

BC/18630

IB/81435



UNICAMP

T/UNICAMP

L990_m

Este exemplar corresponde à reação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
ROSA MARIA LIZANA BALLVE
Berthelmy (ORIENTADOR)
e aprovada pela Comissão Julgadora 3/12/92



**MARCADORES ISOENZÍMICOS E BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE
Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni**

ROSA MARIA LIZANA BALLVE

Orientador: Prof. Dr. Herculano Penna Medina Filho

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências em
Biologia na área de Genética

CAMPINAS
Estado de São Paulo - Brasil

1992

UNIDADE	IB/198
N.º CHAMADA:	L990m
V.	
T.	18630
FR.º	264/93
C	<input type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 100.000,00
DATA	30/04/93
N.º CPD	

CM 000375193

...

" Y el firmamento anuncia la obra de sus manos
en aquel Arquetipo Inmovible de lo escrito
donde el humano espíritu se purga."

(de Urgente Purgatorio, TLALOLINI, Héctor Olea)

A mis padres, Pedro e Rosa,
por todo su amor y apoyo
durante mi vida.

OFREZCO

A Roberto, siempre mi compañero,
con mucho amor,

DEDICO

A G R A D E C I M E N T O S

Esse trabalho só foi possível com a colaboração de muitas pessoas e instituições. Registro aqui todos meus agradecimentos:

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

Aos irmãos Massaki, pelo fornecimento das sementes para formar a população estudada no presente trabalho.

À colega Bernardete Silvarolla, por toda sua ajuda na preparação das lâminas para o estudo citológico.

À Dra. Rita de Cassia do Instituto de Botânica de São Paulo, pelo fornecimento de sementes de plantas mantidas nessa instituição.

Ao Dr. M. L. Roose, pela cessão do programa de computador MX&X2LIN, de grande utilidade no estudo de ligação genética.

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

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

À Comissão de Pós-Graduação do Departamento de Genética da Universidade Estadual de Campinas pelos ensinamentos e pelas facilidades concedidas na elaboração deste trabalho.

À CAPES pelo suporte financeiro concedido para a realização desse trabalho.

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

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	v
SUMMARY	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 TAXONOMIA, BOTÂNICA E CARACTERÍSTICAS DE <i>Stevia rebaudiana</i>	3
2.2 MORFOLOGIA FLORAL E SISTEMA REPRODUTIVO DE <i>Stevia rebaudiana</i> ..	6
2.3 ELETROFORESE E ISOENZIMAS.....	9
2.4 INTERPRETAÇÃO DOS ZIMOGRAMAS E GENÉTICA DAS ISOENZIMAS.....	13
2.5 ISOENZIMAS EM ESTUDOS DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 SÍNTESE.....	20
3.2 EQUIPAMENTO PARA ELETROFORESE.....	21
3.3 METODOLOGIA DA ELETROFORESE.....	23
3.3.1 Preparação do Gel.....	24
3.3.2 Preparação das Amostras Vegetais.....	24
3.3.3 Condições Elétricas.....	25
3.3.4 Sistemas Isoenzímicos e Revelação.....	26

	iv
3.4 ANÁLISE GENÉTICA DE ISOENZIMAS.....	27
3.4.1 Cruzamentos Dirigidos e Condução das Progenies.....	27
3.4.2 Caracterização de Locos e Alelos.....	29
3.4.3 Estudo de Ligação Genética.....	31
3.5 ESTUDO DA BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 METODOLOGIA DA ELETROFORESE EM <i>Stevia rebaudiana</i>	36
4.1.1 pH do Gel de Amido.....	36
4.1.2 Preparação das Amostras.....	38
4.1.3 Condições Elétricas.....	40
4.1.4 Sistemas Isoenzímicos.....	41
4.2 ANÁLISES ISOENZÍMICAS.....	42
4.2.1 Sistemas Isoenzímicos e Caracterização de Locos.....	43
4.2.2 Alelos Nulos.....	52
4.2.3 Ligação Genética.....	57
4.3 BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO.....	61
5. CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
TABELAS	78
FIGURAS	86
APÊNDICES	104

RESUMO**MARCADORES ISOENZÍMICOS E BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE
Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni**

Foi desenvolvida uma metodologia de eletroforese em gel de amido para o estudo de isoenzimas em *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Com isso caracterizaram-se geneticamente os locos Aps, Est-1, Est-2, Got-2, Lap, Pgi, Pgm-1, Pgm-2 e Prx, os primeiros nove genes descritos nesta espécie. Para esses locos foram identificados 38 alelos com distintas migrações além de 4 alelos nulos para os locos Aps, Est-2, Got-2 e Pgm-2.

Os testes de qui-quadrado para ligação entre os nove locos revelaram que, certamente Pgm-1 e Pgm-2 estão ligados, com valores de recombinação estimados entre 6,3% e 22,2% através do método da máxima verossimilhança. Talvez estejam também ligados os pares de locos Aps,Prx e Lap,Prx com valores de recombinação de 33,2% e 38,5%.

Os nove locos isoenzímicos foram usados como marcadores genéticos para estudar a biologia da reprodução da espécie, através da análise de progênies individuais.

Verificou-se que *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni não é uma espécie apomítica obrigatória como consta na literatura. Ao contrário, trata-se de uma espécie sexual reproduzindo-se quase que exclusivamente por fecundação cruzada, podendo portanto, ser considerada uma espécie alógama.

SUMMARY**ISOZYMES MARKERS AND REPRODUCTION BIOLOGY OF
Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni**

In order to perform isozymes studies in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni a starch gel electrophoresis method was developed. Nine loci were genetically characterized, namely: *Aps*, *Est-1*, *Est-2*, *Got-2*, *Lap*, *Pgi*, *Pgm-1*, *Pgm-2* and *Prx*, the first genes described in this species. Thirty eight alleles with distinct migration in addition to four null alleles for *Aps*, *Est-2*, *Got-2* and *Pgm-2* were detected for these loci.

The chi-square test for linkage between the nine loci showed without doubt *Pgm-1* and *Pgm-2* to be linked with recombination values estimated by maximum likelihood varying from 6,3% to 22,2%. The gene pairs *Aps,Prx* and *Lap,Prx* also may be linked with recombination estimates of 33,2% and 38,5% respectively.

All nine isozyme loci were used as genetic markers to study the reproduction biology of the species using single-progeny arrays.

We verified that *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni is not an obligate apomictic species as stated in the literature. On the contrary, it is a sexual species, propagated almost exclusively by outcrossing, and should be considered an allogamous species.

1. INTRODUÇÃO

Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoní, conhecida desde épocas remotas pelos índios guaranis por kaá-hê-ê, que significa erva-doce, é uma espécie herbácea nativa da região da cordilheira do Amambai, nordeste do Paraguai nos limites da fronteira com o Brasil.

O interesse nessa planta, vulgarmente conhecida por estévia, está no fato de ela possuir nas folhas esteviosídeos e rebaudiosídeos, compostos glicosídeos não calóricos com poder adoçante trezentas vezes maior que a sacarose. Por serem estáveis em altas temperaturas e não fermentarem, ocupam lugar de destaque como substitutos de edulcorantes sintéticos como a sacarina, ciclamatos e aspartame, com a vantagem adicional de serem atóxicos. É nessas características de seus edulcorantes que reside o grande potencial na utilização da estévia. No Japão onde seu uso é liberado, existem centenas de produtos industrializados onde o adoçante é o esteviosídeo. No Brasil, sua utilização foi regulamentada em 1986 pela portaria nº 14 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (DINAL). Portanto, a cultura de estévia poderá ter grande importância para o Brasil visto a atual demanda para adoçantes não calóricos.

O potencial agro-industrial dessa planta, entretanto, ainda não foi extensivamente explorado. Uma das razões é a inexistência de variedades melhoradas. Um programa de melhoramento genético é pois imperativo para o estabelecimento extensivo dessa cultura.

Para se estabelecer um programa de melhoramento é necessário conhecer o sistema reprodutivo da espécie pois os métodos e as estratégias de melhoramento empregadas são diferentes caso a espécie seja apomítica ou sexuada, autogâma, alógama ou intermediária. O tipo de reprodução tem ainda influência direta em aspectos fundamentais como a estrutura genética das populações e os métodos de coleta e conservação de germoplasma.

O único trabalho encontrado sobre a biologia da reprodução de *S.rebaudiana*, um estudo histológico da embriogênese realizado por MONTEIRO (1980), conclue taxativamente que se trata de uma espécie apomítica obrigatória, mais especificamente do tipo pseudogâmica. Por outro lado, MEDINA FILHO (informação pessoal) observou grande variabilidade fenotípica em progênies oriundas de polinizações abertas, fato que, contrariamente, sugere a ocorrência de sexualidade na propagação da espécie.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a biologia da reprodução de *S.rebaudiana* através da análise genética de marcadores em progênies individuais, método tradicional que oferece resultados inequívocos. Como *S.rebaudiana* é uma espécie pouco estudada e não se conhecem genes ou mesmo marcadores morfológicos descritos, desenvolveu-se primeiramente uma metodologia de eletroforese de isoenzimas procurando-se a caracterização de locos e alelos isoenzímicos que foram, posteriormente, utilizados como marcadores genéticos para estudar o sistema reprodutivo da espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TAXONOMIA, BOTÂNICA E CARACTERÍSTICAS DE *S. rebaudiana*

Taxonomicamente, a espécie *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni pertence à família Compositae, tribo Eupatorieae e série Multiaristateae. É uma erva ereta, de raiz pivotante perene e parte aérea anual, alcançando até aproximadamente 90 cms de altura. As folhas são pequenas, medindo 3 a 5 cms de comprimento e 1 a 1,5 cms de largura, simples, sésseis e com disposição oposta em vértices alternados. Possui flores com pétalas brancas reunidas em capítulos terminais ou axilares. Os frutos são do tipo aquênios com cinco vértices quase uniformes, delgados e plumosos, de cerca de 2,5mm de comprimento (BERTONI, 1905; MONTEIRO, 1980). Por serem aquênios e por serem empregados diretamente na propagação e multiplicação das plantas, os frutos são comumente referidos como sementes.

S.rebaudiana, conhecida no Brasil como estévia, é nativa do continente sul-americano, entre 22°-25° de latitude sul e 54°-56° de longitude oeste, habitando pastagens arenosas e úmidas nas encostas da serra do Amambáí, região limítrofe entre o Paraguai e o estado de Mato Grosso do Sul no Brasil (ALVAREZ, 1984).

Sua introdução em outras regiões do Brasil (Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo) bem como em outros países (Japão, Coreia, USA) tem mostrado que a espécie não é de difícil adaptação desde que o clima não seja extremamente frio e o solo seja úmido ou se faça irrigação (MANARA et al, 1986; SHOCK, 1982; SAKAGUCHI & KAN, 1982).

As folhas de *S.rebaudiana* apresentam diversos glicosídeos edulcorantes não calóricos. Os principais são o esteviosídeo, cerca de trezentas vezes mais doce que a sacarose e o rebaudiosídeo-A, uma vez e meia mais doce que o esteviosídeo e de paladar mais agradável e sem gosto amargo residual (KANEDA et al, 1977).

As características químicas do esteviosídeo, os efeitos fisiológicos no organismo bem como suas possíveis utilizações industriais em alimentos vem sendo estudadas desde o início deste século em vários países e, mais recentemente no Brasil. ANGELUCCI (1979) e ALVAREZ (1984) em extensas revisões relatam as principais linhas de pesquisas desenvolvidas, principalmente no que se refere à caracterização, purificação e utilização do steviosídeo.

Nas áreas relativas à planta, o número de trabalhos é porém reduzido, no geral versando sobre aspectos agrônômicos de seu cultivo como tratos culturais para o desenvolvimento das plantas (DONALIZIO et al, 1982; MANARA et al, 1986), colheita, secagem e beneficiamento das folhas (SAKAGUCHI & KAN, 1982).

As plantas de estévia apresentam normalmente três tipos de

frutos: aquênios claros que são estéreis e aquênios escuros que podem ser estéreis ou férteis (FELIPPE & LUCAS, 1971; FELIPPE, 1977). MONTEIRO (1980) verificou que os frutos claros não possuem embrião e os escuros que não germinam possuem embrião abortado durante o desenvolvimento.

MANARA et al (1981) realizaram estudos de viabilidade do pólen e de pareamento e segregação dos cromossomos em células mãe de grãos de pólen. Verificaram que o pólen tem uma alta viabilidade e que o comportamento dos cromossomos na microsporogênese é normal. Portanto, a esterilidade das sementes escuras não seria causada por irregularidades meióticas.

Pesquisas visando obter variedades melhoradas de *S.rebaudiana* vem sendo conduzidas, os resultados porém, até o presente, são bastante limitados. No Brasil, MANARA et al (1986) relatam a seleção de alguns tipos diferentes com relação a caracteres morfológicos e rendimento de esteviosídeo, os quais seriam mantidos por multiplicação vegetativa. Uma "variedade", Suweon 11, com alto conteúdo de steviosídeo e rebaudiosídeo-A, é mencionada em um resumo no *Plant Breeding Abstracts* referente ao relatório anual da *OFFICE OF RURAL DEVELOPMENT, SUWEON, S.KOREA* (1981). SAKAGUCHI & KAN (1982) mencionam superficialmente um relatório privado no Japão o qual se referiria a 22 "variedades". Ambos os trabalhos foram inacessíveis, apesar de intensos esforços para consegui-los.

2.2 MORFOLOGIA FLORAL E SISTEMA REPRODUTIVO EM *S.rebaudiana*

Informações detalhadas sobre a morfologia floral são apresentadas por MONTEIRO (1980). A espécie apresenta as características típicas do gênero, estabelecidas por outros autores. A superfície estigmática é seca, sem secreções fluídas e com células receptivas típicas, concentradas em distintas regiões, de acordo com a descrição para Compositae feita por HESLOP-HARRISON & SHIVANNA (1977). Os grãos de pólen são uniformes, esféricos, tricolporados e com a exina ornamentada com espinhos, tipo polínico observado por KING & ROBINSON (1967, 1968) em outras espécies do gênero *Stevia*. Os grãos de pólen trinucleados apresentam dois núcleos espermáticos que se coram fortemente com carmin acético e um núcleo vegetativo de fraca coloração, comum na família Compositae. MONTEIRO (1980) verificou, também, uma abundância de pólen nas anteras e uma alta viabilidade destes nos três lotes de plantas por ele estudados.

Tradicionalmente, as características florais têm sido utilizadas não somente para se inferir o sistema reprodutivo nas angiospermas indicando sexualidade ou asexualidade, como também acerca dos sistemas de incompatibilidade (FRYXELL, 1957).

As características da morfologia floral de *S.rebaudiana* verificadas por MONTEIRO (1980), sugerem ter a espécie autoincompatibilidade do tipo esporofítico visto ser a superfície estigmática seca, os grãos de pólen trinucleados e alto o número de grãos de pólen por antera, características essas de espécies

autoincompatíveis com sistema esporofítico (HESLOP-HARRISON & SHIVANNA, 1977; BREWBAKER, 1967; CRUDEN, 1977 e GIBBS et al, 1975). De fato, BRUCHER (1974) e MONTEIRO (1980) verificaram que a autopolinização em *S.rebaudiana* não resulta na produção de sementes sugerindo os autores a existência de um forte sistema de autoincompatibilidade.

Com relação ao tipo de reprodução, cabe mencionar que GRASSHOFF (1974) classificou várias espécies de *Stevia* da América Central e do Norte utilizando como critério a morfologia dos grãos de pólen. As espécies sexuais apresentariam grãos de pólen normais, uniformes e tricolporados enquanto que as espécies apomíticas obrigatórias teriam grãos de pólen mal formados. Algumas espécies possuiriam os dois tipos de grãos de pólen.

Características citológicas também têm sido utilizadas como critério de identificação. KING et al (1976) correlacionaram a ocorrência de irregularidades meióticas com a apomixia observando que as espécies apomíticas estudadas por GRASSHOFF (1974) apresentaram meiose irregular.

Estes autores estabeleceram, também, uma correlação entre características citológicas, hábito de crescimento e ocorrência de aneuploidia. As espécies arbustivas apresentam $n=12$ cromossomos, as espécies herbáceas com $n=11$ não apresentam aneuploidia e as espécies herbáceas com $n=17$ mostram formação de univalentes e aneuploidia frequente.

Os estudos antes mencionados, sugerem ser *Stevia rebaudiana* uma espécie sexual visto que:

a) é uma espécie herbácea que possui $2n=22$ cromossomos (BRUCHER, 1974; MONTEIRO, 1980);

b) apresenta grãos de pólen normais, uniformes e tricolporados (MONTEIRO, 1980) e

c) não apresenta irregularidades meióticas (MANARA et al, 1986).

Entretanto, o único estudo específico sobre a biologia da reprodução da espécie foi realizado por MONTEIRO (1980) com plantas de três lotes provenientes de duas localidades cujos descendentes são mantidos no Instituto de Botânica de São Paulo. Nessa investigação concluiu-se, através de estudos histológicos da embriogênese *in vivo*, que *S.rebaudiana* (Bert.) Bertoni é uma espécie apomítica obrigatória. A apomixia presente seria do tipo pseudogâmica, na qual não há fusão do gameta masculino com a oosfera, porém, a célula mãe do endosperma é fertilizada por um dos núcleos masculinos. A formação do embrião pseudogâmico teria início em período anterior à polinização com a divisão de uma célula apósspora do nucelo. O saco embrionário original seria então digerido e o embrião apomítico passaria então a ocupar seu lugar e continuaria o desenvolvimento somente se estimulado pela polinização cruzada. Especulou-se que a apomixia em *S.rebaudiana* seria devida a algum fator fisiológico e/ou ecológico visto que as características florais seriam mais indicativas de sexualidade para a espécie.

Por outro lado, MEDINA FILHO (inf. pessoal) verificou grande variabilidade em progênies de estévia quanto a

características agronômicas como época de floração, tamanho, forma e coloração de folhas, flexibilidade dos ramos e altura das plantas. A enorme variabilidade fenotípica observada nessas progênies sugere que, pelo menos em parte, ela poderia ser devida à variabilidade genética. Essa suposta variabilidade genética somente poderia ocorrer se a espécie se reproduzisse sexualmente e não por apomixia.

É amplamente conhecido que para a determinação inequívoca da biologia da reprodução de uma espécie são necessárias análises genéticas em progênies (FRYXELL, 1957). Em *S.rebaudiana*, entretanto, tais estudos são inexistentes. Muito provavelmente, isto se deve à falta de marcadores genéticos o que explica o interesse nos estudos de isoenzimas para essa espécie.

2.3 ELETROFORESE E ISOENZIMAS

Eletroforese é um método bioquímico que promove a migração e permite a separação de partículas iônicas quando submetidas a ação de um campo elétrico. A migração depende de duas forças: uma de condução e outra de resistência. Basicamente, a força de condução é função do número de cargas residuais que a molécula carrega e do potencial do campo elétrico atuante. A força de resistência é consequência do tamanho e forma dos íons e da concentração e viscosidade do meio em que migram as moléculas. A velocidade de movimento é, por isso, diretamente proporcional ao

número de cargas e inversamente proporcional ao tamanho da molécula e à viscosidade do meio de migração. Uma revisão simplificada dos conceitos físico-químicos da eletroforese encontra-se em BREWER et al (1974).

Pelo fato de as proteínas serem compostos polieletrólitos, a carga residual é dependente do meio circundante. Variando-se o pH do meio é possível, sob influência de uma diferença de potencial, induzir uma migração das proteínas, separando-as em função de sua mobilidade a qual por sua vez é determinada pelo tamanho e pela carga elétrica específica de cada proteína.

O primeiro sistema de eletroforese para a migração de proteínas empregava meio líquido (TISSELIUS, 1937). Posteriormente, desenvolveu-se a eletroforese de zona, na qual o meio de migração foi estabilizado através do uso de papel, agar, poliacrilamida ou mesmo amido hidrolizado. Este último, utilizado no presente trabalho, foi introduzido por SMITHIES em 1955. Oferece vantagens em relação aos demais. É atóxico, de fácil preparação e manuseio, e várias isoenzimas podem ser analisadas simultaneamente porque o gel pode ser seccionado em diversas camadas horizontais e cada uma revelada para um sistema isoenzímico. Atualmente, existem diversos equipamentos, todos eles de fácil operação, econômicos e de construção bastante simples (TANKSLEY, 1979; CARDY et al., 1983).

O gel de amido representou uma importante contribuição para o posterior descobrimento das isoenzimas. HUNTER e MARKERT (1957) demonstraram que as enzimas podiam ser visualizadas diretamente

no gel utilizando corantes histoquímicos específicos. Chamaram então de zimograma ao conjunto de bandas reveladas e demonstraram a especificidade do substrato na revelação dessas enzimas. MARKERT e MOLLER (1959), verificaram formas multimoleculares de enzimas com a mesma especificidade do substrato e sugeriram o termo "isoenzima" para caracterizar essas formas distintas.

A importante aplicação das isoenzimas como marcadores genéticos teve como base os trabalhos de HARRIS (1966) em humanos e de HUBBY e LEWONTIN (1968) em *Drosophila*, os quais verificaram que as análises eletroforéticas revelavam polimorfismos genéticos que podiam ser utilizados para caracterizar populações e espécies. Desde então, as pesquisas relativas à técnica de eletroforese, à bioquímica e regulação gênica das isoenzimas aumentaram consideravelmente (SHANNON, 1968; BREWER & SING, 1970; NELSON & BURR, 1973; SCANDALIOS, 1974; MARKERT, 1975; SHIELDS et al, 1983).

A técnica da eletroforese em gel de amido envolve, inicialmente, a maceração da amostra vegetal, inserção no gel e a aplicação de um campo elétrico, que promove a migração das enzimas presentes nas amostras. Terminada a eletroforese, o gel é colorido através de reações específicas para cada sistema enzimático. A reação forma complexos coloridos e insolúveis no gel, visualizados como bandas, exatamente nas posições em que as enzimas se encontravam quando se interrompeu a eletroforese. A resolução nítida dessas bandas é dependente das condições apropriadas da técnica de eletroforese, da metodologia de

extração das enzimas e das soluções de coloração. Diversos protocolos têm sido desenvolvidos e a decisão para utilização de um, outro ou combinação deles, resulta geralmente de testes empíricos para o caso específico em estudo (SHAW & PRASAD, 1970; CARDY et al, 1983; VALLEJOS, 1983; WENDEL & WEEDEN, 1989).

O conjunto de bandas observadas no gel é o zimograma e corresponde ao fenótipo eletroforético. Representa as formas multimoleculares das enzimas, as isoenzimas. As bandas correspondentes aos produtos de alelos codificando para enzimas específicas são denominadas aloenzimas.

A migração diferencial da proteína codificada por um alelo baseia-se, basicamente, na diferente composição ou sequência dos aminoácidos das cadeias polipeptídicas que são os produtos primários especificados por esses alelos e que compõem as proteínas. Mudanças de bases aminadas do DNA do gene estrutural podem resultar na substituição de um aminoácido e conseqüentemente na formação de um polipeptídeo de carga ou configuração diferente. A enzima resultante, também modificada, quando submetida à eletroforese, terá uma migração alterada, refletindo, portanto, indiretamente a variabilidade no DNA correspondente ao gene estrutural. Embora considere-se que a eletroforese não detecte todas as alterações, como por exemplo, as substituições neutras ou aquelas no interior da molécula que não produzem mudanças conformacionais, tem-se verificado que a maioria das alterações é discriminada (RAMSHAW et al, 1979). Em genética de plantas, o interesse das isoenzimas é a exploração

dessa variabilidade.

2.4 INTERPRETAÇÃO DOS ZIMOGRAMAS E GENÉTICA DAS ISOENZIMAS

Várias são as características das isoenzimas que as tornam excelentes marcadores genéticos: exibem, no geral, herança mendeliana simples, codominância, penetrância completa, ausência de pleiotropia e de interações epistáticas e estão disponíveis na população apresentando grande diversidade (WEEDEN & WENDEL, 1989).

Um loco isoenzímico pode ser definido como o gene estrutural codificando para uma enzima que cataliza uma reação bioquímica específica (WEEDEN & WENDEL, 1989). A sua caracterização requer a interpretação dos zimogramas (fenótipos) em termos genéticos (genótipos). Um mesmo zimograma pode revelar diversos locos.

Para um determinado loco, o número de bandas observadas no gel depende de seu estado alélico, homozigótico ou heterozigótico, e da estrutura quaternária da isoenzima codificada. Um loco homozigótico é representado por somente uma banda, de migração específica, correspondente ao único tipo de aloenzima codificada. Os genótipos heterozigóticos são representados por número variável de bandas de acordo com o número de polipeptídeos que formam a enzima ativa (Esquema 1). Assim, para uma enzima monômera são vistas duas bandas,

correspondentes às duas aloenzimas monômeras codificadas (A e B). Para uma enzima dîmera, três bandas, duas correspondentes aos homodîmeros (AA e BB) e uma intermediária, o heterodîmero (AB), composto dos dois polipeptídeos distintos, A e B, especificados por cada alelo parental (a e b). Quando a enzima tem estrutura tetramérica, o heterozigoto apresenta cinco bandas, dois homotetrâmeros (AAAA e BBBB) e três heterotetrâmeros (AAAB, AABB, ABBB) diferentes.

DIAGRAMA 1 - Zimogramas de genótipos homozogóticos, o heterozigótico e segregação F₂ para um loco codificando uma enzima monômera, dîmera e tetramérica.

ENZIMA	GENÓTIPOS			SEGREGAÇÃO F ₂		
	GENITORES aa	bb	HÍBRIDO ab	1 aa	2 ab	1 bb
Monômera	___A		___A	___	___	
		___B	___B		___	___
Dîmera	___AA		___AA	___	___	
			___AB		___	
		___BB	___BB		___	___
Tetramera	___AAAA		___AAAA	___	___	
			___AAAB		___	
			___AABB		___	
			___ABBB		___	
		___BBBB	___BBBB		___	___

A complexidade dos zimogramas aumenta consideravelmente com a expressão de mais de um loco e com as possíveis interações entre eles. Em determinadas situações a interpretação dos fenótipos é facilitada com a análise dos zimogramas de grãos de pólen, haplóides, comparados àqueles dos tecidos somáticos diplóides (WEEDEN & GOTTLIEB, 1979). De qualquer forma é a análise genética dos fenótipos eletroforéticos em progênie específicas que caracteriza locos e alelos.

Certas situações excepcionais podem entretanto complicar a interpretação dos zimogramas (Esquema 2) como:

a) Bandas heterodímeras que não migram exatamente na mediana entre as bandas homodímeras (GOODMAN & STUBER, 1983);

b) Bandas adicionais que resultam do armazenamento, preparação das amostras ou mesmo do processo da eletroforese (STAUB et al, 1985);

c) Bandas múltiplas oriundas de modificações pós-tradução das enzimas, frequentemente chamadas de sombras ou bandas fantasmas. Essas bandas múltiplas, de migração concomitante, podem se comportar geneticamente como alelos simples (RICK & FOBES, 1976; KAHLER, 1983; HARRY, 1986). Não se sabe ao certo se estas aloenzimas com padrão de bandas múltiplas são produzidas por modificações pós-tradução *in vivo* ou por mudanças conformacionais *in vitro*;

d) Presença de "alelos nulos", assim denominados porque ou não são transcritos ou codificam para polipeptídeos defeituosos,

que resultam em ausência de atividade enzimática, alterando assim o número de bandas normalmente observadas nos genótipos heterozigotos (WENDEL & WEEDEN, 1989).

DIAGRAMA 2 - Zimogramas de locos isoenzímicos que apresentam heterodímeros atípicos, bandas múltiplas e alelos nulos.

ENZIMA	GENÓTIPOS			SEGREGAÇÃO F2		
	GENITORES aa	bb	HÍBRIDO ab	1 aa	2 ab	1 bb
Heterodímero atípico	—		— —	—	— —	
		—	—		—	—
Bandas múltiplas (monômero)	— —		— —	— —	— —	
		—	—		—	—
Alelo nulo	—		—	—	—	

A caracterização de locos e alelos permite que se façam estudos para aumentar o conhecimento genético acerca de uma espécie. Por exemplo, é sempre de interesse o estabelecimento de grupos de ligação. Para esses estudos existem delinhamentos

experimentais descritos para marcadores morfológicos (MATHER, 1938), aplicáveis também a locos isoenzímicos. A própria teoria cromossômica da hereditariedade conduz a medir a ligação através da frequência de recombinação entre dois genes. Dois genes não ligados segregam independentemente. Essa independência é testada estatisticamente pelo teste de Qui-quadrado ou estatística G (SOKAL & ROHLF, 1981). Desvios da segregação independente entre os dois genes indicam que eles são ligados.

Para estimar a frequência de recombinação diversos métodos tom sido desenvolvidos. Alguns deles, o de EMERSON ou da Adição e o de FISHER-BALMAKUND ou dos Produtos, descritos em BRIQUET JUNIOR (1961), são bastante simples, porém, resultam em estimativas com erros padrão muito grandes, sendo, portanto, pouco eficientes. Um método reconhecidamente superior é o da Máxima Verossimilhança, desenvolvido por FISHER (1928), amplamente elaborado e extendido por MATHER (1938) e ALLARD (1956). Apesar de precisa, a análise de ligação através desse método é complexa e tediosa, sendo porém em muito facilitada com programas de computador como LINKAGE-1 (SUITER et al, 1983) e X2MXLIN (JARRELL et al, 1992).

Outros métodos para estimar a recombinação baseados em modificações da Máxima Verossimilhança são conhecidos (NORDHEIM et al, 1983), apresentando desempenho um pouco melhor para os casos com reduzido número de plantas e ligações próximas ao valor 0,5. No entanto, é de consenso geral que, para essas ligações fracas, a obtenção de uma estimativa com erro padrão mínimo

somente é obtida com a análise de grande número de plantas, independentemente do método utilizado para estimar o valor de recombinação.

2.5 ISOENZIMAS EM ESTUDOS DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO

Tradicionalmente, os estudos da biologia da reprodução são amparados nos aspectos morfológicos da flor ou derivados da análise genética de marcadores morfológicos. FRYXELL (1957) em extensiva revisão estabeleceu uma classificação das plantas de importância econômica em sete categorias de acordo com o modo predominante de reprodução. Chamou atenção para as dúvidas existentes com esses sistemas e destacou o valor das análises genéticas na determinação dos sistemas reprodutivos.

Com o domínio generalizado das técnicas de eletroforese de isoenzimas, associada às vantagens do seu uso como marcadores, ocorreu um considerável aumento nos estudos de biologia da reprodução das espécies. Com estes trabalhos surgiram também métodos de análise mais refinados. BROWN et al (1989) distinguem e descrevem detalhadamente dois tipos de abordagens para estudos de biologia da reprodução, que diferem na unidade básica de estudo considerada: indivíduos ou populações.

A nível populacional a biologia da reprodução é inferida indiretamente através de estimativas das taxas de cruzamento, autofecundação e apomixia, obtidas a partir das mudanças nas

frequências genotípicas de uma geração à seguinte. A determinação dessas estimativas é assunto básico para o conhecimento da estrutura genética das populações (HAMRICK, 1989).

Existem diversos modelos estatísticos aplicáveis a diferentes tipos de populações segundo sejam naturais ou de plantas cultivadas e, de espécies predominantemente alógamas ou autógamas (BROWN & ALLARD, 1970; SHAW & BROWN, 1982; MARSHALL & BROWN, 1974; RITLAND, 1983 e SCHOEN & CLEGG, 1984). Esses estudos populacionais são, porém, bastante influenciados pelo ambiente e pela ação da seleção. HAMRICK (1989) relata os principais fatores que devem ser considerados em estudos dessa natureza.

A nível individual, os estudos são bastante simples porém precisos. O sistema reprodutivo é caracterizado diretamente em progênies derivadas de indivíduos específicos, através da proporção de descendentes originados por apomixia, autofecundação ou cruzamento. A situação experimental ideal consiste na determinação inequívoca da paternidade de cada indivíduo da progênie. Para isto, é necessário que os genótipos de todas as plantas genitoras que constituem a população em estudo sejam conhecidos e, além disso, que os gametas produzidos por cada planta possuam genótipos específicos atribuíveis a somente uma única planta (ELLSTRAND, 1984). Esta situação requer a ocorrência de amplo polimorfismo enzimático.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SÍNTESE

A *S. rebaudiana* estudada no presente trabalho é oriunda de sementes de uma plantação comercial de propriedade dos irmãos Sakurai e Issau Massaki, localizada na região nativa da espécie, a serra de Amambai no Paraguai. As sementes foram fornecidas por Francisco von Atzingen de Almeida Prado, da firma Stevia do Brasil em Ponta Porã. Essa população comercial, bem variável, foi formada há 20 anos atrás a partir de plantas coletadas na região nativa pelos irmãos Massaki com a ajuda dos índios guaranis. Essa população é a fonte original de sementes para o estabelecimento de todos os campos comerciais atualmente existentes no Brasil e, segundo consta, também no exterior.

As sementes foram germinadas obtendo-se cerca de 20.000 plantas que foram conduzidas na Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas. Dessas 20.000 plantas selecionaram-se, visualmente, 650 indivíduos dos mais diferentes tipos morfológicos para formar a população principal analisada neste estudo.

Dentre as 650 plantas, 100 delas foram utilizadas para desenvolver-se a metodologia de eletroforese e definir os sistemas isoenzímicos a serem estudados. Após isso, determinaram-se os padrões eletroforéticos das 650 plantas da população.

Selecionaram-se posteriormente 14 plantas para cruzamentos dirigidos visando a caracterização de locos e alelos e a realização de testes de ligação genética em suas progênes totalizando 670 descendentes.

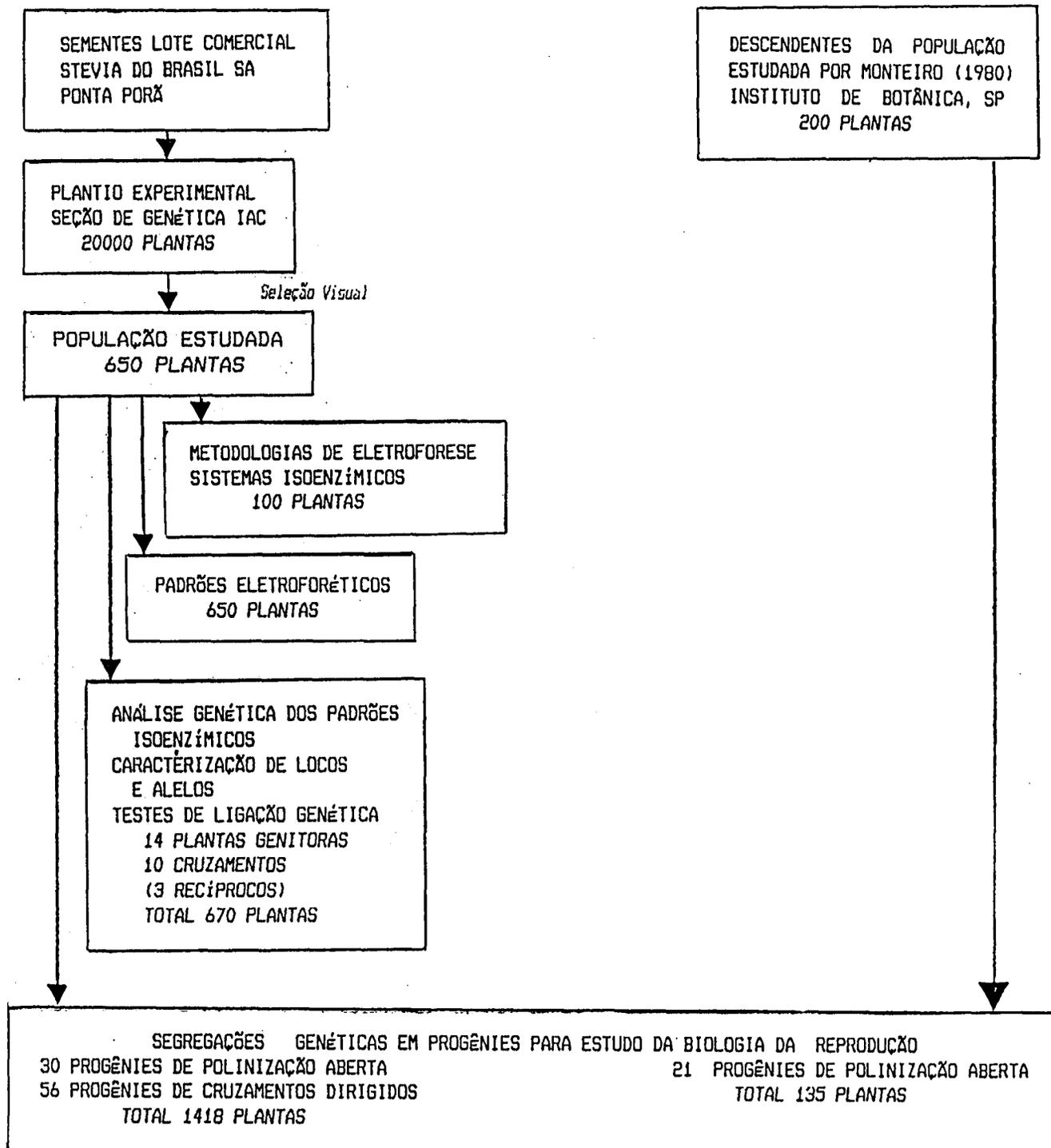
Para o estudo da biologia da reprodução analisaram-se progênes de 86 plantas, 30 oriundas de polinização aberta e 56 de cruzamentos dirigidos, totalizando 1418 plantas.

A biologia da reprodução foi também investigada em uma outra população, descendente de um lote estudado por MONTEIRO (1980). Essa população de cerca de 200 plantas é mantida em canteiros na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo. Dessa população, foram analisadas 21 progênes de polinização aberta totalizando 135 plantas.

Um diagrama sintetizando os estudos realizados é apresentado na página 22 (Diagrama 3).

3.2 EQUIPAMENTO PARA ELETROFORESE

Foram utilizadas fontes de voltagem Heathkit com controle de miliamperagem e voltagem, conectadas a suporte de géis, com bandejas e cubas de eletrodos mantidas à temperatura de 3 ± 1 °C em uma câmara refrigerada com ventilação forçada ascendente. O equipamento utilizado permite a corrida simultânea de 4 géis, com capacidade de até 36 amostras cada.



Uma característica desse equipamento é que cada gel pode ser cortado em até sete camadas horizontais sendo cada uma delas revelada para um sistema isoenzímico diferente.

As especificações técnicas do equipamento empregado para eletroforese encontram-se detalhadas em TANKSLEY (1979).

3.3 METODOLOGIA DA ELETROFORESE

Os procedimentos laboratoriais para a preparação do gel, das amostras vegetais e do processo de eletroforese são os normalmente empregados no laboratório de eletroforese da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas. A descrição detalhada desses procedimentos encontra-se em MEDINA FILHO E BALLVÉ (1989).

A resolução de bandas das isoenzimas é influenciada por fatores como a composição e pH do gel, a natureza, quantidade e condição fisiológica do tecido vegetal, as condições elétricas e as técnicas de coloração entre outros fatores. Problemas decorrentes da interação dessas variáveis não podem ser totalmente eliminados; no entanto, com adequadas padronizações, podem ser controlados e, em grande parte, atenuados. Visando otimizar a resolução e a repetibilidade dos padrões observados, investigaram-se na fase inicial do trabalho, alguns aspectos das variáveis acima para, posteriormente, manter essas condições constantes nas investigações subsequentes.

Os aspectos investigados são relatados a seguir.

3.3.1 Preparação do Gel

Utilizou-se amido hidrolizado de batata (SIGMA) em concentração de 12% e solução tampão contendo 2,5% de TRIS (0,015M) e 2,5% de Acido Cítrico (0,036M). 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.

Para diversos sistemas isoenzímicos, foram testados os seguintes valores de pH do gel: 7,5; 7,8; 7,9; 8,0; 8,1; 8,2; 8,3 e 8,5. Avaliou-se o efeito na resolução, migração e separação de bandas.

3.3.2 Preparação das Amostras Vegetais

Utilizou-se tecido de folhas para a realização das análises isoenzímicas. Alguns aspectos para a preparação das amostras foram investigados:

- a) **estádio de desenvolvimento das plantas:** foram testadas sementes, plântulas com 15 dias, plantas jovens em desenvolvimento vegetativo (um até quatro meses), em

fase de florescimento (cinco meses) e plantas adultas com mais de um ano de idade.

- b) idades das folhas: avaliaram-se desde as folhas meristemáticas (novas) até o 6° par de folhas com cerca de 3 meses de idade (velhas).
- c) solução extratora: tecidos de folhas foram macerados em soluções extratoras contendo diferentes combinações e concentrações individuais (10, 20, 25, 30 e 40 mg/ml) de antioxidantes como ácido ascórbico, glutatona, sacarose, e polinilpirrolidona (PVP).
- d) quantidade de tecido/quantidade de extrator: investigaram-se diferentes proporções da quantidade de tecido e de extrator, padronizando essa proporção segundo a idade do tecido de folha utilizado. Foram testados 0,03 ml; 0,07 ml; 0,10 ml e 0,12 ml de extrator para 15 mg e 30 mg de tecido de folha.

3.3.3 Condições Elétricas

Para os eletrodos utilizou-se solução tampão de ácido bórico 0,3 M, pH 8,3 ajustado com NaOH 4N. Para esse pH, testaram-se 150 V e 25 mA por 20, 25 e 30 minutos para inserção das amostras no gel. Para a corrida, testaram-se voltagens entre 120 V e 300 V, com 25 e 30 mA, procurando-se boa resolução de bandas no menor tempo possível. Considerou-se terminada a

eletroforese quando o fronte migrou aproximadamente 8 cms da origem.

3.3.4 Sistemas Isoenzímicos e Revelação

Inicialmente foram avaliados 15 sistemas quanto a qualidade e estabilidade de resolução de bandas (nomenclatura e números E.C segundo a classificação da International Union of Biochemistry, 1979):

- ADH (EC 1.1.1.1 - alcool desidrogenase)
- APS (EC 3.1.3.2 - fosfatase ácida)
- EST (EC 3.1.1.1 - esterase)
- GDH (EC 1.4.1.2 - glutamato desidrogenase)
- G6PDH (EC 1.1.1.49 - glucose-6-fosfato desidrogenase)
- 6PGDH (EC 1.1.1.44 - 6-fosfogluconato desidrogenase)
- GOT (EC 2.6.1.1 - glutamato oxaloacético transaminase)
- IDH (EC 1.1.1.42 - isocitrato desidrogenase)
- LAP (EC 3.4.11.1 - leucil aminopeptidase)
- MDH (EC 1.1.1.37 - malato desidrogenase)
- ME (EC 1.1.1.40 - enzima málica)
- PGI (EC 5.1.3.9 - fosfoglucoisomerase)
- PGM (EC 2.7.5.1 - fosfoglucomutase)
- PRX (EC 1.11.1.7 - peroxidase)
- SKDH (EC 1.1.1.25 - ácido shikímico desidrogenase)

As soluções de revelação utilizadas estão descritas em SHAW & PRASAD (1970) exceto PRX, especificada em VALLEJOS (1983). Os géis foram fixados em glicerina P.A. diluída 50 % em água destilada.

Posteriormente, aqueles sistemas que mostraram resolução promissora, foram utilizados para verificar a ocorrência de variabilidade na população. Somente aqueles sistemas que apresentaram resolução nítida, estável e padrões variáveis foram então empregados em análises genéticas.

3.4 ANÁLISE GENÉTICA DE ISOENZIMAS

Após padronizada a metodologia de eletroforese e definidos os sistemas, caracterizaram-se 650 plantas quanto aos padrões isoenzímicos. Os diversos padrões foram identificados pela posição das bandas no gel, referidas pelos seus valores de Rf (migração da banda relativa à migração do frente).

3.4.1 Cruzamentos Dirigidos e Condução das Progenies

Selecionaram-se plantas com padrões eletroforéticos específicos e estabeleceram-se pares de plantas para cruzamentos. Antes do florescimento, cada par foi isolado geograficamente, à distância mínima de 6 Kms. A cada par de plantas foi então

permitida livre polinização e visitação por abelhas e outros insetos. Dessa forma, obteve-se naturalmente, cruzamentos entre as duas plantas de cada par sem ter que recorrer a cruzamentos artificiais, trabalhosos, demorados e pouco eficientes em estévia visto o tamanho reduzido e delicadeza das flores, o baixo número de sementes por flor e o hábito de florescimento sequencial.

A colheita foi realizada periodicamente à medida que as sementes amadureciam separando-se os frutos escuros os quais foram colocados para germinar.

A germinação foi realizada em copos plásticos contendo uma mistura de terra e composto orgânico recoberta por uma fina camada de areia. As sementes foram colocadas sobre a areia e em seguida cobertas com papel de filtro umedecido. Os copos foram então protegidos com tampas plásticas translúcidas para manter a umidade e permitir a passagem de luz. A germinação iniciou-se normalmente no quarto dia e a partir do décimo dia as plantas já apresentavam as primeiras folhas, ocasião na qual foram removidas as tampas e papéis de filtro. As plântulas foram mantidas nessas condições até apresentar o segundo par de folhas (cerca de trinta dias), quando procedeu-se ao transplante para bandejas tipo "speedling". As análises isoenzimicas foram iniciadas quando as plântulas alcançaram o desenvolvimento do quarto par de folhas, por volta de sessenta dias.

3.4.2 Caracterização de Locos e Alelos

A interpretação das bandas nos géis e a determinação de sua correspondência com locos e alelos foi realizada através da análise genética de 10 progênies referentes a 7 cruzamentos diferentes e 3 recíprocos, totalizando 670 plantas.

A análise de segregação dos diversos locos foi efetuada através do teste de Qui-quadrado (χ^2), com significância para o nível de 5% de probabilidade. Aplicou-se o teste de Qui-quadrado para heterogeneidade entre progênies segregando para os mesmos alelos. Para os casos com menos que 5 plantas em classes individuais ou ainda naqueles casos com apenas um grau de liberdade, aplicou-se a correção de YATES para continuidade quando os valores de Qui-quadrado eram próximos ao nível crítico.

Os locos, assim geneticamente caracterizados, foram denominados com a abreviatura do sistema isoenzímico em questão, seguida por um número para aqueles sistemas em que mais de um loco foi definido, começando com 1 para o loco cujas bandas mostraram migração mais anódica. Os alelos foram denominados com letras, começando com A para o alelo correspondente à banda de maior migração no gel, ou seja, mais próxima ao frente.

Em algumas progênies, observaram-se para alguns locos, plantas com padrões eletroforéticos não esperados. Por exemplo, do cruzamento entre duas plantas, cada uma com padrão de uma banda, porém com migrações distintas, seria esperado que todas as

plantas da progênie híbrida apresentassem padrão de, pelo menos, duas bandas, uma correspondente àquela do genitor feminino e a outra do genitor masculino. Entretanto, entre essas esperadas, verificaram-se também plantas em que a banda de origem materna estava ausente, apresentando portanto somente a banda de origem paterna. De forma equivalente, o inverso também se verificou. Como a contaminação por pólen estranho ou mistura de sementes foram hipóteses eliminadas previamente, visto ser o fenômeno repetível várias vezes e com vários locos diferentes, sob condições especial e cuidadosamente controladas, duas hipóteses foram aventadas para explicar este fenômeno:

- a) Ocorrência de aneuploidia. Plantas genitoras seriam aneuploides monossômicas ($2n-1$) e tais aneuploidias seriam transmissíveis às progênies.
- b) Existiriam alelos nulos os quais não teriam atividade eletroforética. Plantas genitoras e as plantas das progênies de fenótipo não esperado seriam, para o loco em questão, heterozigóticas para um alelo nulo.

As hipóteses foram baseadas no raciocínio de que, no gel, uma planta normal ($2n$) homozigótica é indistinguível de uma $2n-1$ para o cromossomo onde estivesse localizado o loco em questão. Da mesma forma, uma planta homozigótica é também indistinguível de uma planta heterozigótica para um alelo nulo. Tanto a planta monossômica quanto a heterozigótica nula, apresentariam no gel

apenas uma banda de migração normal e que poderiam ser erroneamente genotipadas como normais, homozigóticas.

Para o estudo dessas hipóteses, analisou-se a segregação dos fenótipos nas progênies e realizaram-se contagens de cromossomos nas plantas genitoras e em algumas plantas das progênies dos 10 cruzamentos realizados onde ocorria o fenômeno acima. Um total de 25 plantas foram analisadas, sendo que 5 delas, geneticamente normais, foram os controles. A metodologia para preparação das lâminas foi desenvolvida juntamente com M.B.SILVAROLLA, pesquisadora da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas. Foram utilizadas pontas de raízes coletadas de plantas mantidas em vasos e de estacas enraizadas em solo arenoso. Estudou-se a necessidade de pré-tratamento com agentes inibidores do fuso mitótico como paradiclorobenzeno, 8-hidroxiquinolina e 1-bromonaftaleno. A coloração foi realizada pelo método de FEULGEN.

3.4.3 Estudo de Ligação Genética

Após a realização dos cruzamentos dirigidos, da caracterização de locos e alelos e determinação dos genótipos das plantas genitoras, escolheram-se progênies específicas para se estudar a possível ligação genética entre os diversos locos. Para tanto, foram escolhidas progênies derivadas de genitores nos quais, em pelo menos um deles, os dois locos a serem testados

para ligação se apresentavam em estado heterozigótico.

Para o estudo de ligação fez-se uso de um programa de computador em linguagem BASIC, X2&MXLIN (JARRELL et al (1992). Esse programa foi desenvolvido e cedido gentilmente por M.L.ROOSE (Departament of Botany and Plant Sciences, California University, Riverside, USA).

Esse programa, baseado nos genótipos das plantas parentais, nos genótipos das plantas da progênie e no número de locos em análise, calcula primeiramente, os valores de Qui-quadrado (χ^2) total para segregação conjunta de todos os pares de locos. Indica então, com uma probabilidade de 10% e 5%, aqueles pares que não segregam independentemente. Para esses pares de locos, possivelmente ligados, o programa então calcula a estimativa do valor de recombinação (R) e seu desvio padrão (EP) pelo método da Máxima Verossimilhança seguindo as fórmulas descritas por ALLARD (1956). Esse método consiste, basicamente, no cálculo do valor de recombinação mais provável para explicar as frequências obtidas nas diversas classes de segregação conjunta. O procedimento matemático desse método consiste na maximização do logaritmo da expressão da verossimilhança conduzindo a uma estimativa do valor de recombinação com a mínima variância possível.

No presente estudo de ligação, realizou-se a decomposição do χ^2 total da segregação conjunta, retirando-se as contribuições dos χ^2 das segregações individuais de cada loco para obter um valor de χ^2 referente ao desvio devido à ligação. Somente para os pares de locos que apresentaram χ^2 de ligação significativo foram

calculadas as estimativas do valor de recombinação.

3.5 ESTUDO DA BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO

Para o estudo da biologia da reprodução foram feitas análises isoenzímicas de 1553 plantas oriundas de 107 progênies de plantas individuais. Essas 107 progênies referem-se a três tipos de progênies:

A) Progênies derivadas de plantas previamente caracterizadas isoenzimicamente para quatro locos, pelo menos, e mantidas em polinização livre na Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas. Foram caracterizadas 30 progênies contendo 3 a 20 plantas cada uma totalizando 376 plantas. Foi determinado o genótipo para os vários locos a fim de se determinar se essas progênies eram oriundas por apomixia ou de embriões zigóticos:

Apomixia

Se oriundas de apomixia obrigatória, como referido na literatura, a progênie não apresentaria variabilidade genética e todas as plantas da progênie teriam o mesmo genótipo materno, para todos os locos.

Embriões zigóticos

Se no entanto fossem originadas de embriões zigóticos,

seriam observados diversos genótipos na progênie. Para cada loco estudado, esses genótipos seriam compostos de um alelo da planta materna associado a qualquer outro alelo ocorrendo na população ou na própria mãe.

B) Progênies provenientes de cruzamentos dirigidos entre plantas específicas da população mantida na Seção de Genética do IAC. Essas plantas específicas foram agrupadas em lotes de 2 a 10 plantas cada, isolados geograficamente e deixados em regime de polinização livre. Foram compostos 18 lotes, analisadas 56 progênies, num total de 1042 plantas.

As plantas componentes de cada lote foram escolhidas de tal forma que, ao se analisarem suas progênies fosse possível, através de seus genótipos, identificar inequivocamente a origem reprodutiva de cada planta da progênie como sendo oriunda de:

- a) apomixia
- b) autófecundação
- c) cruzamento com um indivíduo específico do lote

Isso foi possível com a formação de lotes contendo somente plantas cuja contribuição gamética fosse específica e inequívoca considerando pelo menos 4 locos. Com isso, também o genitor masculino de cada planta da progênie poderia ser inequivocamente determinado.

C) Progênies derivadas de plantas cultivadas no Instituto de

Botânica de São Paulo. Essas plantas são remanescentes do lote estudado por MONTEIRO (1980) e mantidas, desde então, em regime extensivo em canteiros da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Foram estudadas 21 progênies de polinização livre, totalizando 135 plantas. As sementes de cada uma das 21 progênies foram colhidas de 21 ramos de touceiras diferentes escolhidas ao acaso nos canteiros. Isto assim foi feito para se ter uma garantia que eles realmente representavam 21 plantas diferentes pois, nesse sistema assim extensivo e durante vários anos, em cada touceira de estévia podem estar representados mais de um indivíduo.

A análise dessas progênies seguiu o raciocínio descrito para as progênies tipo A).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma síntese dos estudos realizados e os resultados obtidos são diagramaticamente apresentados na página 37 (Diagrama 4).

4.1 METODOLOGIA DA ELETROFORESE

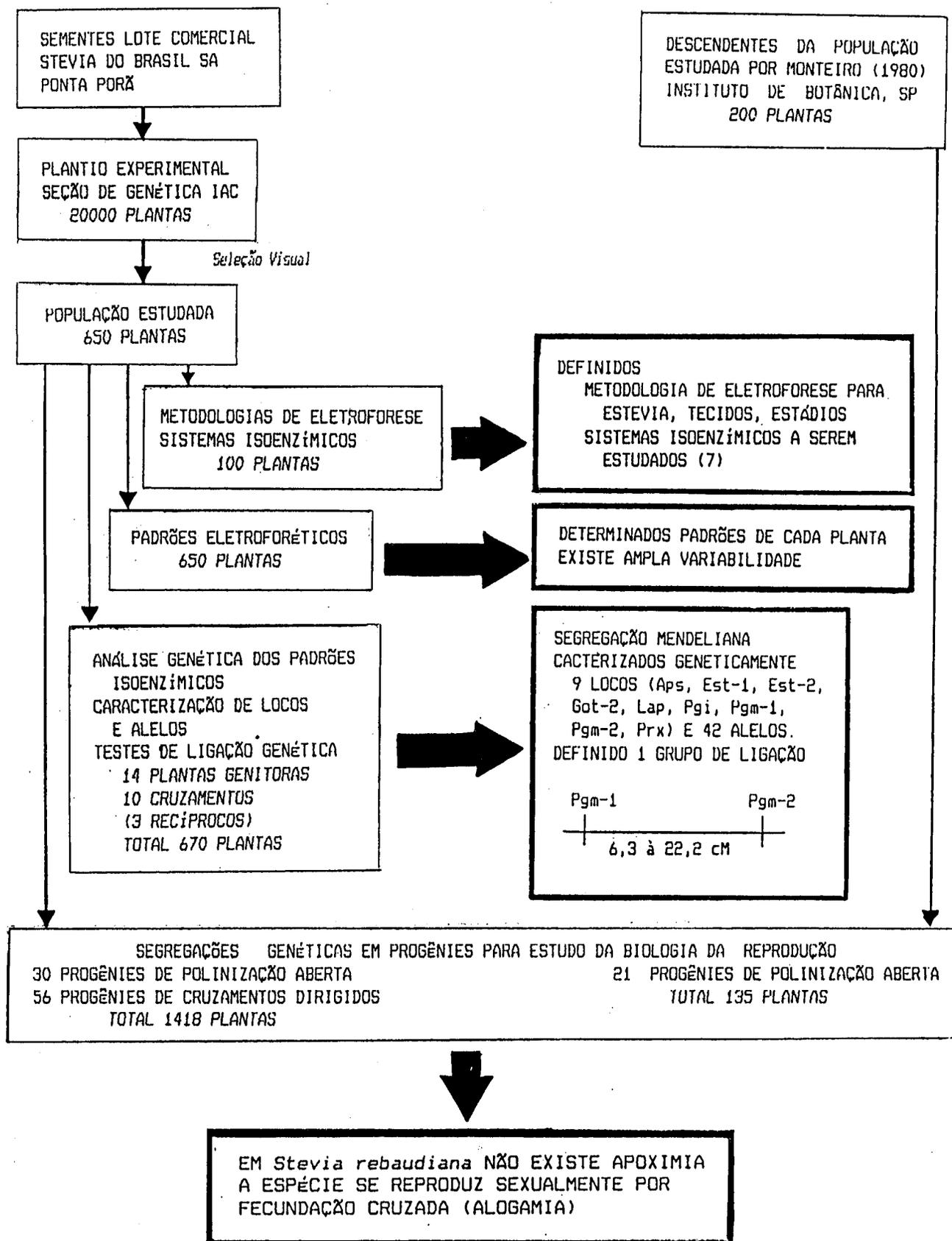
As investigações metodológicas, dentro dos limites estudados, permitiram definir não somente vários sistemas isoenzimicos passíveis de análises eletroforéticas em *S.rebaudiana* como também as condições apropriadas para a corrida simultânea de vários deles numa mesma corrida.

4.1.1 pH do gel de amido

Na eletroforese a migração de cada isoenzima depende do seu ponto isoelétrico. Portanto, o pH da solução tampão do gel influencia a separação entre as bandas e a migração relativa ao frente.

No intervalo de pH 7,8-8,5 investigado, observou-se que com pHs menores que 7,9 os sistemas EST e PRX, que têm resolução na região próxima ao frente, apresentaram bandas migrando junto com

DIAGRAMA 4 - SÍNTESE DOS ESTUDOS E RESULTADOS OBTIDOS



o fronte e com isso, impossibilitando a sua interpretação. Por outro lado, pHs maiores que 8,2 resultaram em géis com menor separação entre as bandas. Nos sistemas APS, EST, LAP e PGI, que apresentaram bandas de migração próximas, com esses pHs altos alguns padrões foram resolvidos em uma banda larga. Nos outros sistemas a resolução mostrou-se fundamentalmente estável.

Baseando-se nos resultados obtidos, optou-se por utilizar o pH no intervalo de 7,9-8,2, no qual a migração relativa das bandas para as diversas isoenzimas permite uma boa resolução.

4.1.2 Preparação das amostras

A resolução em termos de nitidez e coloração das bandas é bastante influenciada pela qualidade do extrato utilizado. Após a maceração, o extrato deve ser tal que contenha uma quantidade de enzimas ativas, que absorvidas no papel de filtro resulte, após a eletroforese e coloração, em bandas com boa resolução.

Verificou-se que, mesmo antes de terminada a maceração, as folhas de estévia já se encontram oxidadas. São oxidações fenólicas, as quais para serem evitadas necessitam da adição de agentes antioxidantes no processo da maceração. Entre os diversos agentes testados, o melhor resultado foi obtido quando utilizou-se 25 mg/ml de Glutateona em solução tampão contendo TRIS (0,1 M) e MgCl₂ (0,04 M) pH 8,5, ajustando-se o pH dessa solução para

7,0-7,5 com NaOH 4N e 1N. A adição de 0,03ml dessa solução extratora a 15mg de tecido de folha colhido e macerado no dia da corrida, resulta em uma boa quantidade de enzima ativa. Em termos práticos e rotineiros, uma padronização aproximada foi obtida utilizando-se duas folhas jovens ou um disco de folha adulta de 0,5 cm de diâmetro macerado com uma gota de solução extratora fornecida por um conta-gotas descartável.

Verificou-se que o estágio de desenvolvimento das plantas e idade das folhas influenciam a resolução das regiões de interesse de alguns sistemas. Para APS é necessário utilizar ramos em pleno desenvolvimento vegetativo utilizando-se as folhas bem jovens anexas ao meristema. Para EST podem ser utilizadas as folhas de até o 3º par também de ramos vegetativos. GOT e LAP se resolvem mais coloridos em folhas jovens de ramos vegetativos, mas podem ser também resolvidos em folhas adultas. PRX e PGM são melhor resolvidos em folhas adultas seja de ramos vegetativos como de ramos em florescimento. Especificamente, uma região de PRX e outra de PGM não mostraram atividade em folhas novas, sendo necessário utilizar folhas adultas. Os sistemas G6PDH, MDH, ME e PGI, mostraram resolução boa e estável não afetada pela idade da folha nem pelo estágio de desenvolvimento das plantas. Os outros sistemas, ADH, GDH, IDH e SKDH mostraram-se inadequados, com resolução difusa e instável em qualquer idade das folhas e das plantas.

Resumindo, os sistemas APS, GOT e LAP e o loco Est-2 são melhor analisados em folhas novas, anexas ao meristema (ramos

vegetativos). O sistema PRX e o loco Pgm-1 são melhor analisados em folhas velhas de ramos vegetativos ou em florescimento. Os sistemas G6PDH, MDH, ME e PGI e os locos Pgm-2 e Est-1 se manifestam igualmente em ambas as situações.

4.1.3 Condições elétricas

A combinação dos valores de voltagem, amperagem e do pH da solução tampão dos eletrodos influencia o tempo da corrida e a atividade das isoenzimas. No geral, baixas voltagens e amperagens, com pH baixo, resultam em corridas demoradas e resolução difusa das bandas. Por outro lado, pela passagem de corrente no gel, voltagens e amperagens muito altas geram muito calor, desnaturando as enzimas.

Para um pH de 8,3 do tampão dos eletrodos e 7,9-8,2 no gel, verificaram-se apropriadas as seguintes especificações:

- a) para a inserção do extrato no gel, um período de 25 minutos aplicando-se um máximo de 25 mA sem ultrapassar 150 V;
- b) um pulso de 60 minutos após a remoção das amostras, aplicando-se novamente um máximo de 25 mA e 150 V, período em que a amperagem se reduz à cerca de 15 mA;
- c) ajuste da amperagem para 30 mA e para um máximo de 300 V;
- d) reajuste da voltagem para 300 V e um máximo de 30 mA após cerca de 40 minutos. Essa última voltagem mantida por duas horas promove a migração do frente para aproximadamente 8,0 cm da

origem.

Com essas condições a corrida se completa em aproximadamente 4 horas, obtendo-se géis com boa resolução.

4.1.4 Sistemas isoenzímicos

No presente estudo, dois grupos de sistemas puderam ser diferenciados de acordo com a qualidade e estabilidade da resolução. O primeiro inclui ADH, GDH, IDH e SKDH, sistemas nos quais raramente observaram-se bandas e, mesmo quando observadas, a resolução mostrou-se difusa e instável. O segundo grupo, constituído de APS, EST, G6PDH, GOT, LAP, MDH, ME, PGI, PGM e PRX considerou-se promissor. Conseguiu-se desenvolver uma metodologia eficiente obtendo-se boa nitidez e repetibilidade na resolução de bandas.

A caracterização eletroforética de 100 plantas ao acaso na população para esses sistemas metodologicamente promissores, mostrou invariavelmente MDH com três bandas e G6PDH e ME com uma única banda, indicando não haver variabilidade na população em estudo. Os outros sistemas, APS, EST, GOT, LAP, PGI, PGM e PRX se mostraram interessantes, revelando padrões evidentes de variabilidade. Esses sete sistemas, foram portanto, melhor estudados.

Os resultados das investigações acerca da metodologia de eletroforese aplicada à estévia está descrito, em forma da

protocolo, no Apêndice B. São indicadas as condições de preparação do gel, das amostras, da corrida e os sistemas isoenzímicos revelados nessas condições.

4.2 ANÁLISES ISOENZÍMICAS

Os padrões de bandas resultantes nos géis, após a eletroforese, correspondem a fenótipos eletroforéticos. É portanto necessário interpretá-los através de análises genéticas e estabelecer a correspondência desses fenótipos com genótipos condicionados por locos específicos para, posteriormente, serem utilizados em outros estudos.

Primeiramente, nesse item, apresentam-se as características dos sistemas isoenzímicos APS, EST, GOT, LAP, PGI, PGM e PRX, estudados em cerca de 650 plantas da população. Descrevem-se os fenótipos eletroforéticos separados por regiões de resolução, mencionando-se a localização aproximada no gel através dos valores de R_f (migração relativa da banda em relação à migração do frente), salientando-se aquelas que permitiram um estudo genético. As regiões caracterizadas como locos isoenzímicos são ilustradas com uma figura mostrando os padrões eletroforéticos dos diversos genótipos e uma tabela apresentando os resultados das análises genéticas correspondentes. Os cruzamentos dirigidos utilizados nos estudos genéticos estão descritos na Tabela 1.

Posteriormente, após caracterizados locos e alelos

específicos, apresentam-se os resultados de testes de ligação genética realizados entre os diversos locos.

4.2.1 Sistemas isoenzímicos e caracterização de locos

APS - Três regiões distintas foram verificadas para **APS**.

A primeira, de Rf 0,80 a 0,75 mostrou aparente variabilidade porém sua expressão se observou difusa e com pouca atividade e não foi melhor estudada.

A segunda região, com migração de Rf 0,64 a 0,46, mostrou-se estável e bem nítida em folhas novas de plantas em pleno desenvolvimento vegetativo e apresentou padrões de variabilidade. A sua expressão é típica de uma enzima dimérica, onde o padrão do genótipo heterozigótico caracteriza-se por apresentar o fenótipo de três bandas, as duas extremas correspondendo aos homodímeros parentais e uma intermediária resultante da interação alélica com a formação de um heterodímero. A análise genética da segregação de 7 progênies (Tabela 2), permitiu caracterizar essa região como um loco, aqui denominado **Aps**. Observaram-se 6 bandas com distintas migrações correspondentes aos alelos A (Rf 0,58), B (Rf 0,56), C (Rf 0,54), D (Rf 0,50), E (Rf 0,44) e F (Rf 0,40) mostrados na Figura 1. Um alelo nulo, N, foi também detectado como será discutido no item Alelos Nulos.

A leitura dos géis de **Aps** apresentou, inicialmente, certo grau de dificuldade. Os padrões das plantas heterozigóticas

muitas vezes mostraram-se atípicos, apresentando as bandas heterodímeras migrando mais próximas dos homodímeros avançados. Não raro observou-se também, nos heterozigotos, a falta ou a coloração extremamente clara de um dos dois homodímeros, resultando portanto, um padrão de duas bandas para esses genótipos. Para enzimas diméricas, esses padrões atípicos de duas bandas geralmente são associados a monômeros defeituosos (WEEDEN & WENDEL, 1989). No presente caso, uma mesma planta heterozigótica revelou, em algumas ocasiões, a falta de um homodímero e em outras ocasiões a falta do outro homodímero, indicando que a perda de atividade não estaria relacionada a um monômero específico. Esses problemas mencionados, entretanto, não interferiram na interpretação genética das bandas de Aps devido à excelente nitidez na resolução dos géis e a segregação genética normal observada.

Próxima à origem foi detectada uma terceira região de resolução (Rf 0,20 a 0,02). Com pHs do gel menores que 8,2 esta região revelou-se difusa e com pouca atividade. No entanto, a resolução com pHs mais altos, embora instável, se mostrou mais colorida e nítida, permitindo a observação de aparente variabilidade. Foram vistos padrões consistindo de uma a quatro bandas espessas, verificando-se expressão diferente para as folhas novas e velhas de um mesmo indivíduo. Devido à instabilidade da resolução com as condições metodológicas empregadas, a interpretação desta terceira região não pôde ser realizada. Estudos posteriores, específicos, provavelmente

permitirão definir esta região e utiliza-la como um marcador genético.

EST - Esse sistema apresentou duas regiões de resolução em folha nova e uma terceira em folha mais velha.

A primeira região, próxima ao fronte (Rf 0,99-0,85), expressa-se em folha nova e folha adulta. Sua atividade é inibida quando as folhas são submersas na água ou mesmo quando molhadas por curto período de tempo. Plantas molhadas logo antes da coleta resultam normalmente em géis com grande proporção de amostras sem atividade.

Caracteristicamente, esta região colore-se nos primeiros cinco minutos da reação de revelação. Após esse tempo é necessário interromper a reação e fixar o gel pois, do contrário, observa-se uma atividade excessiva, com difusão das bandas principais, impossibilitando a leitura dos géis. Observaram-se padrões de variabilidade típicos da expressão de um loco codificando para uma enzima monômera, Est-1, cuja análise genética se encontra na Tabela 3. Foram detectados 4 alelos na população: A (Rf 0,99), B (Rf 0,97), C (Rf 0,95) e D (Rf 0,85). A banda correspondente ao alelo D migra na região do segundo loco de EST (Figura 2). Devido à proximidade das bandas dos alelos A, B e C, o tempo de revelação é crítico para uma correta interpretação. Entretanto, genótipos compostos do alelo D e algum dos outros alelos podem ser facilmente interpretados, mesmo quando o tempo de revelação excede os cinco minutos. Neste caso,

Est-1 pode ser revelado simultaneamente, no mesmo gel, com Est-2 descrito a seguir.

A segunda região de EST, de Rf 0,93 a 0,76, mostrou excelente estabilidade, coloração e nitidez em folhas novas, até o terceiro par. Apresentou variabilidade com padrões compostos de uma ou duas bandas, indicativos de uma enzima de estrutura monomérica. A análise genética da segregação desses padrões, mostrada na Tabela 4, permitiu caracterizar esta região como um outro loco de EST, denominado então Est-2 (Figura 2). Verificou-se ocorrer 6 alelos na população estudada: A (Rf 0,93), B (Rf 0,88), C (Rf 0,87), D (Rf 0,82), E (Rf 0,76) e N, um alelo nulo cuja caracterização é exposta em item separado.

Na terceira região de EST observaram-se bandas finas e nítidas, porém pouco coloridas, ocorrendo em folhas velhas a partir do quarto par. Quatro bandas com migrações distintas entre Rf 0,85 e Rf 0,70 foram vistas, formando padrões de uma ou duas bandas. Duas delas migram na região de Est-2. No quarto e quinto par de folhas foram resolvidas simultaneamente ambas as regiões. Nesta situação, verificou-se a independência na migração das bandas desta região e das bandas de Est-2. A interpretação genética formal desta terceira região, a qual provavelmente deve se constituir em um terceiro loco de EST não foi realizada. Para isso, seria necessário ainda adequar a metodologia para se obter melhor coloração e constância dos padrões.

GOT - Para esse sistema isoenzímico foram observadas quatro

regiões anódicas com migrações distintas e apresentando padrões de variabilidade.

A primeira região, estável e bem colorida revelou, quase que invariavelmente, uma banda de Rf 0,73. Exceção foram algumas plantas com padrões diferentes. Uma delas apresentou uma banda de Rf 0,70 e outra um padrão consistindo de uma banda larga, de Rf 0,70 a Rf 0,73. A análise da progênie dessa planta que apresentou padrão de uma banda larga, revelou em 15 plantas provenientes de polinização aberta, indivíduos com uma banda de Rf 0,73 e indivíduos com a banda larga de Rf 0,70 a Rf 0,73, sugerindo tal resultado tratar-se da segregação de retrocruzamento de um loco. Embora não haja dados extensivos a respeito dessa região, esse resultado é tão indicativo de que se trata realmente de um loco, ao qual foi atribuída a nomenclatura de loco Got-1, a ser confirmado com análises mais pormenorizadas.

A segunda região de GOT (Rf 0,68-0,41) apresentou-se com excelente nitidez, estabilidade e separação entre as bandas especialmente em géis de folhas novas. A ampla variabilidade observada pôde ser claramente interpretada como o resultado da expressão de uma enzima dimérica. A caracterização genética desta região, mostrada na Tabela 5, resultou na identificação do loco denominado Got-2 com 6 alelos (Figura 3): A (Rf 0,68), B (Rf 0,58), C (Rf 0,51), D (Rf 0,44), E (Rf 0,41) e N, um alelo nulo, o qual será discutido em item adiante.

A terceira região de GOT corresponde à resolução de uma banda fina e nítida de Rf 0,30. Uma planta mostrou um padrão

diferente, composto de três bandas (Rf's 0,36, 0,33 e 0,30), típico de um heterozigoto para um loco codificando para uma enzima dímera. Muito provavelmente, essa região representa um outro loco de GOT, porém, devido à sua pouca variabilidade e ao fato de não terem sido obtidos descendentes dessa planta, essa região não foi posteriormente estudada.

A quarta região de GOT refere-se a bandas localizadas próximas à origem (Rf 0,22 a 0,07). Foram observadas seis bandas de distintas migrações, formando diversos padrões de uma, duas ou três bandas. Apesar dessa evidente variabilidade, a resolução foi insatisfatória, instável e as bandas pouco coloridas, o que impossibilitou maiores estudos.

LAP - Esse sistema apresentou uma única região de expressão (Rf 0,79 a 0,76), bem resolvida e com padrões de variabilidade. A interpretação genética mostrou (Tabela 6) que ela corresponde a um loco, *Lap*, que codifica para uma enzima monômera com quatro alelos: A (Rf 0,79), B (Rf 0,78), C (Rf 0,77) e D (Rf 0,76), mostrados na Figura 4. Apesar da proximidade das bandas, a caracterização dos alelos foi possível devido à boa resolução dos géis.

Os genótipos heterozigóticos para aqueles alelos que apresentam bandas com migração muito próxima são, eventualmente, vistos no gel como uma banda mais larga requerendo, para sua identificação, a corrida no mesmo gel dos genótipos homozigóticos para esses alelos como controle. Dessa forma, a distinção fica

clara.

PGI - Esse sistema apresentou resolução na porção média dos géis observando-se duas regiões de migrações próximas.

Na primeira, de Rf 0,70 a 0,65 foram observadas bandas largas, difusas e pouco separadas não sendo portanto de interesse.

A segunda região mostrou-se mais nítida e estável em qualquer idade das folhas e apresentou padrões de variabilidade que foram então investigados. O estudo genético dessa região, apresentado na Tabela 7, resultou na caracterização do loco Pgi que codifica para uma enzima dímera (Figura 5). Verificaram-se 3 alelos para esse loco, A (Rf 0,60), B (Rf 0,56) e C (Rf 0,51). Os genótipos heterozigóticos apresentam a banda do heterodímero migrando um pouco mais próxima do homodímero avançado. Esse efeito, entretanto, não dificulta a identificação dos diversos padrões.

PGM - Observaram-se duas regiões para esse sistema isoenzímico.

A primeira, de Rf 0,83 a 0,79, mostrou resolução nítida e com coloração intensa em géis de folhas adultas. Observaram-se padrões de uma ou duas bandas que sugerem tratar-se de um loco (Pgm-1) codificando para uma enzima monômera, confirmado pela segregação mendeliana observada (Tabela 8). Três alelos foram encontrados na população em estudo: A (Rf 0,83), B (Rf 0,81) e C

(Rf 0,79) mostrados na Figura 6. Nos cruzamentos dirigidos (Tabela 8), apenas um deles (Nº 7) apresentou segregação distorcida. Isso, entretanto, não afetou as análises de caracterização como mostrado pelo teste χ^2 de heterogeneidade realizado. Esse cruzamento Nº 7 é o recíproco do Nº 6, que mostrou segregação perfeitamente normal, da mesma forma que os outros seis cruzamentos que caracterizaram esse loco.

A segunda região de PGM (Rf 0,77 a 0,66), com resolução ótima em qualquer idade das folhas apresentou, como Pgm-1, segregação de acordo com a expressão de um loco codificando uma enzima monômera. A análise genética realizada (Tabela 9) permitiu caracterizar o loco que se denominou Pgm-2. Verificaram-se 5 alelos na população: A (Rf 0,77), B (Rf 0,73), C (Rf 0,70), D (Rf 0,66) e N, um alelo nulo (Figura 6).

PRX - Essa isoenzima apresentou atividade estável e com boa resolução somente na porção próxima ao fronte. Verificaram-se padrões variáveis.

Em géis de folhas adultas foram observados quatro padrões básicos de várias bandas cada, bem como combinações entre esses padrões mostrando a sobreposição das bandas dos padrões básicos, sem, no entanto, bandas adicionais. Isto seria esperado na expressão de um loco codificando para uma enzima monômera. Analisou-se geneticamente a segregação de alguns padrões sendo os resultados apresentados na Tabela 10. Verificou-se segregação mendeliana típica desses padrões multibandas como um todo,

caracterizando-se, dessa forma, um loco denominado Prx, que codifica para uma enzima monômera, expressa no gel em padrões multibandas (Figura 7). Essa situação tem sido observada em outras plantas geneticamente bastante estudadas como tomate e alfalfa (RICK & FOBES, 1976; QUIROS & MORGAN, 1981). Nessas, os padrões multibandas têm sido atribuídos à expressão de apenas um gene. A resolução no gel de bandas múltiplas resultaria de modificações pós-tradução das aloenzimas *in vivo* ou de mudanças químicas *in vitro*.

No presente caso da estévia, poderia se conjecturar que o loco Prx, aqui identificado, fosse o resultado da expressão de mais de um gene, pelas razões descritas adiante. No entanto, independentemente do número de genes envolvidos, os padrões de Prx, especialmente as bandas localizadas entre Rf 0,91 e Rf 0,86 constituem-se pela sua fácil caracterização, em bons marcadores genéticos, tendo em vista sua segregação mendeliana normal.

De acordo com as condições de revelação, os padrões de Prx podem ser separados em duas regiões (ver Figura 7). A primeira, de maior migração, se expressa em tecidos de folhas novas e adultas, enquanto que, a segunda, de menor migração, tem expressão somente em folhas adultas. O fato de as duas regiões apresentarem atividade diferencial de acordo com a idade das folhas, leva a pensar na hipótese da existência de pelo menos dois genes, os quais se expressariam simultaneamente somente nas folhas velhas. Caso essa hipótese fosse verdadeira, esses genes necessariamente teriam que estar fortemente ligados pois, do

total de 820 plantas caracterizadas para Prx (500 da população original, 230 do estudo genético e 90 resultantes de outros cruzamentos), em nenhum caso foi observado um padrão que seria o possível recombinante entre a primeira e segunda regiões. Se ele é o resultado da expressão de um ou mais genes ligados não se sabe ao certo. Outros estudos, com maior número de plantas ou a nível de síntese e estruturas moleculares, seriam necessários para dirimir essa dúvida. O fato é que o loco aqui definido como Prx, apesar do padrão multibandas, apresenta "in toto", segregação mendeliana normal e por essa razão foi caracterizado como tal.

Em resumo, as análises genéticas dos padrões eletroforéticos realizadas permitiram a caracterização, identificação e a atribuição de nove locos izoenzímicos, Aps, Est-1, Est-2, Got, Lap, Pgi, Pgm-1, Pgm-2 e Prx. Esses locos, os primeiros genes a serem descritos na espécie *Stevia rebaudiana*, foram então investigados quanto à possibilidade de ligação genética entre eles e, posteriormente, utilizados para o estudo da biologia de reprodução da espécie.

4.2.2 Alelos Nulos

Nas progênies dos cruzamentos 1, 4, 5, 8, 9 e 10 (Tabela 1) observaram-se plantas com padrões de bandas inesperados para os

locos *Aps*, *Est-2*, *Got-2* e *Pgm-2* nos quais não se observaram ora a banda de origem materna ora a paterna. Todas essas plantas foram identificadas por outros sistemas isoenzímicos como provenientes do cruzamento das plantas genitoras indicadas.

Como destacado no item 3.4.2, duas hipóteses foram consideradas para explicar o fenômeno:

- a) Plantas genitoras seriam aneuploides monossômicas ($2n-1$) e tais aneuploidias seriam transmissíveis às progênes, ou
- b) As plantas que mostraram a falta de uma banda para os locos *Aps*, *Est-2*, *Got-2* ou *Pgm-2* seriam heterozigóticas para um alelo nulo.

Essas hipóteses foram baseadas no seguinte raciocínio. Uma planta normal homozigótica, por exemplo *A/A*, tem o fenótipo de uma banda quando revelada para esse loco isoenzímico. Outros genótipos, entretanto, podem mostrar também esse mesmo fenótipo de uma banda. Por exemplo, plantas aneuploides, monossômicas ($2n-1$) para o cromossomo onde estivesse localizado esse loco isoenzímico. Da mesma forma, uma planta heterozigótica para um alelo nulo, *A/nulo*, terá somente um alelo ativo (*A*) e, nos géis, mostraria também apenas uma banda. Tais fenótipos de apenas uma banda poderiam erroneamente serem interpretados como de plantas homozigóticas normais *A/A*.

Do cruzamento entre duas plantas homozigóticas normais, por exemplo *A/A* x *B/B*, todas as plantas da progênie serão híbridas, de genótipo *A/B* e, apresentar no gel, se a enzima for monômera, as duas bandas parentais relativas aos alelos *A* e *B* e, se for

dímera, além dessas uma banda de migração intermediária, o heterodímero (esquema seção 2.4). Se no entanto uma das plantas fosse monossômica, do cruzamento entre ela (genótipo *A*) e uma homozigótica (genótipo *B/B*) resultariam na progênie plantas *A/B* heterozigóticas normais e plantas monossômicas de genótipo *B* que, no gel, não teriam a banda relativa ao alelo *A*. Caso essa hipótese fosse verdadeira, essas plantas de fenótipo "*B*" não ocorreriam na progênie em proporções mendelianas e sim na taxa de transmissão dessa aneuploidia específica. Citologicamente teriam que ter $2n-1$ cromossomos. Alternativamente, se uma das plantas fosse heterozigota para um alelo nulo, do cruzamento *A/nulo* x *B/B* por exemplo, resultariam na progênie plantas *A/B* heterozigóticas normais e plantas *B/nulo* heterozigóticas que, à semelhança do caso anterior, não teriam a banda relativa ao alelo *A*. No entanto, tais plantas ocorreriam em proporções mendelianas e, citologicamente seriam normais, com $2n$ cromossomos.

Sabe-se que *S.rebaudiana* é uma espécie diplóide que possui $2n=22$ cromossomos (BRUCHER, 1974). Visando verificar a hipótese de aneuploidia, procedeu-se à contagem de cromossomos nas plantas genitoras dos cruzamentos 1, 4, 5, 8, 9 e 10 e em algumas plantas de suas progênies possuindo padrões inesperados. A técnica citológica que se mostrou como a mais adequada para a visualização dos cromossomos se encontra no protocolo descrito no Apêndice A.

Um total de 25 plantas foram citologicamente investigadas. Verificou-se, sem exceção, que todas apresentavam 22 cromossomos

(Figura 8). Portanto, descartou-se a hipótese da aneuploidia.

A existência de alelos nulos nos locos *Aps*, *Est-2*, *Got-2* e *Pgm-2* foi então investigada. Os resultados do estudo de segregação para testar essa hipótese são mostrados na Tabela 11. Verificou-se, em todos os casos, que a segregação observada está de acordo com a herança mendeliana esperada, considerando que as plantas genitoras indicadas são heterozigóticas para um alelo nulo.

Uma característica dos alelos nulos é que, normalmente em populações naturais, panmíticas, eles são mantidos em condição heterozigota. Esse fato tem sido atribuído a duas razões: uma baixa frequência do alelo a qual não seria suficiente para gerar indivíduos homozigóticos nulos devido à alogamia ou que, indivíduos homozigóticos para o alelo nulo seriam inviáveis. No presente caso verificou-se que todas as 650 plantas caracterizadas da população estudada mostraram atividade eletroforética, indicando que, realmente, os alelos nulos em estévia são mantidos na população predominantemente através de genótipos heterozigóticos.

Uma vez que na população original, entre 650 plantas, não se observou nenhuma planta *N/N* para nenhum dos 4 locos em questão, investigou-se a viabilidade das plantas homozigóticas para os alelos nulos.

Para *Est-2* a verificação foi direta. No cruzamento 1 (*CN* x *CN*) eram esperadas plantas homozigóticas *N/N* e observou-se que elas ocorreram, são viáveis e, aparentemente de vigor normal.

Para verificação nos outros locos, os resultados foram obtidos de um lote de cruzamentos ao acaso contendo plantas heterozigóticas para os alelos nulos de *Aps*, *Est-2* e *Got-2* especialmente escolhidas entre as progênies dos cruzamentos 9 e 10 (Tabela 1). Na época desses cruzamentos o alelo nulo de *Pgm-2* não tinha sido ainda identificado, portanto, esse loco não foi incluído. Os resultados, mostrados na Tabela 12, permitiram verificar novamente que indivíduos N/N para *Est* e também, indivíduos N/N para *Aps* e *Got-2* são viáveis. Pode ser concluído que em *S.rebaudiana* a falta de atividade izoenzimica para *Aps*, *Est-2* e *Got-2* aparentemente não afeta a viabilidade das plantas.

A denominação de alelo nulo refere-se ao fenótipo "falta de atividade no gel". No entanto, geneticamente tem segregação normal. A sua natureza, entretanto, pode ser de diferentes tipos. Um tipo são os chamados de alelismo nulo verdadeiro, onde ou não há formação de produto gênico ou o produto é defeituoso. Um alelo específico pode não ser transcrito ou o polipeptídeo produzido não ter atividade devido a inibidores ou por desnaturação ou inativação de enzimas durante o processo de extração ou da eletroforese (JONES et al., 1986; WEEDEN & WENDEL, 1989). Um outro tipo de alelismo nulo pode resultar de interações epistáticas de outros genes que atuam no alelo ou no polipeptídeo modificando sua atividade. Essa interação pode levar à falta de atividade apenas para a reação de coloração no gel e, conseqüentemente, a um fenótipo nulo (WEEDEN & WENDEL, 1989). O reconhecimento do tipo de alelismo nulo é um estudo complexo e

requer muitas informações sobre efeitos de técnica, características bioquímicas dos produtos gênicos e amplo conhecimento do genoma. Em *S.rebaudiana* os conhecimentos científicos nessas áreas são inexistentes e os dados do presente trabalho não permitem especular a cerca do tipo de alelismo nulo. Da mesma forma, parece difícil conjecturar sobre razões que expliquem a ausência de indivíduos homozigóticos para alelos nulos entre os 650 indivíduos estudados uma vez que não se deu a conhecer a frequência desses alelos nessa população nem tampouco naquela que lhe deu origem.

4.2.3 Ligação genética

Para o estudo de ligação entre dois genes é necessário que ambos estejam em estado heterozigótico no mesmo indivíduo e a segregação de cada gene esteja nas proporções mendelianas esperadas, isto é, não distorcida.

Nos cruzamentos dirigidos (Tabela 1), os nove locos analisados mostraram segregação normal (Tabelas 2 à 11) exceto o cruzamento 7. Este, entre os oito realizados para Pgm-1, apresentou segregação distorcida mas foi também incluído no estudo de ligação por tratar-se de uma situação isolada, pouco pronunciada, pois a heterogeneidade não foi significativa (Tabela 8).

Considerando-se os nove locos, 36 combinações de pares de locos poderiam ser formadas. A partir dos 10 cruzamentos indicados na Tabela 1, 31 dessas combinações apresentaram os pares de locos heterozigóticos em, pelo menos, um dos genitores e foram portanto passíveis de estudo de ligação. Para os testes de ligação, as progênies dos cruzamentos recíprocos foram analisadas conjuntamente pois são cruzamentos entre as mesmas plantas e a heterogeneidade entre eles foi não significativa para todos os locos (Tabelas 2 à 11). Essas progênies dos cruzamentos recíprocos combinadas serão aqui referidas como COMB 4,5; COMB 6,7 e COMB 8,9.

Na Tabela 13 estão indicadas as combinações de pares de locos estudadas, os cruzamentos analisados e a significância do χ^2 total da segregação conjunta a uma probabilidade de 5%. O resultado da tabela mostrou que entre as 31 combinações testadas, somente 4 delas, Pgm-1/Pgm-2, Aps/Prx, Est-2/Lap e Lap/Prx apresentaram desvios da segregação conjunta esperada na hipótese de independência.

Para esses pares de locos, realizou-se a decomposição do χ^2 total para obtenção do χ^2 referente ao desvio devido à ligação. Essa análise é mostrada na Tabela 14.

Comparando-se esses resultados com os obtidos na análise conjunta, verificou-se que os pares Pgm-1/Pgm-2 e Aps/Prx confirmaram seus χ^2 significativos. Isto se constitui numa forte evidência de ligação entre esses pares de locos, especialmente no caso de Pgm1/Pgm-2 em que foram testadas cinco progênies sendo

todas significativas para ligação.

Para o par Est-2/Lap o desvio devido à ligação não foi significativo, o que indica que a significância do χ^2 total deve-se provavelmente ao efeito da segregação individual dos locos. Estes locos, portanto, não estariam ligados. Este resultado é consistente com o fato de que as outras quatro progênies testadas para ligação entre Est-2 e Lap mostraram segregação independente (Tabela 13).

Na análise do par Lap/Prx, uma progênie mostrou χ^2 de ligação significativo e, a outra, χ^2 não significativo. Como foram testadas apenas estas duas progênies, a ligação entre Lap e Prx é duvidosa. É possível que exista uma ligação fraca entre eles, porém, para sua detecção seria necessário o estudo de outras progênies com grande número de plantas.

Estimaram-se os valores de recombinação (R) entre Pgm-1/Pgm-2, Aps/Prx e, não obstante as considerações acima, também entre Lap/Prx através do método da Máxima Verossimilhança. Os resultados obtidos para os valores de recombinação são apresentados na Tabela 15.

Para o par Pgm-1/Pgm-2 obteve-se estimativas de recombinação indicando uma ligação moderada entre esses dois genes. O fato de que a ligação foi detectada em todas as progênies analisadas, mesmo naquelas com número pequeno de plantas, é uma indicação segura da real existência dessa ligação. Pgm-1/Pgm-2 estabelecem portanto o primeiro grupo de ligação em *S.rebaudiana*. Os valores de recombinação obtidos variaram de 6,3

$\pm 1,5\%$ a $22,2 \pm 3,3\%$.

Essa variação nos valores de recombinação tem sido também observada praticamente em todas as plantas bem estudadas (ALLARD, 1956; BUTLER, 1968). Tem-se especulado diversas causas que podem alterar as estimativas de recombinação. Entre elas é de se salientar o efeito do próprio genótipo e de condições ambientais como época do ano e temperatura. BUTLER (1977), em estudo sobre valores de recombinação e suas variações, considera importante a repetição dos experimentos em condições controladas para se ter uma idéia da influência ambiental. Se por um lado no presente trabalho não houve controle ambiental, pois foram utilizadas plantas com distintos genótipos e os cruzamentos foram realizados em diferentes épocas, por outro lado, os valores obtidos talvez reflitam a amplitude de variação nos valores de recombinação que se possa esperar para esse par de locos em diversas situações e "backgrounds" genéticos. Tal variação é extremamente comum em investigações sobre o valor de recombinação em plantas.

Para os pares **Aps/Prx** e **Lap/Prx** que mostraram valores de recombinação de $33,2 \pm 3,5\%$ e $38,5 \pm 4,4\%$ respectivamente, os resultados são preliminares visto ter sido analisada apenas uma progênie para a segregação conjunta de **Aps/Prx** e, para **Lap/Prx** a outra progênie testada (COMB 8,9) mostrou segregação independente.

4.3 BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO

As plantas superiores podem se reproduzir sexuada ou asexuadamente. Casos há em que ambos os processos ocorrem em uma mesma espécie. Na reprodução asexuada ou apomixia não há participação dos gametas na formação do embrião sendo que a multiplicação se dá através de tecidos somáticos de bulbos, rizomas, estolões ou mesmo com a produção de sementes contendo embriões asexuados (STEBBINS, 1941; FRANKEL & GALUN, 1977). Geneticamente, a apomixia resulta em uma descendência com o genótipo idêntico ao da planta materna. Na reprodução normal, sexuada, ocorre na formação dos gametas, a meiose e a segregação genética. Com a fertilização ocorre então a recombinação dos genótipos que formarão os embriões. Se a fertilização ocorre mais frequentemente com pólen da mesma planta, se diz que a espécie é autógama e, se a fertilização ocorre em maior proporção com pólen de outras plantas da população chama-se a espécie de alógama.

Para se estudar a biologia da reprodução de *S.rebaudiana* foram instalados lotes experimentais de forma que as análises dos genótipos dos locos isoenzímicos permitissem distinguir a reprodução asexuada da sexuada e, neste caso, autogamia de alogamia. Analisaram-se progênies provenientes de plantas individuais.

Como mencionado no item 3.5 de Materiais e Métodos, para o estudo da biologia da reprodução, três tipos de progênies, (A, B e C), foram analisadas.

A) Progênies de plantas mantidas em regime de livre polinização na Seção de Genética. Avaliou-se a ocorrência de variabilidade genética dentro da progênie.

Nestas progênies foi possível distinguir apomixia obrigatória de reprodução cruzada. Se as plantas maternas se reproduzissem através de apomixia obrigatória, necessariamente todas as plantas de suas progênies teriam o mesmo genótipo, idênticos aos das plantas maternas. No entanto, se a reprodução fosse sexuada, dever-se-ia observar a segregação dos alelos maternos e variabilidade genética em suas progênies.

Foram estudadas progênies de 30 plantas e os resultados são apresentados na Tabela 16. Observou-se que nenhuma das progênies poderia ter sido originada de apomixia obrigatória pois em todas elas verificou-se a segregação dos alelos maternos e ampla variabilidade.

Estes resultados permitiram concluir que *S.rebaudiana* não é uma espécie apomítica obrigatória pois os resultados mostraram que a reprodução é sem dúvida, sexuada. Além disso, o fato de que diferentes alelos do mesmo loco foram observados em uma mesma progênie sugere serem essas progênies oriundas de fecundação cruzada.

B) Progênies de plantas específicas, selecionadas pelos seus genótipos isoenzímicos, obtidas nos lotes de cruzamentos dirigidos.

Nestas progênies, para cada planta foi determinada a sua

paternidade. O conhecimento da contribuição gamética materna e paterna de todas as plantas das progênies permitiu a determinação de sua origem como sendo por apomixia, autofecundação ou o cruzamento entre duas plantas específicas. Foram utilizados como marcadores ao menos quatro locos em cada planta dos lotes. A estratégia de análise seguiu o raciocínio abaixo, exemplificado em um caso, envolvendo três plantas no lote de livre cruzamentos.

DIAGRAMA 5 - Procedimento de análise de progênies obtidas de lotes de cruzamentos dirigidos para a determinação da origem reprodutiva das plantas.

PLANTA NO LOTE DE CRUZAMENTO	GENÓTIPO			
	Aps	Est-2	Got-2	Prx
X	DE	AC	CE	AB
Y	BF	BE	AB	AA
Z	AB	BE	CE	AA
<u>Descendentes da planta X</u>				
X-1	BD	AE	BC	AA
X-2	DD	AA	CE	AA
X-3	DE	AC	CE	AB
X-4	AD	AB	CC	AA

A origem da progênie da planta X poderia ser determinada da seguinte forma:

Planta X-1: se o genótipo, respectivamente para os locos Aps, Est-2, Got-2 e Prx é BD, AE, BC, AA é evidente que o gameta feminino que originou X-1 é D, A, C, A e, portanto, os outros alelos de cada loco compõem o genótipo do gameta masculino, ou seja, B, E, B, A. A única planta desse lote que poderia ter fornecido o gameta masculino com esse genótipo B, E, B, A é a planta Y. Consequentemente, X-1 é oriunda do cruzamento X(♀) x Y(♂).

Planta X-2: O genótipo DD, AA, CE, AA somente poderia ser oriundo da união dos gametas de genótipo D, A, C ou E, A e D, A, E ou C, A. Evidentemente, a única planta que poderia produzir tais gametas seria a própria planta X. Portanto, X-2 teria se originado por autofecundação.

Planta X-3: Observa-se que o genótipo da planta X-3 é o mesmo da planta X. Esta situação poderia resultar de autofecundação ou apomixia. Se for autofecundação, a probabilidade de se obter por autofecundação uma planta heterozigota para os 4 locos seria $(1/2)^2$ ou 6,25%, possível, porém baixa. Logo, essa planta X-3 seria provavelmente de origem apomítica.

Planta X-4: O genótipo AD de Aps é discriminativo. O alelo A só poderia ter origem de um gameta da planta Z, portanto X-4 é oriunda do cruzamento X(♀) x Z(♂). Os genótipos para os demais locos corroboram essa conclusão.

Na Tabela 17 são indicados os resultados obtidos das progênes analisadas com o procedimento antes explicado.

Verificou-se que os 1042 descendentes foram todos originados de reprodução sexual. Nenhuma das plantas das progênes apresentou o mesmo genótipo materno, portanto, sem dúvida alguma, nenhuma das plantas foi originada por apomixia.

Das 1042 plantas, 1028 foram resultantes de fecundação cruzada e, apenas 14 foram provenientes de autofecundação. Todas as 14 plantas oriundas de autofecundação descendem de três plantas, respectivamente dos lotes XIII, XIV e XV, para as quais foram analisadas 99, 55 e 66 plantas da suas progênes (dados não mostrados na Tabela 17). Em termos de porcentagens, essas 3 plantas maternas que originaram as 14 de autofecundação representam 5% do total de 56 e, as plantas originadas por autofecundação representam 1%, 18% e 4% do total de plantas nas progênes dessas plantas. Com exceção dos 18%, os outros valores são pequenos e indicam que a forma de reprodução foi, senão que exclusivamente, como nos outros lotes, predominantemente de fecundação cruzada.

A planta que produziu 18% de indivíduos por autofecundação

foi posteriormente isolada durante o florescimento. Essa planta apresentou uma baixa eficiência reprodutiva, pois de cerca de 1000 sementes colhidas, 400 eram escuras e as que, postas a germinar, deram origem a apenas 82 plantas. Todas as plantas foram provenientes de autofecundação.

BRUCHER (1974) relatou que plantas de estévia isoladas não produziam sementes férteis. MONTEIRO (1980) verificou a necessidade de polinização cruzada para a produção de sementes viáveis. Sugeriu autoincompatibilidade do tipo esporofítica na estévia a julgar pela superfície estigmática seca, grãos de pólen trinucleados e abundância de pólen nas anteras, características de espécies com esse sistema de incompatibilidade. Aparentemente, o mecanismo de incompatibilidade nessa planta que consegue produzir descendentes por autofecundação não é muito forte. Esse fato sugere a possibilidade de utilizar estratégias de melhoramento em que a autofecundação fosse necessária, como por exemplo, na obtenção de linhagens endogâmicas, para exploração da heterose em híbridos.

As 56 progênies do grupo B aqui analisadas, acrescentadas àquelas 30 do primeiro grupo (A), totalizam 86 progênies individualmente estudadas perfazendo um total de 1.418 plantas caracterizadas. Os resultados são claros e dignos de destaque; nenhuma progênie foi originada por apomixia!

A apomixia facultativa, na qual algumas progênies ou algumas plantas de algumas progênies seriam derivadas de reprodução sexuada, também não se verificou. A análise das 1042

plantas das progênies tipo B, onde poderia ter sido detectada, mostrou que todas as plantas apresentaram-se genotipicamente diferentes das plantas mães.

Este resultado, tão frontalmente contrário à conclusão de MONTEIRO (1980), que afirma ser *Stevia rebaudiana* uma espécie apomítica obrigatória, levantou a dúvida de que talvez as populações estudadas por MONTEIRO fossem diferentes da população analisada neste trabalho o que então explicaria tal disparidade nos resultados. Por essa razão, decidiu-se então estudar também progênies de plantas derivadas de uma das populações estudadas por MONTEIRO (1980).

C) Progênies de livre polinização oriundas do Instituto de Botânica de São Paulo, descendentes de uma das populações estudadas por MONTEIRO (1980). As plantas das progênies tiveram seus genótipos determinados para os locos *Aps*, *Est-2*, *Got-2*, *Lap* e *Pgm-2*, sendo no entanto desconhecido o genótipo da planta materna.

Nessas progênies observou-se a ocorrência dos alelos comuns às populações mantidas na Seção de Genética oriundas do Paraguai, não tendo sido observado nenhum alelo diferente. Nessa população, ocorreram os alelos A, C, D e E para *Aps*, A, B, C, D e E para *Est-2*, B, C, D e E para *Got-2*, A, B, C e D para *Lap* e A, C e D para *Pgm-2*, de ocorrência comum na população da Seção de Genética. Isso mostra serem essas populações comparáveis. Verificou-se através dos genótipos das plantas das progênies que,

à semelhança dos estudos anteriores e ao contrário da conclusão de MONTEIRO (1980), nenhuma das progênies se originou por apomixia obrigatória (Tabela 18). Observou-se ampla variabilidade genética dentro das progênies para os cinco locos (Aps, Est-2, Got-2, Lap e Pgm-2) estudados. Diversos alelos ocorreram normalmente em uma mesma progênie, fato que indica a ocorrência de fecundação cruzada. Esta situação está totalmente de acordo e confirma as conclusões para a população da Seção de Genética do IAC.

Resumindo os resultados do estudo da biologia da reprodução, foram analisadas 107 progênies, sendo que todas as progênies mostraram variabilidade aloenzímica, descartando a ocorrência de apomixia obrigatória. Nas 56 progênies em que poderia ter sido detectada apomixia facultativa, observou-se que isso também não ocorreu. A autofecundação foi uma exceção, indicativa que na espécie efetivamente opera um forte sistema de autoincompatibilidade corroborando BRUCHER (1974) e MONTEIRO (1980).

Definitivamente, de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii não é uma espécie apomítica obrigatória, nem mesmo apomítica facultativa. Ao contrário, trata-se de uma espécie que se reproduz sexualmente, quase que exclusivamente por fecundação cruzada. Visto a rara ocorrência de autofecundação a espécie deve ser considerada alógama.

5. CONCLUSÕES

- 1) A metodologia de eletroforese em gel de amido desenvolvida em folhas de *Stevia rebaudiana* permitiu a revelação de dez sistemas isoenzímicos: APS, EST, GOT, G6PDH, LAP, MDH, ME, PGI, PGM e PRX.
- 2) Os sistemas MDH, ME e G6PDH revelaram-se monomórficos numa amostra de 100 plantas da população estudada. APS, EST, GOT, LAP, PGI, PGM e PRX mostraram ampla variabilidade que foi estudada geneticamente.
- 3) Caracterizaram-se geneticamente nove locos: Aps, Est-1, Est-2, Got-2, Lap, Pgi, Pgm-1, Pgm-2 e Prx, para os quais foram identificados 38 alelos com migrações distintas e quatro alelos nulos que não apresentam atividade eletroforética. Esses locos e alelos se constituem nos primeiros descritos para a espécie.
- 4) Verificou-se que Pgm-1 e Pgm-2 estão ligados com valor de recombinação de 6,3 a 22,2 %. Este representa o primeiro grupo de ligação descrito em *Stevia rebaudiana*.

5) A análise genética de progênies utilizando locos isoenzímicos como marcadores genéticos revelou que ao contrário do descrito na literatura, nessa espécie não ocorre apomixia obrigatória nem tampouco facultativa. *Stevia rebaudiana* apresenta reprodução sexuada e predominantemente por fecundação cruzada visto a rara ocorrência de autofecundação. Pode portanto, ser considerada uma espécie alógama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R.W. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia*, Berkeley, 24(10):235-278, 1956.
- ALVAREZ, M. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: estado atual de conhecimento. Maringá, Universidade Estadual de Maringá (UEM). 1984. 118p. Monografia-mimeografado.
- ANGELUCCI, E. *O estevioside de plantas brasileiras de Stevia rebaudiana Bertoni e a potencialidade de seu emprego em alimentos. Ensaio em formulações hídricas e carbonatadas*. São Paulo, Universidade de São Paulo (USP), 1979. 112p. Tese (Doutorado).
- BERTONI, M.S. Le kaà-hê-é. Sa nature et ses propriétés. *Anales Científicos Paraguayos*, 1:1, 1905.
- BREWBAKER, J.L. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the Angiosperm. *American Journal of Botany*, Baltimore, 54:1069-1083, 1967.
- BREWER, J.H.; PESCE, A.J. & ASHWORTH, R.B. Electrophoresis. In: BREWER, J.M., PESCE, A.J. & ASHWORTH, R.B., eds. *Experimental techniques in biochemistry*. New Jersey, Prentice Hall Inc., 1974. p.128-160.
- BREWER, G.J. & SING, C.F. *An introduction to isoenzyme techniques*. New York, Academic Press, 1970. 186p.
- BRIQUET JUNIOR, R. *Lições de Genética*. Universidade Rural do Rio de Janeiro. Série Didática nº 2, 1961. 269p.
- BROWN, A.H.D.; BURDON, J.J. & JAROSZ, A.M. Isozyme analysis of plant mating systems. In: SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.M., eds. *Isoenzymes in plant biology*. Oregon, Dioscorides Press, 1989. p.73-86.

- BROWN, A.H.D. & ALLARD, R.W. Estimation of mating systems in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. *Genetics*, Baltimore, 66: 133-145, 1970.
- BRUCHER, H. Paraguays "Susstoff"-pflanze *Stevia rebaudiana*. *Naturwissenschaftliche, Rundschau*, 27(6):231-236, 1974.
- BUTLER, L. Heterogeneity of recombination values in the tomato. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, Ottawa, 10:886-892, 1968.
- BUTLER, L. Recombination values and their erros. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, Ottawa, 19:521-529, 1977.
- CARDY, B.J.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. & GOODMAN, M.M. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). *Inst. Stat. Mimeo. No. 1317R*, North Carolina State University, Raleigh, 1983.
- CRUDEN, W.R. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, New York, 31:32-46, 1977.
- DONALISIO, M.G.R.; DUARTE, F.R.; SOUZA, C.J. de; CASTRO, L.H.S.M. de & FORSTER, R. Triagem de herbicidas para *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. In: SEMINARIO SOBRE *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, II. Campinas, ITAL, 1982. *Resumos*. Seção IX. 1.
- ELLSTRAND, N.C. Multiple paternity within the fruits of the wild radish *Raphanus sativus*. *American Naturalist*, 123: 819-828, 1984.
- FELIPE, G.M. & LUCAS, N.M.C. Estudo da variabilidade dos frutos de *Stevia rebaudiana* Bert. *Hoehna*, São Paulo, 1: 95-105, 1971.
- FELIPPE, G.M. *Stevia rebaudiana* Bert.: uma revisão. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 29(11):1240-1248, 1977.
- FISHER, R.A. On a property connecting the X^2 measure of discrepancy with the method of maximum likelihood. *Atti del Congresso Internazionale dei Matematici* (Bologna), 6: 95-100, 1928.

- FRANKEL, R. & GALUN, E. *Pollination mechanisms, Reproduction and Plant Breeding*. FRANKEL, R.; GALL, G.A.E. & LINSKENS, H.F., eds. New York, Heidelberg, Berlin, Springer-Verlag, 1977. 281pp.
- FRYXELL, P.A. Mode of reproduction of higher plants. *The Botanical Review*, Bronx, 23(3):135-162, 1957.
- GIBBS, P.E.; MILNE, C. & VARGAS CARRILLO, M. Correlation between the breeding system and recombination index in the five species of *Senecio*. *New Phytologist*, Oxford, 75 (3): 619-626, 1975.
- GOODMAN, M.M. & STUBER, C.W. Maize. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J., eds. *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part B. Amsterdam, Elsevier, 1983. p.1-33.
- GOTTLIEB, L.D. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, St. Louis, 64:161-180, 1977.
- GRASSHOFF, J.L. Novelties in *Stevia* (Compositae:Eupatorieae). *Brittonia*, New York, 26:347-384, 1974.
- HARRICK, J.L. Analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.M., eds. *Isozymes in plant biology*. Oregon, Discorides Press, 1989. p. 87-105.
- HARRIS, H. Enzyme polymorphism in man. *Proceedings Royal Society (B)*, 164:298-310, 1966.
- HARRY, D.E. Inheritance and lineage of isozyme variants in incensecedar. *Journal of Heredity*, Washington, 77:261-266, 1986.
- HESLOP-HARRISON, Y. & SHIVANNA, K.R. Receptive surface of the Angiosperm stigma. *Annals of Botany*, London, 41:1233-1258, 1977.

- HUBBY, J.L. & LEWONTIN, R.C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, Baltimore, 54:577-587, 1966.
- HUNTER, R.L. & MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, Washington, 125:1294-1295, 1957.
- INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY-(IUB). Enzyme nomenclature 1978. New York, San Francisco, London, Academic Press, 1978. 606p.
- JARRELL, D.C.; ROOSE, M.L.; TRAUGH, S.N. & TRAUGH, R.S. A genetic map of *Citrus* based on the segregation of isozymes and RFLP's in an intergeneric cross. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 84: 49-56, 1982.
- JONES, T.W.A.; PICHERSKY, E. & GOTTLIEB, L.D. Enzyme activity in EMS-induced null mutations of duplicated genes encoding phosphoglucose isomerases in *Clarkia*. *Genetics*, Baltimore, 113:101-114, 1986.
- KAHLER, A.L. Inheritance and linkage of acid phosphatase locus *Acp4* in maize. *Journal of Heredity*, Washington, 74:239-246, 1983.
- KANEDA, N.; KASAI, R.; YAMASAKI, K & TANAKA, O. Chemical studies on sweet diterpene. Glucosides of *Stevia rebaudiana*: Conversion of stevioside into rebaudioside-A. *Chemical Pharmacological Bulletin*, 25(9):2466-2467, 1977.
- KING, R.M. & ROBINSON, H. Studies in the Compositae Eupatorieae VIII: Observations on the microstructure of *Stevia*. *Sida*, Dallas, 3:257-269, 1968.
- KING, R.M. & ROBINSON, H. Multiple forms in two species of the genus *Stevia* (Compositae). *Sida*, Dallas, 3:165-169, 1967.
- KING, R.M.; KYOS, D.W.; POWELL, A.M.; RAVEN, P.H. & ROBINSON, H. Chromosome number in Compositae XIII Eupatorieae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, St. Louis, 63:862-888, 1976.

- MANARA, W.; MANARA, N.T.F.; VEIGA, P. & TARRAGÓ, M.F.S. Relação entre microsporogenesis e fertilidade das sementes em *Stevia rebaudiana* Bert. *Revista Centro Ciências Rurais*, Santa Maria 11(2-3):133-138, 1981.
- MANARA, W.; VEIGA, P.; TARRAGÓ, M.F.S. & MANARA, N.T.F. *ESTEVIA-Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni - Aspectos do cultivo no Rio Grande do Sul. Boletim Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, RS, 1986. 24p.
- MARKERT, C.L. Biology of isozymes. *Bioscience*, Washington, 25(6): 365-368, 1975.
- MARKERT, C.L. & MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, 45:753-763, 1959.
- MARSHALL, D.R. & BROWN, A.H.D. Estimation of the level of apomixis in plant populations. *Heredity*, London, 32:321-333, 1974.
- MATHER, K. *The measurement of linkage in heredity*. First edition, London, Methuen e Co. LTD. 1938. 132p.
- MEDINA FILHO, H.P. & BALLVÉ, R.M.L. Protocolo laboratorial para preparação e corrida de géis de amido e revelação para isoenzimas vegetais. In: CURSO TEÓRICO-PRÁTICO DE ELETROFORESE; 5., Nova Odessa, 1989. Nova Odessa, Instituto de Zootecnia, 1989. 59p.
- MONTEIRO, R. *Taxonomia e biologia da reprodução em Stevia rebaudiana* Bert. Campinas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 1980. Tese (Mestrado).
- NELSON JR., O.E. & BURR, B. Biochemical genetics of higher plants. *Annal Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 24:493-518, 1973.
- NORDHEIM, E.V.; O'MALLEY, D.M. & GURIES, R.P. Estimation of recombination frequency in genetic linkage studies. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 66:313-321, 1983.

OFFICE OF RURAL DEVELOPMENT, S. KOREA. *Stevia*. Annual research report, 1981. Suweon, S. Korea, 1982.

QUIROS, C.F. & MORGAN, K. Peroxidase and leucine-aminopeptidase in diploid *Medicago* species closely related to alfalfa: multiple gene loci, multiple allelism, and linkage. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 60:221-228, 1981.

RAMSHAW, J.A.M.; COYNE, J.A. & LEWONTIN, R.C. The sensitivity of gel electrophoresis as a detector of genetic variation. *Genetics*, Baltimore, 93:1019-1037, 1979.

RICK, C.M. & FOBES, J.F. Peroxidase complex with concomitant anodal and cathodal variation in red-fruited tomato species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, 73:900-904, 1976.

RITLAND, K. Estimation of mating systems. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J., eds. *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part A. Amsterdam, Elsevier, 1983. p.289-302.

SAKAGUCHI, M. & KAN, T. As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni e o esteviosídeo. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 34(2):235-248, 1982.

SCANDALIOS, J.G. Isozymes in development and differentiation. *Annal Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 25:225-258, 1974.

SCHOEN, D.J. & CLEGG, M.T. Estimation of mating system parameters when events are correlated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, 81: 5258-5262, 1984.

SHANNON, L.M. Plant isoenzymes. *Annal Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 19:187-210, 1968.

SHAW, C.R. & PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochemical Genetics*, New York, 4:297-320, 1970.

- SHAW, D.V. & BROWN, A.H.D. Optimum number of marker loci for estimating outcrossing in plant populations. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 61:321-325, 1982.
- SHIELDS, C.R., ORTON, T.J. & STUBER, C.W. An outline of general resources needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissues. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J., eds. *Isozymes in plant genetics and breeding*, part A. Amsterdam, Elsevier, 1983. p.443-468.
- SHOCK, C.C. Rebaudi's *Stevia*: natural noncaloric sweeteners. *California Agriculture*, Sept.-Oct.:4-5, 1982.
- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochemical Journal*, London, 61:629-635, 1955.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. *Biometry*. W.H. Freeman, New York. 1981.
- STAUB, J.E.; KUPPER, R.S.; SCHUMAN, D.; WEHNER, T.C. & MAY, B. Electrophoretic variation and enzyme storage stability in cucumber. *Journal of the American Society for the Horticultural Science*, New York, 110(3):426-431, 1985.
- STEBBINS, G.L. Apomixis in the Angiosperms. *The Botanical Review*, Bronx, 7:507-542, 1941.
- SUITER, K.A.; WENDEL, J.F. & CASE, J.S. LINKAGE-1: a PASCAL computer program for the detection and analysis of genetic linkage. *Journal of Heredity*, Washington, 74:203-204, 1983.
- TANKSLEY, S.D. An efficient and economical design for starch gel electrophoresis. *Report of the Tomato Cooperative*, Davis, 29:37-38, 1979.
- TISSELIUS, A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans. Faraday Soc.*, London, 33:524-531, 1937.
- VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J., eds. *Isozymes in plant genetics and breeding*, part A. Amsterdam, Elsevier, 1983. p.469-516.

- WEEDEN, N.F. & GOTTLIEB, L.D. Distinguishing allozymes and isozymes of phosphoglucose isomerases by electrophoretic comparisons of pollen and somatic tissues. *Biochemical Genetics*, London, 17:287-296, 1979.
- WEEDEN, N.F. & WENDEL, J.F. Genetics of plant isozymes. In: SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.M., eds. *Isozymes in plant biology*. Oregon, Dioscorides Press, 1989. p.46-72.
- WENDEL, J.F. & WEEDEN, N.F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.M., eds. *Isozymes in plant biology*. Oregon, Dioscorides Press, 1989. p.5-45.

TABELA 1 - Relação dos genótipos parentais observados para nove sistemas isoenzímicos e os cruzamentos realizados para caracterização de locos.

CRUZAMENTO*	GENÓTIPOS PARENTAIS									
	♀	Aps	Est-1	Est-2	Got-2	Lap	Pgi	Pgm-1	Pgm-2	Prx
1	♀	DD	CC	CN	BC	CD	BB	BB	CC	DD
	♂	DD	CC	CN	BC	CD	BB	BB	CC	DD
2	♀	DE	CC	DD	CE	BB	BB	BB	CC	AA
	♂	DE	AA	BD	BC	CD	BC	BC	CD	CC
3	♀	CD	AA	AC	CC	BB	BB	BC	BD	AA
	♂	DE	AA	BD	BC	CD	BC	BC	CD	CC
4	♀	DN	—	AE	CC	DD	BB	BC	DD	CC
	♂	CD	—	DE	CC	BC	BB	BC	AC	CC
5	♀	CD	—	DE	CC	BC	BB	BC	AC	CC
	♂	DN	—	AE	CC	DD	BB	BC	DD	CC
6	♀	CC	BB	CD	AE	CD	BB	CC	DD	AD
	♂	DD	—	BC	BC	AB	BB	BC	CD	AA
7	♀	DD	—	BC	BC	AB	BB	BC	CD	AA
	♂	CC	BB	CD	AE	CD	BB	CC	DD	AD
8	♀	AD	CC	BC	CN	BB	BB	BC	BD	AB
	♂	CN	CD	CC	BB	CD	BB	BC	DN	CD
9	♀	CN	CD	CC	BB	CD	BB	BC	DN	CD
	♂	AD	CC	BC	CN	BB	BB	BC	BD	AB
10	♀	DD	CC	CN	BC	CD	BB	BB	CC	DD
	♂	CN	CC	DE	BN	BC	BB	CC	CD	AA

* Os pares de cruzamentos 4 e 5, 6 e 7, 8 e 9 correspondem a cruzamentos recíprocos, entre as mesmas plantas.

♀ Genitor Feminino, ♂ Genitor Masculino

TABELA 2 - Análise genética da segregação para caracterização do loco isoenzimico Aps através do teste de Qui-quadrado (χ^2).

CRUZAMENTO	GENÓTIPOS PARENTAIS ♀ x ♂	TOTAL PLANTAS	SEGREGAÇÃO NA PROGENIE		GL	χ^2	> P >
			OBSERVADA	ESPERADA			
2	DE x DE	42	DD : DE : EE (10) (20) (12)	1:2:1	2	0,286	0,90 - 0,80
3	CD x DE	145	CD : CE : DD : DE (34) (39) (39) (33)	1:1:1:1	3	0,848	0,90 - 0,80
1	DD x DD	58	DD (58)	100%			
6	CC x DD	99	CD (99)	100%			
7	DD x CC	70	CD (70)	100%			

Nível de significância do χ^2 : $p=0,05$

TABELA 3 - Análise genética da segregação para caracterização do loco isoenzimico Est-1 através do teste de Qui-quadrado (χ^2).

CRUZAMENTO	GENÓTIPOS PARENTAIS ♀ x ♂	TOTAL PLANTAS	SEGREGAÇÃO NA PROGENIE		GL	χ^2	> P >
			OBSERVADA	ESPERADA			
8	CC x CD	71	CC : CD (35) (36)	1:1	1	0,014	0,95 - 0,90
9	CD x CC	52	CC : CD (29) (23)	1:1	1	0,692	0,50 - 0,30
				χ^2 Heterogeneidade	1	0,502	0,50 - 0,30
1	CC x CC	30	CC (30)	100%			
3	AA x AA	100	AA (100)	100%			

Nível de significância do χ^2 : P=0,05

TABELA 4 - Análise genética da segregação para caracterização do loco isoenzimico Est-2 através do teste de Qui-quadrado (χ^2).

CRUZAMENTO	GENÓTIPOS PARENTAIS ♀ x ♂	TOTAL PLANTAS	SEGREGAÇÃO NA PROGENIE		GL	χ^2	> P >
			OBSERVADA	ESPERADA			
2	DD x BD	42	BD : DD (27) (15)	1:1	1	2,880 ^y	0,10 - 0,05
8	BC x CC	62	BC : CC (30) (32)	1:1	1	0,065	0,80 - 0,70
9	CC x BC	48	BC : CC (18) (30)	1:1	1	2,520	0,20 - 0,10
				χ^2 Heterogeneidade	1	0,803	0,50 - 0,30
3	AC x BD	140	AB : AD : BC : CD (32) (41) (40) (27)	1:1:1:1	3	3,829	0,30 - 0,20
6	CD x BC	98	BC : CC : BD : CD (28) (25) (24) (21)	1:1:1:1	3	1,020	0,80 - 0,70
7	BC x CD	70	BC : CC : BD : CD (15) (16) (17) (22)	1:1:1:1	3	1,657	0,70 - 0,50
				χ^2 Heterogeneidade	3	2,581	0,50 - 0,30
4	AE x DE	22	AD : AE : DE : EE (9) (7) (4) (2)	1:1:1:1	3	5,273	0,20 - 0,10
5	DE x AE	61	AD : AE : DE : EE (21) (12) (17) (11)	1:1:1:1	3	4,246	0,30 - 0,20
				χ^2 Heterogeneidade	3	2,351	0,50 - 0,30

Nível de significância do χ^2 : $p=0,05$ ^y Com correção de Yates

TABELA 5 - Análise genética da segregação para caracterização do loco Got-2 através do teste de Qui-quadrado (χ^2).

CRUZAMENTO	GENÓTIPOS PARENTAIS ♀ x ♂	TOTAL PLANTAS	SEGREGAÇÃO NA PROGENIE		GL	χ^2	> P >
			OBSERVADA	ESPERADA			
3	CC x BC	150	CC : BC (80) (70)	1:1	1	0,669	0,50 - 0,30
1	BC x BC	55	BB : BC : CC (15) (21) (19)	1:2:1	2	3,655	0,20 - 0,10
2	CE x BC	42	BC : CC : BE : CE (10) (9) (11) (12)	1:1:1:1	3	0,476	0,95 - 0,90
6	AE x BC	97	AB : AC : BE : CE (25) (29) (23) (20)	1:1:1:1	3	1,763	0,70 - 0,50
7	BC x AE	70	AB : AC : BE : CE (20) (17) (13) (20)	1:1:1:1	3	1,886	0,70 - 0,50
				χ^2 Heterogeneidade	3	2,098	0,70 - 0,50
4	CC x CC	24	CC (24)	100%			
5	CC x CC	64	CC (64)	100%			

Nível de significância do χ^2 : P=0,05

TABELA 6 - Análise genética da segregação para caracterização do loco isoenzimico Lap através do teste de Qui-quadrado (χ^2).

CRUZAMENTO	GENÓTIPOS PARENTAIS ♀ x ♂	TOTAL PLANTAS	SEGREGAÇÃO NA PROGENIE		GL	χ^2	> P >
			OBSERVADA	ESPERADA			
2	BB x CD	40	BC : BD (21) (19)	1:1	1	0,100	0,80 - 0,70
3	BB x CD	144	BC : BD (79) (65)	1:1	1	1,361	0,30 - 0,20
8	BB x CD	68	BC : BD (30) (38)	1:1	1	0,941	0,80 - 0,70
9	CD x BB	50	BC : BD (20) (30)	1:1	1	2,000	0,20 - 0,10
				χ^2 Heterogeneidade	3	4,145	0,30 - 0,20
4	DD x BC	22	BD : CD (9) (13)	1:1	1	0,727	0,50 - 0,30
5	BC x DD	61	BD : CD (34) (27)	1:1	1	0,803	0,50 - 0,30
				χ^2 Heterogeneidade	1	1,422	0,30 - 0,20
1	CD x CD	52	CC : CD : DD (10) (29) (13)	1:2:1	2	1,038	0,70 - 0,50
10	CD x BC	39	BC : CC : BD : CD (12) (12) (6) (9)	1:1:1:1	3	2,538	0,50 - 0,30
6	CD x AB	99	AC : BC : AD : BD (20) (31) (29) (19)	1:1:1:1	3	4,556	0,30 - 0,20
7	AB x CD	66	AC : BC : AD : BD (13) (18) (17) (18)	1:1:1:1	3	1,030	0,80 - 0,70
				χ^2 Heterogeneidade	3	1,495	0,70 - 0,50

Nível de significância do χ^2 : P=0,05

TABELA 7 - Análise genética da segregação para caracterização do loco isoenzimico Pgi através do teste de Qui-quadrado (χ^2).

CRUZAMENTO	GENÓTIPOS PARENTAIS ♀ x ♂	TOTAL PLANTAS	SEGREGAÇÃO NA PROGENIE		GL	χ^2	> P >
			OBSERVADA	ESPERADA			
2	BB x BC	42	BB : BC (18) (24)	1:1	1	0,857	0,50 - 0,30
3	BB x BC	122	BB : BC (69) (53)	1:1	1	2,098	0,20 - 0,10
				χ^2 Heterogeneidade	1	2,345	0,20 - 0,10
4	BB x BB	20	BB (BB)	100%			

Nível de significância do χ^2 : P=0,05

TABELA 8 - Análise genética da segregação para caracterização do loco isoenzimico Pgm-1 através do teste de Qui-quadrado (χ^2).

CRUZAMENTO	GENÓTIPOS PARENTAIS ♀ x ♂	TOTAL PLANTAS	SEGREGAÇÃO NA PROGENIE		GL	χ^2	> P >
			OBSERVADA	ESPERADA			
2	BB x BC	40	BC : BB (16) (24)	1:1	1	1,600	0,30 - 0,20
6	CC x BC	64	BC : CC (35) (29)	1:1	1	0,563	0,50 - 0,30
7	BC x CC	61	BC : CC (22) (39)	1:1	1	4,196 ^v	0,05 - 0,02*
				χ^2 Heterogeneidade	2	4,171	0,20 - 0,10
3	BC x BC	145	BB : BC : CC (35) (69) (41)	1:2:1	2	0,834	0,70 - 0,50
4	BC x BC	22	BB : BC : CC (7) (9) (6)	1:2:1	2	0,400	0,90 - 0,80
5	BC x BC	60	BB : BC : CC (15) (32) (13)	1:2:1	2	0,818	0,70 - 0,50
8	BC x BC	60	BB : BC : CC (14) (29) (17)	1:2:1	2	0,367	0,90 - 0,80
9	BC x BC	48	BB : BC : CC (16) (21) (11)	1:2:1	2	1,792	0,50 - 0,30
				χ^2 Heterogeneidade	8	3,841	0,90 - 0,80
1	BB x BB	15	BB (15)	100%			
10	BB x CC	13	BC (13)	100%			

Nível de significância do χ^2 : $p=0,05$ * Significativo para $P=0,05$ ^v Com correção de Yates

TABELA 9 - Análise genética da segregação para caracterização do loco isoenzimico Pgm-2 através do teste de Qui-quadrado (χ^2).

CRUZAMENTO	GENÓTIPOS PARENTAIS ♀ x ♂	TOTAL PLANTAS	SEGREGAÇÃO NA PROGENIE		GL	χ^2	> P >
			OBSERVADA	ESPERADA			
10	CC x CD	39	CC : CD (24) (15)	1:1	1	2,077	0,20 - 0,10
2	CC x CD	41	CC : CD (16) (25)	1:1	1	1,976	0,20 - 0,10
6	DD x CD	99	DD : CD (47) (52)	1:1	1	0,253	0,70 - 0,50
7	CD x DD	60	DD : CD (24) (36)	1:1	1	2,400	0,20 - 0,10
				χ^2 Heterogeneidade	3	5,496	0,20 - 0,10
4	DD x AC	22	AD : CD (12) (10)	1:1	1	0,182	0,70 - 0,50
5	AC x DD	61	AD : CD (35) (26)	1:1	1	1,328	0,30 - 0,20
				χ^2 Heterogeneidade	1	0,052	0,90 - 0,80
3	BD x CD	146	BC : BD : CD : DD (45) (38) (31) (32)	1:1:1:1	3	3,425	0,20 - 0,10
1	CC x CC	26	CC (26)	100%			

Nível de significância do χ^2 : P=0,05

TABELA 10 - Análise genética da segregação para caracterização do loco isoenzimico Prx através do teste de Qui-quadrado (χ^2).

CRUZAMENTO	GENÓTIPOS PARENTAIS ♀ x ♂	TOTAL PLANTAS	SEGREGAÇÃO NA PROGENIE		GL	χ^2	> P >
			OBSERVADA	ESPERADA			
6	AD x AA	91	AD : AA (40) (51)	1:1	1	1,330	0,30 - 0,20
7	AA x AD	33	AD : AA (13) (20)	1:1	1	1,485	0,30 - 0,20
				χ^2 Heterogeneidade	1	0,206	0,70 - 0,50
8	AB x CD	59	AC : AD : BC : BD (11) (21) (15) (12)	1:1:1:1	3	4,119	0,30 - 0,20
9	CD x AB	47	AC : AD : BC : BD (12) (16) (11) (8)	1:1:1:1	3	2,787	0,50 - 0,30
				χ^2 Heterogeneidade	3	6,225	0,20 - 0,10
4	CC x CC	19	CC (19)	100%			
5	CC x CC	14	CC (14)	100%			
10	DD x AA	12	AD (12)	100%			

Nível de significância do χ^2 : P=0,05

TABELA 11 - Análises genéticas da segregação para caracterização de alelos nulos dos locos Aps, Est-2, Got-2 e Pgm-2.

LOCO	CRUZAMENTO	GENÓTIPOS PARENTAIS ♀ x ♂	TOTAL PLANTAS	SEGREGAÇÃO NA PROGENIE		GL	χ^2	> P >
				OBSERVADA	ESPERADA			
Aps	10	DD x CN	36	CD : DN (20) (16)	1:1	1	0,444	0,70 - 0,50
	4	DN x CD	22	CD : CN : DD+DN (5) (2) (15)	1:2:1	2	3,727	0,20 - 0,10
	5	CD x DN	60	CD : CN : DD+DN (14) (18) (28)	1:2:1	2	0,800	0,20 - 0,10
					χ^2 Heterogeneidade	2	4,305	0,20 - 0,10
	8	AD x CN	62	AC : AN : CD : DN (10) (12) (20) (20)	1:1:1:1	3	5,355	0,20 - 0,10
	9	CN x AD	47	AC : AN : CD : DN (15) (11) (13) (8)	1:1:1:1	3	2,277	0,70 - 0,50
				χ^2 Heterogeneidade	3	5,549	0,20 - 0,10	
Est-2	1	CN x CN	57	CC+CN : NN (44) (13)	3:1	1	0,101	0,80 - 0,70
	10	CN x DE	38	CD : CE : DN : EN (11) (12) (7) (8)	1:1:1:1	3	1,789	0,70 - 0,50
Got-2	8	CN x BB	72	BC : BN (39) (33)	1:1	1	0,500	0,50 - 0,30
	9	BB x CN	52	BC : BN (29) (23)	1:1	1	0,692	0,50 - 0,30
					χ^2 Heterogeneidade	1	0,030	0,90 - 0,80
	10	BC x BN	38	BB+BN : BC : CN (20) (6) (12)	1:2:1	2	2,000	0,50 - 0,30
Pgm-2	8	BD x DN	68	BD : BN : DD+DN (17) (18) (33)	1:1:2	2	0,088	0,98 - 0,95
	9	DN x BD	50	BD : BN : DD+DN (10) (11) (29)	1:1:2	2	1,320	0,70 - 0,50
					χ^2 Heterogeneidade	2	1,034	0,70 - 0,50

Nível de significância do χ^2 : P=0,05

TABELA 12 - Lote para cruzamentos ao acaso entre oito plantas heterozigóticas ⁽¹⁾ para alelos nulos (N) de Bot-2, Aps e Est-2 e as progênies resultantes desses cruzamentos.

LOTE DE CRUZAMENTO GENÓTIPOS			PROGÊNIE PLANTAS COM GENÓTIPO NN			TOTAL PLANTAS NA PROGÊNIE
Got-2	Aps	Est-2	Got-2	Aps	Est-2	
DN	DN	DN	8	3	3	38
DN	DN	EN	2	3	—	23
DN	CN	DN	2	—	—	8
CN	DN	BC	—	—	—	1
CN	DN	BC	1	1	—	5
CN	AN	BC	—	1	—	2
CN	AN	CC	2	4	—	16
CN	CD	BC	1	—	—	10
TOTAL			16	12	3	103

(¹): Essas 8 plantas foram escolhidas entre plantas das progênies dos cruzamentos 9 e 10 (Tabela 1).

TABELA 13 - Significância do teste de Qui-quadrado (χ^2) para a segregação independente entre 31 pares de locos isoenzimicos.

LOCOS	CRUZAMENTO ⁽¹⁾	Nº PLANTAS ⁽²⁾	SIGNIFICÂNCIA χ^2 ⁽³⁾
Aps Est-1	COMB 4,5	108	NS
Aps Est-2	2; 3; 10; COMB 4,5; COMB 6,7; COMB 8,9	411	NS
Aps Got-2	2; 3; 10; COMB 8,9	338	NS
Aps Lap	2; 3; 10; COMB 4,5; COMB 8,9	406	NS
Aps Pgi	2; 3	163	NS
Aps Pga-1	2; 3; COMB 4,5; COMB 8,9	361	NS
Aps Pga-2	2; 3; 10; COMB 4,5; COMB 8,9	411	NS
APB PRX	COMB 8,9	92	***
Est-1 Lap	COMB 8,9	117	NS
Est-1 Pga-1	COMB 8,9	108	NS
Est-1 Prx	COMB 8,9	105	NS
Est-2 Got-2	2; 3; 10; COMB 6,7; COMB 8,9	504	NS
Est-2 Lap	2; 3; 10; COMB 4,5; COMB 6,7	468	† (COMB 4,5)
Est-2 Pgi	2; 3	159	NS
Est-2 Pga-1	2; 3; COMB 4,5; COMB 6,7; COMB 8,9	486	NS
Est-2 Pga-2	2; 3; 10; COMB 4,5; COMB 6,7; COMB 8,9	570	NS
Est-2 Prx	COMB 6,7; COMB 8,9	217	NS
Got-2 Lap	1; 2; 3; COMB 6,7	382	NS
Got-2 Pgi	2; 3	166	NS
Got-2 Pga-1	2; 3; COMB 6,7	314	NS
Got-2 Pga-2	2; 3; COMB 6,7	351	NS
Got-2 Prx	COMB 6,7; COMB 8,9	230	NS
Lap Pgi	2; 3	158	NS
Lap Pga-1	2; 3; COMB 4,5; COMB 6,7; COMB 8,9	504	NS
Lap Pga-2	2; 3; 10; COMB 4,5; COMB 6,7; COMB 8,9	584	NS
Lap Prx	COMB 6,7; COMB 8,9	226	† (TODOS)
Pgi Pga-1	2; 3	160	NS
Pgi Pga-2	2; 3	162	NS
Pga-1 Pga-2	2; 3; COMB 4,5; COMB 6,7; COMB 8,9	496	*** (TODOS)
Pga-1 Prx	COMB 8,9	99	NS
Pga-2 Prx	COMB 8,9	104	NS

(¹) São indicados os cruzamentos analisados a partir da Tabela 1.

(²) Número total de plantas das progênies de cada cruzamento.

(³) Significância de χ^2 : NS=não significativo à $p=0,05$; †= significativo à $p=0,05$ e ***=significativo à $p=0,01$.

TABELA 14 - Decomposição do Qui-quadrado (χ^2) total da segregação conjunta e os desvios da hipótese de independência para os pares de locos isoenzímicos indicados pela Tabela 13 como possivelmente ligados.

LOCOS	CRUZAMENTO	Nº PLANTAS	χ^2 (GL)	χ^2 Loco1 (GL)	χ^2 Loco2 (GL)	χ^2 Ligação (GL)
Pgm-1/Pgm-2	2	40	26,600*** (3)	1,600 ^{nm} (1)	1,976 ^{nm} (1)	22,424*** (1)
	3	144	196,817*** (11)	0,834 ^{nm} (2)	3,425 ^{nm} (3)	192,558*** (6)
	COMB 4 e 5	82	23,707*** (5)	0,220 ^{nm} (2)	1,458 ^{nm} (1)	22,029*** (2)
	COMB 6 e 7	123	78,138*** (3)	0,962 ^{nm} (1)	1,818 ^{nm} (1)	75,352*** (1)
	COMB 8 e 9	107	70,421*** (8)	0,667 ^{nm} (2)	0,373 ^{nm} (2)	69,381*** (4)
	TOTAL	496				
Aps/Prx	COMB 8 e 9	92	33,565*** (15)	2,083 ^{nm} (3)	6,226 ^{nm} (3)	25,256** (9)
Est-2/Lap	COMB 4 e 5	83	14,446* (7)	7,169 ^{nm} (3)	0,108 ^{nm} (1)	7,169 ^{nm} (3)
Lap/Prx	COMB 6 e 7	124	15,097* (7)	4,091 ^{nm} (3)	2,613 ^{nm} (1)	8,393* (3)
	COMB 8 e 9	102	15,961* (7)	2,746 ^{nm} (1)	6,226 ^{nm} (3)	6,989 ^{nm} (3)
	TOTAL	226				

*, **, ***, significativo para P=0,05, 0,001 e <0,001, respectivamente.

^{nm} não significativo para P=0,05.

TABELA 15 - Estimativas⁽¹⁾ do valor de recombinação (R) e do erro padrão (EP), para os pares de locos que apresentaram valores de Qui-quadrado significativos (Tabela 14) na análise de segregação conjunta.

LOCO	CRUZAMENTO NR	R ± EP
Pga-1/Pga-2	2	0,115 ± 0,050
	3	0,063 ± 0,015
	COMB 4,5	0,136 ± 0,053
	COMB 6,7	0,096 ± 0,027
	COMB 8,9	0,222 ± 0,033
Aps/Prx	COMB 8,9	0,332 ± 0,035
Lap/Prx	COMB 6,7	0,385 ± 0,044

⁽¹⁾ Estimativas pelo método da Máxima Verossimilhança.

TABELA 16 - Origem reprodutiva de progênies de livre polinização de plantas da população mantida na Seção de Genética avaliadas para, pelo menos, quatro locos isoenzimicos.

IDENTIFICAÇÃO PROGÊNIE	Nº PLANTAS ANALISADAS	LOCOS ANALISADOS	ORIGEM APOMIXIA	REPRODUTIVA ⁽¹⁾ REPRODUÇÃO SEXUADA
2-	8	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2,	-	+
3-	8	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2,	-	+
4-	8	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2,	-	+
5-	8	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2,	-	+
6-	11	Aps, Est-2, Got-2, Pge-1, Pge-2, Prx	-	+
13-	20	Aps, Est-2, Got-2, Pge-1, Pge-2, Prx	-	+
15-	18	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2, Prx	-	+
40-	15	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2,	-	+
113-	10	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2,	-	+
126-	25	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2,	-	+
147-	10	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2, Lap	-	+
197-	4	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2, Lap, Prx	-	+
210-	10	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2, Lap,	-	+
229-	10	Aps, Est-2, Got-2, Pge-1, Pge-2, Lap	-	+
253-	10	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2, Lap	-	+
265-	10	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2, Lap	-	+
274-	5	Aps, Est-1, Est-2, Got-2, Pge-2,	-	+
335-	10	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2, Lap	-	+
391-	20	Aps, Est-1, Est-2, Got-2, Pge-2, Lap	-	+
400-	10	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2, Lap	-	+
444-	10	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2, Lap	-	+
445-	10	Aps, Est-2, Got-2, Lap, Pgi, Pge-2, Prx	-	+
452-	10	Aps, Est-2, Lap, Pgi, Pge-2,	-	+
486-	15	Aps, Est-1, Est-2, Got-2, Pge-2	-	+
520-	20	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2, Prx	-	+
522-	18	Aps, Est-2, Got-2, Pge-2, Prx	-	+
524-	15	Aps, Est-2, Got-2, Lap, Pgi, Pge-2, Prx	-	+
529-	20	Est-1, Est-2, Got-2, Lap, Pge-1, Pge-2,	-	+
530-	8	Aps, Est-1, Est-2, Got-2, Pge-1, Pge-2, Prx	-	+
531-	20	Aps, Got-2, Lap, Pge-2	-	+

⁽¹⁾ + = variabilidade na progênie (reprodução sexuada).

- = ausência de variabilidade (apomixia obrigatória).

TABELA 17 - Origem reprodutiva das plantas derivadas de cruzamentos dirigidos através da análise genética de ao menos quatro locos isoenzimáticos.

LOTE DE CRUZAMENTO	Nº PLANTAS NO GRUPO	LOCOS ANALIZADOS	Nº PLANTAS NAS PROGENIES	ORIGEM REPRODUTIVA		
				Nº PLANTAS APOMIXIA	Nº PLANTAS AUTOFECUNDAÇÃO	Nº PLANTAS CRUZAMENTO
I	2	Aps,Est-2,Bot-2,Pgm-2	6	0	0	6
II	3	Aps,Est-2,Bot-2,Pgm-2	27	0	0	7
III	6	Aps,Est-2,Bot-2,Pgm-1,Pgm-2	39	0	0	39
IV	7	Aps,Est-2,Bot-2,Pgm-1,Pgm-2,Prx	102	0	0	102
V	6	Aps,Est-2,Bot-2,Pgm-2	15	0	0	15
VI	5	Aps,Est-2,Bot-2,Pgm-2	19	0	0	19
VII	3	Aps,Est-1,Est-2,Bot-2	17	0	0	17
VIII	5	Aps,Est-2,Bot-2,Pgm-1,Pgm-2,Prx	72	0	0	72
IX	3	Aps,Est-2,Pgm-2,Pgi,Prx	12	0	0	12
X	4	Aps,Est-2,Bot-2,Pgm-2,Pgi	4	0	0	4
XI	4	Aps,Est-2,Bot-2,Pgm-2,Pgi	9	0	0	9
XII	9	Aps,Est-2,Bot-2,Lap,Prx	108	0	0	108
XIII	2	Aps,Est-2,Bot-2,Lap	172	0	1	171
XIV	2	Est-2,Bot-2,Lap,Pgm-1,Prx	61	0	10	51
XV	2	Aps,Est-2,Lap,Pgm-2	87	0	3	84
XVI	2	Est-1,Est-2,Lap,Pgm-1,Prx	120	0	0	120
XVII	2	Est-1,Bot-2,Lap,Prx	42	0	0	42
XVIII	2	Aps,Est-2,Lap,Pgi,Pgm-2,Prx	150	0	0	150
Totais	56		1042	0	14	1028

TABELA 18 - Origem reprodutiva de progênies dos descendentes da população estudada por MONTEIRO (1980) avaliados para Aps, Est-2, Got-2, Lap e Pgm-2.

IDENTIFICAÇÃO PROGÊNIE	Nº PLANTAS ANALISADAS	ORIGEM APOMIXIA	REPRODUTIVA ⁽¹⁾ REPRODUÇÃO SEXUADA
IB1-1	10	-	+
IB1-5	10	-	+
IB2-2	4	-	+
IB2-3	7	-	+
IB2-4	2	-	+
IB2-5	9	-	+
IB2-6	6	-	+
IB2-7	3	-	+
IB2-13	10	-	+
IB2-14	10	-	+
IB2-17	10	-	+
IB3-5	2	-	+
IB3-7	10	-	+
IB3-10	10	-	+
IB3-11	8	-	+
IB3-12	10	-	+
IB4-2	2	-	+
IB4-3	3	-	+
IB4-4	2	-	+
IB4-6	5	-	+
IB4-11	2	-	+

(1) + = variabilidade na progênie (reprodução sexuada)
 - = ausência de variabilidade (apomixia obrigatória).

FIGURA 1 - Aps

Diagrama representando as bandas e as migrações relativas ao fronte (Rf's) dos alelos A, B, C, D, E, F e os diversos genótipos heterozigóticos (AB,...,EF).

Foto de géis mostrando as regiões de resolução, alguns genótipos e segregação da progênie N° 8 (AD x CN).

Aps

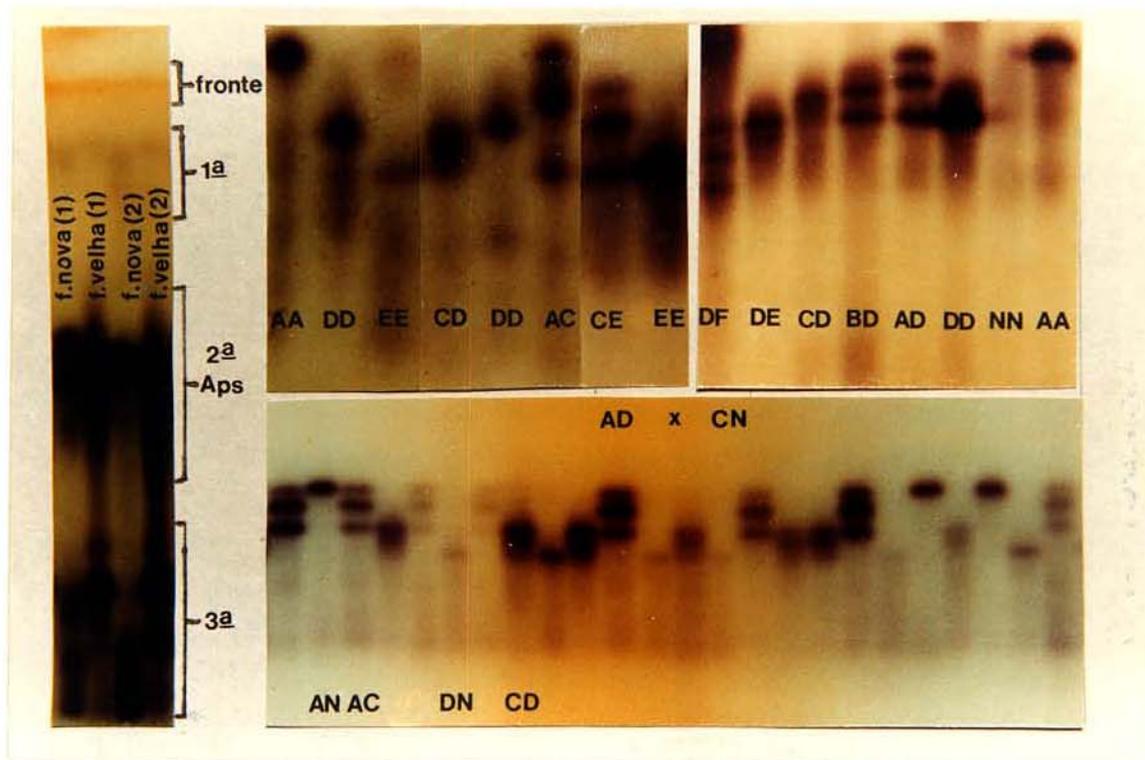
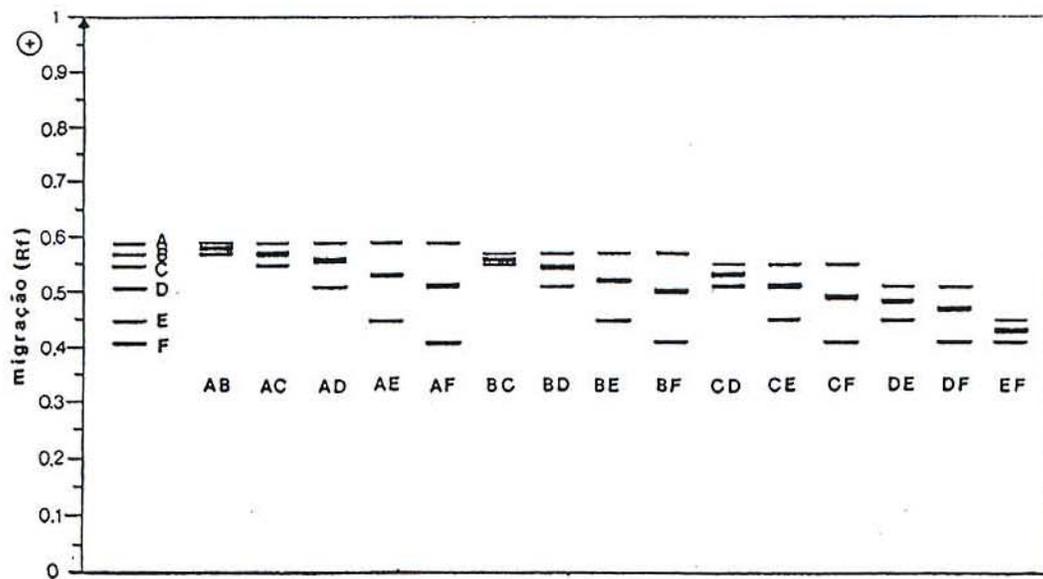


FIGURA - 2 Est-1 e Est-2

Diagrama mostrando as bandas e as migrações relativas (Rf's) dos alelos A, B, C, D do loco Est-1 e dos alelos A, B, C, D, E do loco Est-2 e os diversos genótipos heterozigóticos (AB,...,DE) para esses locos.

Foto de géis mostrando as regiões de resolução, alguns genótipos e segregação da progênie N° 10 para Est-2 (CN x DE) e da progênie N° 8 para Est-1 (CC x CD) e Est-2 (BC x CC).

Est-1

Est-2

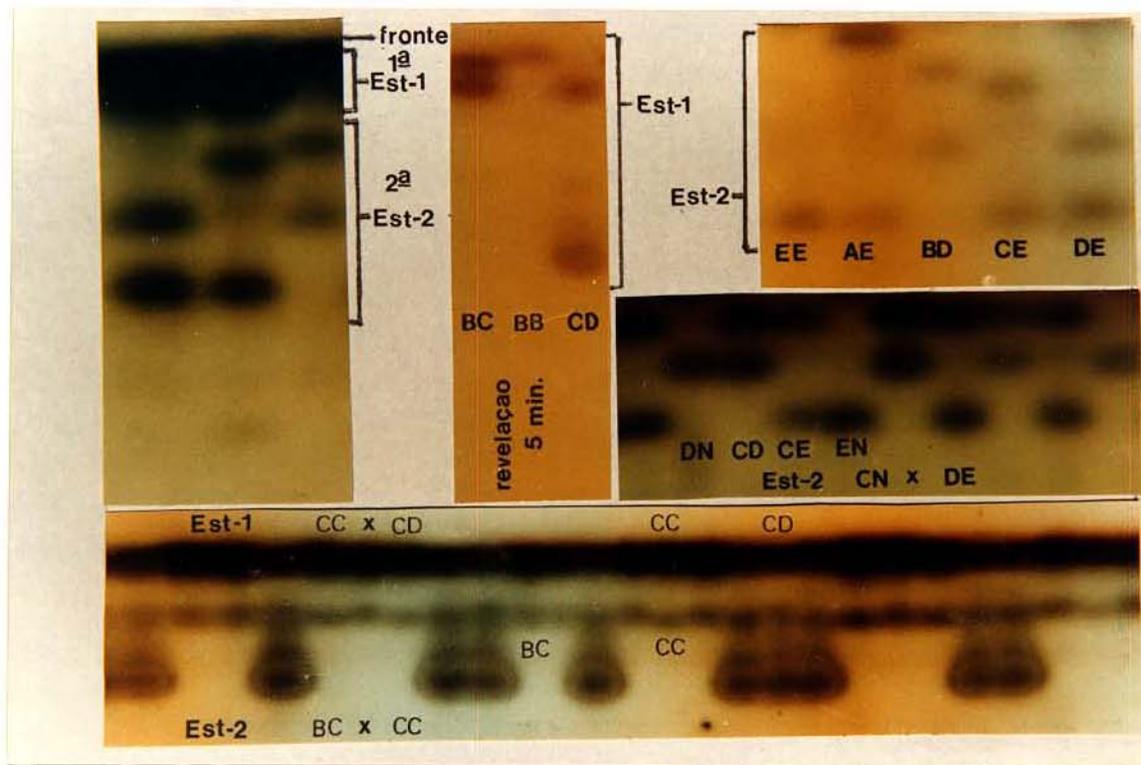
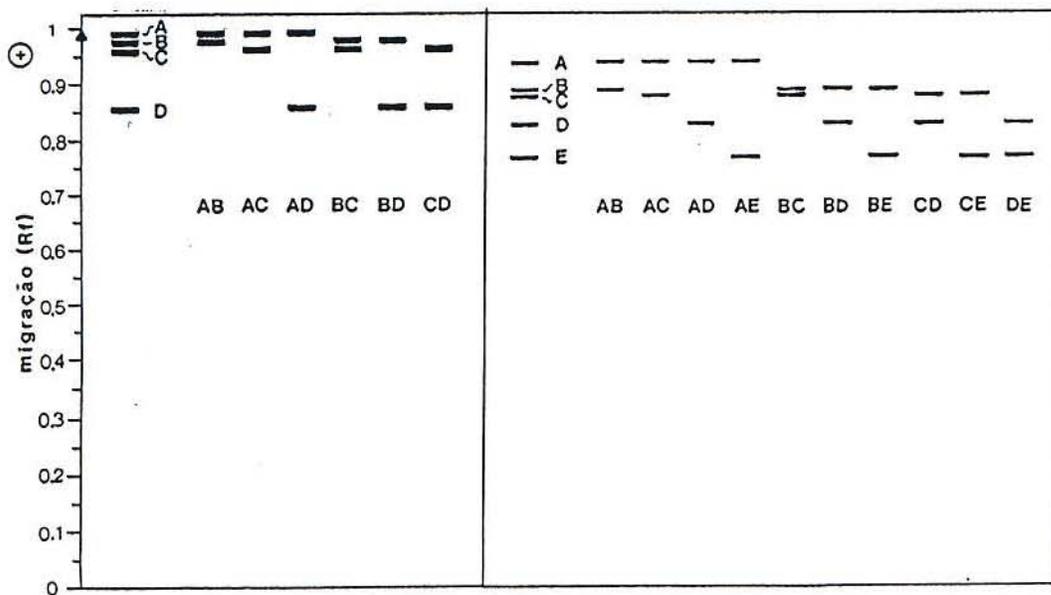


FIGURA 3 - Got-2

Diagrama representando as bandas e as migrações relativas ao fronte (Rf's) dos alelos A, B, C, D, E e os diversos genótipos heterozigóticos (AB,...,DE).

Foto de géis mostrando as regiões de resolução, alguns genótipos e segregação da progênie N° 6 (AE x BC).

Got-2

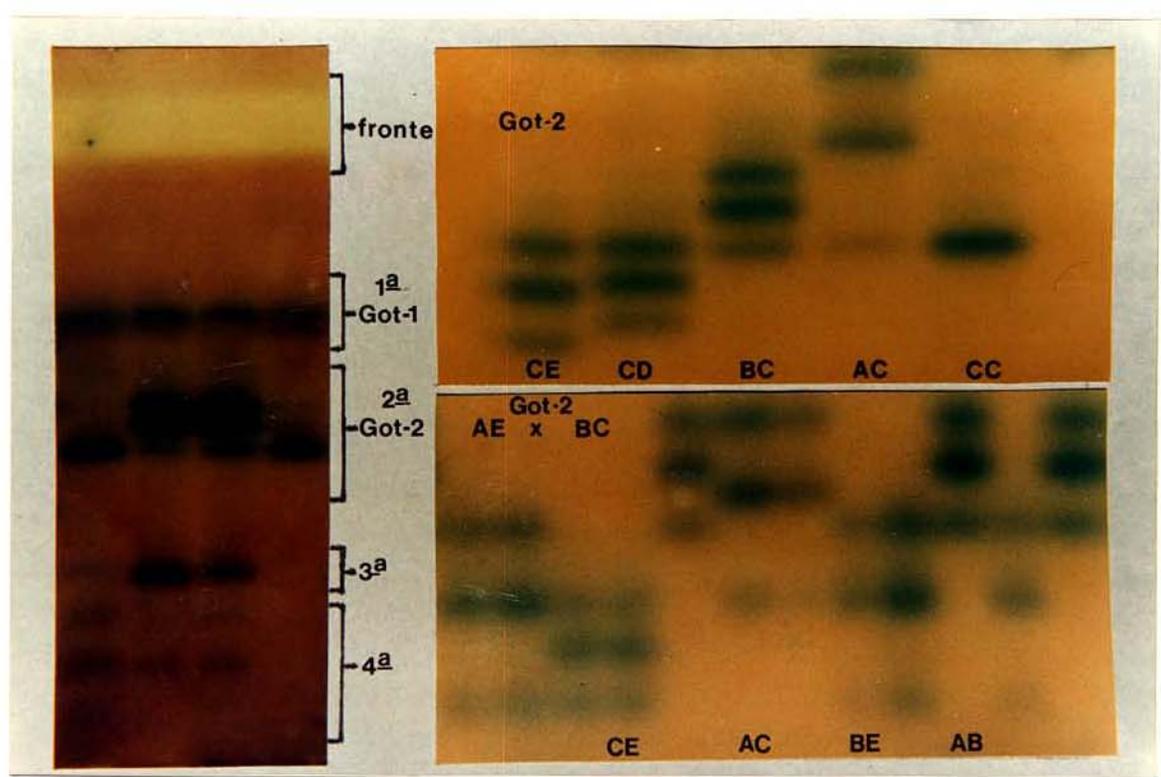
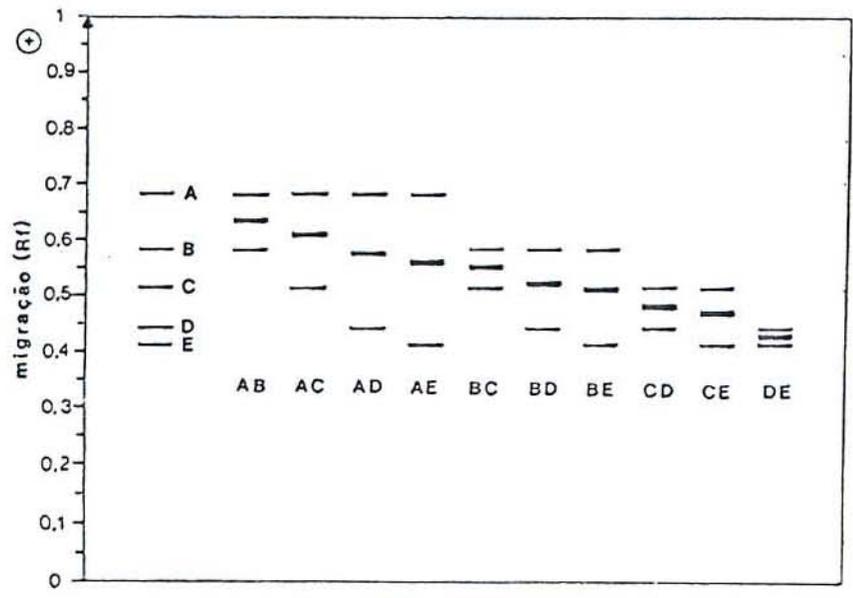


FIGURA 4 - Lap

Diagrama representando as bandas e as migrações relativas ao fronte (Rf's) dos alelos A, B, C, D e os diversos genótipos heterozigóticos (AB,...,CD).

Foto de géis mostrando as regiões de resolução, alguns genótipos e segregação da progênie N° 1 (CD x CD).

Lap

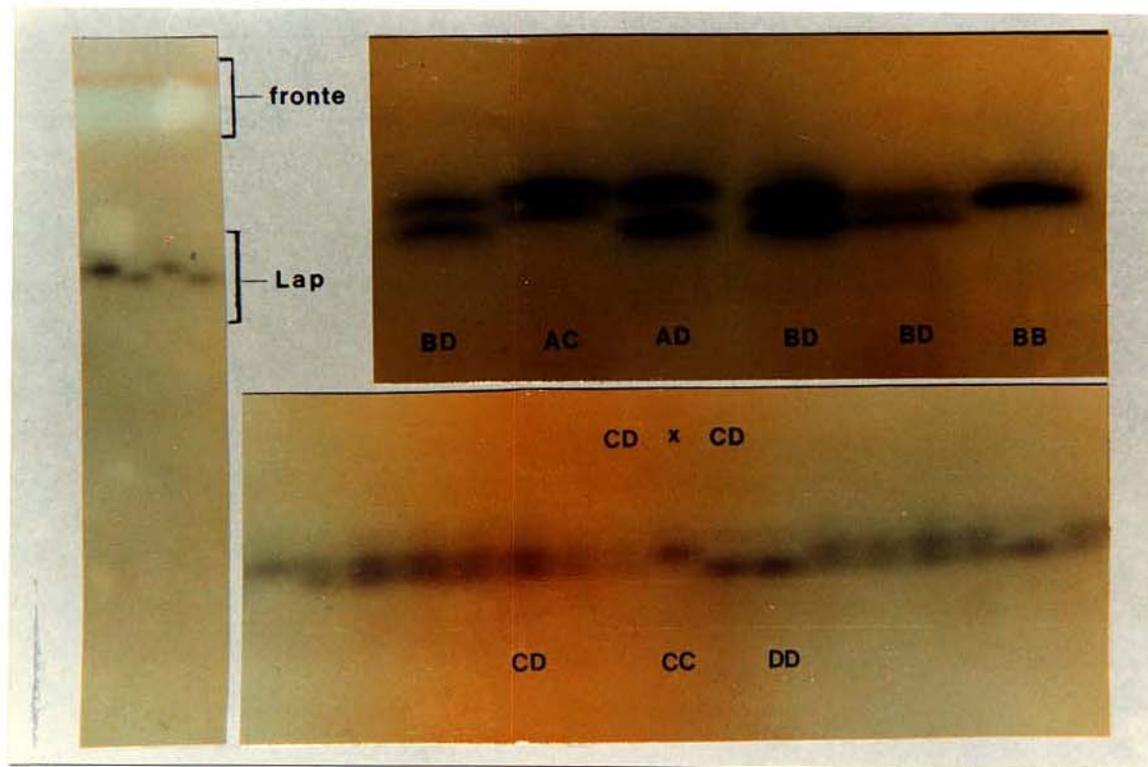
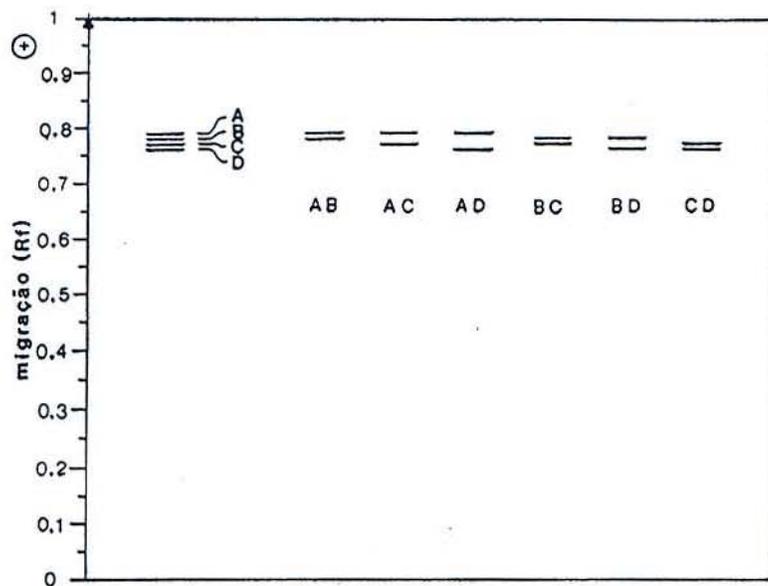


FIGURA 5 - Pgi

Diagrama representando as bandas e as migrações relativas ao fronte (Rf's) dos alelos A, B, C e os diversos genótipos heterozigóticos (AB, AC, BC).

Foto de géis mostrando as regiões de resolução, alguns genótipos e segregação da progênie N° 3 (BC x BB).

Pgi

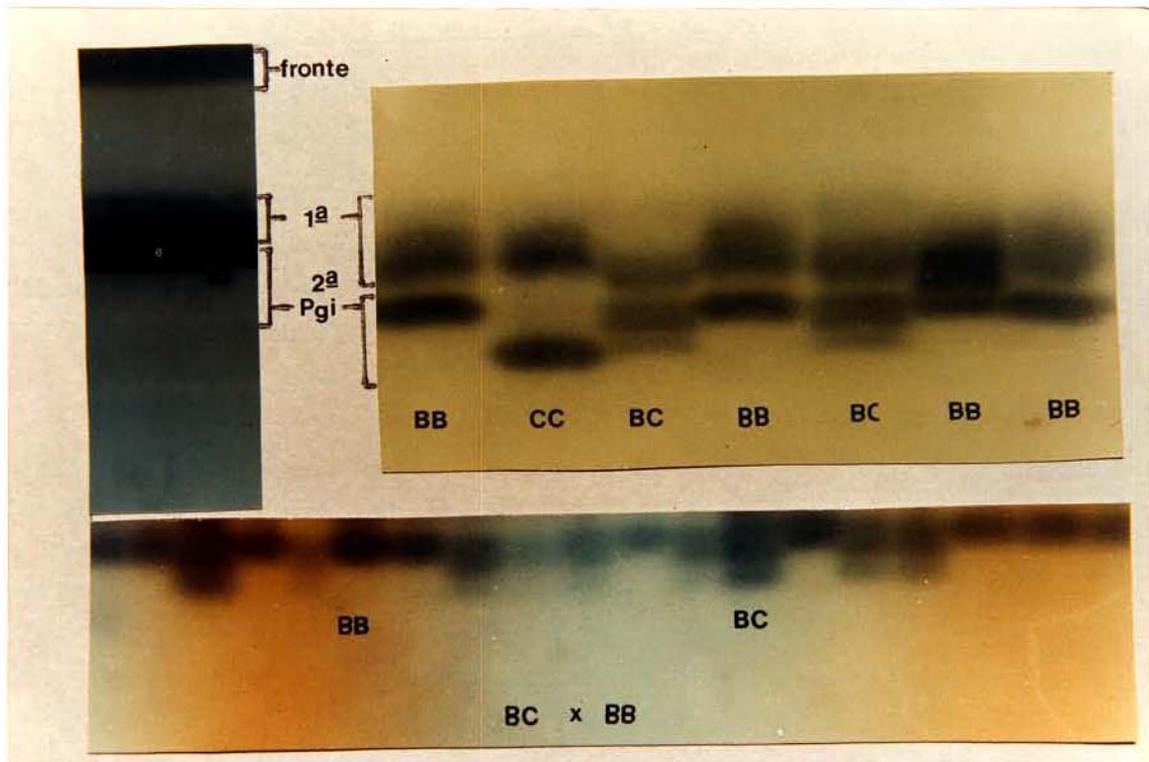
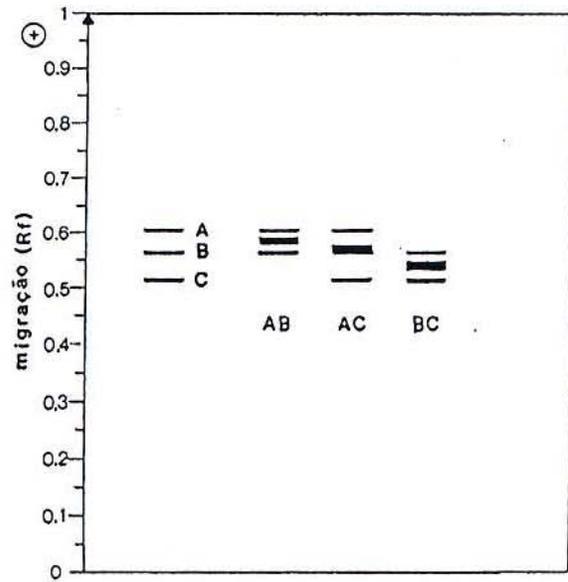


FIGURA 6 - Pgm-1 e Pgm-2

Diagrama representando as bandas e as migrações relativas ao fronte (Rf's) dos alelos A, B, C de Est-1 e dos alelos A, B, C, D, E de Est-2 e os diversos genótipos heterozigóticos (AB,...,DE) para esses locos.

Foto de géis mostrando as regiões de resolução, alguns genótipos e segregação da progênie N° 6 (Pgm-1 CC x BC, Pgm-2 DD x CD) e da progênie N° 8 (Pgm-1 BC x BC, Pgm-2 BD x DN).

Pgm-1

Pgm-2

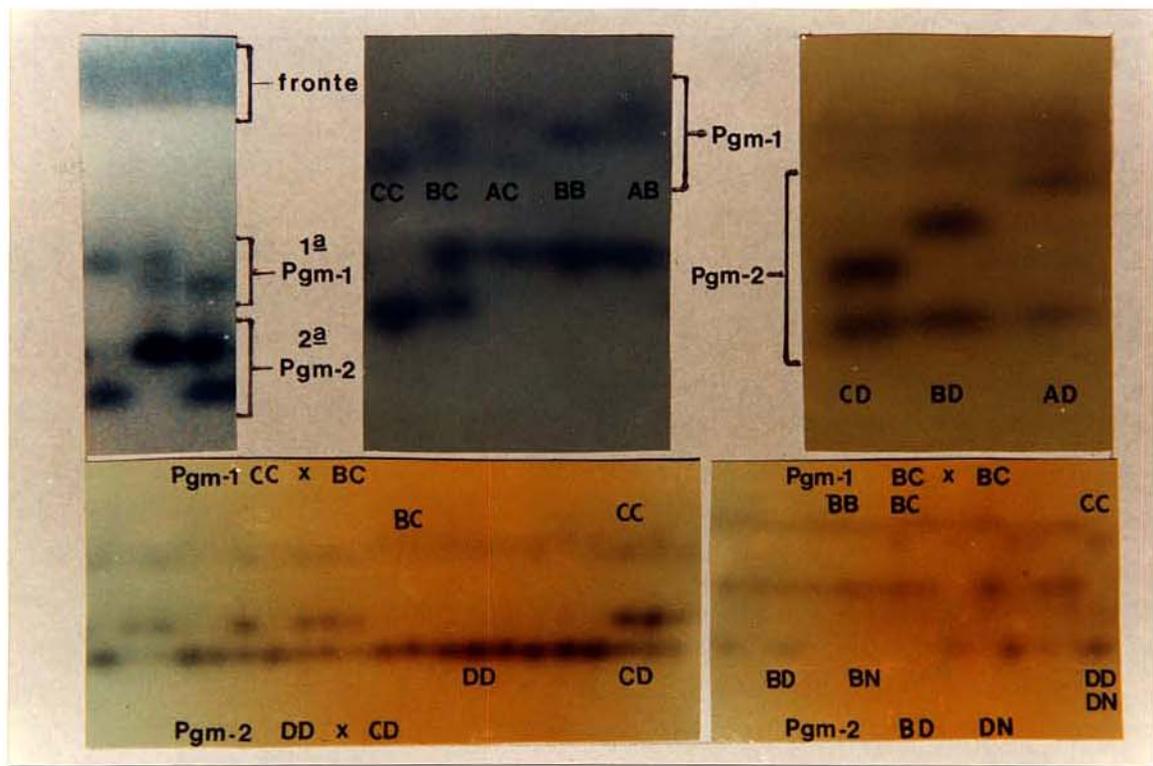
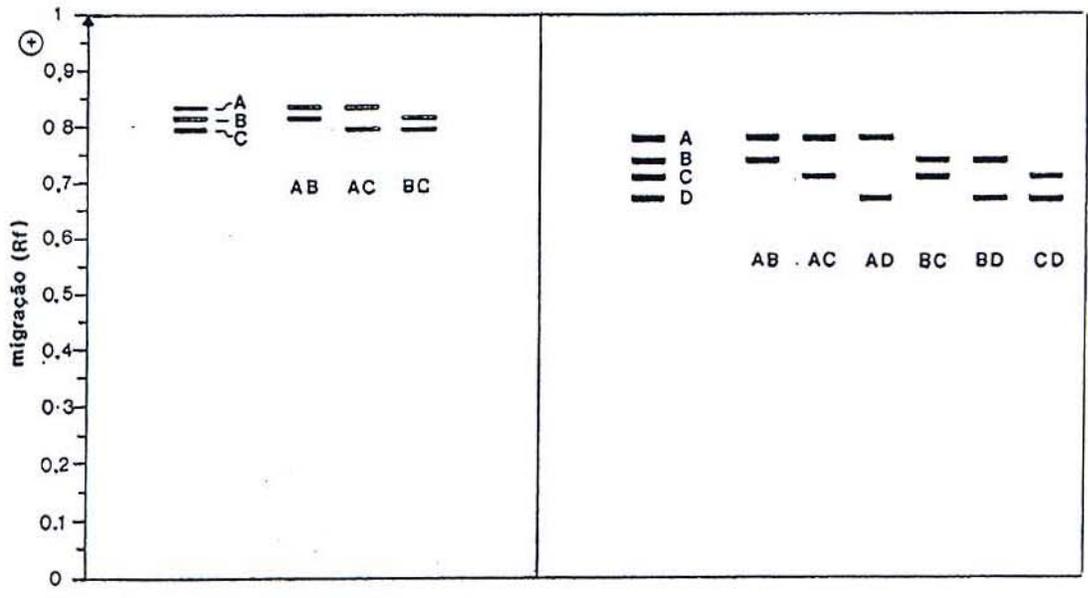


FIGURA 7 - Prx

Diagrama representando as bandas e as migrações relativas ao fronte (Rf's) dos alelos A, B, C, D e os diversos genótipos heterozigóticos (AB,...,CD).

Foto de géis mostrando as regiões de resolução, alguns genótipos e segregação das progênies N° 6 (AA x AD) e N° 8 (AB x CD).

Prx

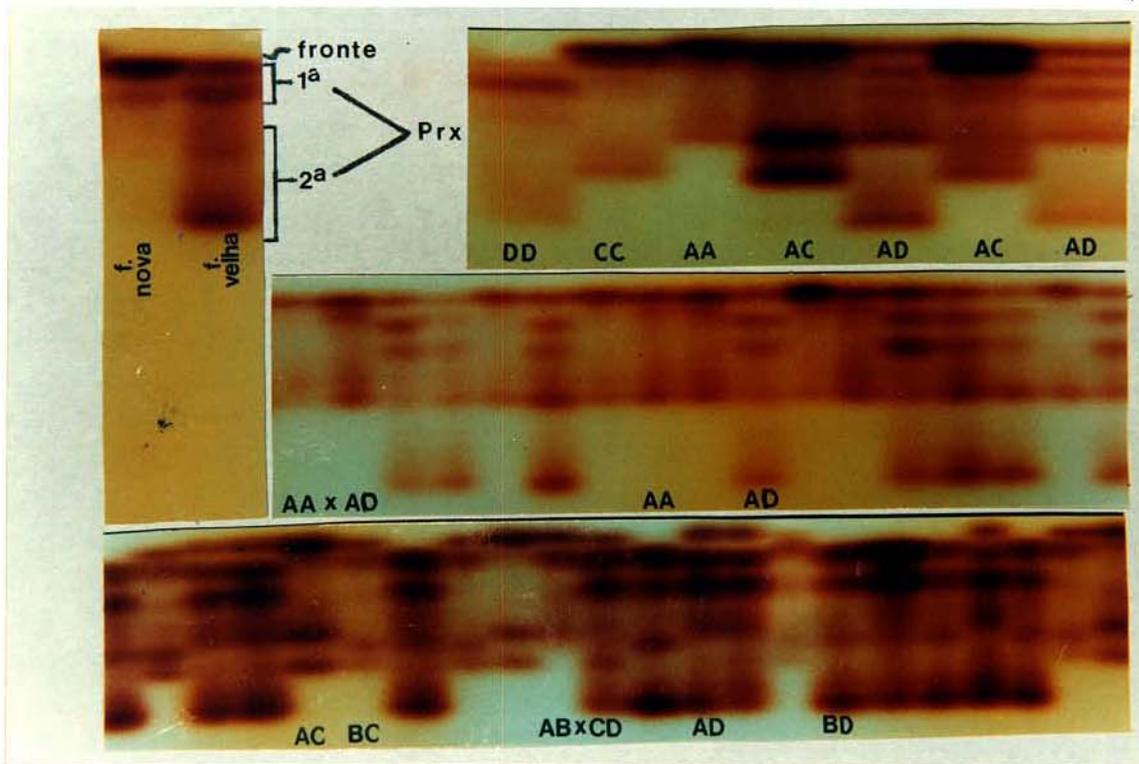
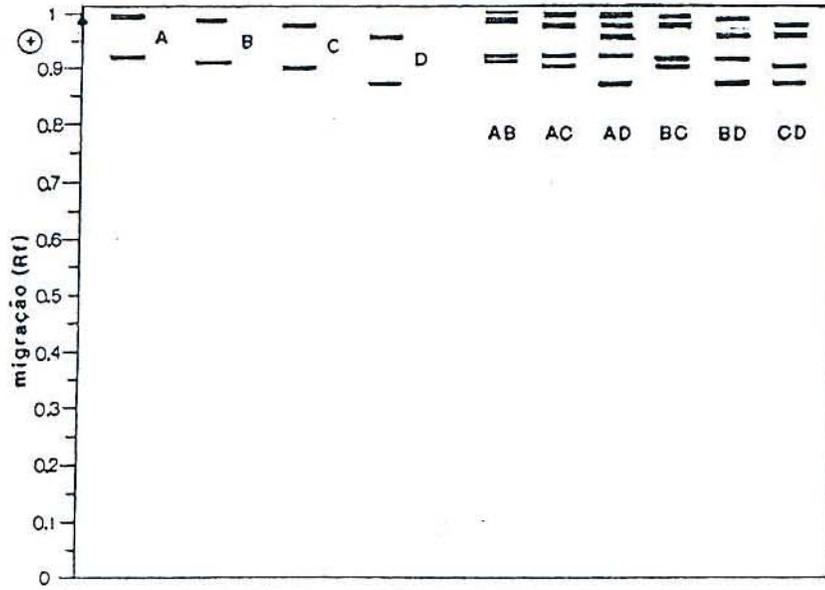


FIGURA 8

Metáfases mitóticas em pontas de raiz de plantas de *Stevia rebaudiana* heterozigóticas para alelos nulos de *Aps*, *Est-2* ou *Got-2*, mostrando 22 cromossomos.

Pré-tratamento com 8-hidroxiquinolina 0,015% e 1 gota de 1-bromonaftaleno por 30 minutos.

Pré-tratamento com 8-hidroxiquinolina 0,0075% e 1 gota de 1-bromonaftaleno por 45 minutos.



APÊNDICE A

PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO
CROMOSSÔMICO DE *Stevia rebaudiana*A) Material vegetal

- Pontas de raízes coletadas de plantas mantidas em vasos e de estacas enraizadas em solo arenoso.

B) Pré-tratamento e fixação

- Pré-tratamento com 8-hidroxiquinolina 0,015% + 1 gota 1-bromonaftaleno por 30 minutos ou 8-hidroxiquinolina 0,0075% + 1 gota 1-bromonaftaleno por 45 minutos.
- Fixador carnoy (álcool-ácido acético 3:1), seguido de 2 trocas de álcool 70° GL. Armazenamento a temperatura de $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

C) Método de coloração (Feulgen)

- Hidrólise em HCl 1N à 60°C por 8 minutos.
- Lavagem em água destilada.
- Coloração pelo reativo de Schiff durante 45 minutos.
- Lavagem em água corrente por 5 minutos.
- Esmagamento dos meristemas radiculares em carmin acético 1%.
- Remoção da lamínula em ácido acético 45% seguida de secagem ao ar.
- Montagem das lâminas e lamínulas em bálsamo do Canadá.

APÊNDICE B

PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE ISOENZIMAS
EM FOLHAS DE *Stevia rebaudiana*A) Gel de amido

amido: 12% (p/v) marca SIGMA. A concentração ótima é dependente da marca e do lote específico.

solução tampão: TRIS (0,018 M)
Ácido Cítrico (0,036 M)

pH: 7,9-8,2 ajustado com TRIS (0,018 M)

B) Amostras vegetais

quantidade de tecido: Aproximadamente 15mg. Corresponde a utilizar 2 folhas anexas ao meristema ou 1 disco de folha adulta de 0,5cm de diâmetro.

solução extratora: 25 mg/ml de Glutateona em solução tampão contendo TRIS (0,1 M) e MgCl₂ (0,04 M), pH 7,5, ajustado com HCl 3N.

pH solução final: 7,0-7,5 com NaOH 4N e 1N.

Utiliza-se 0,03ml, correspondente a 1 gota de um contagotas descartável.

C) Eletroforese

tampão eletrodos: Ácido Bórico 0,3M pH 8,3 ajustado com NaOH 4N.

condições elétricas: 25mA sem ultrapassar 150V por 25 minutos para inserção do extrato no gel. Após a remoção das amostras, um máximo de 30mA e 150V por 60 minutos. Posteriormente reajuste da amperagem para 30mA e após cerca de 40 minutos, reajuste da voltagem para 300V sem ultrapassar 30mA.

tempo total de corrida: Aproximadamente 4 horas.

D) Isoenzimas

APS, EST, GOT, G8PDH, LAP, MDH, ME, PGI, PGM, PRX

E) Revelação

A temperatura ambiente de acordo com Shaw & Prasad (1970) à excessão de PRX a qual é segundo Vallejos (1983).

F) Fixação dos géis

Glicerina P.A. 50% em água destilada.