uma divergência interpopulacional maior ($D=0,023$; e portanto um I menor) do que o de *H. euspinosissimum* ($D=0,007$), de autofecundação predominante (BAATOUT e cols., 1990).

Os resultados obtidos para *H. euclaston* mostram um alto grau de semelhança entre as populações ($I_{sp}=0,98$). Mesmo com uma distância aproximada de 140 km entre as populações 5 e 8 esta semelhança não se altera. Possíveis explicações para um grau tão elevado de identidade genética entre populações relativamente distantes e com um fluxo gênico reduzido pela aparente inexistência de migração de pólen (cleistogamia) são muitas:

a - A espécie pode ter desenvolvido adaptações para dispersão de sementes mediada por animais a longas distâncias, como é observado em outras espécies altamente autofecundadas de *Hordeum* (STEBBINS, 1974; LEVIN & WILSON, 1976). Este fluxo gênico alto pode estar associado a uma seleção mais frouxa para os locos analisados.

b - As populações podem ter uma origem evlutiva comum e colonizado o ambiente a um tempo insuficiente para uma maior diferenciação genética, conforme foi levantado para a ausência de diferenças genéticas entre cinco populações do caracol *Chondrina clienta*, separadas por distâncias de aproximadamente 100 km (BAUER & KLEMM, 1989).

c - As três populações analisadas pertencem a mesma região fisiogeográfica e, portanto, podem estar sujeitas as mesmas pressões seletivas, de tal modo que os alelos mantidos são praticamente os mesmos nas três populações.

Deve-se considerar, entretanto, que a variabilidade genética detectada foi muito pequena e que este pode ter sido um fator fundamental para a baixa divergência verificada entre as populações. A maior parte da variabilidade isoenzimática (fenotípica) foi devida a diferenças regulatórias, cujas variações entre as populações não foram analisadas. A ativação dos locos EST3 e EST4, por exemplo, variou consideravelmente entre as populações (ver resultados), fato que talvez signifique que uma divergência populacional estimada a partir da variabilidade isoenzimática total, e não somente a de locos estruturais, resulte em um valor expressivamente maior.

4.4 Diferenças regulatórias

Foram encontradas diferenças tissulares com relação ao número, intensidade e velocidade de migração das bandas de *H. euclaston* (ver resultados). Diferenças nas intensidades relativas das bandas isoenzimáticas de tecido para tecido (ou estágio para estágio) são uma evidência de diferenças em reguladores tecido (ou estágio) específicos, não se excluindo explicações baseadas nas propriedades das

enzimas (por exemplo, estabilidade diferencial tecido específica; DICKINSON, 1983). Promotores múltiplos também conferem diferenças tanto qualitativas como quantitativas a expressão dos genes. Diferenças ontogenéticas em ADH (álcool desidrogenase) de *Drosophila melanogaster* e teciduais em AMI (amilase) de camundongo são comprovadamente devidas a presença de dois promotores distintos (SCHIBLER & SIERRA, 1987). Padrões tecido específicos também podem ser explicados por regulação-cis, a qual também parece relacionar-se a promotores múltiplos (DICKINSON, 1983).

Como pode ser comprovado no estudo dos sistemas enzimáticos, foram encontradas diferenças regulatórias entre determinados indivíduos de *Hordeum euclaston*. Alguns locos estão ativos em algumas linhagens e não nas restantes, como pode ser facilmente visualizado na Figura 10, cujo gel de EST possui somente uma linhagem com as bandas beta-esterásicas de $MR6\%=0,86$, $MR6\%=0,82$ e $MR6\%=0,77$ presentes. Em um teste de progênie desta linhagem comprovou-se que todos os indivíduos apresentavam este(s) loco(s) ativo(s). Situação semelhante foi também encontrada para outras bandas, inclusive as que representam os locos EST2, EST3 e EST8.

A espécie *Relbunium hypocarpium*, também de autofecundação, com uma taxa de fecundação cruzada extremamente pequena, apresentou diferenças entre suas linhagens semelhantes as encontradas neste trabalho, as quais

comprovadamente são conseqüências de diferenças regulatórias ontogenéticas (MOTTA, 1981; SCHIENGOLD, 1985; FREITAS, 1989). SCHIENGOLD (1985), estudando esterases de *R. hypocarpium* ao longo da ontogenia chega a levantar a possibilidade de cada linhagem possuir uma linha própria de desenvolvimento. A espécie de reprodução assexual, *Potamogeton pectinatus*, também apresenta variações marcantes no número de isoenzimas nos padrões de SOD entre diferentes populações (WIJK, 1988). Essas observações parecem sugerir que a ativação diferencial de locos em indivíduos de uma mesma espécie possa ser uma situação comum em plantas cujo sistema de reprodução limite o fluxo gênico entre os indivíduos, proporcionando que cada linhagem siga linhas evolutivas independentes.

Além das diferenças entre linhagens foram também encontradas diferenças regulatórias dentro da mesma linhagem. Pelo menos quatro linhagens apresentaram alterações no padrão entre plântulas-irmãs que não podem ser explicadas por segregação mendeliana clássica. As diferenças encontradas entre indivíduos-irmãos foram:

- presença de duas bandas ausentes na plântula-irmã da mesma linhagem ao invés da banda mais comum detectada na grande maioria dos indivíduos da espécie, verificada na linhagem HW3173(6) para o sistema de GOT (ver Figura 6 e resultados de GOT);

- presença/ausência de uma banda num tecido específico, como para o loco SOD9 na linhagem SCM1113(8) (ver resultados de SOD);

- variações na intensidade das bandas de locos específicos não acompanhados pelo resto do padrão, podendo inclusive incluir a ausência de certas bandas, conforme verificado na linhagem EKS3H(8) para os locos SOD8 e SOD9 (ver resultados de SOD) e na linhagem SCM1112(8) para os locos EST2, EST3, EST4, EST5 e EST10 (ver Figura 11 e resultados de EST);

- diferenças na migração de bandas em tecidos diferentes do mesmo indivíduo, quando normalmente a mesma banda ocorre nos dois tecidos, como verificado na linhagem EKS3H(8) para o loco SOD8 (ver resultados de SOD).

Em todos os casos essas diferenças não podem ser atribuídas a regulação ontogenética, uma vez que as plântulas-irmãs de todas as linhagens analisadas apresentaram diferenças muito pequenas quanto ao tamanho do coleóptilo e idade. Muitas vezes foi verificada coincidência nesses dois parâmetros ontogenéticos entre plântulas-irmãs com padrões distintos. Além disso as variações de idade e tamanho do coleóptilo nessas linhagens foram menores que as apresentadas por outras plântulas analisadas em outros testes de progênie que não mostraram diferenças em seus padrões isoenzimáticos. Também não acreditamos na

possibilidade de estar ocorrendo segregação em genes reguladores e/ou modificadores responsáveis pela ativação x desativação de locos específicos e/ou alterações pós-síntese dos produtos gênicos primários, respectivamente, desde que não foi observado nenhuma evidência de segregação em genes estruturais que, a princípio, seriam mais fáceis de serem detectados e analisados.

Está sendo proposta como uma possível explicação comum a estes quatro casos a presença de elementos de transposição, cuja atividade representaria a causa das alterações regulatórias verificadas dentro da mesma linhagem.

Os elementos de transposição (transposons) são seqüências de DNA, muito semelhantes a vírus, que possuem a capacidade de modificar a sua localização dentro do genoma. A transposição desses elementos pode causar uma alta freqüência de mutações instáveis, as quais podem ser revertidas também em alta freqüência. Essas mutações parecem possuir várias causas, que incluem alterações no módulo de leitura, redução da atividade e estabilidade das proteínas, além de poderem funcionar como introns, podendo alterar o RNA mensageiro. A excisão dos transposons nem sempre resulta na reversão da mutação causada pela inserção, pois normalmente a saída do elemento é acompanhada por pequenas mutações e duplicações junto ao sítio de excisão. Também são verificadas alterações cromossômicas estruturais, que

incluem inversões, duplicações, deleções, translocações e até mesmo a indução de ciclos quebra-fusão de pontes cromossômicas. Os transposons podem, além disso, assumir algum tipo de função regulatória no controle da expressão de determinados locos, reprimindo ou desreprimindo genes. Os transposons fazem parte do DNA repetitivo e moderadamente repetitivo, e parecem representar pelo menos 10% do genoma de eucariotos superiores (STROMMER, 1982; McCLINTOCK, 1984; SUTTON e cols., 1984; WALBOT & CULLIS, 1985; DÖRING & STARLINGER, 1986; CHEN e cols., 1986; COEN & CARPENTER, 1986; SAEDLER e cols., 1987; ALBERTS e cols., 1989; WESSLER, 1991a,b).

Também é necessário considerar que nem sempre as transposições ocorrem ao acaso no genoma. A inserção de elementos Ds (de milho) parecem ser influenciados por determinadas seqüências homólogas (SUTTON e cols., 1984), como já é evidenciado para alguns transposons de bactéria.

Na tentativa de relacionar uma maior freqüência de sementes inviáveis em certas linhagens com um aumento na taxa de transposição, analisamos a taxa de germinação de cada linhagem e a ocorrência de diferenças regulatórias. Pode-se notar que das quatro linhagens com diferenças regulatórias, três são tão viáveis quanto a maioria das outras, enquanto que a linhagem EKS3H(8) possui uma taxa de germinação bem menor que a média da população e da espécie (ver germinação de *Hordeum euclaston*, Tabela III).

Infelizmente não foi possível mostrar uma relação mais direta entre estas diferenças regulatórias e a viabilidade das linhagens, pois sementes inviáveis não podem ser analisadas e teste de progênie de outras linhagens com baixa taxa de germinação não foram realizadas pela falta de sementes e indivíduos viáveis. Entretanto deve-se mencionar que um teste piloto de uma população de *H. euclaston* (população 1), coletada em uma região diferente (Lagoa Vermelha; ver Figura 1) das três utilizadas neste trabalho, demonstrou que, aparentemente, esta população não possuía sementes férteis. Mesmo submetidas as mesmas condições de estocagem e germinação utilizadas nas populações analisadas neste trabalho nenhuma semente germinou. Nem mesmo as sementes plantadas em casa de vegetação e no telado germinaram (S. L. S. KAZMIERCZAK, comunicação pessoal). Este fato pode sugerir que o ambiente original das plantas-mãe possa ser o responsável por um aumento na frequência de transposições, induzindo alterações nas sementes que levem a inviabilidade.

Há vários indícios de ativação de elementos de transposição em plantas por diferentes condições de estresse. O elemento Ac2, em milho, parece ser temperatura sensível, respondendo ao aumento de temperatura com um aumento na frequência de transposições (OSTERMAN, 1991). Transposons parecem estar envolvidos na variação somaclonal observada em plantas geradas por cultura de tecidos (LARKIN

& SCOWCROFT, 1981), tendo sido encontrados presumíveis ativações de transposons em plantas regeneradas e sua progênie (LEE & PHILLIPS, 1988).

A inativação dos transposons parece ser consequência da metilação. É possível que haja, portanto, uma relação entre estresse, demetilação e ativação de elementos de transposição (DÖRING & STARLINGER, 1986). É possível, também, que diferentes condições de estresse causem a ativação de diferentes transposons (McCLINTOCK, 1984).

Admitindo-se um possível estresse submetido a população 1 de *H. euclaston*, deve-se considerar que o solo da região dos Campos de Cima da Serra (Lagoa Vermelha) é ácido, rico em alumínio e pobre em nutrientes, bem ao contrário da região da Campanha (região proveniente das populações estudadas), rico em nutrientes, menos ácido e com baixas concentrações de alumínio (S. C. LEITE, comunicação pessoal).

Caso esta possível transposição de elementos sugerida pelas análises eletroforéticas esteja envolvida na viabilidade das sementes de *H. euclaston* deve-se ressaltar que outras famílias de transposons, que causem alterações maiores no genoma, possam ser as responsáveis (ou parcialmente responsáveis) pela inviabilidade das sementes, pois os possíveis transposons presentes em EKS3H(8) e

SCM1112(8) foram obviamente encontrados em indivíduos viáveis. Apesar de considerarmos que a não germinação das sementes da população 1 possa ser devida a inviabilidade causada pela indução de transposições por estresse ambiental, não se pode descartar outras possibilidades, como a das sementes não terem sido coletadas totalmente maduras ou, talvez induzidas pelo estresse, as mesmas apresentarem dormência. Em *Chrysothamus nauseosus* foi verificado que a dormência é condicional e temperatura-dependente (MEYER e cols., 1989).

A infecção de plantas é outra situação de estresse que pode ocasionar um aumento de transposição. Em plantas de milho, a infecção com os vírus do mosaico estriado da cevada e mosaico estriado do trigo comprovadamente ativam dois diferentes tipos de transposons (McCLINTOCK, 1984; DÖRING & STARLINGER, 1986; SHAPIRO, 1987). Analogamente, MAUCH e cols. (1991) descobriram que um alelo aparentemente defectivo do gene da glutathione-S-transferase, pertencente a um loco que parece ser ativado em infecções do fungo *Erysiphe graminis* em trigo (*Triticum aestivum*), possui seqüências tipo transposon na região promotora. Em *H. euclaston* foi encontrado um indivíduo que apresentou alterações regulatórias aparentemente consequentes de uma infecção por fungos. Em um teste de progênie da linhagem HW3171(6), em EST, todos os indivíduos-irmãos analisados mostraram o mesmo padrão, excetuando um (fungado), o qual

apresentou alterações regulatórias nos locos EST2, EST3, EST9 e EST10. Excluindo o loco EST9, todos os locos restantes também apresentaram diferenças regulatórias na linhagem SCM1112(8). Essas alterações podem refletir a ativação x desativação direta de locos causados pela infecção ou, pode-se supor que essas diferenças regulatórias apresentadas pelo indivíduo infectado sejam decorrentes da ativação de transposons.

A respeito das alterações encontradas em SOD há um aspecto diferente com relação ao loco SOD8. Como mencionado anteriormente, foram encontradas diferenças de atividade na linhagem EKS3H(8) e um grau de polimorfismo muito alto quando comparado aos demais locos de *H. euclaston*. Além disso três indivíduos de linhagens distintas apresentaram diferenças de migração entre as bandas do coleóptilo e da raiz (ver resultados de SOD). Pode-se notar, inclusive, que nestes indivíduos as bandas dos dois tecidos possuem migrações que correspondem a alelos diferentes. Caso haja algum envolvimento de elementos de transposição com este loco é possível, portanto que algumas diferenças entre os alelos deva-se a inserção ou excisão de elementos de transposição no loco SOD8.

Os transposons comprovadamente são capazes de aumentar a variabilidade genética. Em *Antirrhinum majus* foram encontrados diferentes alelos para locos responsáveis por características morfológicas da flor derivados da

excisão imprecisa de elementos de transposição em linhagens autopolinizadas (COEN & CARPENTER, 1986). Diferentes formas proteicas são geradas pelo "splicing" alternativo em exons de genes de milho, fato que parece indicar que determinados transposons podem funcionar como introns móveis (WESSLER, 1991a,b). DÖRING & STARLINGER (1986) afirmam, inclusive, que as alterações decorrentes de elementos de transposição podem estar envolvidas diretamente na evolução proteica do milho.

Esta hipótese poderia explicar o alto grau de polimorfismo apresentado por SOD8 comparado com os outros locos polimórficos. Fato semelhante pode ter acontecido com a linhagem SCM1042(6) em GOT, a qual apresentou um alelo um pouco mais lento que o comum no loco GOT2 (ver Figura 7). Este loco sabidamente apresenta alterações regulatórias possivelmente causadas por transposição, e esta mesma linhagem não apresentou uma banda cuja ausência também talvez seja explicada por alterações regulatórias decorrentes de transposição (ver resultados de GOT).

Assim, a transposição, caso confirmada, seria um mecanismo de aumento da variabilidade na espécie *H. euclaston*. Além disso, caso também confirmada a especificidade dos sítios de inserção dos elementos e da influência do ambiente na sua ativação, pode-se sugerir que este aumento de variabilidade (tanto alélica como fenotípica) decorrente da transposição seja uma resposta a estresses ambientais sofridos pela planta. Com relação ao

fato dos possíveis transposons restringirem a sua ação a sistemas enzimáticos específicos, pode-se também inferir que esta resposta não seja devida somente a mutações aleatórias, mas também relativamente dirigidas como mecanismo de regulação da expressão gênica. Em levedura foram encontrados 14 locos reguladores da atividade do retrotransposon Ty, relacionados a muitas funções diferentes, como esporulação, reprodução e viabilidade (SHAPIRO, 1987). Também com relação ao fato dos possíveis transposons não transporem aleatoriamente, pode-se concluir que os genes das isoenzimas que apresentam alterações regulatórias possuem homologia pelo menos nos sítios de inserção, sugerindo, inclusive, que estes genes possam ter uma origem comum. É tentador imaginar, também, lembrando-se que uma das consequências da transposição são duplicações gênicas, uma possível relação entre transposição e a origem das isoenzimas.

Deve-se ressaltar, porém, que o que foi encontrado neste trabalho foram alterações regulatórias que não podem ser explicadas por segregação mendeliana, principalmente considerando a não existência de segregação nos genes estruturais analisados. Para explicar estes resultados obtidos é levantada a hipótese de serem consequência da atuação de elementos de transposição. Não há condições de comprovar a existência dos transposons com as técnicas utilizadas, mas pode-se sugerir que, qualquer que seja o mecanismo que regule estas alterações regulatórias, ele

possui uma estreita relação com o sistema de reprodução da espécie, incrementando consideravelmente a sua variabilidade fenotípica, pelo menos em termos de isoenzimas.

5. RESUMO E CONCLUSÃO

Hordeus euclastus é uma grama anual, diploide (2n=24), nativa do Rio Grande do Sul que apresenta alta variabilidade morfológica e fisiológica em uma ampla gama de habitats. A variabilidade genética desta espécie foi avaliada em três populações naturais da região da Campanha, Estado do Rio Grande do Sul, por quatro sistemas isoenzimáticos: esterase (EST), superóxido desidrogenase (SOD), aspartato aminotransferase (AAT) e álcool desidrogenase (ADH). O método de análise utilizado foi a eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida.

A variabilidade genética foi avaliada por meio de testes de variância a partir de dados de caráter qualitativo e quantitativo. Os resultados indicam que a população de Campanha apresenta alta variabilidade genética, o que pode ser explicado por fatores como o isolamento geográfico e a adaptação local.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Hordeum euclaston é uma gramínea anual, diplóide ($2n=14$), nativa do Rio Grande do Sul que apresenta uma grande variabilidade morfológica e distribui-se em uma ampla série de habitats. A variabilidade genética desta espécie foi avaliada em três populações naturais da região da Campanha, Estado do Rio Grande do Sul, para quatro sistemas isoenzimáticos: esterases (EST), superóxido dismutases (SOD), malato desidrogenases (MDH) e glutamato oxalacetato transaminases (GOT). O método de análise utilizado foi a eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida.

A variabilidade genética intrapopulacional foi estimada a partir do número de alelos por loco (A), proporção de locos polimórficos (P) e heterozigose média esperada por indivíduo. As divergências e similaridades interpopulacionais foram calculadas a partir de NEI (1972).

Os resultados obtidos podem ser sumariados como segue:

- A média geral de germinação da espécie, em placas de petri, foi de 82,5%, com limites por plants de 33,0% e 100,0%, sem grandes diferenças entre as populações. Quanto à velocidade de germinação o início da germinação ocorreu em média no 10º dia após a sementeira, com limites de 4 a 51 dias por sementes.

- Foram realizados 46 testes de progênie, nos quais não foi detectada segregação para nenhum loco estrutural das isoenzimas analisadas. Também não foi detectado nenhum padrão que pudesse corresponder a um heterozigoto nos 95 indivíduos das três populações analisadas. Estes resultados indicam um sistema de reprodução predominantemente por autofecundação, provavelmente por cleistogamia, e uma taxa de fecundação cruzada, se existente, muito pequena.

- Para o sistema MDH foi detectado um total de sete bandas controladas, possivelmente, por três locos. Somente o loco MDH2 é polimórfico, apresentando dois alelos, sendo que o mais raro apresenta um padrão idêntico ao do controle (*H. vulgare*), com duas secundárias, enquanto o alelo mais freqüente apresenta apenas a banda principal.

- Para o sistema GOT foram detectadas oito bandas controladas por, pelo menos, quatro locos. Somente o loco GOT2 é polimórfico, com o alelo raro ocorrendo em somente uma linhagem. Também foram encontrados dois indivíduos com

um padrão com duas bandas em lugar das bandas do loco GOT2, aparentemente originados por alterações regulatórias.

Para o sistema SOD foram detectadas 18 bandas, sendo nove catódicas. Foram definidos nove locos, dois deles, com certeza, polimórficos: SOD2, com dois alelos e atividade restrita à raiz, e SOD8, com pelo menos quatro alelos e atividade no coleóptilo e raiz. SOD8 e SOD9 apresentaram diferenças regulatórias dentro da mesma linhagem e no mesmo estágio ontogenético.

- Para o sistema EST foram detectadas 38 bandas, sendo nove com atividade beta-esterásica, 27 com atividade alfa-esterásica e duas bandas com ambas as atividades. Foram definidos 11 locos, sendo dois polimórficos: EST7, com dois alelos e atividade no coleóptilo, raiz e endosperma, e EST11, com dois alelos e atividade restrita à raiz e endosperma. As bandas de EST11 apresentaram uma modificação pós-síntese que alterou as suas mobilidades em um dos tecidos analisados. Foram detectadas diferenças regulatórias dentro de uma mesma linhagem para os locos EST2, EST3, EST4, EST5, EST9 e EST10.

- Foram detectadas diferenças na ativação de bandas isoenzimáticas entre linhagens. Essas diferenças são possivelmente devidas a diferenças regulatórias entre as linhagens que causam a ativação ou desativação dos genes

estruturais que codificam as isoenzimas num determinado estágio do desenvolvimento.

- Também foram observadas diferenças nos padrões isoenzimáticos entre indivíduos-irmãos de quatro linhagens. Como estas diferenças não podem ser explicadas nem por diferenças ontogenéticas entre os indivíduos analisados, nem por segregação em genes reguladores ou modificadores, sugere-se a possibilidade das mesmas serem causadas pela ativação de elementos de transposição.

- As médias da espécie para os três parâmetros de variabilidade intrapopulacional foram: $A = 1,113$, $P = 0,16$ e $H = 0,03$. Foram utilizados 26 locos para o cálculo de P , excluindo-se o loco SOD8 nos cálculos do A e H . As três populações analisadas foram muito similares, apresentando uma divergência genética média de 0,02 (com uma identidade correspondente de 0,98).

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Hordeum euclaston is an annual, diploid ($2n=14$) species, wild in Rio Grande do Sul, that shows a great morphologic variability and is distributed in a large number of habitats. The genetic variability of this species was estimated in three natural populations from Campanha region, state of Rio Grande do Sul, for four enzymatic systems: esterases (EST), superoxide dismutases (SOD), malate dehydrogenases (MDH), and glutamate oxalacetate transaminases (GOT). The analysis method used was horizontal electrophoresis on polyacrilamide gels.

The intrapopulation genetic variability was estimated from the number of alleles per locus (A), proportion of polymorphic loci (P) and theoretical mean heterozygosity per individual (H). The interpopulation divergences and similarities were calculated according to NEI (1972).

The results obtained can be summarized as follows:

- The species germination mean, in Petry Dishes, was 82.5%, with limits per plant of 33.0% and 100.0%, with no significative differences among the populations. In relation to the germination speed, the germination beginning occurred, on average, on the 10th day after the sowing, with limits per seed of 4 and 51 days.

- Forty-six progeny tests were carried out with no detection of seggregation to any structural locus of the isoenzyme systems analysed. The patterns of the 95 individuals from the three populations analysed did not show any clue about the existence of heterozygous. These results indicate a reproductive system predominantly autogamous, probably by cleistogamy, and a crossed fecundation rate, if not absent, too low.

- For the MDH system a total of seven bands was detected, controlled possibly by three loci. Only the locus MDH2 is polymorphic, with two alleles. The least common shows a pattern identical to the controle (*H. vulgare*), with two secondaries, while the most frequent allele shows just the main band.

- For the GOT system eighth bands were detected, controlled by, at least, four loci. Only the locus GOT2 is polymorphic, with the least common allele occurring in just one strain. Two individuals also showed a pattern with two

bands, instead of the GOT2 bands, apparently originated by regulatory alterations.

- For the SOD system a total of 18 bands was detected, being nine cathodic. Nine loci were defined, with two polymorphic: SOD2, with two alleles and activity restricted to the root, and SOD8, with at least four alleles and activity in both tissues (coleoptile and root). SOD8 and SOD9 showed regulatory differences among the same strain and at the same ontogenetic stage.

- For the EST system a total of 38 bands was detected, nine with beta-esterase activity, 27 with alpha-esterase activity, and two with both activities. Eleven loci were defined, being two of them polymorphic: EST7, with two alleles and activity in all tissues (coleoptile, root and endosperm); and EST11, with two alleles and activity restricted to the root and endosperm. EST11 also showed a post synthesis modification that alters the mobility of its bands in one of the analysed tissues. Regulatory differences were detected in the same strain in six loci: EST2, EST3, EST4, EST5, EST9, and EST10.

- Activation differences of isoenzymatic bands were detected among strains. These differences are possibly originated by regulatory differences among the strains that cause activation or repression of structural genes that transcribe the isoenzymes at a given developmental stage.

- Differences in the isoenzymatic patterns among "sister-seedlings" of four strains were also detected. Since these differences cannot be explained neither as ontogenetic differences nor by segregation of regulator or modifier genes, we suggest the possibility of they be caused by the activation of transposition elements.

- The species means values for the three intrapopulation genetic variability parameters were: $A = 1.13$, $P = 0.16$, and $H = 0.03$. Twenty-six loci were used to calculate P , excluding the locus SOD8 in the A and H calculations. The three populations analysed were very similar, showing a genetic divergence mean of 0.02 (with a correspondent identity mean of 0.98).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, A. & SCANDALIOS, J.G. Expression of the catalase and superoxide dismutase genes in mature problems in maize. **Theor. Appl. Genet.**, **80**:705-711, 1990.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular biology of the cell**. New York and London, Garland Publishing, Inc., 1989. p.605.
- ALLARD, R.W. The mating system and microevolution. **Genetics**, **79**:115-126, 1975.
- ALLARD, R.W.; JAIN, S.K.; VORKMAN, P.L. The genetics of inbreeding populations. **Advances in Genetics**, **14**:55-131, 1968.
- ALMANSA, M.S.; RIO, L.A. DEL; ALCARAZ, C.F.; SEVILLA, F. Isoenzyme pattern of superoxide dismutase in different varieties of citrus plants. **Physiologia Plantarum**, **76**:563-568, 1989.
- ALMGARD, G. & LANDEGREN, U. Isoenzyme variation used for the identification of barley cultivars. **Z. Pflanzenzüchtg.**, **72**:63-73, 1974.
- BAATOUT, H.; MARRAKCHI, M.; PERNES, J. Electrophoretic studies of genetic variation in natural populations of allogamous *Hedysarum capitatum* and autogamous *Hedysarum euspinosissimum*. **Plant Science**, **69**:49-64, 1990.
- BABEL, G.R. & WAIN, R.P. Genetic structure of *Hordeum jubatum*. I. Outcrossing rates and heterozygosity levels. **Can. J. Genet. Cytol.**, **19**:193-152, 1977.
- BASSIRI, A. Barley cultivar identification by use of isozyme electrophoretic patterns. **Can. J. Plant Sci.**, **56**:1-6, 1976.
- BAUR, B. & KLEMM, M. Absence of isozyme variation in geographically isolated populations of the land snail *Chondrina clienta*. **Heredity**, **63**:239-244, 1989.

- BAYER, R.J. Patterns of isozyme variation in western North American *Antennaria* (Asteraceae: Inuleae) II. Diploid and polyploid species of section *Alpinae*. **Amer. J. Bot.**, **76**(5):679-691, 1989.
- BEKELE, F. Some measures of gene diversity analysis on land race populations of Ethiopian barley. **Hereditas**, **98**:127-143, 1983.
- BOYLE, T.; LIENGSIRI, C.; PIEWLUANG, C. Genetic structure of black spruce on two contrasting sites. **Heredity**, **65**:393-399, 1990.
- BREWER, G.J. **An introduction to isozyme techniques**. New York, Academic Press, 1970. 175p.
- BROWN, A.H.D. apud. MUNDAY, J. Population-genetic structure and optimal sampling of land races of barley from Iran. **Genetica**, **58**:85-96, 1982.
- BROWN, A.H.D. Barley. In: TANKSLEY, S. D. & ORTON, T.J. (eds.). **Isozymes in plants genetics and breeding, part B**. Amsterdam, Elsevier Science Publisher B.V., 1983.
- BROWN, A.H.D. Barley. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J. (eds.). **Isozymes in plant genetics and breeding, part B**. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., 1983. p.57-77.
- BROWN, A.H.D., ZOHARY, D.; NEVO, E. Outcrossing rates and heterozygosity in natural populations of *Hordeum spontaneum* Koch in Israel. **Heredity**, **41**(1):49-62, 1978.
- BROWN, A.H.D.; NEVO, E., ZOHARY, D.; DAGAN, O. Genetic variation in natural populations of wild barley (*Hordeum spontaneum*). **Genetics**, **49**(2-3):970-108, 1978.
- BUCKLEY, D.P.; O'MALLEY, D.M.; APSIT, V.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl.; Lecythidaceae). 1. Genetic variation in natural populations. **Theor. Appl. Genet.**, **76**:923-928, 1988.
- CANNON, R.E. & SCANDALIOS, J.G. Two cDNAs encode two nearly identical Cu/Zn superoxide dismutase proteins in maize. **Mol. Gen. Genet.**, **219**:1-8, 1989. (citado por ACEVEDO & SCANDALIOS, 1990)>
- CAVALLI, S.S. **Divergência isozímica e relações evolutivas entre espécies do gênero *Relbunium* (Rubiaceae)**. Dissertação de Mestrado em Genética, Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 1976.

- CAVALLI-MOLINA, S. & WINGE, H. Phenetic relationships among populations of the autogamous plant *Relbunium hypocarpium* (Rubiaceae). *Rev. Brasil. Genet.*, 11(2):401-418, 1988.
- CAVALLI-MOLINA, S. **Variabilidade genética em populações naturais de *Relbunium hypocarpium*** (Rubiaceae). Tese de Doutorado em Genética. Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 1989.
- CAVALLI-MOLINA, S.; MOTTA, V.E.P.; SCHIENGOLD, M.; WINGE, H. Identical isoenzyme patterns in sib plants of *Relbunium hypocarpium* (Rubiaceae). *Rev. Brasil. Genet.*, 12(2):361-368, 1989.
- CHELIAK, W.M. & DANCIAK, B.P. Genic diversity of natural populations of a clone-forming tree *Populus tremuloides*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 24:611-616, 1982.
- CHEN, C.H.; FREELING, M.; MERCKELBACH, A. Enzymatic and morphological consequence of Ds excisions from maize Adh1. *Maydica*, 31:93-108, 1986. (citado por DÖRIONG & STARLINGER, 1986).
- COCHRANE, B.J. & RICHMOND, R.C. Studies of esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. I - The genetics of a post-translational modification. *Biochem. Genet.*, 17:167-183, 1979.
- COEN, E.S. & CARPENTER, R. Transposable elements in *Antirrhinum majus*: generators of genetic diversity. *Trends Genet.*, 2:292-296, 1986.
- CORDEIRO, A.R. **Variabilidade e regulação genética nos processos evolutivos**. Tese apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul para concurso a Professor Titular em Genética. Porto Alegre, RS, 1974.
- DICKINSON, W.J. Tissue-specific allelic isozyme patterns and cis-acting developmental regulators. In: MARKERT, C.L. **Current topics in biological and medical research**. vol. 9: Gene expression and development. New York, Alan R. Liss, Inc., 1983. p.107-123.
- DÖRIONG, H.P. & STARLINGER, P. Molecular genetics of transposable elements in plants. *Ann. Rev. Genet.*, 20:175-209, 1986.
- DREYFUS, J.C.; KAHN, A.; SHAPIRA, F. Post-translational modifications of enzymes. *Current Topics in Cellular Regulation*, 14:243-297, 1978.

- DUCOUSSO, A.; PETIT, D.; VALERO, M.; VERUET, P. Genetic variation between and within populations of a perennial grass: *Arrhenatherum elatius*. *Heredity*, **65**:179-188, 1990.
- DUNWELL, J.M. Barley. In: EVANS, D.A.; SHARP, E.R.; AMMIRATO, P.V. (eds.) *Handbook of plant cell culture*. New York, Macmillan Publ. Co. **4**:339-369, 1986.
- EGGERS, L. & BOLDRINI, I.I. Espécies silvestres do gênero *Hordeum* L. (Gramineae) ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul. *Iheringia, Ser. Bot.* (37):71-87, 1988.
- ELLSTRAND, N.C. & ROOSE, M.L. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *Amer. J. Bot.*, **74**(1):123-131, 1987.
- FEDAK, G. & RAJMATHY, T. Esterase isozymes in Canadian barley cultivars. *Can. J. Plant Sci.*, **52**:507-516, 1972.
- FEVERSTEIN, U.; BROWN, A.H.D.; BURDON, J.J. Linkage of rust resistance genes from wild barley (*Hordeum spontaneum*) with isozyme markers. *Plant Breeding*, **104**:318-324, 1990.
- FINNERTY, V. & JOHNSON, G. Post-translational modification as a potential explanation of high levels of enzyme polymorphisms: xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **91**:695-722, 1979.
- FORD-LLOYD, B.V. & JACKSON, M.T. Biotechnology and methods of conservation of plant genetic resources. *Journal of Biotchnology*, **170**:247-256, 1991.
- FORSTER, B.P.; PHILLIPS, M.S.; MILHER, T.E.; BAIRD, E.; POWELL, W. Chromosome location of genes controlling tolerance to salt (NaCl) and vigour in *Hordeum vulgare* and *H. chilense*. *Heredity*, **65**:99-107, 1990.
- FREITAS, L.B. de. **Contribuição da regulação gênica para a variabilidade isoenzimática de GOT (Glutamato-Oxalacetato Transaminase) em *Relbunium hypocarpium* (Rubiaceae)**. Dissertação de Mestrado em Genética. Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 1989.
- FRIDDWICH, I. Superoxide dismutase. In: HAYAISHI, O. **Molecular mechanisms of oxigen activation**. New York, Academic Press, 1974. p.453-477.
- GILES, B.E. & von BOTHMER, R.V. The progenitor of barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) - its importance as a gene resource. *Svenges Utsödesförenings Tidstirift*, **95**:53-61, 1985.

- GILLESPIE, J.H. & LANGLEY, C.H. A general mode to account for enzyme variation in natural populations. **Genetics**, **76**:837-884, 1974.
- GOTTLIEB, L.D. Conservation and duplication of isozymes in plants. **Science**, **216**(23):273-380, 1982.
- GOTTLIEB, L.D. Genetic differentiation, sympatric speciation and the origin of a diploid species of *Stephanomeria*. **Amer. J. Bot.**, **60**:545-553, 1973.
- GOVINDARAJU, D.R. Mating systems and the opportunity for group selection in plants. **Evolutionary Trends in Plants**, **2**(2):99-106, 1988b.
- GOVINDARAJU, D.R. Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. **J. Evol. Biol.**, **3**:173-181, 1989.
- GOVINDORAJU, D.R. A note on the relationship between outcrossing rate and gene flow in plants. **Heredity**, **61**:401-404, 1988a.
- HAMRICK, J.L. Genetic variation and longevity. In: SOLBRIG, O.T.; JAIN, S.; JOHNSON, G.B.; RAVEN, P.H. (eds.). **Topics in plant population biology**. New York, Columbia University Press, 1979. p.84-113. (citado por CAVALLI-MOLINA, 1984).
- HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationship between life-history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, **10**:173-200, 1979. (citado por WOLFF, 1991).
- HANKES, J.G. The importance of genetic resources in plant breeding. **Biological Journal of the Linnean Society**, **43**:3-10, 1991.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics**. Amsterdam, North-Holland Publ. Co., 1977. p.1-12.
- HARRY, D.E. Identification of a locus modifying the electrophoretic mobility of malate dehydrogenase isozymes in incense-cedar (*Calocedrus decurrens*), and its implications for population studies. **Biochemical Genetics**, **21**(5-6):417-439, 1983.
- HARRY, D.E. Identification of a locus modifying the electrophoretic mobility of malate dehydrogenase isozymes in Incense cedar (*Calocedens decurrens*), and its implications for population studies. **Biochemical Genetics**, **21**(5-6):417-434, 1983.

- HAWKINS, B.J. & SWEET, G.B. Genetic variation in rimu - an investigation using isozyme analysis. **New Zealand Journal of Botany**, 27:83-90, 1989.
- HOPKINSON, D.A. & HARRIS, H. The investigation of reactive sulphhydryls in enzymes and their variants by starch gel electrophoresis. Studies on red cells adenosine deaminase. **Ann. Hum. Genet.**, 33:81-87, 1969.
- HOPKINSON, D.A. Isozymes. **J. Clin. Path.**, 27(8):122-127, 1974.
- HOPKINSON, D.A. The investigation of reactive sulphhydryls in enzymes and their variants by starch-gel electrophoresis: studies on the human phosphohexose isomerase variant PHI5-1. **Ann. Hum. Genet.**, 34: 79-84, 1970.
- HUBBY, J.L. & THROCKMORTON, L.H. Protein differences in *Drosophila*. IV. A study of sibling species. **The American Naturalist**, 102:193-205, 1968.
- HVID, S. & NIELSEN, G. Esterase isoenzyme variants in barley. **Heredity**, 87:155-167, 1977.
- JAIN, S.K. The evolution of inbreeding in plants. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, 7:469-495, 1976.
- JESUS, M.D. de; TABATABAI, F.; CHAPMAN, D.J. Taxonomic distribution of cooper-zinc superoxide dismutase in green algae and its phylogenetic importance. **J. Phycol.**, 25:767-772, 1989.
- JOHNSON, G. Importance of substrate variability to enzyme polymorphism. **Nature New Biology**, 243:151-153, 1973.
- JOHNSON, G.; FINNERTY, V.; HARTL, D. Post-translational modification of xanthine dehydrogenase in a natural population of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 98:817-831, 1981.
- JOHNSON, G.B. Enzyme polymorphism and metabolism. **Science**, 184:28-37, 1974.
- KAHLER, A.L. & ALLARD, R.W. Genetics of isozymes variants in barley. I. Esterases. **Crop. Science**, 10:444-448, 1970.
- KAHLER, A.L. & ALLARD, R.W. Worldwide patterns of genetic variation among four esterase loci in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theor. Appl. Genet.**, 59:101-111, 1981.

- KAHLER, A.L.; HEATH-PAGLIUSO, S.; ALLARD, R.W. Genetics of isozyme variants in barley. II. 6-Phosphogluconate dehydrogenase, glutamatae oxalate transaminase, and acid phosphatase. **Crop Science**, 21:536-540, 1981.
- KEPHART, S.R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **Amer. J. Bot.**, 77(5):643-712, 1990.
- KIMURA, M. The neutral theory of molecular evolution. IN: NEI, M. & KOEHN, R.K. (eds.). **Evolution of genes and proteins**. Sinauer Associates Inc., 1983. p.208-233.
- KOEHN, R.K.; ZERA, A.J.; MALL, J.G. Enzyme polymorphisms and natural selection. In: NEI, M. & KOEHN, R.K. (eds.). **Evolution of genes and proteins**. Sinauer Associates Inc., 1983. p.115-136.
- KRUEGER, S.K. & KNAPP, S.J. Genetics of allozyme variation in *Cuphea laminuligera* and *C. lutea*. **Journal of Heredity**, 81:351-358, 1990.
- LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theor. Appl. Genet.**, 60:197-219, 1981. (citado por LEE & PHILLIPS, 1988).
- LEBHERZ, H.G. On epigenetically generated isozymes ("Pseudo isozymes") and their possible biological relevance. In: MARKERT, C.L. **Isozymes: current topics in biological and medical research**, vol. 7: Molecular structure and regulation. New York, Alan R. Liss, 1983. p.203-219.
- LEE, M. & PHILLIPS, R.L. The chromosomal basis of somaclonal variation. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 39:413-437, 1988.
- LEVIN, D.A. & WILSON, A.C. Rates of evolution in seed plants: net increase in diversity of chromosome numbers and species numbers through time. **Proc. nat. Acad. Sci. USA**, 73:2086-2090, 1976. (citado por GOVINDORAJU, 1989).
- MAUCH, F.; HERTIG, C.; REBMANN, G.; BULL, J.; DUDLER, R. A wheat glutathione-S-transferase gene with transposon-like sequences in the promoter region. **Plant Molecular Biology**, 16:1089-1091, 1991.
- McCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. **Science**, 226:792-801, 1984.

- McMILLAN, D.E. & SCANDALIOS, J.G. Genetic analysis of the duplicated mitochondrial and cytosolic dehydrogenase isozymes in maize. IN: NEI, M. & KOELN, R.K. (eds.). **Evolution of genes and proteins**. Sinauer Associates Inc., 1983. p.67-90.
- MEYER, S.E.; McARTHUR, E.D.; JORGENSEN, G.L. Variation in germination response to temperature in rubber rabbitbrush (*Chrysothamnus nauseosus*: Asteraceae) and its ecological implications. **Amer. J. Bot.**, 76(7):981-991, 1989.
- MORDEN, C.W.; DOEBLEY, J.F.; SCHERTZ, K.F. Allozyme variation in old world races of *Sorghum bicolor* (Poaceae). **Amer. J. Bot.**, 76(2):247-255, 1989.
- MORISHIMA, H. & BARBIER, P. Mating system and genetic structure of natural populations in wild rice *Oryza rufipogon*. **Plant Species Biol.**, 5:31-39, 1990.
- MOTTA, V.E.P. **Desenvolvimento ontogenético e modificações dos padrões isoesterásicos de *Relbunium hypocarpium* (Rubiaceae)**. Dissertação de Mestrado em Genética. Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 1989.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **Amerc. Naturl.**, 106:283-292, 1972.
- NEVO, E.; BEILES, A.; KRUGMAN, T. Natural selection of allozyme polymorphisms: a microgeographical differentiation by edaphic, topographical, and temporal factors in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*). **Theor. Appl. Genet.**, 76:737-752, 1988.
- NEVO, E.; ZOHARY, D.; BROWN, A.H.D.; HABER, M. Genetic diversity and environmental associations of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in Israel. **Evolution**, 33 (3):815-833, 1979.
- NIELSEN, G. & FRYDENBERG, O. Distribution of esterase isozymne, α -amylase types, and DDT reactions in some European barleys. **Z. Pflanzenzüchtg.**, 68:213-224, 1972.
- OSTERMAN, J.C. Transposition of Ac2 in response to temperature. **Maydica**, 36:197-151, 1991.
- PARKS, C.R.; WENDEL, J.F., SEWELL, M.M.; OIU, Y.L. Genetic control of isozyme variation in the genus *Liriodendron* L. (Magnoliaceae). **The Journal of Heredity**, 81(4):317-323, 1990.

- PIGLIUCI, M.; MALVOLTI, M.E.; FINESCHI, S. Relationships between protein polymorphism and phenotypic variation in *Populus deltoides* Bartr. **Hereditas**, **114**:79-84, 1991.
- RAJORA, O.P.; DANCİK, B.P.; ALEKSIUK, M. Associations of genes encoding allozymes of peroxidase and superoxide dismutase in poplar and spruce species. **Theor. Appl. Genet.**, **81**:729-734, 1991.
- RAJORA, Om.P. Marker allozyme genes and alleles for differentiation of *Populus deltoides*, *P. nigro*, *P. maximowiczii*, and their interspecific hybrids. **Can. J. Bot.**, **68**:990-998, 1990.
- REBORDINOS, L. & VEGA, M.P. de la. Genetic variability of leaf esterases in *Triticum aestivum* L. $2n=6x=92$. **Theor. Appl. Genet.**, **79**:673-678, 1990.
- RICK, C.M. & FOBES, J.F. Allozyme variation in the cultivated tomato and closely related species. **Bulletin of the Türey Botanical Club**, **102**(6):376-384, 1975.
- RICK, C.M. Natural variability in wild species of *Lycopersicon* and its bearing on tomato breeding. **Genet. Agr.**, **30**:249-259, 1976.
- RICK, C.M.; FABER, J.F.; HOLLE, M. Genetic variation in *Lycopersicon pimpinellifolium*: evidence of evolutionary change in mating systems. **Plant System. Evol.**, **127**:139-170, 1977.
- RICK, C.M.; TANKSLEY, S.D.; FOBES, J.F. A pseudoduplication in *Lycopersicon pimpinellifolium*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **76**(7):3435-3439, 1979.
- ROOSE, M.L. & GOTTLIEB, L.D. Genetic and biochemical consequences of polyploidy in *Trogopogon*. **Evolution**, **30**:818-830, 1976.
- SAEDLER, H.; GIERL, A.; SOMMER, H.; SCHWARZ-SOMMER, Z. Plant transposable elements and their role in the evolution of regulatory units and proteins. **J. Cell Sci., Suppl.**, **7**:139-144, 1987.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, **3**(1):37-79, 1969.
- SCANDALIOS, J.G. Isozymes in development and differentiation. **Ann Rev. Plant Physiol.**, **25**:225-258, 1974.

- SCHIBLER, U. & SIERRA, F. Alternative promoters in developmental gene expression. *Ann. Rev. Genet.*, 21:237-257, 1987.
- SCHIENGOLD, M. Efeito da regulação gênica na variabilidade isoesterásica de *Relbunium hypocarpium* (Rubiaceae). Dissertação de Mestrado em Genética. Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 1985.
- SHAPIRO, J. Eukaryotic transposable elements as mutagenic agents: a meeting review. *Genes and development*, 1:747-750, 1987.
- SHUMAKER, K.M. & BABBLE, G.R. Patterns of allozymic similarity in ecologically central and marginal populations of *Hordeum jubatum* in Utah. *Evolution*, 34(1):110-116, 1980.
- SINHA, K.P. & HOPKINSON, D.A. The investigation of reactive sulphhydryls in enzymes and their variants by starch gel electrophoresis. *Ann. Hum. Genet.*, 33:139-147, 1969.
- SMITH-HUERTA, N.L.; HUERTA, A.J.; BARNHART, D.; WAINES, J.G. Genetic diversity in wild diploid wheats *Triticum monococcum* var. *boroticuym* and *T. urartu* (Poaceae). *Theor. Appl. Genet.*, 78:260-264, 1989.
- SOULÉ, M. The epistasis cycle: a theory of marginal populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 4:165-187, 1973.
- STEBBINS, G.L. **Flowering plants: evolution above the species level.** Cambridge, Belknap Press, 1974. (citado por GOVINDORAJU, 1989).
- STEBBINS, G.L. Self fertilization and population variability in the higher plants. *The American Naturalist*, 91(861):337-354, 1957.
- STROMMER, J.N.; HAKE, S.; BENNETZEN, J.; TAYLOR, W.C.; FREELING, M. Regulatory mutants of the maize *Adh1* gene caused by DNA insertions. *Nature*, 300(9):542-544, 1982.
- SUTTON, W.D.; GERLACH, W.L.; SCHWARTZ, D.; PEACOCK, W.J. Molecular analysis of *Ds* controlling element mutations at the *Adh1* locus of maize. *Science*, 223:1265-1268, 1984.
- UPADHYA, M.D. & YEE, J. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. VII. Isoenzyme variations in tissues of barley seedling. *Phytochemistry*, 7:937-943, 1968.

- VALLEJOS, E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J. (eds.). **Isozymes and plant genetics and breeding, Part A**. Amsterdam, Elsevier Science Publisher B.V., 1983, p.469-516.
- VAN GEYT, J.P.C.; SMED, E.; OLÉO, M. Genetical control and linkage relationships of isozyme markers in sugar beet (*B. vulgaris* L.). 2. NADP- and NAD-specific malate dehydrogenases, 6-P-gluconate dehydrogenase, shikimate dehydrogenase, diophorase and aconitase. **Theor. Appl. Genet.**, **80**:593-601, 1990.
- VAN WIJK, R.J.; VAN GOOR, E.M.J.; VERLEY, J.H.C. Ecological studies on *Potamogeton pectinatus* L. II. Autoecological characteristics, with emphasis on salt tolerance, intraspecific variation and isozyme patterns. **Aquatic Botany**, **32**:239-260, 1988.
- von BOTHMER, R. & JACOBSEN, N. Origin, taxonomy and related species. In: **Barley**. Agronomy, Monograph, Madison (26):19-56. 1985.
- von BOTHMER, R. & JACOBSEN, N. Wilde species of *Hordeum* (Barley) in Argentina and Chile. **Geogr. Tidsskr** **80**:18-21, 1980.
- von BOTHMER, R.; JACOBSEN, N.; JORGENSEN, R.B.; NICORA, E. Revision of the *Hordeum pusillum* group. **Noed. J. Bot.** **2**:307-321, 1982.
- VORSA, N.; MANOS, P.S.; HEEMSTRA, M.I.V. Isozyme variation and inheritance in blueberry. **Genome**, **30**:776-781, 1988.
- WAGNER, O.B. & ALLARD, R.W. Pollen migration in predominantly self-fertilizing plants: barley. **Journal of Heredity**, **82**:302-304, 1991.
- WALBOT, V. & CULLIS, C.A. Rapid genomic change in higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, **36**:367-396, 1985.
- WEIR, B.S.; ALLARD, R.W.; KAHLER, A.L. Amylase polymorphisms in a barley population. **Genetics**, **72**:505-523, 1972.
- WENDEL, J.F. & WEEDEN, N.F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.S. (eds.). **Isozymes in plant biology**. Portland, Dioscorides Press (in press). 1989). (citado por PARKS e cols., 1990).
- WESSLER, S.R. Alternative splicing of a DS element from exon sequences may account for two forms of Wx protein encoded by the Wx-M9 allele. **Maydica**, **36**:317-33, 1991b.

- WESSLER, S>R. The maize transposable DsI element is alternatively spliced from exon sequences. **Molecular and Cellular Biology**, 11(12):6192-6196, 1991a.
- WESTPHAL, L. & WRICKER, G. Genetic analysis of DIA, GOT and PGI isozyme loci in *Daucus corota* L. ssp. *sativus*. **Plant Breeding**, 102:51-57, 1989.
- WILSON, A.C.; MAXSON, L.R.; SARICK, V.M. Two types of molecular evolution. Evidence from studies of interspecific hybridization. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 71:2893-2847, 1974.
- WOLFF, K. Analysis of allozyme variability in three *Plantago* species and a comparison to morphological variability. **Theor. Appl. Genet.**, 81:119-126, 1991.
- WOLLHEIM, C. Modificações dos padrões isoesterásicos ao longo do desenvolvimento de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae). Dissertação de Mestrado em Genética. Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 1991.