

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/9227
IB/80533

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1988

Este exemplar corresponde à redação final da tese
defendida pela candidata Sra. Rosa Maria Lizana Balloé
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Ricardo
23/3/88

ISOENZIMAS COMO MARCADORES GENÉTICOS EM PALMITEIRO
(*Euterpe spp.*)

Rosa Maria Lizana Balloé

Orientador: Herculano Penna Medina Filho

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título
de mestre em Biologia.

CAMPINAS - SP

1988

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Classif. T	
Autor B2141	
V. Ex.	
Combo BC/ B227	
1B	783

1B/80533
3C/9227

Al recuerdo de mi compañero,
Jaime,
y a los que hoy me acompañan,
Cristian, Sebastian y Milena,
dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Herculano Penna Medina Filho, a quem devo a orientação desta tese, e, particularmente pela confiança, pelo estímulo e pela grande atenção amiga sempre oferecida.

A Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas pelas concessões de materiais do Laboratório de Eletroforese utilizados neste trabalho.

A todo pessoal amigo da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas, pelo apoio e amizade oferecida.

A Dra. M.L.A.Bovi da Seção de Plantas Tropicais do Instituto Agronômico de Campinas pela concessão do material vegetal utilizado, pelo trabalho de revisão desta tese e especialmente pelo constante apoio oferecido.

Ao Dr. Rolf Dieter Illg, como Coordenador do Curso de Pós Graduação de Genética da UNICAMP pelo constante estímulo e apoio durante o curso.

A Silvia, pela sua incessante ajuda e sua eficiência na secretaria de Pós Graduação do Dpto. de Genética da UNICAMP.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a CAPES pelo suporte financeiro concedido para a realização desse trabalho.

Ao Dr. William José da Silva da UNICAMP e ao Dr. José Alfredo Usberti do IAC pelo seu trabalho de revisão desta tese.

A meus pais Pedro e Rosa pelo seu amor, confiança, estímulo e apoio durante a minha vida.

A Ramon e Madya pelo todo seu carinho e entendimento; a Feliciano e Elga, meus amigos e vizinhos, pelo seu apoio e constante atenção;

A Magaly pela sua ajuda e dedicação para com nós; a Mitchie pela sua espiritualidade; a Zamira pela sua alegria; a Mirtes, minha amiga sem perguntas; a Gabriela pela sua preocupação; a Isabel pelo que significou e a Laura, mãe amiga, porque sempre me ouviu.

A meus amigos Angel, sempre dedicado; Rodolfo, sempre atento; David, sempre preocupado; Gerardo, sempre atencioso e a Roberto, sempre pensando e me lembrando que hoje posso ser feliz e melhor graças ao aprendido ontem.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desse trabalho.

CONTEUDO

APRESENTAÇÃO	1
1 - INTRODUÇÃO	2
2 - REVISAO BIBLIOGRAFICA	6
2.1 - PROBLEMATICA	6
2.2 - <u>EUTERPE EDULIS</u> E <u>EUTERPE OLERACEA</u>	8
2.3 - HIBRIDOS INTERESPECIFICOS	12
2.4 - ELETROFORESE E ISOENZIMAS	15
2.5 - ELETROFORESE EM GENETICA E MELHORAMENTO	19
3 - MATERIAIS E METODOS	25
3.1 - EQUIPAMENTO	25
3.2 - MATERIAL VEGETAL	26
3.3 - TECIDOS ALTERNATIVOS E ESTADIOS DE DESENVOLVIMENTO	27
3.4 - ARMAZENAMENTO DOS TECIDOS VEGETAIS	28
3.5 - TECNICA E METODOLOGIA DA ELETROFORESE	28
3.5.1 - Preparação do gel de amido	28
3.5.2 - Eletroforese	29
3.5.2.1 - Concentração de amido no gel	30
3.5.2.2 - Concentração e pH das soluções tampão	30
3.5.2.3 - Soluções extratoras	31
3.5.2.4 - Maceração	31
3.5.2.5 - Tempo e intensidade de corrente para a eletroforese	32
3.5.2.6 - Camadas apropriadas	32
3.5.2.6 - Sistemas enzimáticos	32

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 - METODOLOGIA DE ELETROFORESE EM PALMITEIRO	35
4.1.1 - Técnica	35
4.1.1.1 - Concentração de amido no gel	35
4.1.1.2 - Composição e pH das soluções..... tampão	36
4.1.1.3 - Soluções extratoras	38
4.1.1.4 - Maceração.....	39
4.1.1.5 - Tempo e intensidade de corrente para a eletroforese	40
4.1.1.6 - Camadas apropriadas	41
4.1.1.7 - Sistemas enzimáticos	42
4.1.2 - Tecidos Alternativos e Estádios de Desenvolvimento	42
4.1.2.1 - Endosperma	42
4.1.2.2 - Coleoptilo	43
4.1.2.3 - Caule, meristema e palmito	43
4.1.2.4 - Pólen	44
4.1.2.5 - Raiz	45
4.1.2.6 - Folha	46
4.1.3 - Armazenamento dos Tecidos Vegetais	47
4.2 - SISTEMAS ENZIMATICOS, EXPRESSÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA	49
4.2.1 - AFS (fosfatase ácida).....	50
4.2.2 - EST (esterase).....	52
4.2.3 - PRX (peroxidase).....	55
4.2.4 - ADH (alcool desidrogenase).....	58
4.2.5 - PGI (fosfoglucoisomerase).....	59
4.2.6 - ME (enzima málica).....	60

4.2.7 - GOT (glutamato oxaloacético transaminase).....	61
4.2.8 - PPO (polifenoloxidase).....	62
4.3 - ANALISE DE PROGENIES INDIVIDUAIS.....	63
4.4 - IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS ENTRE <u>E.edulis</u> e <u>E.oleracea</u>	67
4.5 - ISOENZIMAS E QUALIDADE DO PALMITO "IN NATURA".....	74
4.6 - ANALISE DE ISOENZIMAS COMO TÉCNICA AUXILIAR NOS ESTUDOS BOTÂNICOS DO GÊNERO <u>Euterpe</u>	76
5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
6 - CONCLUSÕES.....	82
7 - RESUMO	83
8 - SUMMARY	84
9 - APÊNDICE - Protocolo para análise de isoenzimas em folhas de palmito (<u>Euterpe</u> spp).....	85
10- REFERÊNCIAS	86

APRESENTAÇÃO

O palmitreiro (Euterpe spp.) é uma palmácea de grande importância econômica para o Brasil. Poucos, no entanto, são os estudos básicos de botânica, genética e melhoramento no gênero, devido ao reduzido número de pesquisadores envolvidos e, ao ciclo longo e grande altura das plantas adultas.

O estudo de isoenzimas através de eletroforese é uma das técnicas que poderia contribuir, a curto prazo e com custo relativamente baixo, para um melhor conhecimento científico do gênero. Resumidamente, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- A) Desenvolver um conjunto de metodologias e técnicas de eletroforese horizontal em gel de amido, aplicável à análise de isoenzimas em palmitreiro (Euterpe spp.).
- B) Observar-se a expressão de diversos sistemas isoenzimáticos e estudar a variabilidade genética em populações de E.edulis Mart. e E.oleracea Mart., em híbridos interespecíficos E.edulis X E.oleracea e em populações de Euterpe spp. de taxonomia indeterminada.
- C) Definir marcadores genéticos e utilizá-los em:
 - a) identificação inequívoca de híbridos interespecíficos E.edulis X E.oleracea; b) correlação entre padrões isoenzimáticos e potencial de perfilhamento de plantas híbridas; c) caracterização da origem de palmitos "in natura" e d) estudos de taxonomia de Euterpe.

1 - INTRODUÇÃO

No Brasil, diversas são as palmeiras que proporcionam palmitos comestíveis, porém, apenas as do gênero Euterpe são exploradas comercialmente em virtude da qualidade do palmito e facilidade de extração entre outras características desejáveis. Somente duas espécies deste gênero são empregadas em larga escala: Euterpe oleracea Mart. e Euterpe edulis Mart..

A primeira, conhecida como açaí, é originária do norte do país. Apresenta abundante perfilhamento determinando uma produção quase que contínua de palmito. Este, porém, é de menor tamanho e de qualidade organoléptica inferior ao palmito de E.edulis. Vulgarmente denominado palmito de jucara, E.edulis é nativo da região centro sul do Brasil, sendo palmeira de tronco único, na qual a remoção do palmito resulta na morte da planta. Fornece, porém, um produto de bom rendimento e ótima qualidade.

Vários subprodutos são também obtidos dessas palmeiras. Do fruto obtém-se vinho, da semente, torta para ração e dos resíduos da extração do palmito, quando decompostos servem como fertilizantes. O estipe é usado como esteio para construções rústicas e como matéria prima para a produção de papel e chapas de aglomerados. Finalmente, as folhas servem como cobertura de casas e galpões ou ainda como ração animal.

Produto tipicamente brasileiro, o palmito vem sendo consumido no país desde o período anterior à colonização. Por seu delicado sabor e textura, tornou-se amplamente conhecido no exterior, conquistando o mercado de outros países. A FAO/WHO (1978) como órgão controlador de qualidade de produtos

comercializados definiu o palmito processado, como sendo a porção comestível de palmeiras sãs, a gema apical e as regiões acima e abaixo, correspondendo às folhas macias em crescimento (estrutura heterogênea) e aos tecidos macios do estipe (estrutura homogênea). O estipe pode ser envolvido por uma ou duas folhas tenras, característica variável, conforme as espécies Euterpe edulis Mart., Euterpe oleracea Mart., ou ainda algum outro gênero e/ou espécies apropriados para consumo humano. Anatomicamente, o palmito é a gema apical responsável pelo desenvolvimento da palmeira.

Atualmente, o Brasil é o principal produtor e exportador mundial de palmito em conserva. A industrialização do palmito iniciou-se nas regiões sudeste e sul do país há mais de 45 anos, quando o produto passou a ocupar lugar de destaque no mercado brasileiro e de outros países. Entre os principais consumidores de palmito enlatado destacam-se a França, Estados Unidos, Argentina, Bélgica, Itália e México (CACEX, 1987).

A situação atual parece extremamente favorável quanto à demanda e à simplicidade da tecnologia de processamento do palmito. Em contrapartida, a exploração extrativa constante, não balanceada com plantios comerciais extensivos e sistemáticos, tem determinado um sensível decréscimo nas reservas naturais nos últimos anos, onerando sobremaneira os custos de extração e transporte. Outrora abundante, o palmitreiro juçara somente é encontrado em matas distantes das zonas povoadas. A continuar o processo de extrativismo em andamento, tende a desaparecer a curto prazo. Como consequência, iniciou-se no norte do país a

exploração das reservas locais de açaí. Atualmente, o mercado do Estado de São Paulo e os do sul do país, onde a demanda é superior à oferta local, estão sendo supridos pelo produto originário do norte, principalmente do Estado de Pará responsável por 90 % das exportações.

A exploração do açaizeiro, entretanto, também vem sendo feita de maneira predatória. Embora essa espécie apresente abundante perfilhamento, o corte indiscriminado dos estipes visando o aumento da produção de palmito por unidade de área causa o depauperamento e morte eventual das touceiras. Em decorrência, as reservas naturais de açaí também estão ficando distantes das unidades de processamento, acarretando considerável aumento do preço.

Por todos os motivos acima mencionados, torna-se imperativo o estabelecimento de condições adequadas de cultivo destas palmeiras nativas. Para tanto, existe a necessidade de pesquisas básicas de melhoramento genético que possam tornar o palmitreiro uma cultura agrícola racional e rentável. Embora o juçara e o açaí sejam plantas de ciclo bastante longo (sete a oito anos), essas pesquisas vem sendo realizadas na Seção de Plantas Tropicais do Instituto Agronômico de Campinas desde 1972.

Híbridos entre as palmeiras juçara e açaí têm-se mostrado altamente promissores (BOVI et. al.,1987). São rústicos, precoces e, além de perfilhar, fornecem produto de boa qualidade (FERREIRA et. al.,1982a e 1982b). As populações híbridas são, no entanto, ainda desuniformes. Observam-se evidentes variações no grau de perfilhamento e outros atributos morfológicos. Tais variações são esperadas, uma vez que os progenitores são,

aparentemente, provenientes de populações alógamas que ainda não sofreram seleção artificial.

O Instituto Agrônomo de Campinas mantém há 15 anos um banco de germoplasma contendo várias das "espécies" de Euterpe que ocorrem no Brasil, assim como variações destas e algumas populações de híbridos interespecíficos.

Plantas perenes de ciclo longo, como é o caso das palmeiras do gênero Euterpe, são, em geral, geneticamente pouco estudadas devido às dificuldades na obtenção de marcadores morfológicos. No caso específico do palmitheiro, o fato de ser uma planta nativa não cultivada e de grande altura, seriam também, provavelmente, algumas das razões que poderiam explicar a inexistência de estudos de genética do palmitheiro.

O conhecimento da variabilidade genética existente, sua distribuição entre germoplasmas diversos, a identificação e caracterização de genótipos e seu monitoramento são de extrema importância em programas de melhoramento genético. / Classicamente fez-se uso nesses estudos de marcadores morfológicos, porém, com o desenvolvimento da técnica de eletroforese para isoenzimas, a utilização de marcadores bioquímicos tornasse, em muitas situações, o método preferido nas investigações dessa natureza.

Foram objetivos deste estudo a adequação da metodologia da eletroforese e o estudo dos padrões de diversos sistemas isoenzimáticos em espécies, híbridos interespecíficos, populações e introduções de Euterpe visando fornecer subsídios a serem futuramente aplicados ao melhoramento genético e estudos taxonômicos do gênero Euterpe.

2 - REVISAO BIBLIOGRAFICA

2.1 - PROBLEMATICA

Extremamente úteis como fonte natural de alimento, óleo e matéria prima para diversos fins, as palmeiras têm sido também amplamente utilizadas como plantas ornamentais. Apesar da sua importância, somente pouquíssimas espécies consideram-se domesticadas. Muito provavelmente, esse fato deve-se à abundância das palmeiras em nossas matas e à falta de estudos dirigidos para o estabelecimento racional das culturas. Com poucas exceções como o côco, a tamareira e o dendê, até o presente, a exploração das palmeiras vem sendo basicamente extrativa e feita de uma forma indiscriminada.

A tentativa de domesticação de qualquer espécie envolve a utilização do máximo potencial natural disponível. Na grande maioria das espécies de palmáceas, a domesticação constitui ainda um grande desafio, devido à ausência de bancos de germoplasmas representativos e claramente definidos. Três dificuldades práticas parecem impedir a obtenção destas coleções: grande altura das plantas, longo ciclo de crescimento e ampla distribuição geográfica (BAILEY, 1946).

Atualmente a classificação taxonômica de muitas espécies de palmeiras poderia ser revista. Os limites genéricos são duvidosos e, não raro são encontrados híbridos interespecíficos e mesmo intergenéricos. Assim, mesmo os materiais a serem usados em pesquisas básicas de botânica e genética, tidos como típicos, são ainda pouco estudados, servindo apenas como referência

inicial.

Desde as mais antigas classificações revisadas por DENTERGHEM (1878) até a época atual, diversas modificações têm sido sugeridas. ALVES E DEMATTE (1987), numa recente revisão sobre as palmeiras, chamam a atenção para a grande confusão existente quanto à nomenclatura. Não raro o mesmo material é descrito por diferentes autores com nomes distintos. Alguns deles são, ainda reclassificados pelo mesmo autor, causando grandes dificuldades aos demais pesquisadores do assunto.

Em nosso país, as espécies de palmáceas foram, inicialmente classificadas por VON MARTIUS (1824) e por BARBOSA RODRIGUES (1891). O material analisado por esses dois botânicos, segundo consta, foi limitado a umas poucas plantas, a maioria das quais não foram mantidas vivas, a não ser alguns materiais representados atualmente no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. A correta identificação taxonômica destes materiais é, no entanto, até hoje, confusa. BARBOSA RODRIGUES (1903) chegou a aventar a possibilidade de ter havido troca de material e etiquetas no herbário de VON MARTIUS. Por sua vez, WESSELS BOER (1965) têm recentemente questionado a obra de BARBOSA RODRIGUES. Os herbários de palmeiras na Europa, contendo as coleções de WALLACE (1853) e de BURRETT (1930) foram perdidos em um naufrágio, assim como os herbários originais de BARBOSA RODRIGUES, destruídos durante a Segunda Guerra Mundial (GLASSMANN, 1972).

Por essas razões, taxônomos e descritores de plantas vem negligenciando a família das palmáceas. Em recente levantamento de herbários das palmeiras amazônicas BALICK, ANDERSON e SILVA

(1982) ressaltam a pouca representatividade da maioria dos taxons tidos como existentes nessa região. Além disso, LLERAS (1983) em levantamento do herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia em Manaus, estimou que 75% do material constante nos herbários não está nem mesmo identificado.

2.2 - EUTERPE EDULIS E EUTERPE OLERACEA

Segundo a classificação das palmáceas atualmente aceita (TAKHTAJAN, 1980; CRONQUIST, 1981), a família Arecaceae (= Palmae), única dentro da ordem Arecales (= Principes), abrange cerca de 236 gêneros e 3500 espécies. De um grande número destes gêneros pode ser extraído o palmito. Destacam-se Arcantophoenix, Acrocomia, Astrocaryum, Attalea, Bactris, Syagrus, Geonoma, Guilielma, Hyospathe, Roystonea, Mauritia, Orbignia, Sabal, Scheelea, Socratea, Welfia e Euterpe (BOVI E CARDOSO, 1976). Entretanto, o gênero Euterpe é o principal fornecedor de palmito de boa qualidade.

Originário da América Latina, esse gênero compreende cerca de 50 espécies. Provavelmente mais de 10 delas ocorrem no Brasil, das quais reconhece-se com segurança apenas três: E.edulis, E.oleracea e E.precatoria.

Segundo GLASSMAN (1972), das 80 espécies originalmente descritas no gênero Euterpe, somente 49 são válidas. Algumas foram enquadradas em outros gêneros, como é o caso de E.decurrens e E.longepetiolata, originárias da Costa Rica, que passaram a pertencer ao gênero Prestoea. A maioria das restantes foram reclassificadas dentro do mesmo gênero. Assim, Euterpe

badiocarpa e Euterpe beardii passaram a ser consideradas como pertencentes a Euterpe oleracea Mart. e Euterpe egusquizeae, a Euterpe edulis Mart.. Nessa revisão, GLASSMAN ressalta o fato da taxonomia do gênero ser incompleta e falha, necessitando de estudos mais detalhados.

O Instituto Agronômico de Campinas vem, desde 1973, mantendo um banco de germoplasma de espécies e/ou ecotipos com e sem perfilhamento de Euterpe, com o intuito de estudar e preservar a variabilidade genética presente no gênero. Atualmente conta com 36 introduções de palmiteiros sem perfilhamento oriundos de diferentes regiões dos estados de Amazonas, Bahia, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Com relação às espécies de Euterpe com perfilhamento, a coleção contém 29 espécies e/ou ecotipos, formada em sua maior parte com material enviado dos estados de Pará, Amazonas e Mato Grosso. Há ainda algumas introduções provenientes de açazeiros em cultivo na Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro (BOVI et.al.,1987). Esses materiais vem sendo avaliados em relação à cerca de 50 características morfológicas e outras relacionadas à biologia floral e ao sistema reprodutivo, no sentido de auxiliar a sua identificação taxonômica (BOVI et.al.,1987). Esses estudos mostram que há materiais que divergem em diversas características morfológicas básicas dos elementos florais como tamanho, coloração e disposição das flores masculinas e femininas.

Euterpe edulis Mart.: Popularmente conhecida por juçara, ripa ou inçara, esta espécie habita as regiões das matas

pluviais da costa Atlântica e do planalto dos estados da região Centro-Sul e Sudeste do Brasil, alcançando ainda o norte da Argentina e Paraguai (LEAO E CARDOSO,1974; MACEDO,1970). A exploração para palmito é sua principal importância.

Morfologicamente caracteriza-se por possuir estipe único. Na fase adulta, esta palmeira alcança 15 a 25 metros de altura e 15 a 20 centímetros de diâmetro. O florescimento inicia-se entre o sexto e oitavo ano após a germinação, idade em que o palmitreiro encontra-se apto para o corte (BOVI et.al.,1987).

Entre os palmitreiros existentes em nosso litoral e tidos como pertencentes à espécie Euterpe edulis, ocorrem "tipos"(assim referidos devido à falta de uma classificação mais definida) cuja diferenciação é feita, principalmente, pela coloração da bainha que envolve o palmito. Dessa forma, se conhece o palmito branco, o vermelho e o macho ou encapado. Segundo os caçeras, o branco é o que dá o melhor palmito. A diferença de coloração da casca tem sido atribuída a diversas causas. Segundo CASTRO E VALERY (1954), isso é devido a idade da planta, sendo o vermelho mais velho que o branco. Já MACEDO (1970) afirma que a variação é devida ao tipo de solo, sendo o branco característico de solos húmidos e o vermelho de solos mais pobres, em geral das bordas das matas. Por outro lado, LESCHER (1973) classifica os três "tipos" como variedades de juçara.

Estudos da biologia floral realizados por BOVI E DIAS

(1986a) mostram que E.edulis é uma espécie monóica, dicógama e marcadamente protândrica. As flores são sesséis, unissexuais em triade (2 masculinas e 1 feminina central), exceto no ápice, onde aparecem apenas flores masculinas. A antese masculinas é gradativa, ocorrendo ordenadamente da base para o ápice das ráquulas. Numa mesma inflorescência, o processo dura de 4 à 11 dias. Dois à 6 dias após, inicia-se a fase feminina a qual dura de 3 à 6 dias. A autofecundação é possível uma vez que, não existindo autoincompatibilidade, as flores femininas de inflorescências mais velhas podem ser polinizadas pela ação do vento, insetos e/ou gravidade, pelo pólen de flores masculinas situadas em inflorescências mais novas da mesma planta (ROVI E DIAS,1986b).

Floresce principalmente entre setembro e novembro, apresentando de 1 à 6 inflorescências por ano, produzindo frutos de coloração preto arroxoado quando maduros e, com sementes de endosperma homogêneo.

Euterpe oleracea Mart.: Vulgarmente conhecida como açaí ou açaizeiro, esta outra palmeira fornecedora de palmito apresenta menores dimensões quando comparadas às da palmeira juçara. Os estipes alcançam uma altura média de 14 metros, com diâmetro entre 10 e 15 centímetros. Ocorre na região norte do país, principalmente nos Estados do Pará e Amazonas, Guianas e Venezuela. Apresenta perfilhamento, produzindo touceiras formadas por diversos estipes (LEÃO E CARDOSO,1974). As flores são também sésseis, unissexuais em

triade (2 masculinas e 1 feminina central) sendo que, no terço final das ráquulas, há somente flores masculinas. A antese masculina é gradativa, dura de 10 à 15 dias e ocorrendo desordenadamente ao longo das ráquulas. A fase feminina, também gradativa e desordenada, dura entre 4 e 8 dias. Inicia-se porém, antes do término da antese masculina, ocorrendo assim, superposição de fases na mesma inflorescência. Por essa razão, no açaizeiro a autofecundação independe da presença de inflorescências mais novas na mesma planta (BOVI et.al.,1986).

Apresenta duas épocas principais de florescimento: outubro-dezembro e abril-junho, emitindo até 5 inflorescências por ano. As sementes apresentam endosperma ruminado e os frutos quando maduros tem coloração preto acinzentado.

De forma similar que a palmeira juçara, observam-se tipos distintos no açaí, como o roxo, frequente na amazônia, e o branco, assim denominado devido à coloração da polpa dos frutos maduros (CALZAVARA,1972).

2.3 - HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS

A ocorrência de híbridos interespecíficos em palmeiras não é um fato novo. BARBOSA RODRIGUES em 1903, constatou a existência de plantas híbridas entre palmeiras cultivadas do gênero *Syagrus*. Anos mais tarde, essas plantas foram também estudadas por outros taxônomos (BAILEY,1936 e BURRET,1940), confirmando-se a sua natureza híbrida. Outros gêneros apresentam

confirmando-se a sua natureza híbrida. Outros gêneros apresentam delimitação taxonômica não definida, devido provavelmente, à hibridações interespecíficas e intergenéricas. São os casos de Orbignia, Attalea e Maximiliana (CORADIN E LLERAS,1983).

Euterpe edulis Mart. e Euterpe oleracea Mart., são palmeiras monóicas e apresentam acentuada protandria (BOVI E DIAS,1986; BOVI et.al.,1986), características que favorecem a fecundação cruzada. Em condições naturais o cruzamento entre essas duas espécies não ocorre pelo fato de serem alopátricas. Porém, quando plantadas próximas, pode ocorrer hibridação (BOVI et.al.,1987).

Embora nessa área poucos sejam os estudos no gênero Euterpe, provavelmente o isolamento reprodutivo entre as espécies deve-se mais a barreiras geográficas do que a barreiras genéticas. Até o presente, não foram detectados mecanismos de incompatibilidade entre as espécies E.edulis e E.oleracea (BOVI,1986).

Híbridos entre E.edulis e E.oleracea foram identificados pela primeira vez na Estação Experimental de Ubatuba,SP do Instituto Agrônomo de Campinas em 1973, provenientes do cruzamento de vários palmiteiros juçara nativos com dois açaizeiros introduzidos nessa localidade para fins ornamentais. (BOVI E CARDOSO,1976). Tais híbridos, obtidos por polinização natural, encontram-se atualmente em fase adulta. Em condições normais de cultivo revelaram ter ampla adaptação, maior rusticidade e precocidade quando comparados com os progenitores. Além de apresentarem a vantagem do perfilhamento, esses híbridos são tolerantes a maiores níveis de insolação do que o palmiteiro

juçara e mais resistentes a doenças (especialmente Colletotrichum gloeosporioides) do que o açaizeiro (ROVI,1986).

Estudos realizados no Instituto de Tecnologia de Alimentos em Campinas indicam que a composição química dos palmitos híbridos, para a maioria dos compostos de interesse para o processamento, é intermediária àquelas dos progenitores. Seu rendimento industrial é 3 a 4 vezes maior que o do açaizeiro e 1,5 vezes o do juçara, com diâmetro do palmito bem superior ao do açaí e ligeiramente superior ao do juçara. Nos testes organolépticos de cor, aparência, sabor e textura o palmito híbrido foi bem aceito, apresentando também características intermediárias entre E.edulis e E.oleracea (FERREIRA et al.,1981;1982).

Embora as populações híbridas tenham se mostrado, de uma maneira geral, superiores em relação ao juçara e ao açaí quanto às características agrônômicas e bem aceito industrialmente, são ainda desuniformes, com variações evidentes quanto ao grau de perfilhamento e outros atributos morfológicos. Essas variações são esperadas, uma vez que os progenitores são provenientes de populações alógamas que ainda não sofreram seleção artificial (ROVI et al.,1987).

Dada a potencialidade do emprego de híbridos em culturas racionais de palmitreiro, torna-se importante a seleção de progenitores e identificação precoce de híbridos superiores obtidos através de polinização controlada. A característica de maior interesse a ser melhorada nos híbridos é, sem dúvida, o potencial de perfilhamento. O ideal seria a obtenção de populações de elevado vigor nas quais todas as plantas tivessem

um número razoável de perfilhos. Pesquisas visando a produção dessas populações híbridas estão sendo, atualmente, realizadas na Seção de Plantas Tropicais do Instituto Agronômico de Campinas, SP.

2.4 - ELETROFORESE E ISOENZIMAS

Eletroforese em gel é uma técnica de análise bioquímica que permite a separação de partículas iônicas através dos processos concomitantes de filtração exercido pelo gel e da migração diferencial das partículas iônicas, quando submetidas a um campo elétrico.

Uma das grandes aplicações da técnica de eletroforese é nos estudos de proteínas, por serem estas polieletrólitos, com carga dependente do meio circundante. Variando-se o pH da solução tampão é possível, sob a influência de um campo elétrico, induzir a migração das proteínas. As frações protéicas são separadas em função da sua mobilidade diferencial, determinada pelo tamanho e, principalmente, pela carga elétrica de cada proteína.

Um grande desenvolvimento da técnica de eletroforese se iniciou com o trabalho de ARNE TISSELIUS em 1930, utilizando meio líquido para a migração das proteínas. Tão importante foi sua contribuição científica que, em 1948, recebeu o Prêmio Nobel. Mais tarde, foram feitas modificações desenvolvendo-se a eletroforese de zona, na qual o meio de migração é estabilizado através do uso de papel, agar, poliacrilamida ou mesmo amido hidrolizado. Este último, utilizado no presente estudo, oferece uma série de vantagens em relação aos demais. É barato, de fácil

manuseio, atóxico e pode ser seccionado em diversas camadas horizontais, onde cada uma delas pode ser revelada para um sistema enzimático diferente. Além disso, o equipamento empregado é de fácil operação, econômico e de construção bastante simples (TANKSLEY, 1979).

Introduzido por SMITHIES, em 1955, o gel de amido foi utilizado, inicialmente, no estudo de proteínas do soro biológico. Posteriormente, em 1957, HUNTER E MARKERT desenvolveram a técnica de coloração dos géis utilizando corantes histoquímicos e chamaram de zimogramas as bandas visualizadas no gel. Verificaram ainda a ocorrência de zimogramas distintos em diferentes organismos como em cogumelos, na batata e, em rato, onde cada órgão tem seu próprio padrão. MARKERT E MOLLER em 1959, sugeriram o termo "isoenzima" para caracterizar formas multimoleculares de enzimas com a mesma especificidade para o substrato após estudar lactato desidrogenase em diversos animais, diversos órgãos em diversas fases de desenvolvimento, com isso mostrando que essas enzimas eram específicas aos órgãos, à espécie e dependente da fase de desenvolvimento.

As primeiras isoenzimas em plantas foram identificadas por SCHWARTZ (1960), utilizando eletroforese em gel de amido em endosperma de sementes de milho. Desde então, pesquisas relativas à técnica de eletroforese e a bioquímica das isoenzimas vegetais começaram a ser desenvolvidas (BREWER E SING, 1970; NELSON E BURR, 1973; GORDON, 1975 e JACOBS, 1975).

SHAW (1969) postulou que a diferente expressão isoenzimica dentro de um mesmo organismo deve-se à localização no tecido e à

regulação da atividade enzimática. Posteriormente, SCANDALIOS (1969/1974) atribuiu as variações isoenzimáticas à três fatores principais: distintas isoenzimas em diferentes tecidos de um mesmo organismo; isoenzimas presentes em um tecido em determinado estágio de desenvolvimento e ausentes em outro; e isoenzimas semelhantes presentes em diferentes tecidos mas em quantidade variável. MARKERT (1975), estudando os eventos moleculares da biologia do desenvolvimento, constatou que os padrões isoenzimáticos são dependentes do tipo de célula e estágio de diferenciação, concluindo que a ontogenia de tais padrões reflete variações na ativação e repressão dos genes.

Normalmente, a técnica da eletroforese em gel de amido envolve, inicialmente, a maceração da amostra vegetal, inserção no gel e a aplicação de uma diferença de potencial elétrico, que promove a migração das enzimas presentes nas amostras. Terminada a eletroforese, procede-se à coloração do gel, cuja reação é específica para cada sistema enzimático. Nessa etapa, a enzima presente no gel reage com o substrato específico dando um produto que, ao se ligar ao corante também presente na solução de revelação, irá formar um complexo colorido e insolúvel no gel, visualizado como uma banda colorida, exatamente na posição em que a enzima se encontrava quando se interrompeu a eletroforese. Se a amostra originalmente inserida no gel for homogênea, apenas uma banda será observada, após a eletroforese e coloração. Por outro lado, se a amostra contiver enzimas com diferentes cargas elétricas, tamanho ou configurações espaciais, serão observadas diversas bandas. [Essas formas multimoleculares de enzimas visualizadas no gel como bandas múltiplas representam

as isoenzimas e são produtos de alelos que codificam para enzimas específicas. O número de isoenzimas detectadas pelo processo depende de vários fatores como o número de genes em atividade, ocorrência de alelos especificando polipeptídeos de diferentes cargas e estrutura quaternária da enzima em questão.]

Basicamente, a principal razão da migração diferencial de um alelo de isoenzima em relação a outro está na diferente composição ou sequência de aminoácidos do produto primário especificado por esse alelo, ou seja a cadeia polipeptídica. Assim, a mudança de uma base aminada do DNA do gene estrutural pode (porém, não necessariamente) resultar na formação de um polipeptídeo de carga elétrica diferente devido à substituição de um aminoácido. A enzima resultante, também de carga alterada quando submetida à eletroforese, terá uma migração alterada. Essa migração diferencial reflete, portanto, a variabilidade no DNA correspondente ao gene estrutural, daí o interesse desse método de análise em estudos de genética de plantas (MEDINA FILHO, 1983).

Atualmente, a eletroforese em gel de amido hidrolizado de batata para a análise de isoenzimas é amplamente utilizada nas áreas de genética e melhoramento vegetal. Entretanto, é essencial o uso de amostras representativas da população de plantas em estudo, provenientes de tecidos comparáveis e em fase de desenvolvimento similares para a obtenção de resultados confiáveis. PIERCE E BREWBAKER (1973) salientam ainda que uma clara resolução das bandas eletroforéticas depende, também, das condições apropriadas de técnica de eletroforese e da metodologia de extração das enzimas.

2.5 - ELETROFORESE EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

A análise genética de padrões eletroforéticos tem demonstrado segregação monogênica para a maioria dos polimorfismos isoenzimáticos encontrados em plantas. Além disso, a expressão dessas isoenzimas é notavelmente pouco influenciada pelo ambiente. Constituem-se portanto, em excelentes marcadores genéticos. Esses marcadores genéticos são extremamente úteis em vários aspectos aplicados da genética e melhoramento vegetal, como na caracterização de cultivares, identificação de híbridos naturais, produzidos via cultura de embrião ou mesmo via fusão de protoplastos, distinções entre duplo-haplóides e diplóides maternos em cultura de anteras "in vitro", construção de estoques de marcadores para localização de novos mutantes nos cromossomos, mapeamento de genes quantitativos, estimativa de variabilidade genética em populações, estimativa de taxas de cruzamento natural e de contaminação de lotes de sementes híbridas, monitoramento de sistemas de seleção gamética, etc.

As possibilidades são inúmeras e aumentam dia a dia. Por exemplo, tradicionalmente, a identificação de cultivares tem-se baseado na utilização de várias combinações de caracteres agronômicos. Muitos desses, apesar de geneticamente determinados, são fortemente influenciados pelo ambiente e sujeitos a variações decorrentes das condições de desenvolvimento. O problema da identificação de cultivares consiste, portanto, em determinar e avaliar as diferenças entre os caracteres marcadores. Sendo que as manifestações

morfológicas das diferenças devem traduzir, em última análise, diferenças bioquímicas, é possível em alguns casos, através da eletroforese, determinar tais diferenças. Para tanto, é necessário que cada cultivar ou grupo de cultivares apresente um padrão único para, pelo menos, um sistema enzimático (NIELSEN,1984). Diversos exemplos são encontrados na literatura. Podem ser citados: milho (HEIDRICH-SOBRINHO,1982); cana de açúcar (BARRETO E SIMON,1982); batata (OLIVER E MARTINEZ-ZAPATER,1985); alho (SIQUEIRA et al.,1985); mostarda (KUMAR E GUPTA,1985); feijão (BASSIRI E ROUHANI,1977); centeio (NIELSEN et al.,1985) e tomate (TANKSLEY E RICK,1980). Cultivares de frutas também tem sido amplamente estudados através de eletroforese, destacando-se a pêra (SANTAMOUR E DEMUTH,1980), o pêssego (ARULSEKAR et al.,1986); a uva, a amêndoa e o figo (ARULSEKAR,1986).

Plantas perenes de ciclo longo são, em geral, pouco estudadas geneticamente, devido às dificuldades na obtenção de marcadores morfológicos. Nessas, os variantes eletroforéticos constituem, muitas vezes, os únicos marcadores conhecidos. No abacateiro e na tamareira, por exemplo, foram descritos genes e alelos específicos para várias enzimas e, através deles, foi possível comprovar-se as origens de diversos cultivares (TORRES E TISSERAT,1980; TORRES et al.,1978). [Em programas de melhoramento de Citrus a partir de uma única polinização, é necessária a distinção das plantas oriundas de apomixia daquelas de reprodução sexuada. A eletroforese pela visualização do padrão híbrido ou maternal permite esta distinção em mudas de [dois meses]

dois meses de idade, abreviando portanto, os programas de melhoramento e reduzindo os custos(TORRES et al.,1978).

Na área de biotecnologia, a técnica de eletroforese encontra também sua aplicação na cultura de anteras *in vitro*. Em brocoli (*Brassica oleracea*) são utilizados marcadores genéticos heterozigotos na planta doadora da antera para classificar as plantas regeneradas como de origem gametofítica ou esporofítica (ORTON E BROWERS,1985).

Embora com baixa frequência, é possível, às vezes, serem detectados híbridos naturais espontâneos de grande valia, de origem desconhecida ou duvidosa. A análise de padrões de isoenzimas fornece informações adicionais sobre a origem de tais plantas e, de seu provável potencial genético para fins de melhoramento. Dessa forma, MEDINA FILHO E CARVALHO em 1981 confirmaram a origem do café Piatã, encontrado em uma plantação em São Paulo há 50 anos, como um híbrido natural entre *C.arabica* e *C.dewevrei*. O café Piatã é tetraplóide como *C.arabica* e, sendo *C.dewevrei* diplóide, acredita-se que participaram na sua formação, provavelmente, um gameta normal de *C.arabica* e um gameta não reduzido de *C.dewevrei*. A análise de isoenzimas revelou estarem presentes, no café Piatã, dois alelos de *C.dewevrei*.

Por outro lado, a produção artificial de híbridos interespecíficos, visando reunir as características mais favoráveis das espécies progenitoras é uma alternativa bastante utilizada em programas de melhoramento. Sejam estes híbridos produtos de cruzamentos controlados ou produzidos através das

modernas técnicas de fusão de protoplastos ou de cultura *in vitro* de embriões imaturos, sua possível identificação precoce é importante, uma vez que o programa pode tornar-se mais eficiente e progredir com maior rapidez. [A presença, no híbrido, de bandas específicas dos tipos parentais, permite uma inequívoca identificação de sua natureza híbrida.] Como exemplos podem ser citados os híbridos somáticos entre duas espécies de *Nicotiana* com o fumo cultivado *Nicotiana tabacum* (EVANS et al., 1981), e híbridos entre pêssogo e ameixa (PARFITT et al., 1985).

Nos estudos de ligação e mapeamento genético vegetal a segregação de um gene é testada em relação a conhecidos marcadores morfológicos, os quais são, na sua grande maioria, recessivos, o que impede na mesma geração a identificação dos genótipos heterozigotos. No caso de marcadores isoenzimáticos, devido à codominância, aumenta-se a eficiência dos testes (ALLARD et al., 1975). Teoricamente, com apenas um cruzamento, seria possível testar a ligação para todos os braços dos cromossomos simultaneamente, se cada um deles tivesse, ao menos, um marcador isoenzimático. Tais marcadores em uma única linhagem é possível, devido a que, tanto quanto se sabe, a expressão dos variantes eletroforéticos não modifica a viabilidade e/ou o crescimento normal das plantas. Isto permite sintetizar linhagens de marcadores isoenzimáticos e classificar, inequivocamente, os genótipos segregantes devido à codominância. Além do mapeamento de genes simples, essas linhagens são também úteis no mapeamento de loci responsáveis por caracteres quantitativos (TANKSLEY et al., 1982).

A associação entre resistência genética à doenças e loci isoenzimáticos é, também, um aspecto estudado através de eletroforese. Essa associação, encontrada recentemente em trigo (Mc MILLIN et al., 1986), foi constatada já há alguns anos em tomate. Neste último, a técnica de eletroforese pode ser aplicada à seleção de plantas resistentes a nematóides causadores de galhas nas raízes. Devido à ligação genética do alelo Aps-1 da enzima fosfatase ácida com o alelo Mi, que confere resistência à várias espécies de Meloidogyne, é possível selecionar os tomateiros resistentes, baseando-se unicamente, no padrão eletroforético de mudas de três semanas de idade. Estando Mi fortemente ligado à Aps-1, podem ser distinguidas as plantas resistentes heterozigotas (Mi Mi Aps-1) das resistentes homozigotas (Mi Mi Aps-1). Este fato elimina os testes de progênie normalmente necessários quando se faz o teste direto com nematóides, uma vez que Mi, que confere a resistência, é dominante em relação a Mi. Dessa forma, o programa de melhoramento torna-se mais rápido, barato e eficiente (MEDINA FILHO E STEVENS, 1980).

Em programas de melhoramento visando a transferência de características agronômicas desejáveis presentes em espécies selvagens, à cultivares comerciais, a eletroforese pode representar grandes benefícios. Os maiores problemas após a obtenção do híbrido F₁ são o tempo, número de gerações e de indivíduos a serem manipulados em programas de retrocruzamentos sucessivos, devido à presença de características indesejáveis nas espécies selvagens. Empregando-se a eletroforese, pode-se

selecionar também para os alelos eletroforéticos do cultivar que, muitas vezes, são diferentes daqueles da espécie selvagem. Desse modo, há maior eficiência na recuperação do genoma recorrente. Numa espécie perene, a aplicação dessa técnica resultaria em grande economia de tempo e de mão de obra (TANKSLEY E RICK, 1980).

Programas de melhoramento, em bases sólidas, apoiam-se em informações básicas sobre genética, sistemática, biologia da reprodução e outros aspectos botânicos. A análise de isoenzimas pode ser utilizada como técnica auxiliar no estudo de evolução e de relações filogenéticas. No entanto, para sua correta aplicação é fundamental o prévio conhecimento e avaliação da variabilidade genética existente no material em estudo (CRAMFORD, 1985). Trabalhos nesse sentido têm sido relatados em batata (RICKEMAN E DESBOROUGH, 1978), milho (KAHLER et al., 1986) e cevada (JORGENSEN, 1986), entre outros.

Em palmeiras a aplicação da técnica de eletroforese para análise de isoenzimas está ainda em fase inicial de desenvolvimento da metodologia e de avaliação da variabilidade genética disponível. Os poucos trabalhos realizados nesta área mostram que ocorre grande variabilidade em populações e progênies das diferentes palmeiras estudadas (TORRES E TISSERAT, 1980; GHESQUIERE, 1984; AHMAD, 1985). No gênero Euterpe, desconhecem-se, até o presente momento, estudos envolvendo análise isoenzimática. Provavelmente, o presente estudo é pioneiro na área de aplicação da eletroforese em palmeiras Euterpe.

3 - MATERIAIS E METODOS

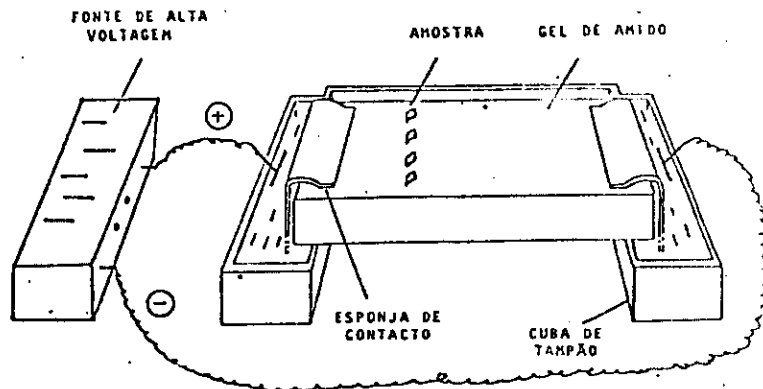
3.1 - EQUIPAMENTO

Esquemáticamente, o equipamento básico empregado nesse estudo é mostrado na Figura 1. Foram utilizadas fontes de voltagem Heathkit com controle de miliamperagem e voltagem conectadas aos suportes dos géis, bandejas e cubas de acrílico mantidas à temperatura de $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em uma câmara frigorífica com ventilação forçada ascendente. Esse sistema permite a corrida simultânea e independente de 4 géis, com capacidade de até 36 amostras por gel. Uma vez que parte fundamental desse trabalho foi a adequação da metodologia de eletroforese para diversos tecidos do palmitreiro, optou-se por analisar apenas 25 amostras por gel para maior clareza nas interpretações. Uma característica do sistema empregado é que cada gel pode ser cortado em 5 camadas horizontais sendo cada uma delas revelada para um sistema isoenzimático diferente.

Os demais equipamentos utilizados para a eletroforese são os usualmente empregados em laboratórios de bioquímica como potenciômetro, balanças analíticas, placas aquecedoras, agitadores, bomba de vácuo e geladeiras.

FIGURA 1:

Equipamento utilizado para eletroforese horizontal em gel de amido.
(Fonte: Medina-Filho, 1983)



3.2 - MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado para as análises foi fornecido pela pesquisadora M.L.A.Bovi da Seção de Plantas Tropicais do Instituto Agronômico de Campinas, sendo o trabalho realizado na Seção de Genética do mesmo Instituto.

Constituíram o material básico analisado espécies e introduções de Euterpe, mantidas em coleções vivas nas diversas Estações Experimentais do Instituto Agronômico. Algumas progênes oriundas de autofecundação de plantas de E.edulis foram também analisadas. Relacionam-se a seguir:

- Vinte introduções botanicamente caracterizadas de E.edulis num total de 400 plantas;
- Sete introduções botanicamente caracterizadas de E.oleracea com cerca de 300 plantas;
- Quatro introduções de Euterpe spp. sem perfilhamento totalizando 50 plantas.
- Três introduções de Euterpe spp. com perfilhamento num total de 50 plantas;
- Híbridos SI naturais entre E.oleracea e E.edulis, totalizando 180 plantas;
- Três progênes SI de E.edulis oriundas de autofecundação natural devido a isolamento geográfico, totalizando 150 plantas;
- Uma progênie de E.edulis oriunda de autofecundação artificial, totalizando 30 plantas.

3.3 - TECIDOS ALTERNATIVOS E ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO

Alguns estádios de desenvolvimento e diferentes tecidos vegetais foram investigados quanto à expressão, estabilidade e resolução das bandas, com a finalidade de se determinar aqueles mais apropriados para as análises isoenzimáticas. Levou-se também em consideração aspectos relativos à disponibilidade, obtenção e armazenamento dos tecidos vegetais.

Foram investigados coleoptilo, endosperma, caule, meristema apical, palmito, polem, raiz e folha.

Endosperma e coleoptilo de sementes recém germinadas foram testados devido ao interesse na identificação de plantas nos primeiros estádios de desenvolvimento, antes de serem transplantadas para sacos de polietileno, em viveiros.

Por outro lado, foram estudados os tecidos do caule, meristema e palmito na tentativa de correlacionar os padrões eletroforéticos com a origem dos palmitos "in natura" uma vez que, após a remoção da porção que contém no seu interior o palmito, a identificação da planta não é mais possível.

Considerou-se também importante, apesar das dificuldades encontradas na sua obtenção, o estudo do polem, devido a sua natureza hemizigótica, livre de interações intralélicas, que pode ser muito útil na caracterização de loci específicos.

Tecido de raiz foi investigado principalmente em mudas mantidas em casa-de-vegetação, pelo interesse de caracterizar plantas individuais com marcadores genéticos, antes de serem levadas ao campo.

Tecidos de folha foram os mais estudados ao longo do

trabalho por serem disponíveis em qualquer época do ano. Dentre o germoplasma disponível encontram-se plantas das mais diversas idades, desde mudas com apenas a primeira folha, até plantas com mais de 30 anos de idade. Com o objetivo de comparar padrões de isoenzimas em plantas de diferentes idades, investigaram-se diversos estádios de desenvolvimento bem como folhas de diferentes idades em uma mesma planta.

3.4 - ARMAZENAMENTO DOS TECIDOS VEGETAIS

Uma vez que grande parte do material vegetal foi obtido nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico de Campinas, situadas em diversas regiões do Estado de São Paulo, procurou-se uniformizar as condições de coleta e armazenamento para os tecidos de folha.

Investigou-se o máximo tempo possível de armazenamento dos tecidos de folíolos até 20 dias em diversas combinações de temperatura (0°C a 35°C) e de umidade (discos de folíolos submersos em água, úmidos e secos).

3.5 - TÉCNICA E METODOLOGIA DA ELETROFORESE

3.5.1 - Preparação do gel de amido.

Para a preparação dos géis utilizou-se amido hidrolizado de batata em concentração entre 11 e 12%, determinada previamente para cada lote, e solução tampão contendo 2,5% de TRIS (0,0152 M) e 2,5% de Citrato (0,036 M). O pH dessa solução foi ajustado aumentando-se a concentração de TRIS ou Citrato, segundo a

necessidade, procedimento que evidentemente modifica também a concentração final da solução-tampão.

Resumidamente a preparação dos géis foi realizada sequencialmente nas seguintes etapas:

- a) Dissolução da quantidade total de amido em 1/4 da solução tampão à temperatura ambiente em frasco Kitassato;
- b) Adição dos 3/4 restantes da solução-tampão em fervura ao amido previamente dissolvido e agitação vigorosa da emulsão viscosa que se forma durante 10 segundos;
- c) Aplicação de vácuo para a remoção do ar da emulsão em placa aquecedora por cerca de 1 minuto, período no qual observa-se intensa fervura e a emulsão adquire aspecto mais translúcido;
- d) Preenchimento das placas de molde com a emulsão de amido ainda quente;
- e) Nivelamento do gel com a colocação de uma placa de vidro, aplicando-se uma leve pressão em cima do gel.

Após a preparação, o gel foi deixado descansar à temperatura ambiente até o dia seguinte. Antes da inserção das amostras nos géis, estes foram previamente resfriados à $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em câmara frigorífica por 30 minutos. A placa de vidro foi cuidadosamente removida e o gel cortado transversalmente à 4cm do bordo catódico da placa para a inserção das amostras.

3.5.2 - Eletroforese

O processo de eletroforese foi desenvolvido de acordo com as seguintes etapas:

- a) Adição de solução de extratores ao tecido vegetal;
- b) Maceração do tecido para liberação das enzimas;
- c) Absorção do líquido resultante que contém as enzimas

em pedaços de 5x9 mm de papel de filtro de 1 mm de espessura;

- d) Inserção das amostras no gel de amido;
- e) Aplicação de uma diferença de potencial (corrente elétrica) para a migração das enzimas;
- f) Interrupção da corrente elétrica;
- g) Seccionamento horizontal do gel para a obtenção de diversas camadas;
- h) Revelação do gel em solução contendo uma mistura de substratos e corantes, específicos para cada sistema enzimático;
- i) Lavagem do gel em água corrente após o desenvolvimento completo da coloração das bandas e interrupção do processo químico de revelação;
- j) Fixação do gel em glicerina 50%.

Para aplicação da técnica da eletroforese no palmitreiro, os detalhes e variações na preparação do gel e nas fases da eletroforese foram investigadas. Incluíram, principalmente, aspectos relativos à concentração de amido no gel, composição e pH das soluções tampão, soluções extratoras, maceração, tempo e intensidade de corrente para a eletroforese, posição das camadas no gel e sistemas enzimáticos.

3.5.2.1 Concentração de amido no gel

Além da textura e da manipulação, a concentração de amido do gel influencia a migração relativa das bandas. Concentrações entre 11% e 14% foram testadas visando a obtenção de géis de boa resolução e textura.

3.5.2.2 Concentração e pH das soluções tampão

Foram utilizadas as seguintes composições básicas:

- tampão eletrodo: Solução Borato 0,3 M, ajustando-se o pH com

NaOH 4 N. Foram testados diversos pHs entre 7,6 e 8,6.

- tampão do gel: A partir de uma solução standard contendo 25ml 0,0151 M de Tris (hidroximetil-aminometano) e 25ml de ácido cítrico em 1000ml de água destilada, o pH foi ajustado aumentando a concentração de Tris ou Citrato, segundo os resultados obtidos. Os pHs resultantes das diversas concentrações de TRIS e Citrato testadas se situaram entre 7,8 e 8,6.

3.5.2.3 Soluções extratoras

Para cada enzima foi estudada a necessidade de extratores antioxidantes durante a maceração dos tecidos. Diversos são os compostos que tem a propriedade de controlar as oxidações fenólicas muito comuns em plantas tropicais. Entre outros, citam-se: ácido ascórbico, glutathiona, polivinilpirrolidona(PVP), 2-mercaptoetanol, sacarose e cisteína. Foram avaliada concentrações individuais destes produtos, bem como diversas combinações entre eles, conjuntamente com Triton X-100 usado como dispersante.

Tambem foram realizados testes utilizando-se uma pequena quantidade de lignito comercial na solução extratora. Este produto, de alta capacidade de troca catiónica, poderia influenciar a absorção de fenóis que alteram a resolução das bandas.

3.5.2.4 Maceração

Após a maceração, o extrato deve ser tal que contenha uma quantidade adequada de enzimas ativas absorvidas no papel filtro

que, após a eletroforese, vão produzir bandas no gel. A resolução dessas bandas depende, dentre outros fatores, do processo de maceração do tecido.

No processo de maceração foram investigadas a intensidade de maceração, quantidade de tecido, e adição de abrasivos, uma vez determinada a solução de extratores mais adequada. Estes estudos foram conduzidos principalmente com tecidos de folha devido a alta quantidade de fibras.

3.5.2.5 Tempo e intensidade de corrente para a eletroforese

Diversas combinações da voltagem, amperagem e pH do tampão eletrodo foram avaliadas, em relação à resolução das bandas e ao tempo de corrida.

As condições ótimas foram determinadas para pH no intervalo de 8,0-8,5.

3.5.2.6 Camadas apropriadas

Os géis foram seccionados em 5 camadas horizontais, podendo ser reveladas diferentes enzimas em cada camada. A resolução das bandas pode também ser influenciada diferentemente nos diversos sistemas isoenzimáticos pela posição da camada no gel. Assim, as isoenzimas estudadas foram reveladas nas distintas camadas e as suas resoluções avaliadas.

3.5.2.7 - Sistemas enzimáticos

Procurou-se, para cada tecido, estudar o maior número possível de sistemas enzimáticos. A seguir, relacionam-se as enzimas testadas e suas respectivas soluções de revelação (SHAW E PRASAD, 1970):

- ADH (alcohol desidrogenase) - NAD 20 mg; MTT 10 mg; PMS 2 mg;
etanol 99% 3 ml; 50 ml TRIS 0,1 M pH 7,5.

- PGI (fosfoglucoisomerase) - NADP 7 mg; F-6-P 40 mg; MTT 10 mg;
PMS 2 mg; G6PDH 15 unidades; 50 ml TRIS 0,1 M pH 7,5.

- PGM (fosfoglucomutase) - G-1-P 150 mg; NADP 7 mg; MTT 10 mg;
PMS 2 mg; G6PDH 15 unidades; 50 ml TRIS 0,1 M pH 7,5.

- EST (esterase) - Fast Blue RR 50 mg; 1-naftil acetato 3 ml;
50 ml tampão fosfato 0,1 M pH 6,25.

- PRX (peroxidase) - 3A9EC 50 mg; N.N.D.M.F. 3 ml; 100 ml tampão
Na acetato 0,05 M pH 4,5; H₂O 3% 0,75ml.
2 2

- ME (enzima málica) - ácido málico 500 mg; NADP 7 mg;
MTT 10 mg; PMS 2 mg; 50 ml tampão TRIS 0,1 M pH 7,5.

- APS (fosfatase ácida) - Fast Black K 50 mg; 1,5 ml 2-naftil
ácido fosfato 1% em 50% acetona; 50 ml tampão Na acetato
0,05 M pH 5,5.

- G6PDH (glucose-6-fosfato desidrogenase) - G6P 100 mg; NADP 7 mg;
MTT 10 mg; PMS 2 mg; 50 ml tampão TRIS 0,1 M pH 7,5.

- 6PGDH (6-fosfogluconato desidrogenase) - NADP 7 mg; 6-PGA
10 mg; MTT 10 mg; PMS 2 mg; 50 ml tampão TRIS 0,1 M pH 7,5.

- MDH (malato desidrogenase) - ácido málico 200 mg; NAD 15 mg;
MTT 10 mg; PMS 2 mg; 50 ml tampão TRIS 0,1 M pH 7,5.

- GOT (glutamato oxaloacético transaminase) - KG 100 mg;
ácido aspártico 200 mg; P5P 10 mg; Fast Blue BB 150 mg;
100 ml tampão TRIS 0,1 M pH 8,5.
- PPD (polifenoloxidase) - DOPA 200 mg; 100 ml tampão Fosfato
0,1 m pH 7,0.

Para facilitar a descrição da metodologia as seguintes abreviaturas foram usadas:

DOPA	- 3,4-dihidroxifenilalanina
F-6-P	- Frutose-6-fosfato
G-1-P	- Glicose-1-fosfato
G-6-P	- Glicose-6-fosfato
G6PDH	- Glucose-6-fosfato desidrogenase
MTT	- (4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-tetrazolium-bromide
NAID	- Nicotinamida-adenina-dinucleotideo
NADP	- Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotideo
NNDMF	- N,N-dimetil-formamide
PMS	- Phenazine methosulfate
TRIS	- Hidroximetil-amino-metano
6PGA	- Acido 6-fosfogluconico
1-KG	- Acido 1-ketoglutarico
3A9EC	- 3 amino-9-etil-carbazol

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- METODOLOGIA DA ELETROFORESE EM PALMITEIRO

Vários são os fatores que podem influenciar a qualidade da resolução das bandas em eletroforese, como a natureza, quantidade e condição fisiológica do tecido vegetal, as soluções extratoras, composição e pH do gel, corrente elétrica e os métodos de coloração, entre outros. Estas variáveis e suas interações causam problemas que podem ser, através de adequadas padronizações, muito atenuados. Por isso, ao longo deste trabalho, uma vez determinadas as melhores condições para certas variáveis, procurou-se mantê-las constantes nas investigações subsequentes.

4.1.1 - Técnica

4.1.1.1 - Concentração de amido do gel

A migração relativa das bandas foi influenciada pela concentração de amido do gel. Concentrações menores que 11% resultaram em géis flácidos, de difícil manipulação, além de uma migração excessiva das bandas que se localizaram junto ao fronte. Por outro lado, concentrações acima de 13% resultaram em géis muito densos, apresentando bandas distorcidas em forma de V, com o ápice voltado para o fronte.

A concentração de 11,6% se mostrou a mais apropriada. Nessa concentração, os géis revelaram boa textura, adequada à manipulação mesmo de camadas com espessuras inferiores a 1mm, e com boa resolução de bandas. Cabe ressaltar, entretanto, que essa concentração é válida apenas para o lote específico de amido

utilizado desde que o grau de hidrólise do amido comercial pode variar, alterando-se assim a concentração ótima. Da mesma forma, para um mesmo lote comercial, ela é influenciada pelo período de armazenamento do amido. Assim, a concentração de 11,6%, inicialmente considerada ótima, teve que ser modificada para 11,9% após 12 meses, mesmo mantendo-se o amido sob refrigeração.

Géis preparados com amido armazenado por mais de dois anos apresentaram, frequentemente, grumos de amido não dissolvido. Normalmente, esses lotes são eliminados pois não permitem a preparação de géis homogêneos. Após inúmeras tentativas, conseguiu-se contornar o problema abaixando-se a temperatura da solução tampão para 5-10 °C antes de se dissolver o amido.

4.1.1.2 - Composição e pH das soluções tampão do eletrodo e do gel

- Tampão do eletrodo:

Verificou-se que o pH da solução tampão do eletrodo influencia a velocidade de migração sem afetar a resolução e migração relativa das bandas, sendo o tempo de corrida inversamente proporcional ao valor do pH, quando se estabelece um limite de corrente. Mantendo-se 25mA e 300 volts como limites, pH 7,8 resultou em corridas demoradas (6 horas). Por outro lado, com pH acima de 8,6 o gel aqueceu-se demais na voltagem de 300V pois a amperagem atingiu 60mA, provocando a desnaturação das proteínas e, conseqüentemente, resolução inadequada das bandas. Observou-se que, utilizando pHs entre 8,0 e 8,3 não foi gerado calor excessivo, a resolução das bandas permaneceu estável e o tempo de corrida foi reduzido para 3 1/2 hrs, tempo em que o fronte migrou 8,5 cm da origem.

- Tampão do Gel:

Sabe-se que, a utilização de pH menor que 7,5 resulta em géis onde as bandas migram próximas ao fronte, dificultando a resolução. Por outro lado, pH acima de 8,6 pode originar géis com atividade enzimática reduzida.

No intervalo de pH de 7,8-8,6 investigado, foram observados em tecidos de folhas, alterações na resolução e migração relativa das bandas (Rf). Essas alterações diferem nos diversos sistemas enzimáticos (foto 1). Para fosfatase ácida (APS), o efeito na migração relativa foi marcante porém a resolução permaneceu estável nesse intervalo de pH. Em esterase (EST) observou-se pequeno efeito na migração relativa e a resolução dos géis foi alterada com o aumento do pH, com o aparecimento de bandas adicionais com pH acima de 8,0. Para peroxidase (PRX) a migração das bandas e a resolução dos géis mantiveram-se fundamentalmente estável no intervalo de pH testado. Em PRX catódica observou-se somente em E.edulis, que com pH acima de 8,3 há separação de bandas enquanto que com pH menor essas não migram, permanecendo na origem. Esses efeitos são provavelmente consequência do ponto isoelétrico das diversas isoenzimas, uma vez que as enzimas são compostos anfotéricos. O pH da solução tampão e o ponto isoelétrico próprio de cada isoenzima determina a direção e migração relativa observada no gel.

Para GOT, ADH, PGI e ME observou-se apenas que o aumento de pH resulta em menor migração relativa ao fronte, sem no entanto alterar a resolução.

Baseando-se nos resultados obtidos, considerou-se apropriado utilizar o pH no intervalo de 8,0 - 8,3, no qual a migração

relativa das bandas para as diversas isoenzimas permite uma boa resolução, sem problemas de superaquecimento dos géis.

4.1.1.3 - Soluções Extratoras

Os melhores resultados foram obtidos quando empregou-se uma solução extratora contendo de 0,4% a 0,6% de polivinilpirrolidona(PVP) e ácido ascórbico em Tris pH 7,5. Triton X-100 foi adicionado como dispersante numa proporção ótima de 5%, devido a seus efeitos benéficos. O pH final da solução obtida foi ajustado entre 7,0 e 7,5 com NaOH 1N.

Verificou-se que quando a cisteína foi usada nas diversas combinações, em EST houve resolução deficiente. O efeito da sacarose foi comparável ao do ácido ascórbico, e, quando empregados juntos, não foi observado efeito sinérgico. Por esta razão, manteve-se somente o ácido ascórbico na solução extratora. 2-mercaptoetanol foi apropriado para algumas combinações porém, sem diferenças significativas em relação a combinação ótima de componentes acima mencionada. Tanto o PVP (antioxidante) quanto o Triton X-100 (dispersante), mostraram-se essenciais na solução extratora para tecidos de folha, polem, caule e palmito. Verificou-se, porém, que a resolução de ADH, ME e GOT, em tecido de raiz, foi beneficiada com a adição de glutathiona (0,4 - 0,6%) (foto 2).

A utilização de lignito comercial na solução extratora não melhorou a resolução dos géis, pelo contrário, em alguns sistemas, houve mesmo resoluções insatisfatórias.

4.1.1.4 - Maceração

Foram testados, principalmente, tecidos de folhas. Os procedimentos de maceração mais apropriados para folhas, foram também utilizados para outros tecidos, com resultados semelhantes.

Intensidade de maceração: a maceração foi feita com bastões de acrílico, lavados em água destilada a aproximadamente 20°C entre as macerações de amostras diferentes.

Os testes para se determinar a intensidade de maceração foram feitos, tomando-se como base os tamanhos dos fragmentos de folha obtidos após o processo. Quando as amostras ficaram reduzidas a uma pasta, sem fragmentos visíveis, considerou-se o processo na sua forma mais intensa. Maceração menos intensa resultou em fragmentos maiores e, teoricamente, numa menor proporção de enzima ativa por unidade de extrator.

Verificou-se não ser necessária maceração muito intensa. Fragmentos de aproximadamente 2-4mm mostraram uma concentração adequada de enzimas, requerendo menor tempo e esforço para a sua obtenção.

Quantidade de tecido: a quantidade de tecido vegetal a ser usado é dependente da quantidade de solução extratora. Após vários testes, determinou-se uma proporção adequada de 35ml de solução extratora para, aproximadamente, 100mg de tecido de folha. Esses 100 mg de tecido correspondem a dois discos de folíolos com 16mm de diâmetro, obtidos rapidamente com um furador de rolhas. O volume de 0,35ml corresponde a 15 gotas de solução extratora em

um conta gotas plástico descartável. A utilização do furador de rolhas e do conta gotas agilizaram, sobremaneira, a preparação das amostras.

A composição e concentração dos componentes da solução extratora foram desenvolvidas de tal forma que, mesmo quando se reduzia a quantidade de extrator adicionada aos discos de folhas novas, portanto de menor peso, obtinham-se os mesmos resultados em termos de resolução. Tal flexibilidade é extremamente conveniente pois evita-se, com isso, as pesagens prévias das amostras.

Adição de abrasivos: os tecidos das folhas das palmeiras em estudo tem um alto conteúdo de fibras, dificultando o processo de maceração e extração.

O uso de sílica lavada na maceração deu bons resultados. A atividade, resolução e expressão das diversas isoenzimas mantiveram-se invariáveis quando comparadas a amostras maceradas sem a adição desse abrasivo.

4.1.1.5 - Tempo e Intensidade de Corrente para a Eletroforese

Baixas voltagens e amperagens resultaram em corridas muito demoradas e bandas difusas. Por outro lado, voltagens e amperagens extremas geraram, pela excessiva passagem de corrente no gel, grande quantidade de calor, desnaturando as enzimas.

Foram determinadas, através de experimentação, tempos e intensidades de corrente elétrica para pH no intervalo 8,0 a 8,3 : a) Aplicação por 25 minutos de 25mA sem ultrapassar 150 volts, para a inserção no gel de pequena quantidade de enzimas presentes

no extrato; b) Após a remoção dos papéis de filtro contendo os extratos, aplica-se novamente 25mA sem ultrapassar 150 volts, por 30 minutos; c) Após esse tempo aumenta-se a amperagem para 30mA até um limite de 300 volts; d) Após 30 minutos, a voltagem é novamente ajustada para 300 volts, cuidando-se para que não ultrapasse 30mA.

Esse procedimento resultou em bandas de boa resolução. Nestas condições, o tempo de corrida foi dependente do pH do tampão do eletrodo. Com pH 7,8 a corrida demorou cerca de 6 horas e com pH 8,6 o tempo pôde ser reduzido para 2 horas. Com pH 8,3 o processo durou aproximadamente 3 1/2 horas, quando o fronte atingiu 8,5cm da origem.

4.1.1.6 - Camadas apropriadas

Verificou-se que um fator importante influenciando a resolução das bandas em cada sistema é a posição da camada no gel.

Observou-se que, em geral, a última camada, em contacto com a base de vidro, foi a de melhor resolução enquanto que a mais externa, superficial, permitiu apenas detectar a atividade da enzima, sem separação em bandas. As camadas intermediárias mostraram efeitos diferentes nos diversos sistemas enzimáticos, decorrentes da própria estrutura espacial e composição das diferentes enzimas. Por exemplo, a resolução de PRX não foi afetada pela posição da camada no gel. Em ME e GOT o efeito foi pouco pronunciado. APS, EST, ADH e PGI mostraram resoluções deficientes quando revelados em camadas mais superficiais dos geis.

4.1.1.7 - Sistemas Enzimáticos

Em termos de resolução de bandas, três grupos distintos de enzimas podem ser diferenciados. O primeiro inclui APS, EST e PRX, para as quais a metodologia aplicada mostrou-se eficiente, com boa resolução, estável e pouco afetada pelas condições de armazenamento e estádios fisiológicos das plantas. No segundo grupo colocam-se ADH, PGI, ME, GOT e PPO, nas quais observou-se boa resolução de bandas, porém, com expressão instável. O estágio fisiológico das plantas parece ser a causa principal dessa inconstância. No terceiro grupo situam-se G6PDH, 6PGDH, PGM, GDH e MDH, das quais raramente obteve-se atividade enzimática e, mesmo quando esta foi notada, a resolução deixou muito a desejar.

4.1.2 Tecidos Alternativos e Estádios de Desenvolvimento

Foram estudadas a expressão e resolução dos diversos sistemas enzimáticos, em tecidos vegetais distintos. Os resultados obtidos foram avaliados em termos da resolução e repetitividade na obtenção de bandas, além da disponibilidade e simplicidade na obtenção do material.

4.1.2.1 - Endosperma

Dez sementes maduras de E.edulis e E.oleracea foram testadas para PRX, APS, EST, ADH, PGI e PGM. Obteve-se boa resolução de bandas para PRX anódica, enquanto ADH, PGI e PGM não mostraram atividade neste tecido. APS, EST e PRX catódica apresentaram certa atividade, porém com resolução de bandas muito insatisfatória.

A utilização deste tecido não parece ser vantajosa. Não há disponibilidade contínua de sementes novas durante o ano e, além disso, houve dificuldades na germinação das sementes após a remoção de uma porção do endosperma, o que impede a caracterização isoenzimica nesse tecido. Além disso, poucos sistemas são passíveis de análise utilizando-se esse substrato.

4.1.2.2 - Coleoptilo

Foram analisadas 10 plantas de E.edulis e E.oleracea para ADH, PGI, PGM, PRX, APS e EST. Semelhante ao endosperma, a única resolução razoável foi obtida para PRX anódica. Também verificou-se que os padrões obtidos de coleoptilo foram semelhantes àqueles de folhas de plantas das mesmas populações. Não foi possível germinar as sementes após o corte do coleoptilo, portanto, este material também não oferece maiores vantagens.

4.1.2.3 - Caule, Meristema, Palmito

Para todos os sistemas enzimáticos, os padrões de caule, meristema e porção processável do palmito mostraram-se semelhantes, sendo estes três tecidos, então, analisados conjuntamente.

Esses tecidos mostraram-se altamente propensos à oxidações fenólicas. A resolução dos padrões melhorou consideravelmente, quando lavados com uma solução contendo 2,5% de NaCl e 0,8% de ácido cítrico, logo após a remoção da bainha, sendo possível o armazenamento, em geladeira, durante até 7 dias.

Foram testadas para APS, EST, PRX, ADH, PGI e MDH, 10 plantas de 15 populações de E.edulis, 10 plantas do "tipo" Bahia

sem perfilhamento bem como alguns híbridos interespecíficos.

Obtiveram-se resoluções estáveis para EST, APS e PRX. Para ADH e PGI, a resolução também foi satisfatória, porém, com expressão instável.

4.1.2.4 - Polem

Polem de 15 plantas de E.edulis, E.oleracea, alguns híbridos e palmeiras de Euterpe spp. com e sem perfilhamento foram testados quanto à APS, EST, PRX, ADH, PGI, ME e GOT.

Polens armazenados por diferentes períodos de tempo foram estudados, devido às épocas distintas de florescimento dessas palmeiras. Esse fator parece não ter influenciado a resolução de bandas, desde que em alguns casos em que puderam ser testados polens do mesmo material, o recém colhido mostrou resolução semelhante àquela do armazenado.

ADH e ME apresentaram padrões de coloração intensa em polem de E.edulis e de Euterpe spp., com resolução notavelmente mais nítida que a observada nos outros tecidos. Em E.oleracea, bem como seus híbridos, ADH não mostrou atividade e ME apresentou resolução difusa.

PGI e GOT mostraram resoluções razoáveis à semelhança de tecidos de folha. Como em ADH, as amostras de E.oleracea e seus híbridos não apresentaram atividade.

APS, EST e PRX, ao contrário de outros tecidos, apresentaram, em polem, resolução insatisfatória.

Não se conhece a razão dessa expressão diferencial de E.edulis e E.oleracea e seus híbridos, em relação a atividade de ADH, PGI e GOT em polem. Estudos mais detalhados sobre esse

assunto são necessários, uma vez que todos os polens analisados estavam viáveis.

4.1.2.5 - Raiz

Raizes de plantas jovens e adultas, originárias de populações de E.edulis e E.oleracea e alguns híbridos interespecíficos foram testadas para APS, EST, PRX, ADH, MDH, ME, PGI e GOT.

Resolução de bandas nítida e estável foi observada para PRX, EST e APS, sendo semelhantes os padrões de plantas jovens e adultas.

ADH apresentou boa resolução, porém, bastante instável. Em plântulas diferentes no mesmo estágio de desenvolvimento e mantidas nas mesmas condições de cultivo, algumas não mostraram nenhuma atividade enquanto a maioria apresentou atividade enzimática normal. Este fenômeno também foi observado em tecidos de folha. A possibilidade de que a instabilidade de resolução pudesse ser afetada pela quantidade de tecido usada, efeitos de maceração e de soluções extratoras foi descartada, após diversos testes realizados. Provavelmente, deve-se a fatores fisiológicos, relacionados à condições de irrigação e aeração das raízes, pois sabe-se que ADH é caracteristicamente expressa em condições anaeróbicas.

ME e GOT, apesar de melhora significativa com a adição de glutathiona na solução de extração, mostraram-se de resolução instável. PGI não mostrou atividade em nenhum dos materiais estudados.

Os resultados obtidos para PRX, EST e APS em raiz tornam

esse tecido uma excelente opção para estudos de expressão destes sistemas e possível identificação de plantas híbridas. Pequena quantidade de tecido é suficiente e, além disso, observou-se baixa oxidação fenólica.

4.1.2.6 - Folha

Este tecido foi o mais investigado (cerca de 1000 plantas), por ser disponível o ano inteiro, poder ser mantido na geladeira por 10 dias e não provocar injúria ou destruição da planta.

Ao contrário dos outros tecidos estudados, verificou-se que a preparação das amostras para maceração pode ser feita no dia anterior ao da eletroforese, o que facilita bastante a rotina de trabalho, quando se deseja analisar número grande de amostras.

Resolução nítida e estável foi obtida para APS, EST e PRX. ADH, PGI, ME e GOT apresentaram, também, resolução nítida, porém, da mesma forma que em outros tecidos, instável.

Diversos estádios de desenvolvimento foram testados. Verificou-se que não houveram diferenças significativas na qualidade de resolução das bandas para nenhum sistema enzimático. O padrão de expressão das diversas bandas foi também semelhante. Entretanto, em PRX anódica verificou-se que em plântulas ocorre um deslocamento das bandas em direção ao fronte em uma região de resolução e, também, um menor número de bandas é visto em outra região de resolução, em comparação com os padrões obtidos em plantas adultas. Tanto o deslocamento uniforme de bandas como a ocorrência de maior ou menor número de bandas, em amostras de tecidos extraídos em diferentes estádios de desenvolvimento, não são fenômenos raros. Pelo contrário, principalmente em PRX, é de

ocorrência comum e reflete modificações pós tradução e/ou expressão de loci específicos em certas fases ou condições de desenvolvimento (ASINS et.al.,1982).

A nitidez e estabilidade de resolução de bandas excelente em tecidos de folha para PRX, EST e APS e os resultados razoáveis obtidos para ADH, PGI, ME e GOT determinaram, além de outras vantagens, a escolha deste tecido para os estudos preliminares de variabilidade genética do germoplasma disponível.

4.1.3 - Armazenamento dos Tecidos Vegetais

Foram testadas diferentes condições de armazenamento, principalmente quanto à temperatura e umidade, para folhas de diferentes idades. Ambos os fatores ambientais tiveram efeito na resolução das bandas. Verificou-se que, para todos os sistemas enzimáticos, alta umidade no armazenamento é essencial para se manter constante a resolução de bandas. A temperatura, no entanto, teve diferentes efeitos nos diversos sistemas estudados.

Para PRX, EST, APS, GOT e ME obteve-se, sob condição de armazenamento em condições úmidas(sacos plásticos) e ambiente fresco(geladeira) até 10 dias após a colheita, uma resolução semelhante àquela observada em folíolos colhidos e utilizados no mesmo dia. Para PGI, entretanto, essas mesmas condições, por mais de 5 dias, resultaram em bandas menos intensas.

A resolução de ADH mostrou-se altamente influenciada pela condição fisiológica da planta no momento da coleta, desde que foram observadas diferenças em amostras extraídas de uma mesma planta, coletadas em dias diferentes porém armazenadas nas mesmas

condições.

No teste de tecidos de folhas de diferentes idades, amostras de folíolos de plantas adultas colhidos e utilizados no mesmo dia apresentaram resolução constante para ME, PRX, APS, EST e GOT independentemente da idade da folha. Todavia para PGI e PRX, folhas mais velhas resultaram em bandas mais intensas e, para ADH, folhas mais novas resultaram em bandas mais nítidas.

Pode-se concluir que folíolos mantidos na geladeira dentro de sacos plásticos, até 10 dias após a colheita, podem ser utilizados, sem haver perda considerável da atividade enzimática. Após esse tempo, observou-se certa perda na atividade, sendo afetadas, principalmente, EST, ADH, PGI e GOT. APS e PRX foram as menos afetadas, podendo o material ser armazenado até 15 dias, mantendo-se em boas condições para a análise de isoenzimas.

O congelamento dos discos de tecidos de folha não deu bons resultados, sendo deficiente a resolução das bandas.

Os outros tecidos foram todos consideravelmente afetados pelo tempo de armazenamento, sendo aconselhável em futuros trabalhos, a sua coleta e uso dentro de, no máximo, dois dias.

4.2 SISTEMAS ENZIMATICOS, EXPRESSAO E VARIABILIDADE GENETICA

Regiões distintas de atividade de bandas nos géis foram observadas para cada isoenzima, com expressão diferencial das regiões nos diversos tecidos analisados. Esta expressão distinta, está relacionada, provavelmente, com a expressão de diversos loci. O estudo das diferentes expressões é bastante complexo podendo envolver não somente a expressão ou não dos diversos loci como a formação epigenética de bandas extras devido a modificações pós-tradução e, conforme a estrutura quaternária das isoenzimas, uma possível formação de heteropolímeros intra e intergênicos. Estudos mais detalhados do assunto deverão se apoiar em informações complementares sobre citologia e estrutura genômica das espécies e na análise genética após cruzamentos dirigidos. Na ausência destas pesquisas, o entendimento das diferentes expressões observadas é bastante limitado.

A expressão dos sistemas enzimáticos estudou-se comparativamente em diversos tecidos alternativos, procurando-se utilizar plantas das mais variadas origens. Se bem que, não foi possível, a inequívoca identificação de loci e alelos e da estrutura quaternária das isoenzimas estudadas, pôde ser verificada a existência de variabilidade genética, bem como avaliadas as isoenzimas e materiais vegetais de interesse para futuros trabalhos envolvendo análises genéticas dessas espécies.

No Quadro 1 a seguir, relacionam-se os tecidos, sistemas enzimáticos e materiais vegetais utilizados nos estudos de expressão e de variabilidade genética.

QUADRO 1: Materiais vegetais, tecidos e isoenzimas utilizadas nos estudos de variabilidade genética.

GERMOPLASMA	CAULE	MERISTEMA	PALMITO	RAIZ DE MUDAS	POLEN	FOLHA ADULTA	FOLHA JUVEN
<u>E.edulis</u>	APS EST PRX ADH PGI	APS EST PRX ADH PGI	APS EST PRX ADH PGI	APS EST PRX ADH	APS EST PRX ADH PGI ME GOT	APS EST PRX ADH PGI ME GOT PPD	APS EST PRX ADH PGI ME GOT PPD
<u>E.oleracea</u>				APS EST PRX ADH	APS EST PRX ADH PGI ME GOT	APS EST PRX ADH PGI ME GOT PPD	APS EST PRX ADH PGI ME GOT PPD
Híbridos <u>E.edulis</u> x <u>E.oleracea</u>	APS EST PRX ADH PGI	APS EST PRX ADH PGI	APS EST PRX ADH PGI	APS EST PRX ADH	APS EST PRX ADH PGI ME GOT	APS EST PRX ADH PGI ME GOT PPD	APS EST PRX ADH PGI ME GOT PPD
"tipo" Bahia	APS EST PRX ADH	APS EST PRX ADH	APS EST PRX ADH		APS EST PRX ADH PGI ME GOT	APS EST PRX ADH PGI ME GOT	APS EST PRX ADH PGI ME GOT
"tipo" Açaí Mate Grosso					APS EST PRX ADH PGI ME GOT	APS EST PRX ADH PGI ME GOT	APS EST PRX ADH PGI ME GOT
Outros <u>Euterpe</u> spp.					APS EST PRX ADH PGI ME GOT	APS EST PRX ADH PGI ME GOT PPD	APS EST PRX ADH PGI ME GOT PPD

4.2.1 APS (fosfatase ácida) -

A expressão de APS pode ser separada nos géis em 4 regiões. A 2a região foi considerada a mais importante, sendo sua resolução nítida e estável, além de ser expressa em todos os tecidos e materiais vegetais estudados. A 1a região, próxima ao fronte e a 4a, próxima a origem, apresentaram bandas definidas, porém em alguns casos não se observou expressão. A 3a região, apesar de sempre ser expressa, teve resolução nítida somente em E.oleracea e alguns de seus híbridos.

Caule, meristema e palmito apresentaram padrão semelhante de 2 bandas principais, uma na 1a e outra na 2a região, esta última

presente também na folha das mesmas plantas. A 3a região mostrou expressão, porém, de resolução difusa. A 4a região, com uma banda próxima a origem, observou-se somente em alguns indivíduos do chamado "tipo" Bahia sem perfilhamento. Não se observou variabilidade genética em nenhum dos materiais estudados para o padrão principal resolvido nesses tecidos (foto 3).

Tecidos de raiz apresentaram resolução nítida somente nas regiões próximas ao fronte, com expressão diferente em E.edulis e E.oleracea. Para cada espécie, entretanto, observou-se apenas um único padrão. E.oleracea e alguns híbridos apresentaram um padrão de somente uma banda, semelhante ao obtido em tecido de folha na região principal (2a). Em E.edulis e outros híbridos observou-se uma banda bem definida na 1a região, sempre associada à uma banda na 2a região, avançada em relação à banda da folha das mesmas plantas. Esta associação mostra a diferença dos padrões de raiz e folha em E.edulis. Na 3a região observou-se expressão difusa em ambas as espécies e híbridos (foto 4).

Na folha, a expressão principal é uma banda única na 2a região, semelhante para as plantas de E.edulis e E.oleracea testadas. Em outros materiais de Euterpe spp. observou-se, no entanto, para algumas plantas, um padrão também de uma banda, porém de mobilidade diferente e, para outras, expressão nula dessa região (foto 5).

Nesse tecido, também foi constatada atividade enzimática nas outras regiões. Na 1a região observou-se, esporadicamente, uma banda difusa, diferente à encontrada em palmito. Verificou-se que esta expressão se evidencia quando a folha é armazenada à

temperatura ambiente. Porém, no "tipo" Bahia sem perfilhamento, esta banda se expressa sempre e apresenta intensa coloração. A 3a região mostrou nitida e intensa atividade somente em E.oleracea e alguns de seus híbridos. Constatou-se, porém, expressões diferentes em E.oleracea e E.edulis. A 4a região, próxima à origem, mostrou uma banda única presente indistintamente em algumas plantas adultas e plântulas de diversos materiais.

O polem apresentou expressão apenas na 1a e 2a regiões, obtendo-se resolução somente em E.edulis e alguns Euterpe spp., com padrão semelhante ao obtido em folha dessas mesmas plantas.

Em suma, expressões diferentes foram observadas nos diversos tecidos para as 4 regiões de resolução de APS. Pela distribuição diferencial dessas bandas nos distintos tecidos pode-se especular a possibilidade dessas 4 regiões corresponderem a 4 loci distintos. Apesar de amostras de folhas de E.edulis e E.oleracea terem um padrão semelhante na região principal resolvida, constatou-se, no entanto, variabilidade genética para outros materiais vegetais como o "tipo" Açaí Mato Grosso, Bahia e plantas nativas de Barcelos, AM.

4.2.2 EST (esterase) -

A expressão de EST foi observada em 5 regiões, das quais 3 são próximas do fronte. A 1a observou-se somente em tecido de folha de plântulas e de plantas adultas. A 2a corresponde a uma banda presente em todos os tecidos, porém devido a proximidade com a 3a região, sua resolução em alguns casos pode ser

confundida. A 3a considerou-se a região principal devido à sua estabilidade e melhor resolução em todos os tecidos. Na 4a região, observou-se intensa atividade, porém as bandas são de limites difusos. Parece, no entanto, que existem três grupos de bandas envolvidos nesta região. A última região, próxima à origem, expressou-se como uma banda de resolução nítida porém instável.

Caule, meristema e palmito apresentaram uma banda na 2a região, uma ou duas bandas semelhantes às de tecidos de folha na 3a região, atividade intensa com expressão diferente para algumas plantas de E.edulis na 4a região e expressão de uma banda próxima à origem em todos os casos testados (foto 6).

Tecidos de raiz apresentaram atividade na 2a e 3a região. Esta última de expressão semelhante à de tecidos de folha, com uma ou duas bandas. A 4a e 5a regiões, próximas à origem, tiveram expressão somente em algumas plantas (foto 7).

O padrão de tecidos de folha é o mais complexo para ser analisado. Observou-se atividade em todas as regiões (foto 8). Na 1a região, de boa resolução, porém com certa instabilidade, mostrou variabilidade em E.edulis e E.oleracea (foto 8 e foto 9). Na 2a região observou-se uma banda semelhante para essas duas espécies. Na 3a, região principal, observaram-se diversos tipos de padrões: sem expressão, banda única e associação de duas bandas (foto 10). A expressão nula e a banda mais avançada foram de ocorrência comum nos diversos materiais vegetais estudados. A 4a região mostrou, geralmente, resolução difusa e, a região

próxima à origem, à semelhança de tecido de raiz, apresentou expressão somente em algumas plantas.

O polem teve expressão principalmente na 3a região. Sua resolução entretanto foi difusa. Não foi possível a sua utilização para auxiliar a identificação dos diversos loci.

Em resumo, observou-se variabilidade genética entre e dentro de *E.edulis*, *E.oleracea*, híbridos interespecíficos e plantas de *Euterpe* spp.. Devido à complexidade das bandas em EST e a ocorrência de muitos padrões nas diversas regiões, informações precisas sobre os loci envolvidos e as estruturas quaternárias das enzimas devem, necessariamente, basear-se em adequados testes de progênies, após cruzamentos controlados. No estudo das EST, onde é frequente a ocorrência de vários loci, alguns codificando para monômeros, outros para dímeros, além das complicações devidas às modificações pós-tradução, pode ocorrer a formação de diversas bandas de isoesterases, a partir do produto de um único locus.

No entanto, pela expressão diferencial das regiões nos diferentes tecidos e materiais vegetais empregados, existe a possibilidade da 1a, 2a, 3a e 5a região corresponderem a loci distintos. Na 4a região, talvez mais de um locus esteja envolvido. A 3a região (principal), de maior variabilidade, parece corresponder à situação de segregação de um locus, com vários alelos, que codifica para uma enzima monomérica. Caracteristicamente, nesta região observou-se sempre uma ou apenas duas bandas de migração distinta, porém nunca três ou mais bandas em um único indivíduo.

4.2.3 PRX (peroxidase) -

Apresentou atividade anódica e catódica, ambas com excelente resolução. Tanto PRX anódica como PRX catódica situaram-se em 2 regiões definidas, com expressões variáveis, de acordo com os tecidos empregados.

Em caule, meristema e palmito, PRX anódica mostrou variabilidade genética em E.edulis na 1a região, com a expressão de uma ou duas bandas. Na 2a região, devido à intensa atividade não se conseguiu resolver bandas bem definidas. Na mesma espécie, PRX catódica nesses tecidos mostrou grande complexidade com grande número de bandas e também diversos padrões de variabilidade (foto 11).

Em raízes não houve expressão da 1a região de PRX anódica. Na 2a região observaram-se vários padrões em E.edulis, com expressão de duas, três ou quatro bandas. Em relação às folhas das mesmas plantas, verificou-se que esse tecido apresenta maior número de bandas (foto 12). O padrão de PRX catódica em raiz mostrou-se, também, diferente do padrão de folha nas mesmas plantas. Entretanto, revelou padrões únicos e distintos para E.edulis e E.oleracea. Isso permite a identificação de híbridos interespecíficos pelo padrão composto da associação dos padrões das espécies progenitoras (foto 13).

Os polens de diversos materiais foram testados, porém, não se conseguiu boa resolução em nenhum dos casos. PRX anódica mostrou sempre resolução difusa e PRX catódica, bandas pouco

coloridas em apenas alguns polens. Por isso, não pôde ser utilizado para um melhor entendimento dos padrões de PRX.

Em folha, PRX anódica na 1a região, próxima ao fronte, revelou um padrão característico de várias bandas associadas equidistantes e de migração conjunta. Esse tipo de padrão é bastante comum em outras plantas já bem estudadas geneticamente, onde um locus codificando para uma enzima monomérica apresenta bandas equidistantes de migração conjunta e de coloração decrescente. Esse efeito é, muitas vezes, resultado da expressão de confômeros, isoenzimas que apresentam a mesma sequência de aminoácidos, existindo, entretanto, em diferentes estruturas conformacionais (KAPLAN, 1968). Em Euterpe, embora ainda faltem os testes adequados em progênies de cruzamentos dirigidos, é de se esperar, pela semelhança dos fenótipos, uma situação semelhante, onde 1 locus codificaria uma enzima monomérica, responsável pela expressão dessa 1a região. Em E.edulis existe variabilidade genética, a julgar não só pelo número como pela mobilidade dessas bandas. Apesar dessa variabilidade, verificou-se que as bandas de E.oleracea, são avançadas em relação às de todos os padrões de E.edulis. A expressão nos híbridos resultou em uma superposição dos dois padrões o que seria consistente com a hipótese acima (foto 14).

A 2a região de PRX anódica apresentou padrões complexos de serem analisados. Número variável de bandas foram resolvidas em E.edulis e outras plantas sem perfilhamento. E.oleracea no entanto, apresentou-se homogênea para esta região, com um padrão típico de três bandas (foto 15).

Nenhum tipo de associação foi observado entre os padrões e a migração relativa das bandas da 1a e 2a regiões. Parecem tratar-se de regiões codificadas por loci diferentes, a julgar pela expressão diferencial em tecidos distintos. Na 2a região, parece que também apenas um locus está envolvido, como será discutido no item 4.3.

Em folha, PRX anódica, revelou-se influenciada pelo estágio de desenvolvimento das plantas utilizadas. Em plântulas ocorre um deslocamento em direção ao fronte das bandas múltiplas, observadas na 1a região, o número delas sendo semelhante ao observado em plantas adultas. Já na 2a região observou-se, em mudas de E.edulis menor número de bandas. Em E.oleracea a expressão é igual em plântulas e plantas adultas indicando que, para essa região, apesar de não existirem diferenças quanto aos genes estruturais responsáveis pela expressão, existe provavelmente variabilidade genética entre as duas espécies a nível de regulação gênica ou de modificadores, que possam provocar alterações epigenéticas dessas isoenzimas.

PRX catódica em tecidos de folha revelou resultados extremamente interessantes, com padrões únicos e característicos para E.edulis, E.oleracea e seus híbridos. Mais ainda, esses padrões são constantes, expressando-se de forma idêntica nos diversos estádios de desenvolvimento. Constitue-se, portanto, em excelentes marcadores genéticos como será discutido no item 4.4 (foto 16). Para PRX catódica, a julgar pela distância das duas regiões que se expressam, pode-se especular a existência de mais de um locus envolvido.

4.2.4 ADH (alcool desidrogenase) -

Foi observada apenas uma região de atividade enzimática para ADH. As mesmas bandas foram observadas em todos os tecidos vegetais, porém, houve diferenças de expressão quanto à intensidade de coloração das bandas.

Caule, meristema e palmito, testados somente em plantas híbridas, apresentaram um padrão de três bandas, semelhante ao obtido em tecidos de folha de plantas também híbridas.

Tecido de raiz apresentou resolução de três bandas, sendo uma das duas bandas extremas mais colorida em relação à intermediária. Verificou-se que a banda de coloração mais intensa em tecidos de raiz é a menos colorida em tecidos de folhas das mesmas plantas (foto 17). Observou-se variabilidade genética, com padrões característicos diferentes, em E.edulis, E.oleracea e seus híbridos.

Em tecido de folhas de plântulas e plantas adultas foram observadas uma, duas ou três bandas em E.edulis e E.oleracea. No entanto, os padrões destas espécies se mostraram claramente distintos, apresentando E.edulis as bandas mais separadas e retardadas do que E.oleracea.

Cabe ressaltar que, para as duas espécies, observou-se a maior expressão das bandas extremas de ADH, sendo geralmente a mais avançada a de coloração mais intensa. O padrão de plantas híbridas, observado em tecidos de palmito, raiz e folha, mostrou-se também distinto com três bandas (foto 17). Ocasionalmente, houve em E.edulis e E.oleracea resolução de somente uma banda. A

expressão nas plantas híbridas de resolução de uma banda mais grossa, resulta, possivelmente, da associação das duas bandas avançadas das espécies progenitoras (foto 18).

O pólém apresentou ótima resolução em E.edulis e em uma planta de Euterpe spp. com perfilhamento, pertencente à população Açaí Mato Grosso. O padrão correspondeu a um dos padrões de três bandas encontradas em E.edulis (foto 19).

As observações sobre a expressão de ADH nos diversos tecidos, se bem que bastante preliminares, são compatíveis com a possibilidade de serem o resultado da expressão simultânea de dois loci, com a formação de um dímero intergênico, um dos locos expressando-se com maior atividade do que o outro. A formação do heterodímero será totalmente ao acaso ou de atividade mais fraca. A hipótese da existência de dois loci e formação eventual de um heterodímero seria plausível, uma vez que em todas as plantas investigadas a forma ativa de ADH invariavelmente é de estrutura quaternária dimerica. Usualmente, em espécies diploides estão presentes 2 loci diferentes de ADH formando dímeros intra e intergênicos, em alguma fase do desenvolvimento, quando os 2 loci se expressam.

4.2.5 PGI (fosfoglucoisomerase) -

PGI pôde ser visualizada na porção média do gel. Uma banda é vista nos tecidos de palmito, folha e pólém de E.edulis. Para E.oleracea não foi testado o tecido de palmito e não obteve-se resolução nítida em pólém. A expressão obtida em folha mostrou, para esta espécie, o mesmo padrão observado em E.edulis.

Apesar de, não ter sido observada variabilidade genética para as duas espécies estudadas, em mudas provenientes de plantas de Euterpe spp., sem perfilhamento, da localidade de Barcelos a expressão de PGI consistiu num padrão variável de uma ou de duas bandas, sendo a mais retardada semelhante à encontrada em E.edulis e em E.oleracea (foto 20). Esta situação poderia sugerir a expressão de um locus, sendo a enzima formada um monômero ou um dímero. No primeiro caso, o heterozigoto expressaria as duas bandas parentais. Porém, o fenótipo mais avançado referente ao outro homozigoto, como seria esperado ocorrer, não foi observado apesar de terem sido analisadas mais de 30 plantas dessa população o que torna essa hipótese improvável. Pode acontecer, entretanto, que o homozigoto para o alelo avançado ser inviável. No caso de ser um dímero, a segunda banda observada seria um heterodímero de um alelo nulo, cujo homodímero nulo não seria visualizado no gel. Essa explicação implica na ocorrência de plantas sem expressão nenhuma, nessa região, as quais seriam homozigotas para o alelo nulo, fato que também não foi observado. Uma possível hipótese para explicar a ausência desse genótipo seria considerar que o homozigoto nulo fosse inviável.

4.2.6 ME (enzima málica) -

Em todos os tecidos testados ME apresentou atividade somente na região próxima à origem.

Polens de algumas plantas de E.edulis, E.oleracea, assim como de alguns híbridos e plantas de Euterpe spp. foram testados. E.edulis, E.oleracea e os híbridos apresentaram padrão

semelhante, com apenas uma banda. Algumas plantas de Euterpe spp. de origem desconhecida mostraram diversos padrões: bandas de mobilidade diferente, plantas com duas bandas, também de mobilidade diferente e mesmo indivíduos nos quais não se observou nenhuma banda, por razões ainda não determinadas, indicando a ocorrência de variabilidade genética dentro do gênero (foto 21).

Em tecido de folhas verificou-se variabilidade genética em plantas de E.edulis provenientes de um progenitor possivelmente autofecundado, cujo padrão para ME apresentou-se como uma banda espessa (foto 22). As considerações sobre a expressão de ME serão discutidas no Item 4.3 a seguir no qual são analisadas algumas progênies obtidas de autofecundação.

4.2.7 GOT (glutamato oxaloacético transaminase) -

A expressão de GOT observou-se em duas regiões do anodo, sendo semelhante em tecido de raiz, folha e pólen.

Na 1ª região, na porção intermediária do gel, observou-se uma banda única, semelhante para as diversas plantas de E.edulis e alguns híbridos testados. No entanto, em plantas de Euterpe spp. com e sem perfilhamento, oriundas de Barcelos verificou-se a ocorrência de outros padrões para essa região, com uma ou duas bandas (foto 23). Aparentemente estariam presentes nessas populações 2 alelos de 1 locus sendo a enzima monomérica. O heterozigoto no gel seria identificado por padrões consistindo de duas bandas dos respectivos homozigotos. Isso vem de encontro à tradicional situação de GOT, observada em outras espécies vegetais, onde sempre se apresenta como uma enzima dimerica. O único caso de que temos notícia de uma exceção foi constatado por

TORRES e TISSERAT em 1980, com o locus GOT-2 em tâmara, codificando para uma enzima monomérica.

A 2a região, próxima à origem e de resolução menos estável, apresentou um padrão de uma banda avançada ou uma banda retardada ou de três bandas, sendo uma intermediária em tecido de folha e uma ou duas bandas em pólen ocorrendo indistintamente em E.edulis, E.oleracea, híbridos interespecíficos e plantas de Eutierpe spp.. Aparentemente a expressão desta região é controlada por um locus e dois alelos. No heterozigoto ocorreria interação alélica com a formação de um dímero. Da mesma forma que o observado em tâmara, a isoenzima da região próxima à origem é também dimérica. É interessante a coincidência em relação às semelhanças na distribuição dos loci e na estrutura quaternária excepcional de GOT de um deles, justamente em duas palmáceas, porém, quaisquer considerações mais elaboradas a respeito seriam por demais especulativas.

4.2.8 PPQ (polifenol oxidase) -

A expressão de PPQ observou-se com resolução de bandas somente na porção média do gel. Diferentes bandas foram observadas em tecido de folhas de alguns materiais investigados, indicando que provavelmente este sistema apresenta variabilidade genética. A resolução, embora nítida, mostrou-se instável.

4.3 - ANÁLISE DE PROGENIES INDIVIDUAIS

Uma adequada identificação dos loci e alelos para as enzimas envolve, necessariamente, estudos de progênies oriundas de cruzamentos controlados, nas quais pode ser analisada a segregação de todos os genótipos de interesse. Uma vez que, atualmente, não existem tais progênies, esses estudos ficam limitados, sendo aqui discutidos em caráter preliminar. Apesar das dificuldades para a realização dos cruzamentos artificiais, tentativas estão sendo realizadas na Seção de Plantas Tropicais do IAC e espera-se, em futuro próximo, a obtenção de materiais apropriados para os estudos genéticos.

O único material disponível, passível de análise acurada, consistiu de poucas progênies relacionadas a seguir:

- a) Progênies de 3 indivíduos de E.edulis autofecundados naturalmente devido a isolamento geográfico, consistindo de 10, 40 e 90 plantas respectivamente;
- b) 30 plantas da progênie de 1 indivíduo de E.edulis autofecundado artificialmente.

As análises eletroforéticas foram realizadas em folhas de plantas jovens e de plantas adultas. Todas as plantas progenitoras (E.edulis) apresentaram o mesmo padrão para várias isoenzimas. Por isso as progênies são discutidas em conjunto.

APS - Em todos os casos este sistema mostrou o padrão de banda única na região principal (2a) para as plantas progenitoras, e, como era de se esperar, as progênies mostraram padrão idêntico (foto 25). Esta situação está conforme com a hipótese de expressão de um locus homozigoto.

ESI- Diversas bandas foram observadas na região principal (3a), ocorrendo simultaneamente em plantas individuais. Infelizmente, as plantas progenitoras e suas progênes apresentaram o padrão, também não raro, de apenas uma banda, o que impossibilita a análise genética. Tudo parece indicar, entretanto, que as bandas observadas nessa região são resultado da expressão de apenas um locus.

ADH- As 4 plantas progenitoras de *E.edulis* bem como suas progênes apresentaram o padrão de 3 bandas, observado geralmente em *E.edulis*, no qual ou a banda mais avançada ou a mais retardada apresenta-se no gel com uma coloração mais intensa. No presente caso, todas as progenitoras bem como suas progênes apresentaram maior intensidade na banda mais avançada. Em razão de serem encontradas 3 bandas em pólen, que é tecido haploide e essa espécie ser, segundo M.L.A.Bovi, diploide, parece indicar que, salvo modificações improváveis de pós-tradução estão envolvidos dois locos com a formação de um dímero intergênico, tendo um dos locos uma expressão mais intensa que o outro.

EGI - Para todos os casos analisados verificou-se padrões idênticos (uma banda) para as plantas progenitoras e suas respectivas progênes.

GOT - O padrão das plantas progenitoras mostrou-se semelhante para todas elas, com uma banda na 1a região e outra banda retardada na 2a região. Nas plântulas das progênes, observou-se apenas a banda da 1a região, o que está de acordo com a hipótese de que as duas regiões de GOT seriam controladas por loci

distintos. Nesse caso o locus responsável pela 2a região não estaria se expressando nas folhas das plântulas, apenas nas de plantas adultas.

ME - Este sistema apresentou resultados interessantes. Observou-se uma situação clara de segregação simples para um locus e dois alelos. A expressão da isoenzima na planta progenitora foi de uma banda espessa enquanto na sua progênie observaram-se plantas com uma banda avançada, plantas com uma banda retardada e plantas com banda espessa, semelhante à da planta progenitora. Esse padrão de banda espessa é provável que represente o tipo heterozigoto. Observaram-se 11, 10 e 5 plantas respectivamente com banda avançada, espessa e retardada (foto 22). Teoricamente essas classes deveriam ocorrer na proporção mendeliana de 1:2:1, porém é evidente o excesso de plantas na primeira classe. Isso, entretanto, poderia ser devido ao pequeno número de plantas analisadas.

ERX anódica - Como não se observou interação entre as 2 regiões resolvidas, estas foram analisadas separadamente.

Na 1a região, contendo 4 a 5 bandas, como salientado no Item anterior, ocorre um deslocamento concomitante dessas bandas em direção ao frente nas plantas em fase de mudas, sendo entretanto, o número das bandas semelhante às de plantas adultas(foto 26). Em duas das progênies não houve variabilidade sendo o padrão delas correspondente à da planta progenitora (foto 26). Nas outras duas progênies verificou-se segregação, ocorrendo plantas com 4 a 5 bandas retardadas, plantas com 4 à 5 bandas avançadas e também

plantas com maior número de bandas, abrangendo toda a região, incluindo as mais avançadas e as mais retardadas de ambos os tipos (foto 27). Esse último padrão parece ser o do heterozigoto, principalmente considerando-se que as plantas progenitoras dessas progênes de autofecundação também apresentaram esse padrão. Portanto essa região parece ser governada por um locus responsável por bandas múltiplas. Segundo essa hipótese, classificaram-se 32 plantas com o fenótipo de bandas adiantadas, 74 plantas correspondendo ao fenótipo do heterozigoto e 33 plantas com bandas retardadas, o que se adequaria bem à segregação monofatorial de 1:2:1.

Para um dos casos de autofecundação natural, existe uma progênie adulta e uma em fase de muda, ambas provenientes da mesma planta progenitora. Observou-se para essa planta progenitora um padrão de 4 bandas para a 2a região. Na análise das progênes, verificou-se que todas as plantas da progênie adulta apresentaram padrão idêntico ao da planta progenitora (foto 28). Na progênie em fase de muda observou-se a falta da banda mais avançada sendo porém as três bandas restantes semelhantes às da planta progenitora (FOTO 29) o que corrobora a ideia de modificações epigenéticas comuns a esse sistema. Esses resultados indicam que, nessa planta progenitora e na suas progênes a expressão da 2a região de PRX anódica seria o resultado de locus ou loci em condição homozigota.

Nos outros casos de autofecundação natural analisados, observou-se intensa atividade nas plantas progenitoras para a 2a região. Nas suas progênes, em fase de mudas, observaram-se diferentes expressões sem, porém, permitir maiores considerações

devido à complexidade dos padrões observados. Esses casos parecem indicar condição heterozigota na planta progenitora para essa 2a região.

Visando maior entendimento da expressão desta região, cabe discutir mais pormenorizadamente, algumas informações adicionais obtidas da análise dos padrões eletroforéticos da primeira série de híbridos entre *E.edulis* e *E.oleracea*, obtidos por cruzamento natural, em 1973, na Estação Experimental de Ubatuba, SP. Quando foram obtidos existiam nessa estação somente duas plantas de *E.oleracea* porém, nas proximidades, estava presente um grande número de plantas de *E.edulis*.

A análise de PRX anódica revelou que essas duas plantas de *E.oleracea* tem padrões idênticos para a 2a região enquanto as plantas de *E.edulis* apresentaram diversos padrões, distintos daquele encontrado em *E.oleracea* (foto 15).

Analisaram-se dois tipos de híbridos interespecíficos. O primeiro apresenta como progenitor feminino uma planta de *E.edulis*. O outro tipo de híbrido é oriundo de uma das duas plantas de *E.oleracea*. Verificou-se, no primeiro caso, o mesmo padrão para todas as plantas híbridas analisadas (foto 30) enquanto que, no segundo caso, isto é, quando o progenitor feminino foi *E.oleracea*, a progênie híbrida apresentou padrões bastante variáveis para essa 2a região de PRX anódica (foto 31). Esses resultados fazem sentido se considerarmos que, para o primeiro caso, o fato dessas palmeiras serem híbridas e o progenitor feminino uma única planta de *E.edulis*, o progenitor masculino só pôde ter sido uma ou as duas plantas de *E.oleracea* que, por terem padrões iguais, levam a resultados idênticos. Os

que, por terem padrões iguais, levam a resultados idênticos. Os padrões uniformes observados nesses híbridos leva a crer que essas bandas da 2a região em ambos os progenitores devem ser condicionadas por locus ou loci em condição homozigota. Seria, a julgar por essas considerações, mais provável que fosse apenas um locus com vários alelos ocorrendo na população nativa de E.edulis, o que já seria suficiente para explicar a variabilidade encontrada. Caso fosse a região codificada por mais de um locus, por exemplo 2 ou 3, para explicar esses resultados seria necessário postular que justamente aquele progenitor feminino E.edulis, que deu origem à progênie uniforme teria esses 2 ou 3 loci em condição homozigota, fato perfeitamente possível porém bem menos provável. No entanto, a complexidade de padrões observados em algumas progênies de autofecundação já discutidas anteriormente vai de encontro à hipótese de um simples locus.

No caso dos híbridos que tiveram E.oleracea como progenitor feminino, os padrões variáveis encontrados devem-se ao fato de que essas plantas híbridas serem oriundas de diferentes progenitores masculinos de E.edulis, os quais apresentam diversos padrões distintos para esta 2a região.

PRX catódica - Uma vez que todos os casos disponíveis foram plantas de E.edulis, a resolução deste sistema verificou-se na região próxima a origem. As plantas das progênies apresentaram todas o padrão característico de E.edulis, idêntico entre elas e aos das plantas progenitoras.

4.4 - IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS ENTRE E.EDULIS E E.OLERACEA

E.edulis Mart. e E.oleracea Mart., são palmeiras monóicas que apresentam acentuada protandria, o que as torna basicamente de fecundação cruzada. Autofecundações, entretanto, podem ocorrer quando, na mesma planta, há diversas inflorescências em fases complementares. A biologia dessas espécies é tal que permite cruzamentos interespecíficos. No entanto, em condições naturais eles não ocorrem porque essas espécies são alopátricas. Quando plantadas próximas, cruzamentos entre elas podem ocorrer se suas fases de florescimento coincidirem.

Como foi salientado no Item 2.3, os primeiros híbridos interespecíficos, provenientes de cruzamentos naturais, foram observados em 1973 na Estação Experimental do IAC em Ubatuba, SP. Outros híbridos foram identificados mais tarde e, atualmente, essas populações híbridas adultas são mantidas em diversas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo de Campinas.

Procedeu-se à investigação dos padrões eletroforéticos de isoenzimas em populações adultas de híbridos, populações parentais, bem como em mudas provenientes de E.edulis e de E.oleracea plantadas próximas. Relacionam-se a seguir:

<u>E.oleracea</u> (Açaí Casa de Hospedes)	x	<u>E.edulis</u> (Ubatuba)
<u>E.edulis</u> (Ubatuba)	x	<u>E.oleracea</u> (Açaí Casa de Hospedes)
Açaí Cione	x	<u>E.edulis</u> (Pariquera açu)
Açaí Radiocarpa	x	<u>E.edulis</u>

Foi também analisada uma progênie com apenas a primeira

folha desenvolvida, proveniente do cruzamento E.edulis x E.oleracea obtida por polinização controlada.

Dentre todos os sistemas enzimáticos e tecidos investigados, PRX catódica em tecido de folhas apresentou os resultados mais satisfatórios em termos de resolução de bandas, estabilidade e constância dos padrões eletroforéticos em populações adultas e de mudas de E.edulis, E.oleracea e dos híbridos entre elas.

Verificou-se que todas as plantas das diversas populações de E.edulis testadas apresentaram um único padrão eletroforético, idêntico a todas elas. Esse padrão pode ser portanto, considerado como característico da espécie. Situação semelhante foi observada nas populações de E.oleracea porém, com um padrão eletroforético diferente de E.edulis. Assim sendo, quando analisados os padrões para PRX catódica em plantas adultas, caracterizadas morfologicamente como híbridas pela inflorescência ou pelo perfilhamento, verificou-se que todas apresentaram o mesmo padrão, resultante da associação dos padrões individuais das espécies E.edulis e E.oleracea (foto 32). Confirmou-se, portanto, a natureza híbrida dessas plantas através de eletroforese. Inúmeros outros híbridos foram analisados e, invariavelmente, o padrão de PRX catódica sempre se mostrou como composto da associação dos padrões parentais, ou seja, expressão de uma região próxima à origem, característica de E.edulis e de outra distal, típica de E.oleracea (foto 33).

Esses padrões característicos mostraram-se invariáveis nos folíolos de plantas em diferentes estádios de desenvolvimento, como mudas com apenas a primeira folha desenvolvida, plantas jovens e plantas com mais de dez anos de idade. Assim sendo, os

híbridos interespecíficos entre essas duas espécies podem ser precoce e inequivocamente identificados através de tecido de folha.

Verificou-se que a natureza híbrida pode ser também identificada através de ADH em tecidos de palmito, raiz e folha, bem como através de PRX catódica em raiz, porém, com padrão marcador distinto do obtido com tecido de folha (foto 13).

Embora ADH possa ser utilizada como um sistema marcador na identificação dos híbridos, devido a sua resolução instável observada, especialmente, em mudas nas primeiras fases de desenvolvimento, não seria o sistema isoenzimático mais indicado para testes de grande número de plantas.

De interesse agrônomo é o estudo do perfilhamento das populações híbridas devido a que ocorrem plantas híbridas que não perfilham. O ideal seriam populações híbridas nas quais todas as plantas perfilhassem. Procurou-se, através da eletroforese, investigar-se sobre possível associação entre padrões isoenzimáticos e perfilhamento. No entanto, para os sistemas enzimáticos e tecidos vegetais estudados, não foi possível detectar nenhuma correlação.

Em resumo, verificou-se que os padrões de PRX catódica em folha são constantes porém distintos para as espécies *E.edulis*, *E.oleracea* e seus híbridos. Esses padrões são observados facilmente em mudas e plantas adultas. Esse fato permite não somente a identificação inequívoca e precoce de híbridos interespecíficos de grande valor agrônomo, como também estudos básicos de melhoramento para a produção comercial de híbridos, além de oferecer a possibilidade de se conhecer melhor alguns

materiais de interesse agronômico porém de origem desconhecida.

Até recentemente, as plantas híbridas sómente poderiam ser inequivocamente identificadas através de características morfológicas em plantas com mais de quatro anos, quando inicia-se a fase de florescimento. Uma vez que é de grande interesse a produção em larga escala de mudas híbridas, procurou-se através da eletroforese criar subsídios para a identificação morfológica das mudas híbridas como será explicado a seguir.

Caracteristicamente, E.oleracea apresenta a primeira folha completa subdividida em apenas dois folíolos, enquanto que E.edulis possui de seis a oito folíolos. As mudas híbridas, obtidas no IAC em 1973, foram separadas das autofecundadas por M.L.A.Bovi pelo número intermediário (3 à 6) de folíolos da primeira folha (BOVI E CARDOSO, 1976; BOVI, 1986). O vigor inicial e a precocidade dessas plantas, aliados à características observadas posteriormente no florescimento atestaram o correto procedimento. Uma vez que é de grande interesse a produção em larga escala de mudas híbridas, procurou-se, através da eletroforese, criar subsídios para corroborar a identificação morfológica precoce das mudas através do número de folíolos.

A análise das progênes oriundas de E.oleracea como progenitor feminino, obtidas por polinização natural, revelou que todas as plantas adultas, identificadas eletroforéticamente como híbridas, tinham sido classificadas como tal por M.L.A.Bovi por possuir de três a seis folíolos na sua primeira folha. Dessa mesma progênie, aquelas classificadas como autofecundadas por possuir apenas dois folíolos mostraram-se, não somente morfológicamente semelhantes a E.oleracea, como também

apresentaram o padrão típico de PRX catódica para essa espécie. Em mudas de outras progênes, provenientes de cruzamentos similares, os padrões eletroforéticos típicos de híbridos e de E.oleracea puderam ser, também, associados com o número de folíolos. Da mesma forma, invariavelmente, todas as mudas de dois folíolos apresentaram o padrão típico de E.oleracea.

No caso recíproco isto é, quando E.edulis era o progenitor feminino, verificou-se nas progênes um resultado diferente do encontrado para E.oleracea. Todas as plantas, em fase de mudas, foram classificadas como possuindo o mesmo número de folíolos de E.edulis (M.L.A.BOVÍ, com.pess). Atualmente, observar-se nestas progênes adultas algumas plantas com perfilhamento, portanto, híbridas. Tais plantas, como esperado, apresentaram o padrão típico de híbrido para PRX catódica. Entretanto, dentre aquelas sem perfilhamento, algumas mostraram o padrão eletroforético típico de E.edulis e outras o do híbrido. Esses resultados indicam que quando E.edulis é o progenitor feminino o número de folíolos da primeira folha completa não pode ser empregada na identificação dos indivíduos híbridos. Neste caso, a identificação inequívoca precoce fica restrita somente a análise eletroforética.

Como os híbridos tem grande potencial agronômico e o plantio em larga escala irá, no futuro, depender de um sistema eficiente de produção de sementes híbridas por polinização natural, as informações aqui apresentadas adquirem uma grande importância, no futuro, em avaliações da porcentagem de híbridos que se obteria nos diversos sistemas possíveis de número e disposição de progenitores em campos de produção de híbridos.

4.5 - ISOENZIMAS E QUALIDADE DO PALMITO "IN NATURA"

Existem diferenças em qualidade e rendimento industrial dos palmitos, de acordo com a origem das plantas de onde foram extraídos. O rendimento industrial do palmito híbrido é superior ao de E.edulis e ao de E.oleracea, sendo este último o de menor rendimento (FERREIRA et.al.,1982). Da mesma forma ocorrem diferenças de rendimento, entre populações de Eutерpe spp. e E.edulis, como no "tipo Bahia", sem perfilhamento (BOVI,com.pess.). É de interesse portanto, um conhecimento prévio da origem dos materiais recebidos pelas indústrias de processamento, uma vez que após o palmito ser retirado da planta, sua identificação torna-se muito difícil.

Com esse objetivo, foram estudados padrões isoenzimáticos em diversas partes do palmito "in natura", em plantas de E.edulis, Eutерpe spp. sem perfilhamento e híbridos E.edulis X E.oleracea. A porção processável do palmito de plantas híbridas, apresentou o padrão de ADH característico, observado também nos tecidos de raiz e folha, bem distinto de E.edulis e de E.oleracea. Entretanto, a inconstância na resolução deste sistema não permite, até o presente, a sua utilização como um padrão marcador confiável.

PRX catódica que, em tecidos de folha, permite a identificação de plantas híbridas com acurácia, apresentou no palmito, um padrão isoenzimático bastante complexo, com muitas bandas, não sendo possível a caracterização nem de híbridos nem de espécies ou "tipos" com base nesse tecido.

Uma situação diferente foi detectada na análise dos padrões

de tecidos do extremo superior do palmito, região não processada devido a seu alto conteúdo de fibras. Os tecidos analisados revelaram os padrões de APS, EST, ADH e PRX catódica semelhantes aos obtidos em folhas mais desenvolvidas.

Isso possibilita, não apenas a identificação dos palmitos de E.edulis, E.oleracea e seus híbridos através de PRX catódica, bem como a possível identificação de "tipos" de interesse, desde que apresentem um padrão eletroforético único adicional, para, pelo menos, um dos sistemas enzimáticos. É o caso do "tipo Bahia" sem perfilhamento. Nessas palmeiras, apesar do padrão de APS na porção processável do palmito não diferir de E.edulis (foto 6), é porém distinto em tecidos de folhas jovens que acompanham a porção do palmito a ser processado, permitindo facilmente o seu reconhecimento (foto 34).

Torna-se possível, então, para a indústria ou setores do comércio do produto "in natura", a identificação das espécies ou "tipos" dos quais o palmito foi extraído, analisando os padrões eletroforéticos de tecidos da porção não processada.

4.6 - ANÁLISE DE ISOENZIMAS COMO TÉCNICA AUXILIAR NOS ESTUDOS BOTÂNICOS DO GÊNERO EUTERPE

Das 80 espécies originalmente descritas no gênero Euterpe, atualmente são consideradas válidas somente cerca de 49, segundo a classificação de S.F.Glassman (1972). Ainda hoje, considera-se a taxonomia de Euterpe duvidosa e falha. A classificação das espécies brasileiras foi baseada na análise de poucas indivíduos, cujos correspondentes herbários foram perdidos. E, pois, essencial para um programa de melhoramento do palmitero que estudos botânicos detalhados dessas palmeiras sejam efetuados. Felizmente, estes já vem sendo realizados, há algum tempo, pela Seção de Plantas Tropicais-Instituto Agrônomo de Campinas.

Procurou-se, tentativamente, avaliar a possibilidade de utilização da análise de isoenzimas como uma técnica adicional que pudesse auxiliar esses estudos botânicos.

Nesse sentido, analisaram-se os padrões eletroforéticos de diversas plantas de Euterpe spp., com e sem perfilhamento, de taxonomia duvidosa, em comparação com aqueles de exemplares tidos como típicos representantes de E.edulis e de E.oleracea.

Dentre as populações de Euterpe spp. com perfilhamento, o Açaí Branco, assim denominado devido à diferente coloração da polpa do fruto maduro quando comparado com a do açaí comum (E.oleracea), não mostrou diferenças nos padrões de diversas isoenzimas, inclusive quanto ao padrão típico e invariável de PRX anódica, característico de E.oleracea. Situação semelhante foi observada em plantas de Açaí Radiocarpa. Originalmente esse "tipo" foi classificado como uma espécie distinta. Atualmente,

entretanto, Euterpe badiocarpa é considerado, de acordo com GLASSMAN (1972), como pertencente à E.oleracea. A análise dos padrões isoenzimáticos corroboram essa classificação.

Situação diferente, no entanto, foi encontrada no estudo de palmiteiros com perfilhamento provenientes de Mato Grosso (Açaí Mato Grosso), palmiteiros sem perfilhamento provenientes da Bahia ("tipo" Bahia) e a população originária de Barcelos, Estado de Amazonas.

Numa análise comparativa de E.edulis com o "tipo" Bahia, e de E.oleracea com o "tipo" Mato Grosso, observaram-se interessantes resultados. Os padrões para ADH, EST e PRX, encontrados no "tipo" Bahia não diferiram dos padrões observados em E.edulis, porém o padrão de APS em folha do "tipo" Bahia revelou uma banda retardada na região principal e uma banda adicional na região próxima ao fronte, não observadas, até o presente, em nenhuma das plantas de E.edulis testadas. Esse padrão distinto permite, portanto, diferenciar o "tipo" Bahia das populações comuns de E.edulis. Nos estudos botânicos, essas palmeiras merecem, também, destaque especial. Para diversas características taxonômicas apresentam significativas diferenças em relação à E.edulis, principalmente quanto à coloração da bainha e das flores, número de ráquias e florescimento tardio quando comparado com E.edulis (BOVI et.al., 1987).

O "tipo" Açaí Mato Grosso é, também, digno de nota. Os padrões encontrados para APS (foto 5), PRX (foto 35) e ADH (foto 19) são claramente distintos dos observados em E.oleracea. Além disso, observaram-se, em alguns sistemas enzimáticos, padrões típicos de E.edulis, como é o caso de ADH em polem e de ADH e PRX

catódica em tecidos de folha. Por outro lado, algumas plantas de Açaí Mato Grosso mostraram o padrão de banda retardada para APS, encontrado no "tipo" Bahia sem perfilhamento. Esses fatos sugerem uma provável recombinação de hibridação interespecífica.

A análise de isoenzimas está de acordo com as observações botânicas para o Açaí Mato Grosso. Diversas características taxonômicas relacionam esse "tipo" à E.edulis tais como o endosperma homogêneo, seis folíolos na primeira folha, assim como a coloração das anteras e flores femininas (BOVI et.al.,1987).

Palmeiras oriundas da localidade de Barcelos mostraram padrões isoenzimáticos distintos. ADH mostra a expressão de três bandas, porém, ao contrário de E.edulis, a banda mais retardada é a de coloração mais intensa. Para PGI, ME e GOT observaram-se novas bandas, não encontradas em nenhuma das plantas de E.edulis testadas. PRX anódica apresentou variabilidade, como em E.edulis, enquanto PRX catódica pôde ser observada com intensa atividade, abrangendo de forma difusa a região próxima e distal do fronte (foto 35), fenótipo totalmente atípico para E.edulis. Essa população de Barcelos está, atualmente, sendo estudada botanicamente. Resultados preliminares mostram evidentes diferenças nas características das inflorescências quando comparadas com E.edulis (BOVI, com.pess).

Na tentativa de complementar os resultados obtidos das análises eletroforéticas das palmeiras mencionadas como "tipos" Açaí Mato Grosso, Bahia e Barcelos, bem como do Açaí Radiocarpa, efetuou-se um levantamento das palmeiras existentes, atualmente, no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Sabe-se, que alguns dos

materiais utilizados por Barbosa Rodrigues (1891), para a classificação das espécies brasileiras, foram plantados nesse parque.

Dentre as plantas de Euterpe registradas figuram exemplares de quatro espécies, além de algumas plantas de Açaí Radiocarpa. Constatou-se no levantamento feito que, no entanto, existem somente um exemplar de E.oleracea, E.edulis, Açaí Radiocarpa e uma planta cuja placa a identifica como E.catinga, porém não corresponde com as características descritas para esta espécie. Atualmente, há também nesse parque cerca de vinte exemplares de Euterpe com perfilhamento, ainda sem classificação.

Analisaram-se eletroforeticamente todos esses indivíduos para EST, APS, PGI, PRX, ADH, GOT e ME. Os resultados mostraram que os padrões obtidos para todos os sistemas enzimáticos estão dentro dos padrões já observados para as espécies E.edulis e E.oleracea. As plantas com perfilhamento ainda não identificadas, revelaram os padrões típicos de E.oleracea para PRX anódica e catódica, e o exemplar com perfilhamento, identificado como E.catinga mostrou também o padrão de E.oleracea nesses sistemas, indicando que esta planta não deve ser exemplar de E.catinga, espécie conhecida como de tronco único (foto 36).

Para essa espécie analisou-se uma planta do IAC de tronco único, que possivelmente pertence a E.catinga, a qual foi obtida de sementes daquelas E.catinga originais do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Essa planta adulta mostrou em comparação com E.edulis, uma banda de mobilidade diferente para a região principal de APS e um padrão atípico para PRX catódica (foto 37).

5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sem dúvida alguma, a exploração do palmito é de grande importância econômica para o nosso país. Seu potencial agro industrial, entretanto, está longe de ser alcançado devido ao sistema extrativista vigente. Pouco se conhece sobre a maioria dos aspectos biológicos do gênero Euterpe além de sua taxonomia ser imprecisa. Também o ciclo longo, a elevada estatura das plantas e a inexistência de bancos de germoplasmas representativos e bem definidos são restrições que dificultam pesquisas mais detalhadas.

O processo de eletroforese, comumente empregado para análise de variabilidade genética, filogenia, caracterização de híbridos, etc., foi, neste caso, adaptado para o estudo do gênero Euterpe, através de testes experimentais com diferentes pHs do gel, concentrações de amido, soluções extratoras, sistema de preparo de amostras, etc.

No germoplasma disponível de Euterpe estudaram-se os padrões de bandas de 8 sistemas isoenzimáticos, em diferentes tecidos vegetais.

Se bem que não foi possível realizar testes genéticos críticos para se obter conclusões inequívocas normalmente requeridas nessas investigações, isso se deve em grande parte ao longo tempo de geração e a falta de informações básicas acerca do gênero. Mesmo assim, as considerações sobre os resultados observados, quando consideradas à luz das informações conhecidas em outras espécies já bem estudadas permite aventar a possibilidade de que muitas das hipóteses discutidas venham a ser

confirmadas no futuro. De qualquer forma, esse é o passo inicial em trabalhos dessa natureza. E o caso por exemplo das análises genéticas e tentativas de associações das regiões de expressão dos diversos sistemas isoenzimáticos com loci e alelos específicos. Mesmo preliminarmente, é a primeira vez que se tem notícia sobre investigações genéticas a esse nível em Euterpe como por exemplo a possível segregação mendeliana para a 1a região de PRX anódica e ME bem como os indícios sobre variabilidade em genes reguladores para a 2a região de PRX anódica. É interessante também a observação a respeito do caráter excepcional de GOT e a semelhança no palmitreiro e tamareira, duas palmáceas. Da mesma forma, destacam-se as considerações sobre a origem do Açaí Mato Grosso como um provável recombinante de hibridação interespecífica e os padrões isoenzimáticos dos "tipos" Bahia e Barcelos.

Definitivamente confirmou-se a natureza híbrida de diversos indivíduos adultos já estudados e identificou-se inúmeros outros híbridos entre E.edulis e E.oleracea em fase de mudas que serão objeto de investigações agronômicas futuras. A identificação precoce de plantas híbridas através de isoenzimas, se por um lado definiu a credibilidade do critério número de folíolos da primeira folha quando o progenitor feminino é E.oleracea, por outro lado, se constitui na única alternativa de identificação inequívoca de híbridos em fase de mudas quando o progenitor feminino for E.edulis. Esses resultados permitirão no futuro a avaliação prática de métodos de produção de sementes híbridas.

6 - CONCLUSOES

- A) Foi desenvolvida metodologia apropriada de eletroforese horizontal em gel de amido para emprego em análise de isoenzimas em palmitero (Euterpe spp.);
- B) Dentre os diversos tecidos vegetais testados, o de folha foi o que apresentou os melhores resultados para a maioria das isoenzimas estudadas, quando se considera a expressão, resolução e estabilidade das bandas nos géis;
- C) Foi constatada a presença de variabilidade genética entre e dentro de espécies do género Euterpe para diversos sistemas enzimáticos, nos quais sugeriu-se os possíveis loci envolvidos e a estrutura quaternária de algumas isoenzimas;
- D) Híbridos interespecíficos E.edulis X E.oleracea foram precoce e inequivocamente identificados através de padrões isoenzimáticos de PRX catódica;
- E) A análise comparativa de diversos sistemas enzimáticos mostrou-se muito útil como complemento de estudos de botânica e taxonomia do género Euterpe.

7 - RESUMO

Desenvolveu-se um conjunto de metodologias de eletroforese em gel de amido aplicáveis à análise de isoenzimas em palmeiras do gênero Euterpe. Analisaram-se então, diversas introduções de E.edulis, E.oleracea, híbridos entre essas duas espécies e populações de "tipos" de Euterpe spp., com e sem perfilhamento, de taxonomia ainda duvidosa. Esses estudos foram realizados, comparativamente, em tecidos de caule e de palmito e no pólen de plantas adultas, raízes de plântulas e folhas de plantas, em diversas fases de desenvolvimento, para as isoenzimas de PRX, EST, APS, ADH, PGI, ME, GOT e PPO.

Verificou-se a ocorrência de polimorfismos genéticos dentro do gênero para todos os sistemas enzimáticos estudados. Em alguns destes sistemas, embora preliminarmente, identificaram-se possíveis loci, sendo sugerida a estrutura quaternária da isoenzima em questão. Também, através da técnica de eletroforese, foi possível a definição e utilização de marcadores genéticos na identificação de híbridos E.edulis X E.oleracea de grande potencial agronômico, caracterização da origem de palmitos "in natura" bem como o estabelecimento de provável relação de alguns "tipos" de Euterpe spp. com E.edulis, E.oleracea ou ambas.

8 - SUMMARY

Starch gel electrophoresis methodology has been developed for the analysis of isozymes in Euterpe (heart of palm) plants. Several accessions of E.oleracea, E.edulis, F¹ hybrids between them as well as some populations of tillering and non tillering Euterpe of uncertain taxonomic classification were analysed. PRX, EST, APS, ADH, PGI, ME, GOT and PPO isozymes were comparatively studied in stem, heart of palm and pollen of adult plants, as well as in roots and leaves, from seedling to adult stage.

Genetic polymorphism have been detected in the genus for all the isozymes systems studied. In some of them, although on a preliminary basis, possible loci have been determined along with the quaternary structure of the isozyme specified by them. Also, key markers have allowed the identification at any developmental stage of interspecific hybrids of potential agronomic value, helped the characterization of heart of palm received by processing plants as well as the establishment of the putative origin of some taxonomically uncertain Euterpe spp. populations as related to E.oleracea, E.edulis or both.

9 - APENDICE

Protocolo para análise de isoenzimas em folhas de palmito (Euterpe spp.)

A. Gel de amido

amido : 11,6 - 11,9%. A concentração ótima é determinada por tentativa.

solução tampão: 2,5% TRIS (0,0152 M) - 2,5% Citrato (0,036 M).

pH: 8,0 - 8,3

B. Amostras

Quantidade de tecido: aproximadamente 100mg.

Solução extratora: PVP 4-6%

Acido ascórbico 4-6%

Triton X-100 5%

Tampão TRIS pH 7,5

pH solução final: 7,0-7,5 com NaOH 1N

Utiliza-se 0,35ml para 100mg de tecido.

Maceração: até produzir fragmentos entre 2-4mm, com auxílio de 5-8mg de sílica lavada.

C. Eletroforese

Tampão eletrodo: Solução borato 0,3M pH 8,0-8,3
Ajuste de pH com NaOH 4N

Condições elétricas: 25mA sem passar de 150 volts por 25 minutos para inserção do extrato no gel; após a remoção dos papéis de filtro 30 minutos com 25mA sem passar de 150 volts. Novos 30 minutos com 30mA até um limite de 300 volts. Após esse tempo, ajusta-se para 300 volts sem passar de 30mA.

Tempo de corrida: aproximadamente 3 1/2 horas.

D. Isoenzimas

APS, EST, PRX, ADH, PGI, ME, GOT, PPD.

10 - REFERÊNCIAS

- AHMAD K., DIN - "Agronomic performance and genetic variability *Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis* hybrids". In OPB Newsletter 2 (4) 12, 1985.
- ALLARD, R.W.; KÄHLER, A.L. & KLEGG, M.T. - "Isozymes in plant population genetics". In: ISOZYMES, IV. New York, Academic Press, p.213-238, 1975.
- ALVES, M.R.P. & DEMATTE, M.E.S.P.D. - "Palmeiras - características botânicas e evolução." Fundação Cargill, Campinas, SP, Brasil, 1987.
- ARULSEKAR, S.; PARFITT, D.E. & KERSTER, D.E. - "Comparison of isozyme variability in peach and almond cultivars. Journal Heredity, 77 (4) 272-274, 1986.
- _____; _____ - "Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and figs". Hortscience, vol. 21, 4 : 928-934, 1986.
- ASINS, M.J.; BENITO, C. & PEREZ de la VEGA, M. - "A comparative study of the changes of peroxidase patterns during wheat, rye and triticale kernel maturation". Can.J.Bot., 61: 825-829, 1983.
- BAILEY, L.H. - "the genus *Butia*". Gentes Herbarum 4: 49-50, 1936.
- _____. - "The palm herbarium with remarks on certain taxonomic practices". Gentes Herbarum 7 (2): 151-180, 1946.

BALICK, M.J.; ANDERSON, A.B. & SILVA, M.F. DA - "Palm taxonomy in Brazilian Amazonia: the state of systematic collections in regional herbaria". *Brittonia* 34 : 463-477, 1982.

BARBOSA RODRIGUES, J. DE - "Plantas novas cultivadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro". RJ, 1: 10-14, 1891.

- "Les noms des palmiers".
Bruxelles, Martens, 1903.

BARRETO, A. & SIMON, J. - "Utilização de isoenzimas como marcadores genéticos em Saccharum". *Turrialba*, 32 (3): 321-327, 1982.

BASSIRI, A & ROUHANI, I. - "Identification of broad bean cultivars based in isozyme patterns". *Euphytica*, 26 : 279-286, 1977.

BOVI, M.L.A. - (Comunicação pessoal).

- "Hibridação interespecífica no gênero Euterpe".
In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, 6.,
p.47, Campinas, 1986.

& CARDOSO, M. - "Pesquisas com o palmito (E. edulis Mart.)". IAC, (mimeografado), 46p., 1976.

& DIAS, G.S. - "Biologia floral do palmito (Euterpe edulis Mart.)". In : Congresso Nacional de Botânica 37, Ouro Preto, 1986a. Resumos p.35.

& DIAS, G.S. - "Sistema reprodutivo do palmito

- (Euterpe edulis Mart.)" Em: Resumos do XXXVII Congresso Nacional de Botânica, Ouro Preto, p.35, 1986b.
- , & GODOY JUNIOR, G. - "Biologia floral do açaizeiro (Euterpe oleracea Mart.). In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, 6., p.91, 1986.
- ; GODOY JUNIOR, G. & SAES, L.A. - "Pesquisas com os gêneros Euterpe e Bactris no Instituto Agronômico de Campinas", O Agrônomo, 39(2): 129-174, 1987.
- BREWER, G.J. & C.F. SING - "An introduction to isozyme techniques." Acad. Press, N.Y., 186p., 1970.
- BURRET, M. - "Palmae Novae Austroamericanae". Notizblatt, 11:1-19, 1930d.
- BURRET, M. - "Um caso de hibridação entre Arecastrum romanzoffianum e Bulia capitata." Rodriguesia 4: 277, t.1-3, 1940.
- CACEX - Carteira de Comércio Exterior. Exportação Banco do Brasil S/A, Rio de Janeiro, vol. 1, p.234, 1987.
- CALZAVARA, B.B.G. - "As possibilidades do açaizeiro no Estuário Amazônico." Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, No 5, 103p., 1972.
- CORADIN, L. & LLERAS, E. - In: Palmeiras pouco utilizadas da América Tropical." Informe de la reunion de consulta FAO y CATIE, Turrialba, Costa Rica, 168p., 1983.

- CASIRO, D.P. & VALERY, F.P.T. - "Estudos preliminares sobre o valor nutritivo do palmito." Anais Fac. Farm. Odont., São Paulo, 12: 139-142, 1954.
- CRAWFORD, D.J. - "Electrophoretic data and plant speciation". Systematic Botany, 10(4):405-416, 1985.
- CRONQUIST, A. - "An integrated system of classification of flowering plants." New York, Columbia University Press, 1981.
- DENTERGHEM, O. de K. - "Les palmiers." Histoire iconographique. Paris, Rotschild, 1878.
- EVANS, D.A.; FICK, C.E. & R.A. JENSEN - "Disease resistance: Incorporation into sexually incompatible somatic hybrids of the genus *Nicotiana*." Science, 213: 903-907, 1981.
- FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. Proposed Draft Standard for Canned Palmito (at step 2). Rome, 12p., 1978.
(Codex Alimentarius Commission, CX/PFV 78/8)
- FERREIRA, V.L.F.; BOVI, M.L.A.; ANGELUCCI, E.; FIGUEIREDO, I.B. DE; YOKOMIZO, Y & SALES, A.M. - "Estudo dos palmitos das palmeiras e do híbrido de *Euterpe edulis* Mart. (juçara) e *Euterpe oleracea* Mart. (açaí)." Avaliações físicas e químicas. Col. ITAL, Campinas, 12: 243-254, 1981/1982.
- _____; _____; DRAETTA, I.S., PASCHOALINO, J.E. & SHIROSE, I. - "Estudo do palmito do híbrido das palmeiras

- Euterpe edulis* Mart. (juçara) e *Euterpe oleracea* Mart. (açai)" I. Avaliações físicas, organolépticas e bioquímicas. Col. ITAL, Campinas 12: 27-42, 1981/1982.
- GUESQUIERE, M. - "Polymorphisme enzymatique chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). I - Contrôle génétique de neuf systèmes enzymatiques." Oléagineux, vol. 39:12, 561-574, 1984.
- GLASSMAN, S.F. - "A revision of B.E. Dahlgren's index of American Palms. IN Phanerogarum Monographie. Tomus VI. 3301 Lehre. Verlag von J. Cramer, Germany, 1972.
- GORDON, A.H. - "Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels". Amsterdam, North Holland, 213p., 1975.
- HEIDRICH-SOBRINHO, E. - "Isoenzimas como marcadores genéticos na identificação de nove linhagens de milho." Pesquisa Agrop. Bras., Brasília, 17 (2): 281-286, 1982.
- HUNTER, R.L. & MARKERT, C.L. - "Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels." Science, 125 : 1294-1295, 1957.
- JACOBS, M. - "Isozymes and a strategy for their utilization in plant genetics." In : Genetic manipulations with plant material. New York, Plenum Press, p.365-389, 1975.
- JORGENSEN, R.B. - "Relationships in the barley genus (*Hordeum*). An electrophoretic examination of proteins." Contents of Hereditas, 104 : 273-293, 1986.

- KAHLER, A.L.; HALLAVER, A.R. & GARDNER, C.O. - "Allozymes polymorphisms within and among open-pollinated and adapted exotic populations of maize." Theor. and Appl. Genet., 72, 5: 592-602, 1986.
- KAPLAN, N.O. - "Nature of molecular forms of enzymes". Ann. N.Y. Acad. Sci., 151: 382-393, 1968.
- KUMAR, R. & GUPTA, V.P. - "Isozyme studies in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). Theor. Appl. Genet., 70: 107-110, 1985.
- LEMO, M. & CARDOSO, M. - "Instruções sobre o cultivo do palmitreiro." Campinas, IAC - SUDELPA, 18p., 1974.
- LESCHER, H. - "Palmito Cia. Brasileira de Reflorestamento, Santa Catarina, 24p., 1973.
- LLERAS, E.; GIACOMETTI, D.C. & CORADIN, L. - "In: Palmeiras pouco utilizadas da América Tropical". Informe de la reunion de consulta FAO y CATIE, Turrialba, Costa Rica, p.67-101, 1983.
- MACEDO, J.H.P. - "Palmito, uma grande fonte de divisas." Floresta Curitiba, 2 (3): 19-20, 1970.
- MARKERT, C.L. - "Biology of isoenzymes." Bioscience, 25 (6): 365-368, 1975.
- _____ & MOLLER, F. - "Multiple forms of enzymes: tissue ontogenetic and species specific patterns." Proc. Nat. Acad. Sci., 45 : 753-763, 1959.

MARTIUS, C.F.P. VON - "Historia Naturalis Palmarum, Leipzig, 2 :
29-90, t. 28-67, 1824.

MC MILLIN, D.E.; ALLAN, R.E. & ROBERTS, D.E. - "Association of an
isozyme locus and strawbreaker foot rot resistance derived
from Aegilops ventricosa in wheat." Theor. and Appl. Genet.,
72, 6 : 743-748, 1986.

MEDINA FILHO, H.P. - "Eletroforese em gel de amido : Aplicações
em genética e melhoramento de plantas." Circular N^o 121,
IAC, Campinas, 1983.

& CARVALHO, A. - "Novas indicações sobre a
origem do café Fiato. Ciência e Cultura, São Paulo,
33(7): 663, 1981. Suplemento.

& STEVENS, M.A. - "Tomato breeding for nematode
resistance: Survey of resistant varieties for horticultural
characteristics and genotype of Aps-1." Acta Horticulturae,
100 : 383-393m, 1980.

NELSON JR., O.E. & BURR, B. - "Biochemical genetics of higher
plants." Ann. Rev. Plant Physiol., 24: 493-518, 1973.

NIELSEN, G. - "The use of isozymes as probes to identify and label
plant varieties and cultivars. In: Rattazzi, M.C.,
Scandalios, J.G. & Whitt, G.S. (eds.), Isozymes : Current
topics in biological and medical research, 1984.

; OSTERGAARD, H. & JOHANSEN, H. - "Cultivar identification

by means of isoenzymes. II. Genetic variation at four enzyme loci in diploid ryegrass." Z. Pflanzenzuchtg. Bd. 94(1) : 74-86, 1985.

OLIVER, J.L. & MARTINEZ-ZAPATER, J.M. - "A genetic classification of potato cultivars based on allozyme patterns." Theor. and Appl. Genet., 69 : 305-311, 1985.

ORTON, J.J. & BROWERS, M.A. - "Segregation of genetic markers among plants regenerated from cultured anthers of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)." Theor. and Appl. Genet., 69 : 637-643, 1985.

PARFITT, D.E.; ARULSEKAR, S. & RAMMING, D.W. - "Identification of plum x peach hybrids by isoenzyme analysis." Hortscience 20 (2) : 246-248, 1985.

PIERCE, L.C. & BREWBAKER, J.L. - "Applications of isozyme analysis in horticultural science." Hortscience, 8 (1): 17-22, 1973.

RICKEMAN, V.S. & DESBOROUGH, S.L. - "Elucidation of the evolution and taxonomy of cultivated potatoes with electrophoresis. I- Groups Tuberosum, Andigena, Phureja and Stenotum." Theor. and Appl. Genet. 52, 217-220, 1978.

SANTAMOUR JR., F.S. & DEMUTH, P. - "Identification of callery pear cultivars by peroxidase isozyme patterns." J. Hered. 71: 447-449, 1980.

SCANDALIOS, J.G. - "Isozymes in development and differentiation." Ann. Rev. Plant Physiol., 25 : 225-258, 1974.

_____ - "Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants : A review." Biochemical Genetics 3 : 37-79, 1969.

SCHWARTZ,D. - "Genetic studies on mutant enzymes in maize: synthesis of hybrid enzymes by heterozygotes." Proc. Nat. Acad. Sci., 46 : 1210-1215, 1960.

SHAW,G.R. - "Isozymes: classification, frequency, and significance." Int. Rev. Cytol., 25: 297-332, 1969.

_____ & PRASAD,R. - "Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes." Biochemical Genetics, 4: 297-320, 1970.

SIQUEIRA,W.J.; MEDINA FILHO,H.P.; LISBAO,R.S. & FORNASIER,J.B. - "Caracterização isoenzimática e morfológica de clones e introduções de alho." Bragantia, Campinas, 44 (1) : 357-374, 1985.

SMITHIES,O. - "Zone electrophoresis in starch : group variants in the serum proteins of normal human adults." Biochemical Journal, 61 : 629-641, 1955.

TAKHTAJAN,A.L. - "Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta)". The Botanical Review, 46:225-359, 1980.

TANKSLEY,S.D. - "An efficient and economical design for ^{up to} starch gel electrophoresis." Report of the Tomato Genetics

Cooperative, 22 : 37-38, 1979.

_____, & RICK, C.M. - "Isozymic gene linkage map of the tomato. Applications in genetics and breeding." Theor. and Appl. Genet., 57 : 161-170, 1980.

_____; MEDINA FILHO, H.P. & RICK, C.M. - "Use of naturally occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato." Heredity 49 (1) : 11-25, 1982..

TISSELIUS, A. - "A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures." Trans. Faraday Soc. London 33 : 524-531, 1937.

TORRES, A.M.; SOOST, R.K. & DIEDENHOFEN, U. - "Leaf isozymes as genetic markers in Citrus." Amer. J. Bot. 65:869-881, 1978.

_____; DIEDENHOFEN, U.; BERGH, B.O. & KNIGHT, J.R. - "Enzyme polymorphisms as genetic markers in the avocado." Amer. J. Bot. 65 : 134-139, 1978.

_____ & TISSERAT, B. - "Leaf isozymes as genetic markers in date palms." Amer. J. Bot. 67 (2) : 162-167, 1980.

WALLACE, A.R. - "Palms trees of the Amazon and their uses". pp.1-129, dpl.1-48. London, 1853.

WESSELS-BOER, J.G. - "The indigenous palms of Suriname". In: Lanjouw, J. Ed. Flora of Suriname. 172pp., pls.1-18, figs.1-10. Leiden.

FOTO 3:

Expressão de APS em *E.edulis* (1 a 7) e "tipo" Bahia (8 a 14) em tecidos de caule (1, 8), folha (2, 4, 6, 9, 11, 13) e palmito das mesmas plantas (3, 5, 7, 10, 12, 14). Note-se a expressão diferente em palmito e folha.

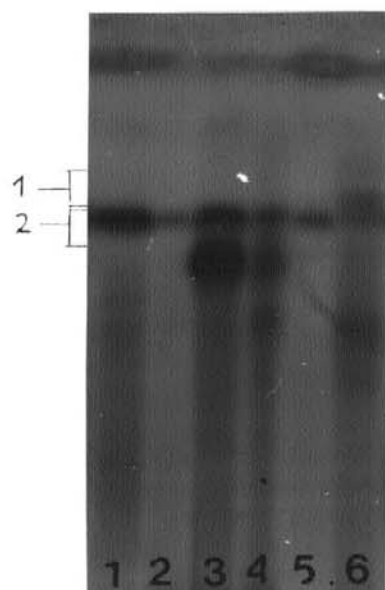
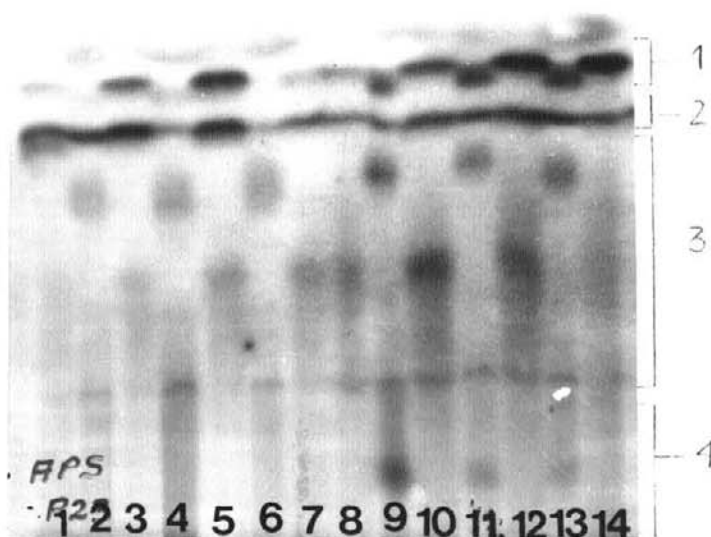
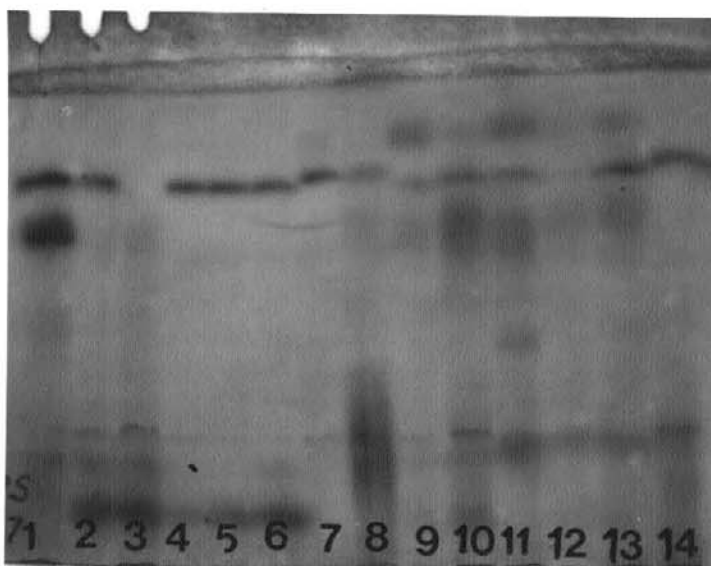


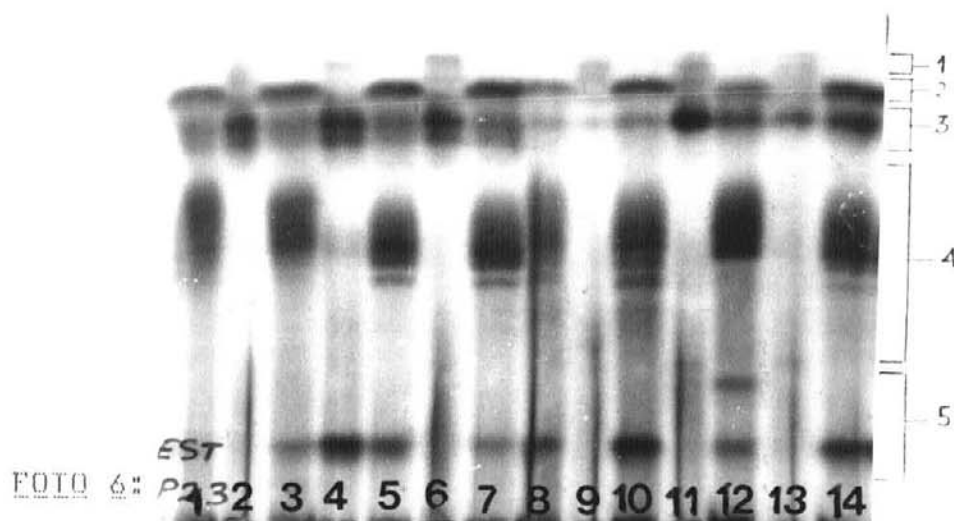
FOTO 4:

APS em tecidos de folha (amostras ímpares) e raiz das respectivas plantas (amostras pares), mostrando a expressão em uma planta híbrida (1,2), *E.oleracea* (3,4) e *E.edulis* (5,6). Nota-se para *E.edulis* uma expressão diferente na região principal.

FOTO 5:

Expressão de APS em folha de *E.oleracea* (1), *E.edulis* (8), no híbrido entre elas (14), em "tipo" Barcelos (7), em Açaí Mato Grosso (2 a 6) e no "tipo" Bahia sem perfilhamento (9 a 12). Destacam-se bandas de mobilidades diferentes para a 2ª região e expressões distintas nos diversos materiais vegetais.





Resolução de EST em *E. edulis* mostrando expressão em caule (1, 8), folha (2, 4, 6, 9, 11, 13) e palmito das respectivas plantas (3, 5, 7, 10, 12, 14). Destaca-se no gel, expressão das 5 regiões de EST, observando-se que a 3a região (principal) se expressa nos diversos tecidos.

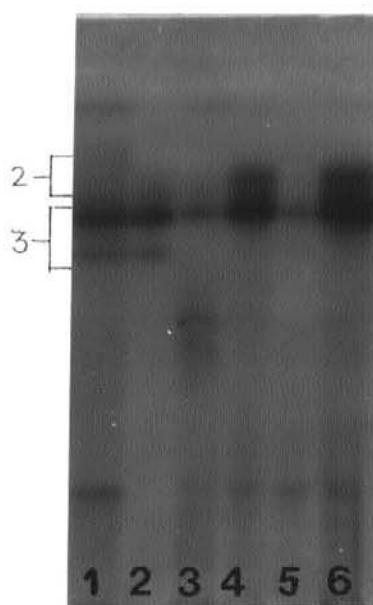


FOTO 7:

Expressão de EST em folha (amostras ímpares) e em raiz das respectivas plantas (amostras pares). Para a 3a região a expressão é semelhante nos dois tecidos porém, quando há expressão de 2 bandas, a intensidade da 2a região é diminuída.

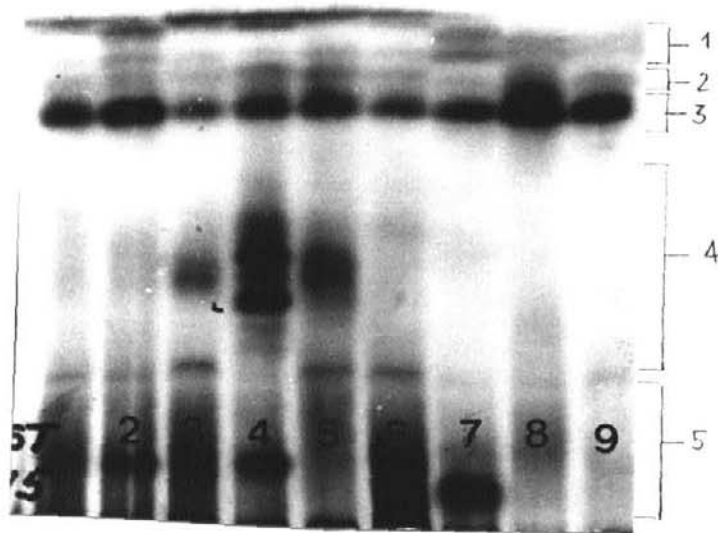


FOTO 8:

Resolução de EST em tecido de folhas de plantas de *E.oleracea* (1 a 6) e de *E.edulis* (7,8,9), notando-se a expressão das 5 regiões resolvidas.

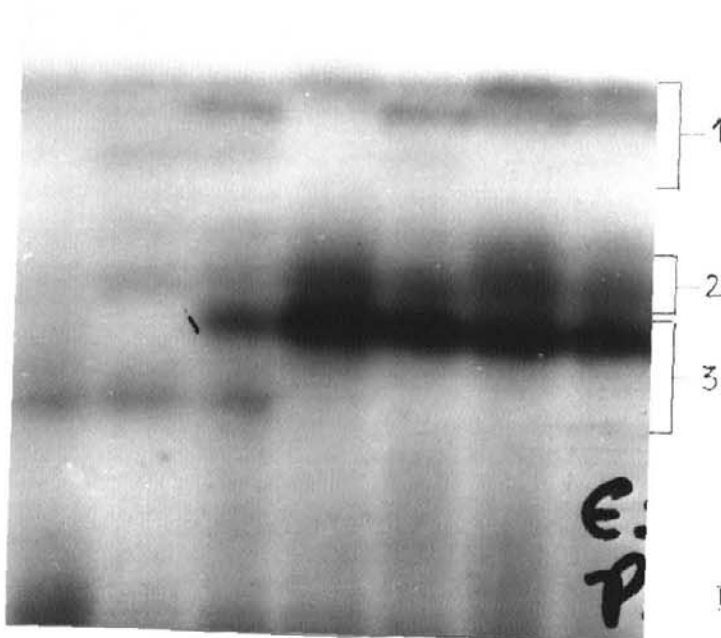


FOTO 9:

EST mostrando diferentes padrões observados para as 1a e 3a regiões de resolução em amostras de *E.oleracea*.

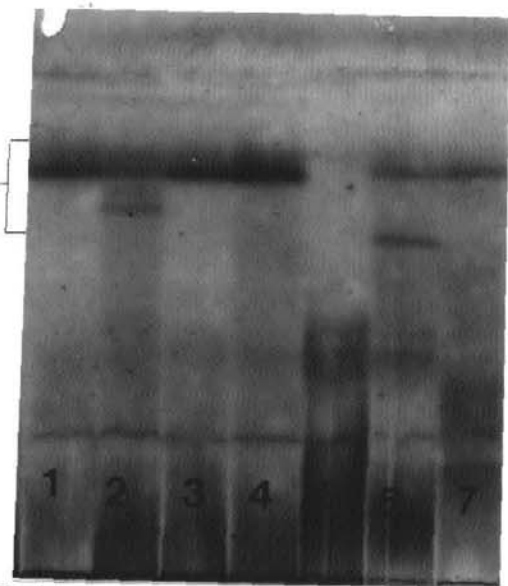


FOTO 10:

EST mostrando variabilidade observada para a região principal resolvida (3a) em amostras de *E.oleracea* (1 a 6) e *E.edulis* (7).



FOTO 11:

Expressão de PRX catódica em tecidos de palmito de plantas de *E.edulis* provenientes de diferentes localidades do país. Observam-se diversos padrões, com grande número de bandas.

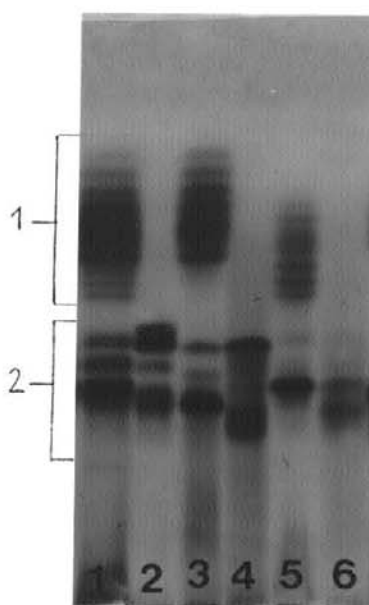


FOTO 12:

PRX anódica em tecidos de folha de uma planta híbrida (1), *E.oleracea* (3) e *E.edulis* (5) e em tecidos de raiz das respectivas plantas (2, 4, 6). Observa-se a expressão diferente na raiz e folha.

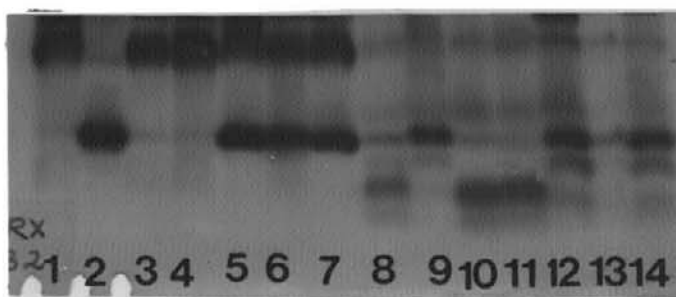


FOTO 13:

PRX catódica em tecidos de folha de mudas (1 a 6) e raiz das respectivas plantas (7 a 14) de *E.edulis* (1, 3, 4, 8, 10, 11), *E.oleracea* (2, 9) e de plantas identificadas como híbridas (5, 6, 7, 12, 13, 14). Observa-se expressão diferente na folha e raiz de plantas individuais. Verifica-se nas plântulas híbridas um padrão composto da associação dos padrões das espécies progenitoras em ambos os tecidos.

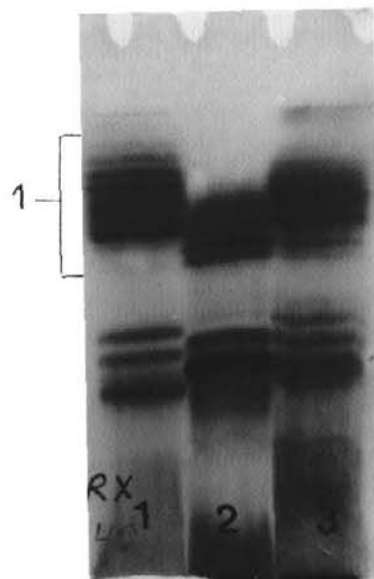


FOTO 14:

Expressão de PRX anódica em *E.oleracea* (1), *E.edulis* (2) e híbrido entre essas duas espécies (3). Destaca-se na la região o padrão do híbrido como composto da associação dos padrões das duas espécies.

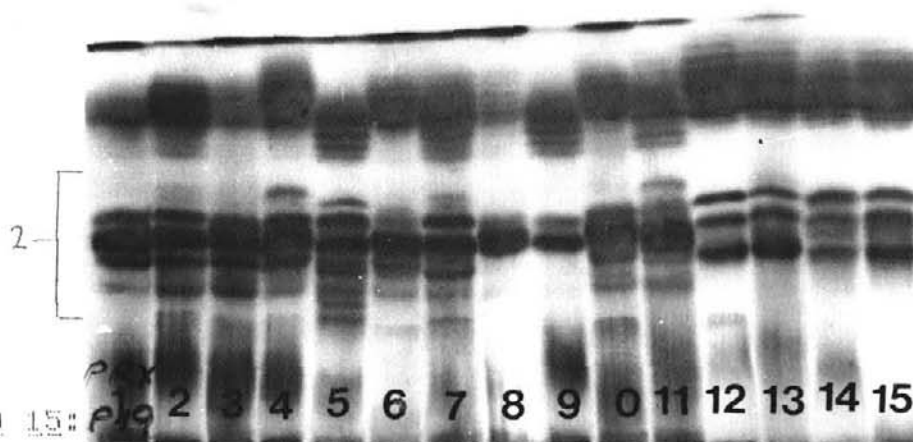
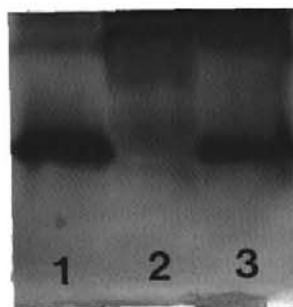


FOTO 15:

PRX anódica em plantas adultas de *E.edulis* (1 a 11) nativas da localidade de Ubaluba, SP e de *E.oleracea* (12 a 15) plantadas nessa mesma localidade. Nota-se para a 2a região os diferentes padrões observados em *E.edulis* e o padrão típico de *E.oleracea*.

FOTO 16:

Expressão de PRX catódica mostrando os padrões invariáveis de folha de *E.oleracea* (1), *E.edulis* (2) e do híbrido interespecífico *E.edulis* x *E.oleracea* (3 e 4).



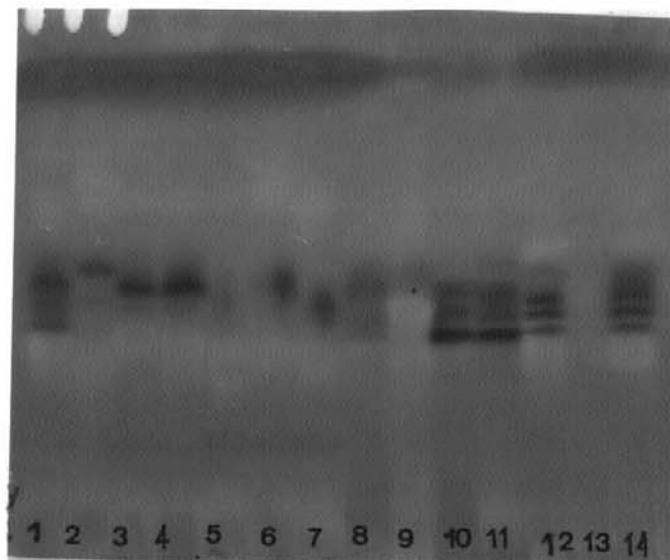


FOTO 17:

Expressão de ADH em folha (1 à 7) e raiz das mesmas plantas (8 à 14) em E.edulis (1,3,4 e 8,10,11 respectivamente), E.oleracea (2 e 9 respectivamente) e mudas híbridas (5,6,7 e 12,13,14 respectivamente). Apesar da instabilidade na resolução pode-se observar a expressão diferente nos tecidos de raiz e folha.

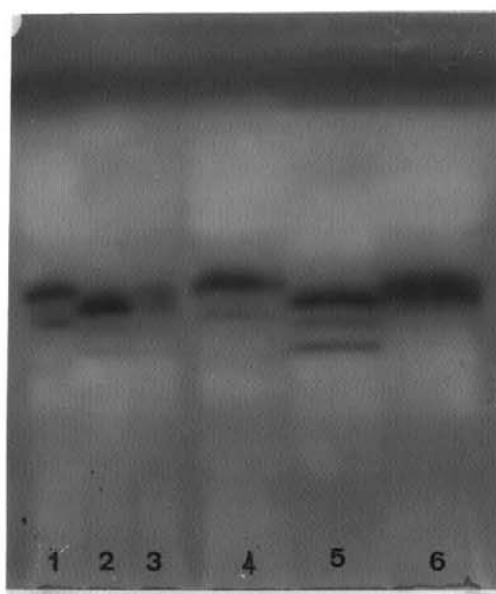


FOTO 18:

ADH em tecido de folha de E.oleracea (1 e 4), E.edulis (2 e 5) e híbridos E.oleracea x E.edulis (3 e 6). Observa-se que nos híbridos a expressão pode resultar na resolução de apenas 1 banda espessa.

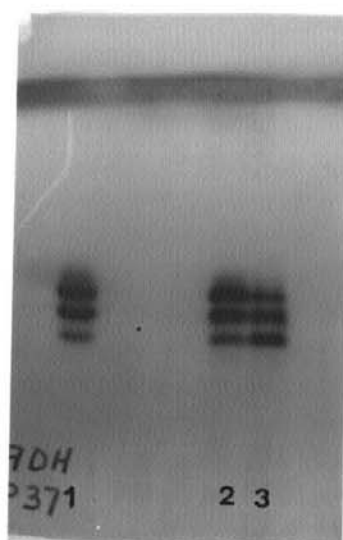


FOTO 19:

Resolução de ADH em pólen de *E. edulis* (1 e 2) e de uma planta do "tipo" Açaí Mato Grosso (3). Note-se a expressão de 3 bandas nesse tecido haploide.

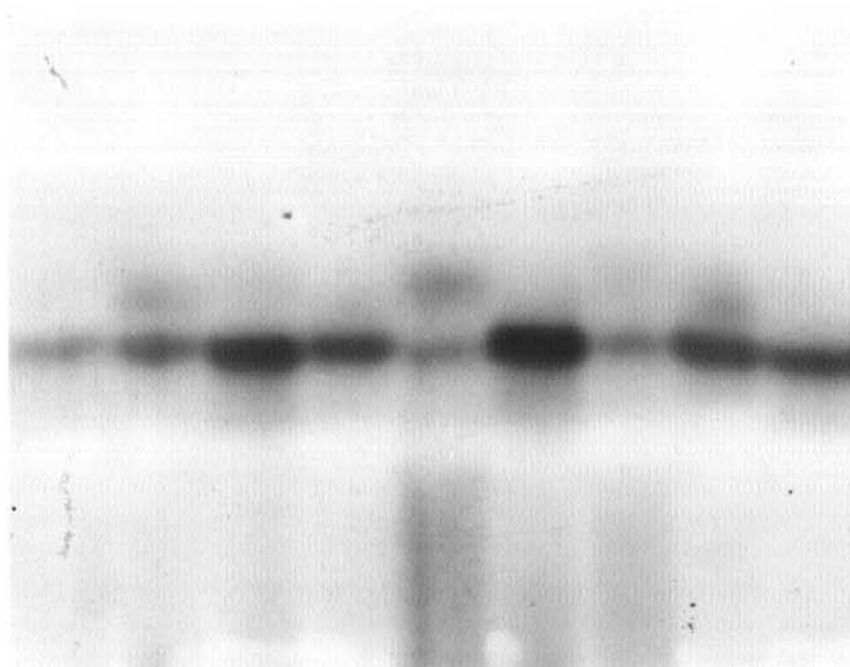


FOTO 20:

Expressão de PGI em plantas de *Euterpe* spp. oriundas da localidade de Barcelos. Observa-se padrões variáveis de uma ou duas bandas, sendo a mais retardada, semelhante à encontrada em *E. edulis*.

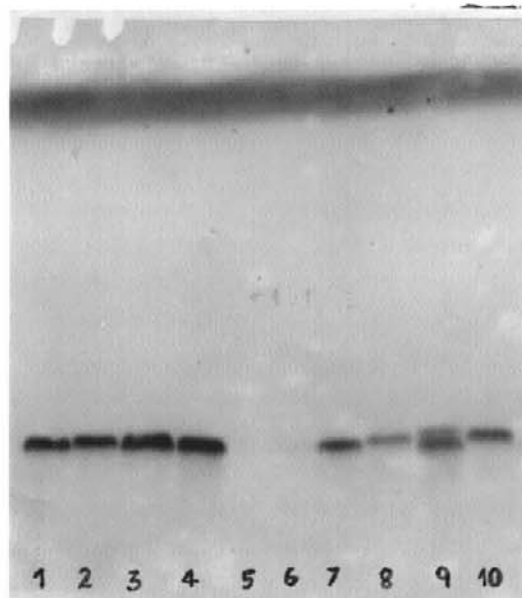
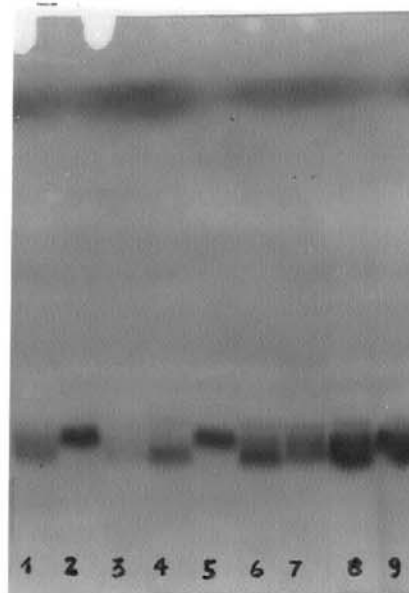


FOTO 21:

Expressão de ME em pólen de *E. edulis* (1,2,3,7,10) e plantas de *Euterpe* spp. (4,5,6,8,9,10). Observam-se bandas de mobilidades diferentes indicando a ocorrência de variabilidade genética dentro do gênero *Euterpe*.

FOTO 22:

ME em progênie de autofecundação de *E. edulis* heterozigoto. Observam-se plantas homozigotas para o alelo avançado (2 e 5), homozigotas para o retardado (4 e 6) e plantas heterozigotas (1,7,8,9).



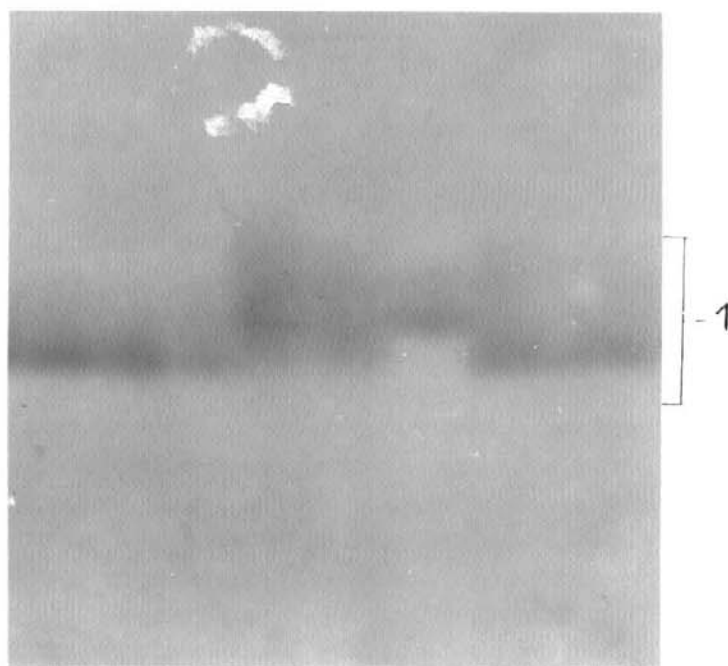


FOTO 23:

Gel mostrando variabilidade genética para a 1a região de resolução em plantas de *Euterpe* spp. oriundas da localidade de Barcelos. Observam-se plantas com uma banda avançada (5), com uma banda retardada (1,2,6) e plantas com uma banda espessa a qual corresponderia ao padrão de plantas heterozigotas (3,4).

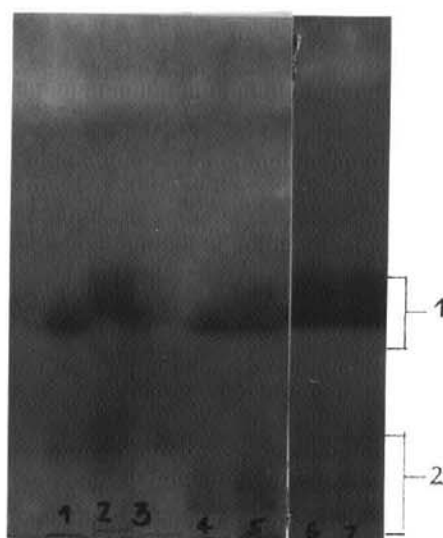


FOTO 24:

Gel em diversas plantas adultas de *Euterpe* mostrando para a 2a região a resolução de uma banda avançada (1,2,3), uma banda retardada (4,5) e a expressão de 3 bandas (6,7). Esses diferentes padrões observaram-se indistintamente nos diversos materiais vegetais.

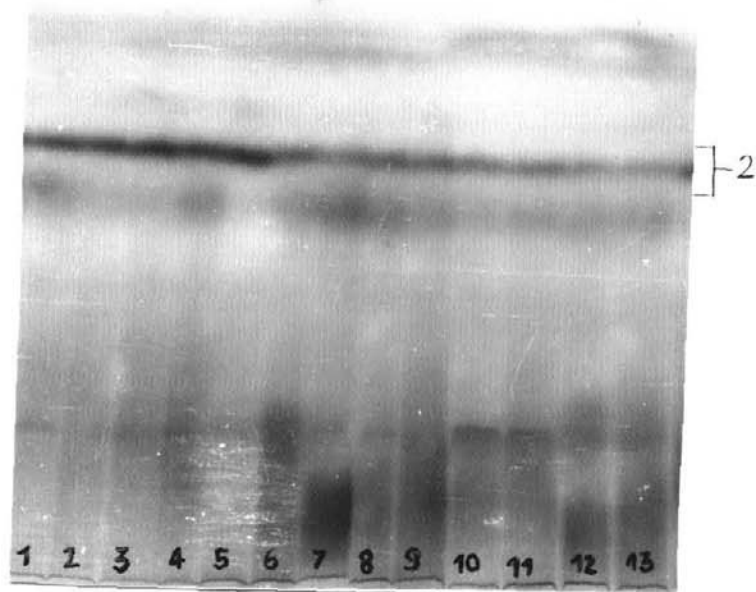


FOTO 25:

Expressão de AFS em uma planta de *E. edulis* (1 e 2) e sua progênie de autofecundação em fase de mudas (3 à 13). Nota-se o padrão igual para a planta progenitora e todas as plantas de sua progênie. Esse caso corresponderia a condição homozigota para a região principal (2a) em todas as plantas.

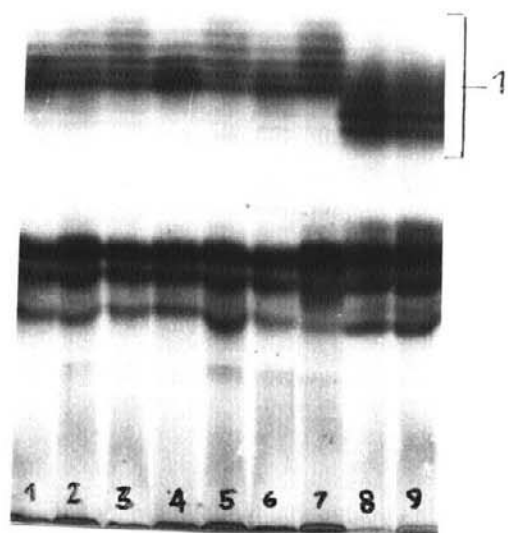


FOTO 26:

Expressão de PRX anódica em uma planta de *E.edulis* (8 e 9) e mudas de sua progênie de autofecundação (1 à 7). Destaca-se na 1a região o deslocamento concomitante em direção ao fronte das bandas nas plantas em fase de mudas e o padrão sem segregação nas mudas correspondente ao padrão da planta progenitora.

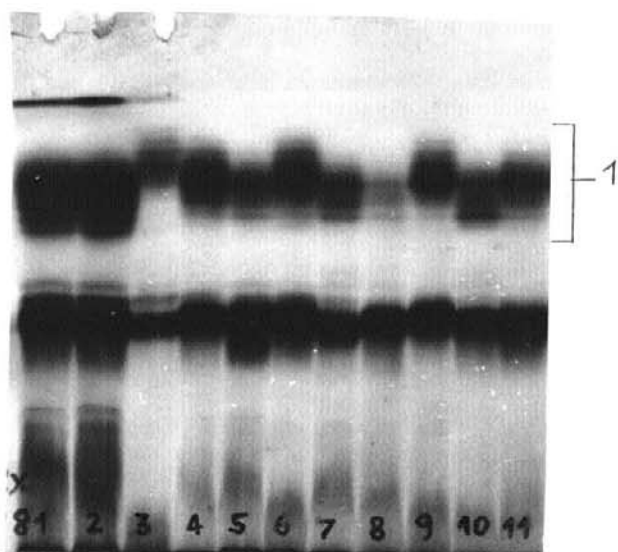


FOTO 27:

PRX anódica em uma planta de *E.edulis* (1 e 2) e sua progênie de autofecundação em fase de mudas. À diferença da foto 26, neste caso observa-se segregação na progênie ocorrendo plantas com fenótipo retardado (5,7,8,10), fenótipo avançado (3,9) e plantas com fenótipo semelhante à planta progenitora (4,6,11).

FOTO 28:

PRX anódica em uma planta de *E. edulis* (1 e 2) e sua progênie de autofecundação em fase adulta (3 à 9). Observa-se nas plantas dessa progênie adulta um padrão idêntico ao da planta progenitora na 2a região de resolução.

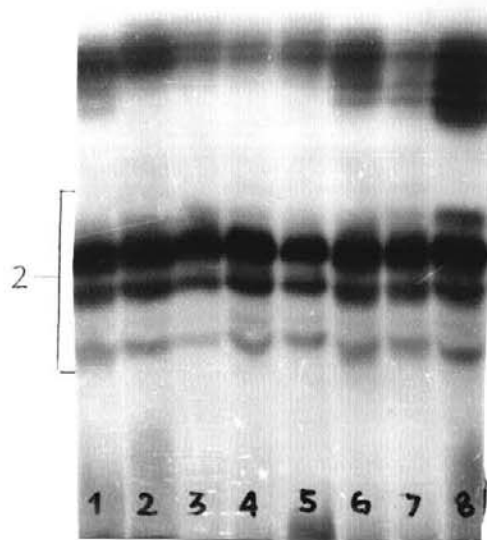
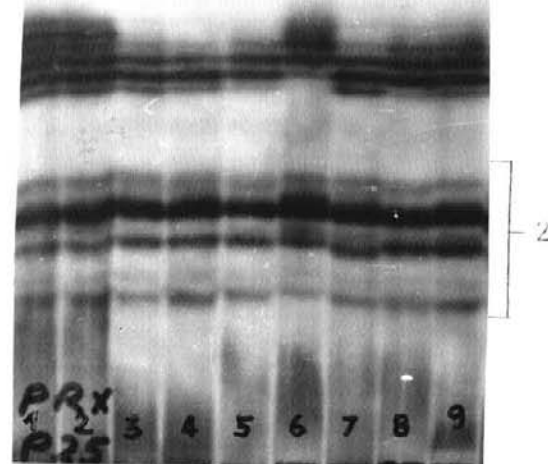


FOTO 29:

PRX anódica mostrando uma progênie em fase de muda (1 à 7) proveniente da mesma planta progenitora da FOTO 28 (8). Nota-se a falta da banda mais avançada da 2a região nas mudas dessa progênie, verificando-se no entanto que as 3 bandas restantes são correspondentes as da planta progenitora.

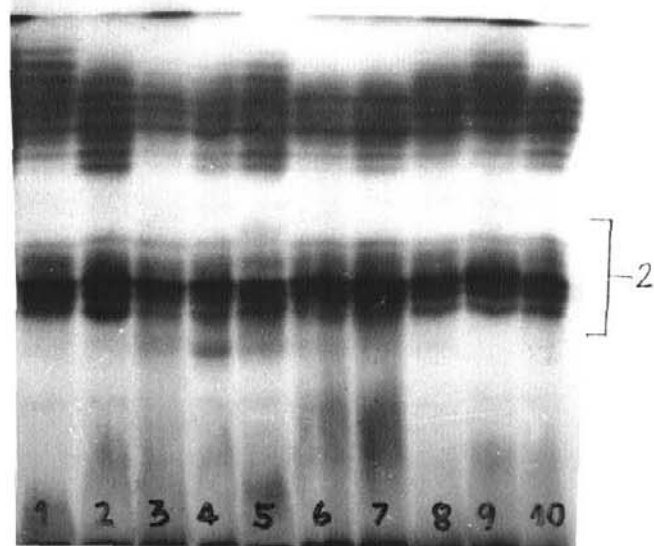


FOTO 30:

PRX anódica mostrando a expressão em híbridos de *E. edulis* x *E. oleracea* cujo progenitor feminino é uma planta de *E. edulis*. Note-se os padrões idênticos na 2a região.

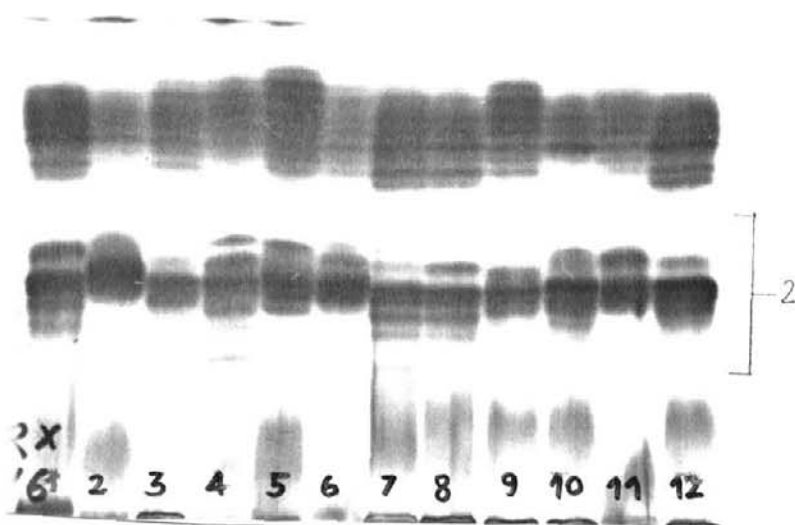


FOTO 31:

PRX anódica mostrando a expressão em híbridos *E. oleracea* x *E. edulis* cujo progenitor feminino é uma planta de *E. oleracea*. Note-se os diferentes padrões observados para a 2a região.

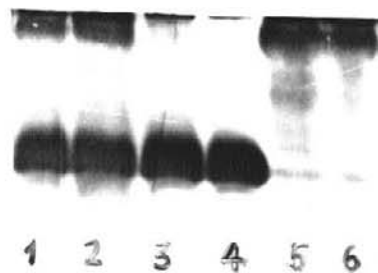


FOTO 32:

PRX catódica mostrando os padrões típicos e invariáveis de híbridos interespecíficos *E. edulis* x *E. oleracea* (1 e 2)- *E. oleracea* (3 e 4) e *E. edulis* (5 e 6).

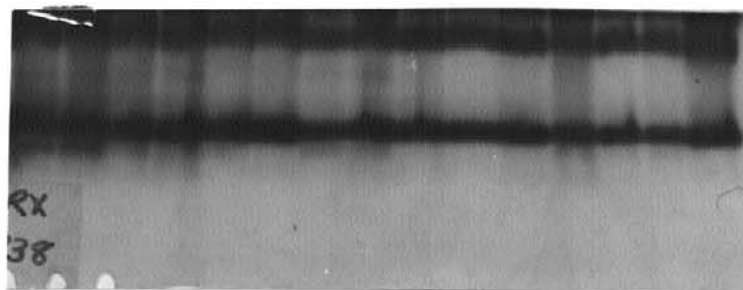


FOTO 33:

Expressão de PRX catódica em uma população adulta caracterizada morfológicamente como híbrida. Note-se que o padrão desses híbridos resulta invariavelmente da associação dos padrões de *E. edulis* (expressão próxima à origem) e de *E. oleracea* (expressão distal da origem).

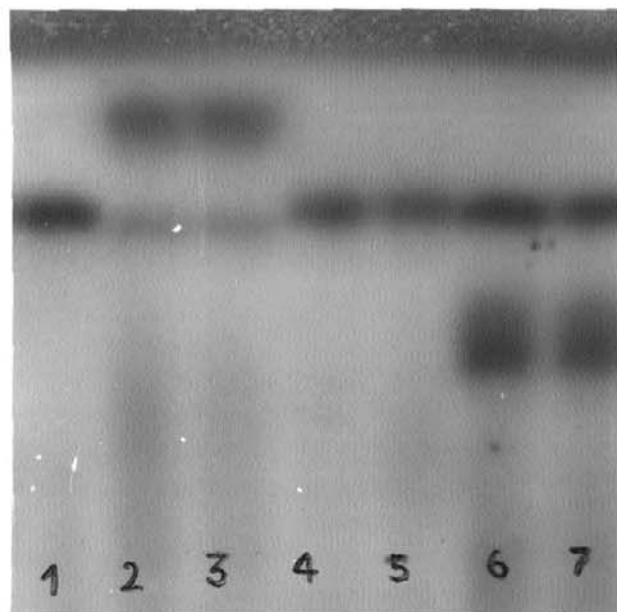
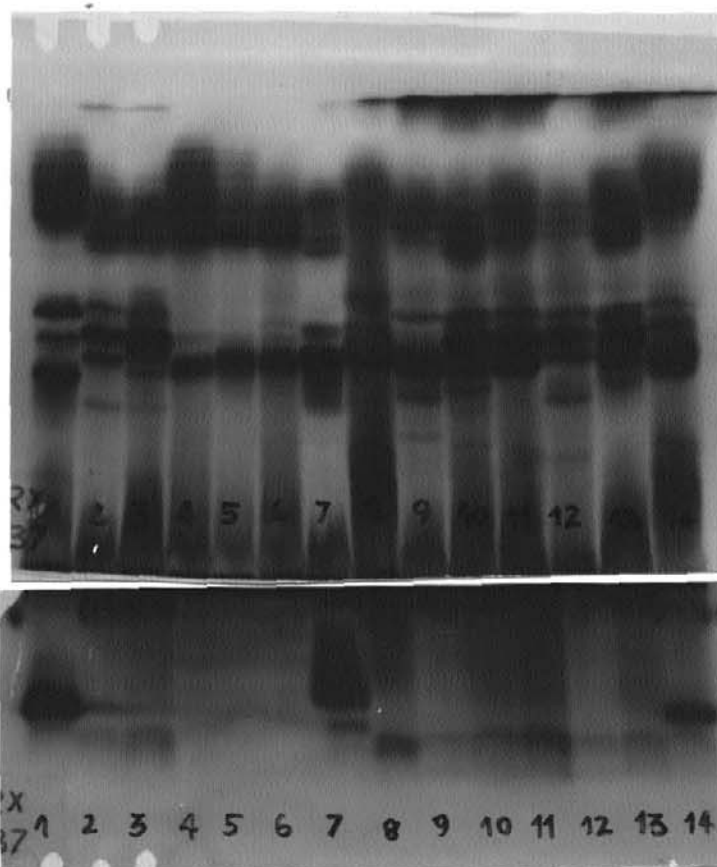


FOTO 34:

Expressão de APS em tecido de
folha de *E.edulis* (1,3,5),
E.oleracea (6,7) e "tipo"
Bahia sem perfilhamento (2,3).
Destaca-se o padrão claramente
distinto nessas plantas do
"tipo" Bahia.

FOTO 35:

Expressão de PRX anódica e
catódica em *E.oleracea* (1),
E.edulis (2), no híbrido entre
elas (14), no "tipo" Barcelos
(7), no Ocaí Mato Grosso (2 à
6) e no "tipo" Bahia sem
perfilhamento (9 à 12). Note-
se os padrões diferentes de
PRX catódica nos diversos
materiais vegetais.



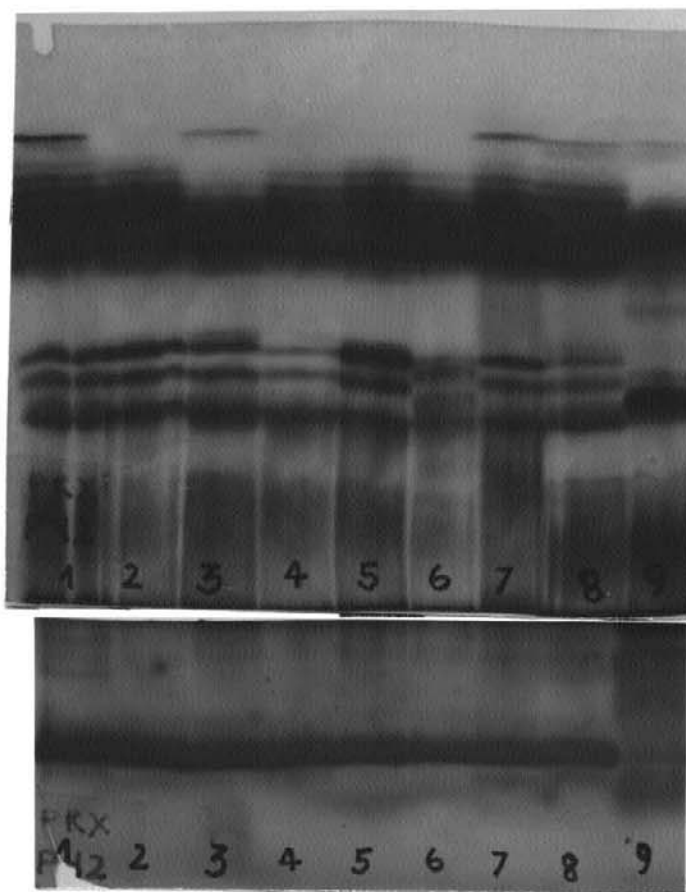


FOTO 36:

Expressão de PRX anódica e catódica em plantas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro mostrando os padrões observados em *E.oleracea*(1), *Euterpe* spp. com perfilhamento (2 à 6), Açaí *Badiocarpa* (7), *E.catinga* (8) e *E.edulis* (9).



FOTO 37:

PRX anódica e catódica em um exemplar de *E.catinga* (1) e em *E.edulis* (2 e 3).

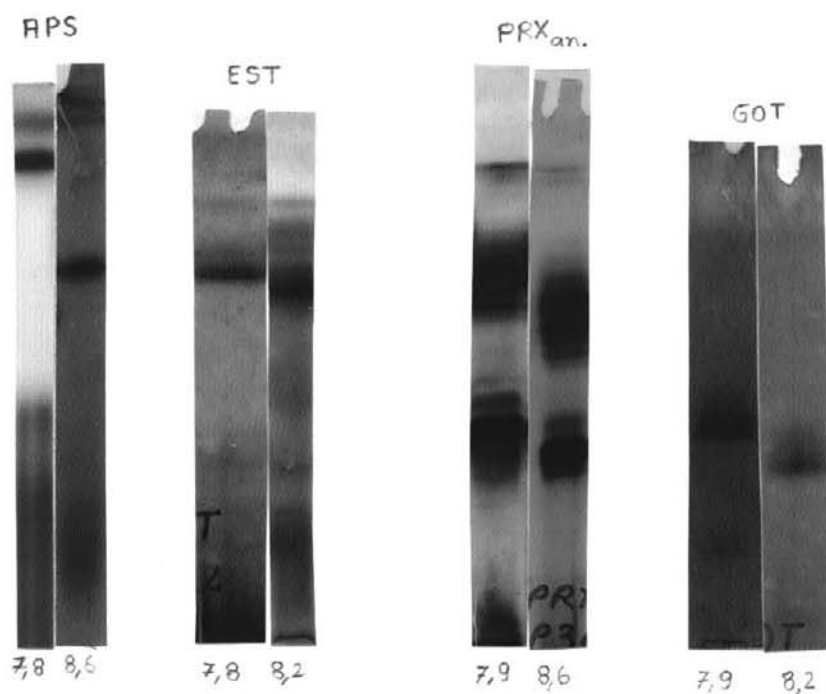


FOTO 1:

Efeitos diferenciais do pH 7,8 à 8,6 em alguns sistemas enzimáticos.

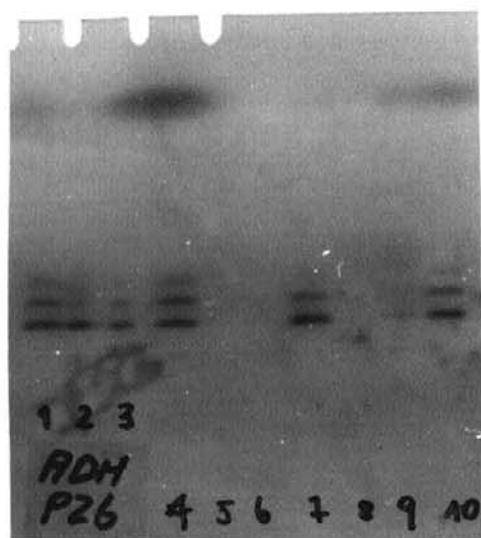


FOTO 2 :

Resolução de ADH em tecido de raízes de plântulas de *E. edulis* mostrando o efeito benéfico da adição de glutathione em diversas combinações de extratores. Amostras com (1, 2, 3, 4, 7, 10) e sem glutathione (5, 6, 8, 9).