

Cesário Lange da Silva Pires

ESTUDO DO POLIMORFISMO ENZIMÁTICO
EM ESTERASES DE
EUCALYPTUS GRANDIS HILL EX MAI.

Orientador: Prof. Dr. Lourival Carmo Mônico

- Campinas 1983 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNICAMP

AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PRE-
ÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: CESARIO LANGE DA SILVA PIRES

Nº de Identificação: 795050

Endereço para Correspondência: Cx. Postal 1322 São Paulo SP

Curso: Biologia Vegetal

Nome do Orientador: Prof. Dr. Lourival Carmo Monaco

Título da Dissertação ou Tese: Estudo do Polimorfismo Enzimático
em Esterase de Eucalyptus grandis
Mill ex Mai.

Data proposta para a Defesa: 28/02/83

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir des
ta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou
Tese a interessados.

1/1
Data

assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a
partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha
Dissertação ou Tese a interessados.

28/02/83

Data

assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consul
te, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o forne
cimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a in
teressados.

1/1
Data

assinatura do aluno

De acordo

Orientador

Classif. 2

Autor P. G. B. S. e

V. _____ Ex. _____

Tombo BC/ 4856

À minha esposa e filhos.

CM-00028522-9

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Lourival Carmo Mônaco cujo apoio e orientação tornou possível o presente trabalho.

Ao Mestre Sérgio da Cruz Coutinho ao qual eu devo a idéia original da eletroforese e muita sugestão.

Ao Dr. Alcides Carvalho que permitiu estágio na Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas.

Ao Prof. Dr. João S. Morgante e Prof. Dr. Aldo Malavasi pelas inúmeras idéias e pelas facilidades de computação dos resultados.

Ao Prof. Dr. Willian José da Silva por permitir trabalhos em seu laboratório na UNICAMP.

Muitas outras pessoas que me ajudaram direta e indiretamente mereceriam ser citadas, porém tornaria esta lista algo longa.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), à JICA (Japan International Cooperation Agency) e à Ideal Standard Wabco pelo auxílio prestado.

Finalmente meus agradecimentos ao Instituto Florestal, ao qual pertença.

ÍNDICE

Página

1	INTRODUÇÃO -----	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	2
	2.1 Espécies estudadas -----	2
	2.2 Polimorfismo e isoenzimas -----	4
	2.3 Estudo das origens -----	7
3	MATERIAIS -----	8
4	MÉTODOS -----	9
	4.1 Obtenção das mudas -----	9
	4.2 Escolha dos sistemas enzimáticos -----	9
	4.3 Preparo do gel -----	14
	4.4 Tampão das cubas dos eletrodos -----	15
	4.5 Preparo e aplicação dos pavios -----	15
	4.6 Montagem do equipamento de eletroforese -----	16
	4.7 Corrente elétrica e tempo de migração -----	18
	4.8 Corte do gel -----	18
	4.9 Revelação, lavagem e fixação -----	18
	4.9.1 Leucina aminopeptidase (LAP) -----	18
	4.9.2 Alfa esterase (α EST) -----	19
	4.9.3 Beta esterase (β EST) -----	19
	4.9.4 Fosfatase ácida (ACPH) -----	20
	4.10 Análise e interpretação -----	20
	4.11 Estimativa da divergência populacional -----	20
5	RESULTADOS -----	22
6	DISCUSSÃO -----	24
7	CONCLUSÕES -----	47
8	RESUMO -----	48
9	SUMMARY -----	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	50

LISTA DE TABELAS

<u>Número</u>	<u>Página</u>
1- Dados dos tratamentos (procedências e origens) de <i>E. grandis</i> (G) e <i>E. saligna</i> (S) -----	10
2- Dados de altura e DAP das origens de <i>E. grandis</i> cole- tadas ao norte de Queensland (Planalto de Atherton) --	11
3- Dados de temperatura e precipitação da estação meteoro- lógica de Atherton (Lat. = 17°17'S, Long. = 145°27'E e Alt. = 752 m) -----	11
4- Esquema dos lotes de 6 indivíduos analisados em cada um dos 52 geis -----	17
5- Frequência alélica do loco α EST-1 (esterase) com os 3 alelos estudados -----	25
6- Frequência alélica do loco α EST-2 (esterase) com os 2 alelos estudados -----	26.7
7- Frequência alélica do loco α EST-3 (esterase) com os 3 alelos estudados -----	27
8- Frequência alélica do loco β EST-1 (esterase) com os 2 alelos estudados -----	28
9- Frequência alélica do loco β EST-2 (esterase) com os 2 alelos estudados -----	29
10- Frequência alélica do loco β EST-3 (esterase) com os 3 alelos estudados -----	30
11- Relação das populações analisadas quanto ao polimorfis- mo -----	31
12- Heterozigosidade média H/N por loco e por população pa- ra esterases -----	32

13- Heterozigosidade média total $\pm$ 1 erro padrão por população -----	33
14- Matriz de coeficientes de distância genética (acima da diagonal) e de similaridade genética (abaixo da diagonal), segundo NEI (1972) -----	34

LISTA DAS FIGURAS

<u>Número</u>	<u>Página</u>
1- Mapa parcial da Austrália com localização das origens de <i>E. grandis</i> (G) e <i>E. saligna</i> (S) - Fonte: CSIRO - adaptado -----	12
2- Mapa do planalto de Atherton (Queensland - Austrália) com localização de 8 origens de <i>E. grandis</i> (G) - Fonte: CSIRO - adaptado -----	13
3- Padrões eletroforéticos da α esterase de <i>E. grandis</i> (G) e <i>E. saligna</i> (S). EST = esterase -----	35
4- Padrões eletroforéticos da β esterase de <i>E. grandis</i> (G) e <i>E. saligna</i> (S). EST = esterase -----	36
5- Mapa parcial da Austrália com as frequências alélicas do loco α esterase 1 de <i>E. grandis</i> (G) e <i>E. saligna</i> (S)	37
6- Mapa parcial da Austrália com as frequências alélicas do loco α esterase 2 de <i>E. grandis</i> (G) e <i>E. saligna</i> (S)	38
7- Mapa parcial da Austrália com as frequências alélicas do loco α esterase 3 de <i>E. grandis</i> (G) e <i>E. saligna</i> (S)	39
8- Mapa parcial da Austrália com as frequências alélicas do loco β esterase 1 de <i>E. grandis</i> (G) e <i>E. saligna</i> (S)	40
9- Mapa parcial da Austrália com as frequências alélicas do loco β esterase 2 de <i>E. grandis</i> (G) e <i>E. saligna</i> (S)	41
10- Mapa parcial da Austrália com as frequências alélicas do loco β esterase 3 de <i>E. grandis</i> (G) e <i>E. saligna</i> (S)	42
11- Fenograma das 20 populações de <i>E. grandis</i> (G) e das 2 de <i>E. saligna</i> (S) -----	43

ESTUDO DO POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EM ESTERASES DE *EUCALYPTUS GRANDIS* HILL EX MAI.

1 INTRODUÇÃO

Os valores diretos e indiretos da floresta nativa e artificial são enormes (GOMES, 1947). Estima-se que atualmente o Brasil possua 2,0 milhões de ha de eucalipto. Em 1977, o produto da transformação da madeira atingiu 28 bilhões de cruzeiros, o qual corresponde, aproximadamente, a 10% do total da transformação industrial do país, inclusive sendo superior ao valor da transformação da indústria automobilística. Grande parte da área de eucalipto é coberta pela espécie *Eucalyptus grandis* Hill ex Mai., que apresenta características favoráveis como madeira e excelentes para a produção de celulose. Ainda seu emprego na obtenção de carvão vegetal é uma realidade e na obtenção de álcool motor uma perspectiva extremamente promissora.

Considerando a existência de centenas de milhões de indivíduos dessa espécie, o maior desafio refere-se à melhoria da qualidade e aumento da produtividade, não somente nas plantações existentes como em novos plantios. Para alcançar esses objetivos é necessário explorar toda a tecnologia disponível, particularmente o melhoramento genético. Embora a metodologia de melhoramento seja conhecida, há necessidade de acumular conhecimentos cada vez mais aprofundados da genética de *E. grandis*, os quais permitirão maior eficiência nos programas, aumentando a probabilidade de sucesso no alcance dos objetivos perseguidos.

Entre as técnicas disponíveis para aumentar o conhecimento do reservatório gênico das populações existentes no país e de introduções recentes da espécie a partir do centro de origem, está o estudo das isoenzimas de *E. grandis*. O presente trabalho relata os primeiros estudos destinados ao conhecimento dos padrões de isoenzimas das populações brasileiras de *E. grandis*. Para esse fim foram analisadas sementes de 19 origens ou populações de *E. grandis* e duas de *Eucalyptus saligna* Sm., recebidas da Divisão de Pesquisa Florestal da Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO). Como termo de comparação, foi incluída ainda uma procedência de *E. grandis* e uma de *E. saligna* coletadas na Estação Experimental de Itirapina, do

Instituto Florestal do Estado de São Paulo, de plantios feitos com sementes colhidas dos povoamentos originais de Navarro de Andrade (ANDRADE, 1961).

Os objetivos do presente trabalho foram:

- a) determinação dos padrões eletroforéticos de esterases de *E. grandis* e de *E. saligna*;
- b) caracterização das origens e procedências;
- c) estudo do grau de polimorfismo;
- d) estudo do relacionamento filogenético entre *E. grandis* e *E. saligna* da Austrália e
- e) estudo da relação genética entre as populações brasileiras e australianas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para facilidade de compreensão a revisão bibliográfica foi dividida em três itens.

2.1 Espécies estudadas

E. grandis ocorre naturalmente na Austrália (FIGURA 1), nas baixadas e início das encostas da região costeira do Estado de Nova Gales do Sul, a partir da latitude de 32°35'S em Newcastle e sudeste do Estado de Queensland (DORAN, s.d.), BLAKELY (1965), HALL et alii (1970) e PROJETO ... (1978). Mais para o norte, já no planalto de Atherton, até a latitude de 17°S, ocorrem pequenas populações descontínuas chamadas por BROOKER* de *saligna/grandis*, em altitudes de 600 a 1100 m, nos solos profundos e vulcânicos das margens dos rios e encostas.

O clima de toda a área de ocorrência de *E. grandis* varia de temperado-quente a subtropical-moderado, com invernos suaves e chuvas abundantes e bem distribuídas, menos na região norte onde são do tipo periódico. Devido a estas condições de seu habitat, a espécie apresenta uma plasticidade limitada. Tomando-se como base as condições de temperatura, tanto na Austrália

*BROOKER, M.I.H. 1978. CSIRO. Canberra. Austrália. Informação pessoal.

como no Brasil, a região ótima para *E. grandis*, neste país, está compreendida entre as isotermas anuais de 17º C e 21º C, encontrando condições ideais, para seu desenvolvimento, em regiões do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (PROJETO ... 1978).

E. saligna é uma espécie muito próxima de *E. grandis* do ponto de vista botânico, ecológico e silvicultural (PROJETO ... 1978), ocorrendo naturalmente na Austrália, da latitude de 21º S até 36º S. No sul de sua área de ocorrência, é encontrada desde o nível do mar até 1000 m, ao passo que na região norte, ocorre somente entre 800 e 1000 m. Comparando-se o balanço hídrico das regiões de sua ocorrência, verifica-se que as condições sulinas australianas se assemelham com as de Bagé, de Pelotas e de Porto Alegre, ao passo que as das regiões setentrionais, correspondem às do nordeste de São Paulo e do sul de Minas Gerais.

A proximidade da capital e também a constatação da diferença entre *E. grandis* e *E. saligna*, reforçam a idéia de que o primeiro não foi descrito com exemplares de populações do planalto de Atherton. A distinção entre essas espécies são observadas em Nova Gales do Sul e no sul de Queensland. As espécies em questão podem ter se originado de um mesmo ancestral, presumivelmente através de seleção disruptiva*. Informações coletadas no planalto de Atherton (FIGURA 2), indicam que o *saligna/grandis* apresenta variações que ocorrem em *E. grandis* e *E. saligna*. Esses dados favorecem o conceito de população ancestral. Nessa região parece não ter havido pressão de seleção para eliminar uma das formas ou criar condições de isolamento das espécies*.

Atualmente está sendo estudada a variação de *E. cloeziana* F. Muell. com o uso de técnicas isoenzimáticas para confirmar estudos tradicionais de variação morfológica e fisiológica**. Ainda segundo esse pesquisador como *E. grandis* e *E. cloeziana* apresentam a mesma distribuição natural, é possível

* BROOKER, M.I.H. 1978. CSIRO. Canberra. Austrália. Informação pessoal.

** TURNBULL, J.W. 1978. CSIRO. Canberra. Austrália. Informação pessoal.

que com *E. grandis* possa ser encontrada considerável variação nas isoenzimas de populações mais isoladas. O citado pesquisador também sugere que em um estudo enzimático de *E. grandis*, poderiam ser incluídas uma ou duas origens de *E. saligna* como termo de comparação.

2.2 Polimorfismo e isoenzimas

AYALA et alii (1972a) e FORD (1980) definem sistema polimórfico ou polimorfismo genético como um sistema de alelos que inclui pelo menos um alelo polimórfico, isto é, com frequência na população, entre 1 % e 99 %. Para outros autores o limite superior seria de 95 %. O significado dos polimorfismos nos processos de seleção e adaptação do organismo (selecionismo), tem sido considerado de forma diversa desde a neutralidade até o efeito positivo (KIMURA & OHTA, 1971 e JOHNSON, 1974). O estudo da variação genética pelo número de alelos por loco, pela proporção de locos polimórficos e pelo número médio de heterozigotos por loco por indivíduo (heterozigosidade) tem sido sugerido.

De acordo com WAGNER & SELANDER (1974) e HARRIS & HOPKINSON (1976), em um loco autossômico, o indivíduo poderá ser homozigoto quando os dois alelos presentes forem o mesmo e somente uma forma de cadeia polipeptídica será sintetizada. Em se tratando de um heterozigoto, haverá dois alelos diferentes, ocorrendo a formação de duas cadeias polipeptídicas estruturalmente distintas. No caso de enzimas monoméricas, o modelo observado no heterozigoto, representará uma simples mistura das duas formas que ocorrerão em cada um dos homozigotos correspondentes. No caso de enzima multimérica serão formadas isoenzimas heteroméricas híbridas no heterozigoto e as isoenzimas homoméricas aparecerão separadamente nos homozigotos correspondentes.

A atividade isoenzimática reflete uma expressão gênica, mas o gene estrutural respectivo pode não estar ativo no mesmo momento em que sua isoenzima está ativa, pois a atividade isoenzimática pode refletir a ativação de cadeias polipeptídicas sintetizadas anteriormente ou a multimerização de cadeias que se encontravam inativas na forma de monômeros. Embora por definição as isoenzimas desempenhem a mesma função catalítica, tudo leva a crer que as mesmas podem refletir atividades metabólicas distintas nos tecidos em que se encontram (SCANDALIOS, 1969).

C. R. SHAW, ap. SCANDALIOS (1974), classifica as isoenzimas em:

a) as constituídas por moléculas caracteristicamente diferenciadas e que são produzidas presumivelmente por diferentes genes e ou alelos e

b) as resultantes de alterações secundárias na estrutura de um único tipo de polipeptideo.

As isoenzimas apresentam-se como excelente material para estudos genéticos de populações pois:

a) são muito pouco influenciadas pelo meio ambiente;

b) apresentam um controle monogênico;

c) quando houver homogeneidade na população, a expressão das isoenzimas será qualitativa;

d) a utilização de técnicas eletroforéticas requer apenas algumas horas ou poucos dias e

e) elas podem ser empregadas como marcadoras, constituindo-se em um método indireto de seleção de características econômicas florestais, porque os genes que codificam certas isoenzimas podem estar ligados a genes que controlam essas características quantitativas (MEDINA FILHO, 1980 e TANKSLEY, 1981).

A eletroforese constitui-se em uma técnica de detecção de mutações que alteram a estrutura das enzimas, que passam a ter múltiplas formas moleculares, modificando suas mobilidades eletroforéticas porém mantendo suas atividades catalíticas. As múltiplas formas de um único loco são chamadas de aloenzimas e as de vários locos são denominadas de isoenzimas. HUBBY & LEWONTIN (1966) salientam que a eletroforese permite a detecção de diferenças fenotípicas causadas por substituição alélica, em um único loco do indivíduo, a identificação de substituição alélica em outros locos e a avaliação de uma amostra substancial do genoma. Todos os cálculos baseados em eletroforese são influenciados pela pequena fração do genoma analisado, pela exclusão dos genes reguladores e pelo fato de nem todas as substituições de aminoácidos serem detectados (WAGNER & SELANDER, 1974).

GILLESPIE & KOJIMA (1968) relatam que a estimativa da variabilidade genética vai ser influenciada pelo fato de que os sistemas enzimáticos ligados ao metabolismo da glicose apresentam menor variabilidade do que aqueles que utilizam substratos inespecíficos. JOHNSON (1974) indica que enzimas regulatórias apresentam um polimorfismo maior do que as não regulatórias.

Embora possam ser estudadas dezenas de sistemas enzimáticos, SCANDALIOS (1974) sugere os seguintes sistemas para as

plantas de um modo geral: leucina aminopeptidase (LAP), esterases (EST), catalase (CAT), fosfatase alcalina (AP), fosfatase ácida (ACPH), peroxidase (PRX), álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH) e amilase (AMY).

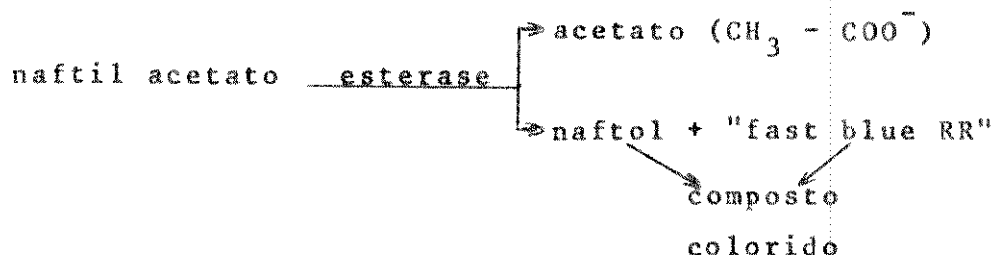
A glutamato oxalo-acetato-transaminase (GOT) e a leucina aminopeptidase estão sendo estudadas em *E. cloeziana**. Os mesmos sistemas enzimáticos são analisados em *E. pauciflora* Sieb. ex Spreng. por PHILLIPS & BROWN (1977).

BROWN et alii (1975) estudam as isoenzimas de *E. obliqua* L'Herit. em sementes embebidas em água por 24 horas. Os sistemas estudados foram: ADH, MDH e ACPH. LOPES** levando em conta o grau de polimorfismo de certos sistemas enzimáticos entre plantas, sugere na primeira etapa o estudo das EST, PRX, ADH e MDH.

De acordo com BREWER & SING (1970) e HARRIS & HOPKINSON (1976) as esterases que não são ligadas ao metabolismo da glicose e não são regulatórias pertencem à classe de enzimas denominadas hidrolases, catalizando as reações de hidrólise de ésteres, com a fórmula geral



O seguinte diagrama das reações de coloração das esterases pode ser feito:



As bandas das isoenzimas de esterases são coradas pela união do α ou β naftol liberado do α ou β naftil acetato pela atividade das esterases com o "fast blue RR" que é um sal diazônico. Além da α e β esterases ainda haveria uma terceira esterase que seria a colinesterase.

* TURNBULL, J.W. 1978. CSIRO. Canberra. Austrália. Informação pessoal.

** LOPES, C.R. 1979. IAC. Campinas. Brasil. Informação pessoal.

FERET & BERGMAN (1976) e KELLEY & ADAMS (1977) salientam que a presença de fenois e quinonas nos tecidos vegetais tem sido a principal causa de problemas na análise em eletroforese. Diversas substâncias protetoras podem ser incluídas no preparo do homogeneizado para impedir a inativação das enzimas. Para tal BROWN et alii (1975) usam ditiotreitol (1 mg/ml) ao estudar *E. obliqua*, PHILLIPS & BROWN (1977) usam polivinil pirrolidona (10 mg. ml⁻¹) e 2-mercaptoetanol (3 µl. ml⁻¹) ao estudar *E. pauciflora* e BROWN et alii (1978) usam ora 2-mercaptoetanol (0,1 M) ora ditiotreitol (43 mM) ao estudar diversos tecidos de *Hordeum spontaneum*. Por sua vez, CAVALLI (1976) ao estudar o gênero *Reibunium* nada usa como substância protetora, apontando ser essa a causa da não obtenção de bons resultados em vários sistemas enzimáticos. A esse respeito MORGANTE* adverte que certas substâncias poderão prejudicar algumas isoenzimas.

2.3 Estudo das origens

O termo procedência, referindo-se ao local de origem geográfica da semente, pólen ou propágulo, tem recebido diversas caracterizações. Assim JONES (1973) denomina de procedência natural quando se considera floresta natural e procedência derivada no caso de floresta implantada. FERREIRA (1980) define origem como sendo a localização geográfica e ambiental na qual os povoamentos fornecedores do material reprodutivo ocorrem naturalmente. Segundo o mesmo autor, procedência é a localização geográfica e ambiental das árvores ou povoamentos fornecedores de material reprodutivo.

Em DEPARTMENT ... (1976) é recomendado que de cada local sejam colhidas sementes de 20 árvores para representar a população. TURNBULL** sugere que o número de árvores para representar uma origem, depende da variabilidade desta e da forma de reprodução da espécie. A evidência disponível no momento, sugere que o gênero *Eucalyptus* é principalmente de polinização cruzada, sendo a progênie de uma determinada árvore, resultado da combinação do material genético de muitas árvores. Para *E. cloeziana*, recomenda ainda o pesquisador australiano que algumas origens

* MORGANTE, J.S. 1982. Dept. de Biologia - Inst. de Bioc. da USP (São Paulo). Informação pessoal.

** TURNBULL, J.W. 1979. CSIRO. Canberra. Austrália. Informação pessoal.

desta espécie podem ser representadas pela progênie de uma única árvore, enquanto que outras origens necessitam da progênie de um mínimo de 5 árvores.

A esse respeito DORAN* indica que é mais vantajoso colher semente de *Eucalyptus* de um número maior de origens, cobrindo toda a área de ocorrência, cada uma delas com menor número de árvores, do que um menor número de origens envolvendo um grande número de árvores.

NAMKOONG et alii (1980) discorrem sobre a importância do estudo de origens nos programas de melhoramento florestal, visto que apenas a escolha da ou das origens de melhor resultado já conduz a um aumento substancial de produção.

3 MATERIAIS

As sementes de *E. grandis* e *E. saligna*, fornecidas pela Divisão de Pesquisa Florestal da CSIRO, foram coletadas de árvores nativas de fenótipo acima da média e distantes entre si, de pelo menos 30 m. Os galhos contendo frutos foram derrubados com rifle. Para a remessa, as sementes foram fumigadas com CS₂. Todas as informações a respeito das sementes australianas, encontram-se nas TABELAS 1, 2 e 3 e nas FIGURAS 1 e 2, adaptadas de mapas originais da referida Divisão de Pesquisa Florestal.

Cada uma das origens G4, G5, G8 e G9 correspondem a apenas 2 árvores amostradas, ao passo que a origem G15, representa uma amostra de 27 árvores*.

As sementes de *E. grandis* (G20) e *E. saligna* (S3) da Estação Experimental de Itirapina, são constituídas de mistura de um número n indeterminado de plantas de povoamento implantado com sementes das populações originárias das introduções de Navarro de Andrade.

As sementes devidamente etiquetadas foram armazenadas em câmara seca, para a conservação do poder germinativo. A pesquisa foi executada no laboratório da Seção de Melhoramento do Instituto Florestal em São Paulo. O tratamento S2 do norte de Raymond Terrace apresentou germinação nula, não permitindo seu estudo.

* DORAN, J.C. 1978. CSIRO. Canberra. Austrália. Informação pessoal.

4 MÉTODOS

Para o estudo das isoenzimas foi utilizada a eletroforese horizontal em gel de amido descrito por BUSH & HUETTEL (1972), STEINER & JOSLYN (1979) e MALAVASI & MORGANTE (1982) com pequenas adaptações, as quais são descritas nesta Seção.

4.1 Obtenção das mudas

A semeadura foi feita em caixas de plástico (gerboxes) medindo 11,5 cm x 11,5 cm x 3,5 cm, tendo como substrato uma camada de 1 cm de vermiculita peneirada, previamente autoclavada e a seguir expostas a uma lâmpada germicida de 15 watts. Após a semeadura os gerboxes foram fechados com fita crepe. Os resultados foram satisfatórios, obtendo-se boa germinação e pouca contaminação.

Para o estudo das isoenzimas, a análise foi feita com plântulas no estágio de "orelha de onça" com o par de folhas cotiledonares (antes portanto do aparecimento das primeiras folhas nomofilares). Após a semeadura e com a permanência dos gerboxes em laboratório, a retirada das plântulas para análise, iniciou-se por volta do 10º dia. Para se dispor de mudas para todo o experimento, foram feitas 3 semeaduras em intervalos de 7 dias.

4.2 Escolha dos sistemas enzimáticos

As frequências gênicas dos vários locos, permitem calcular a similaridade genética (S) e a distância genética (D). Para tanto foram pesquisados os seguintes sistemas enzimáticos (ENZYME nomenclature, 1972):

oxidoredutases

- 1 - EC 1.1.1.1 - álcool desidrogenase (ADH);
- 2 - EC 1.1.1.37 - malato desidrogenase (MDH);
- 3 - EC 1.15.1.1 - superóxido dismutase (SOD);
- 4 - EC 1.14.1.2 - glutamato desidrogenase (GDH);
- 5 - EC 1.11.1.7 - peroxidases (PRX);

TABELA 1 - Dados dos tratamentos (procedências e origens) de *E. grandis* (G) e *E. saligna* (S).

Espécie	Tratamento	Nº Origina	Procedência (*) e Origem	Lat. °S	Long. °E	Alt. m	Árvores amostradas	Sementes viáveis/g
<i>E. grandis</i>	G1	7810	Norte de Bulahdelah - norte de N.S.W.	32º20'	152º13'	120	11	530
	G2	7823	Norte de Coffs Harbour - norte de N.S.W.	30º10'	153º08'	18	12	560
	G3	10693	NE de Gympie - sul de QLD.	26º08'	152º42'	76	3	600
	G4	10695	Kenilworth - sul de QLD.	26º40'	152º33'	530	2	700
	G5	10696	Belthorpe - sul de QLD.	26º52'	152º42'	460	2	600
	G6	11243	Sul de Tyalgum - norte de N.S.W.	28º27'	153º12'	100	4	920
	G7	11244	Sul de Murwillumbah - norte de N.S.W.	28º33'	153º23'	300	3	550
	G8	11587	Port Stephens - norte de N.S.W.	32º55'	151º48'	6	2	260
	G9	11681	Norte de Woolgoolga - norte de N.S.W.	29º32'	153º12'	30	2	350
	G10	12143	Crediton - norte de QLD.	21º09'	148º30'	730	11	500
	G11	12380	E de Mareeba - norte de QLD.	17º03'	145º36'	740	7	520
	G12	12381	Região de Wondecla - norte de QLD.	17º25'	145º27'	1010	7	640
	G13	12382	Região de Tully Falls - norte de QLD.	17º49'	145º31'	800	6	770
	G14	12383	Região de Herberton - norte de QLD.	17º20'	145º24'	1000	6	440
	G15	12409	Região de Ravenshoe - norte de QLD.	17º42'	145º28'	940	27	470
	G16	12422	State Forest Reserve - 310 - Cadgarra - norte de QLD.	17º16'	145º42'	690	20	560
<i>E. saligna</i>	G17	12423	Região de Tirano Falls Dam - norte de QLD.	17º11'	145º36'	800	13	480
	G18	12426	State Forest Reserve - Gillies Highway - norte de QLD.	17º13'	145º42'	730	10	530
	G19	12461	O de Paluma - norte de QLD.	19º00'	146º00'	900	-	660
	G20	*	E. E. de Itirapina (Instituto Florestal - São Paulo)	22º15'	47º49'	760	-	-
	S1	11025	SO de Rockampton - QLD.	23º49'	149º03'	860	4	700
	S2	11605	Norte de Raymond Terrace - N.S.W.	31º55'	151º48'	225	39	400
	S3	*	E. E. de Itirapina (Instituto Florestal - São Paulo)	22º15'	47º49'	760	-	-

N.S.W. = Nova Gales do Sul

QLD. = Queensland.

E. E. = Estação Experimental

Lat. °S = Latitude em graus sul.

Long. °E = Longitude em graus este.

Alt. (m) = Altitude em metros.

g = Grama.

TABELA 2 - Dados de altura e DAP das origens de *E. grandis* coletadas ao norte de Queensland (Planalto de Atherton).

Tratamento	Amplitude de altura (m)	Amplitude de	DAP (cm)
G11	23 - 33	33 -	46
G12	9 - 32	15 -	100
G13	33 - 38	76 -	96
G14	20 - 37	46 -	89
G15	26 - 56	53 -	200
G16	28 - 65	33 -	190
G17	30 - 48	30 -	120
G18	33 - 49	51 -	170

DAP = Diâmetro à altura do peito, à 1,3 m do solo.

TABELA 3 - Dados de temperatura e precipitação da estação meteorológica de Atherton (Lat. = 17°17'S, Long. = 145°27'E e Alt. = 752 m).

Dados	Meses												Média
	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.	
Máxima diária em °C	28	28	27	25	23	22	22	23	25	27	29	30	26
Mínima diária em °C	18	18	17	15	13	11	10	10	12	13	16	17	14
Média mensal da Precipitação em mm	284	305	241	109	60	42	30	20	20	24	70	167	-

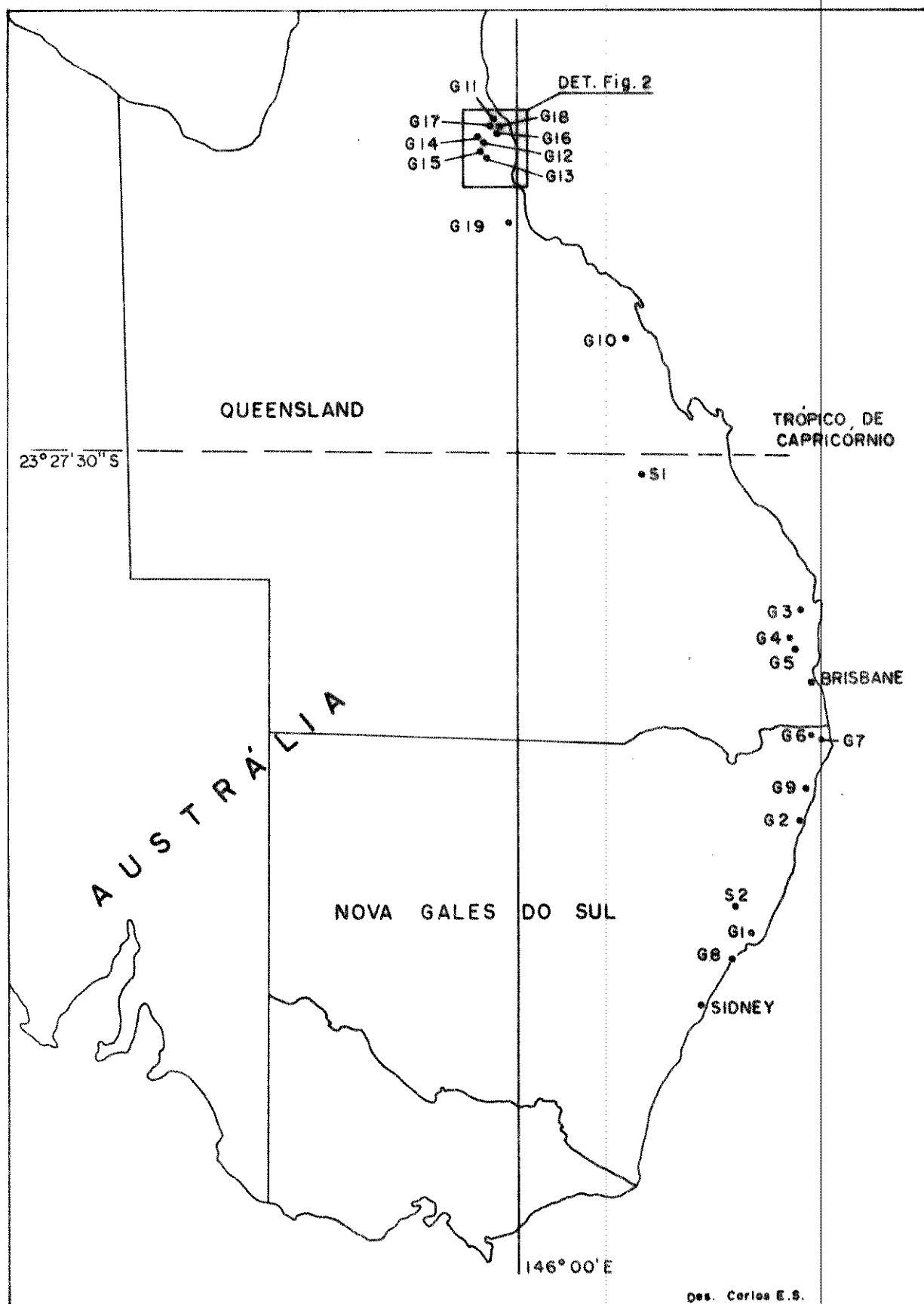


FIGURA 1 - Mapa parcial da Austrália com localização das origens de *E. grandis* (G) e *E. saligna* (S).
(Fonte : CSIRO - adaptado).

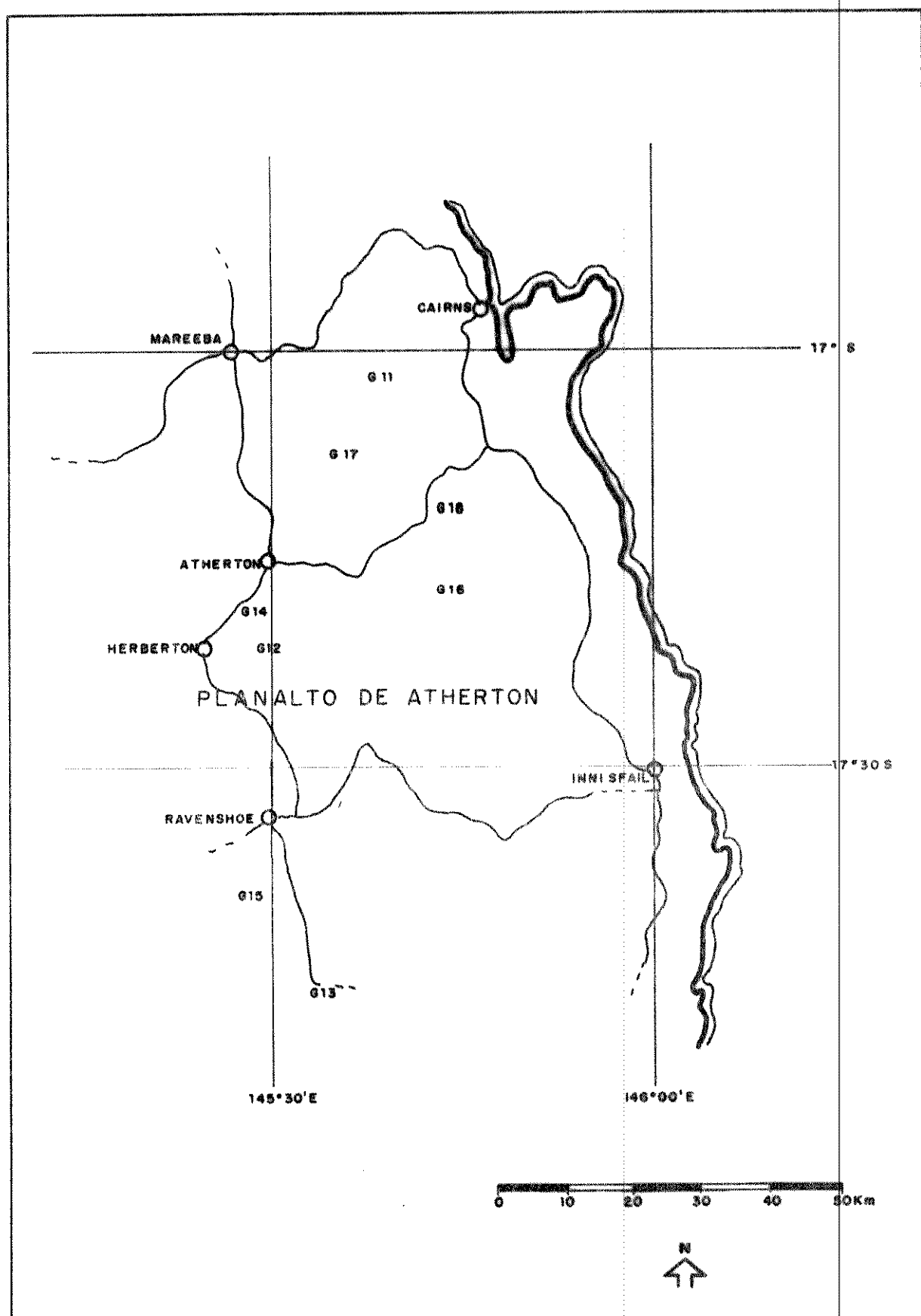


FIGURA 2 - Mapa do planalto de Atherton (Queensland - Austrália) com localização de 8 origens de E. grandis (G).
(Fonte : CSIRO - adaptado).

transferases

6 - EC 2.6.1.1 - glutamato oxalo-acetato transaminase (GOT);

hidrolases

7 - EC 3.4.11.1 - leucina aminopeptidase (LAP);

8 - EC 3.1.1.1 - α esterase (α EST);

9 - EC 3.1.1.1 - β esterase (β EST);

10 - EC 3.1.3.1 - fosfatase ácida (ACPH);

11 - EC 3.1.3.2 - fosfatase alcalina (AP) e

12 - EC desconhecido - tetrazólio oxidase (TO).

Para essa pesquisa foi seguido o método descrito por diversos autores como SCANDALIOS (1969), BREWER & SING (1970), SNAW & PRASAD (1970), AYALA et alii (1972 a e b), BUSH & HUETTEL (1972), STEINER & JOHNSON (1973), LEWONTIN (1974), SCANDALIOS (1974), BROWN et alii (1975), PHILLIPS & BROWN (1977), SCANDALIOS & SORENSON (1977) e STEINER & JOSLYN (1979).

Aliando-se custo relativamente baixo da pesquisa com atividade do sistema e boa resolução, foram estudados os sistemas enzimáticos alfa e beta esterase.

4.3 Preparo do gel

O gel foi preparado com 44,5 g de amido hidrolisado para eletroforese da marca Connaught, 37,6 ml (1/10 do volume) do tampão lítio-borato e 338 ml (9/10 do volume) do tampão triz-citrato.

Os três ingredientes eram colocados em um frasco tipo "kitazato" de 1000 ml e após este ser arrolhado, iniciava-se o cozimento, com uma duração de aproximadamente 5 min acompanhada de constante agitação. O processo era feito em um bico de Bunsen pequeno e mais ou menos por volta dos 4 minutos a massa tornava-se mais consistente. Com a continuação do processo de cozimento a massa adquiria uma consistência gelatinosa, passando de opaca e leitosa a translúcida. A partir desse momento a chama do bico de Bunsen passava a ser vista através do gel. A observação da chama ainda continuava por cerca de 20 segundos, quando era suspenso o cozimento.

A retirada das bolhas de ar era feita durante um minuto, usando-se uma trompa de vácuo ligada à torneira.

O preparo dos tampões usados seguiu SCANDALIOS (1974):

<u>lítio-borato</u>	pH 8,3
LiOH	2,4 g
H ₃ BO ₃ anidro	⁺ 23,0 g
H ₂ O q.s.p.	2,0 l
<u>triz-citrato</u>	pH 8,3
trizma base	12,4 g
ác. cítrico monohidratado	⁺ 3,0 g
H ₂ O q.s.p.	2,0 l

Imediatamente após a retirada das bolhas, a solução era vertida em uma fôrma de acrílico de 21,0 cm x 19,0 cm x 1,5 cm (dimensões externas, de tal maneira que o gel a ser formado tinha aproximadamente 18,8 cm x 16,8 cm x 1,0 cm) e colocada no nível, em cima da mesa. Após o esfriamento a superfície do gel e a fôrma eram envolvidos por plástico para evitar a evaporação. No dia seguinte, aproximadamente uma hora antes da aplicação dos pavios, a fôrma era colocada na geladeira ainda envolvida pelo plástico.

4.4 Tampão das cubas dos eletrodos

Foram usados, em cada cuba, 300 ml do tampão lítio-borato empregados em duas corridas apenas. O eletrodo dentro das cubas era de aço inoxidável.

4.5 Preparo e aplicação dos pavios

A maceração das plântulas (ELLISON et alii, 1962) com o par de folhas cotiledonares, a plúmula do epicótilo, o epicótilo e o sistema radicular provavelmente em estágio primário, era feita nos orifícios de uma placa de teflon, usando-se uma gota de solução aquosa de 2-mercaptoetanol a 0,6 % para evitar a oxidação. O volume da gota foi estudado para embeber convenientemente o pavio. A placa de teflon, guardada normalmente no congelador, era colocada em uma bandeja com gelo para se efetuar a maceração, em temperaturas baixas e assim proteger a atividade das enzimas.

Após a maceração, em cada orifício, era colocado um

pavio (retângulo de 3 x 9 mm) de papel Whatman nº 3. Cada pavio era retirado do orifício e passado suavemente em papel de filtro para eliminação de possíveis pedaços de tecidos vegetais que não tinham sido perfeitamente macerados e imediatamente colocados em fendas feitas no gel.

No gel, ainda dentro da fôrma e parcialmente coberto pelo plástico, eram feitas 27 fendas em linha paralela a um dos lados menores do gel e exatamente a 7,0 cm do mesmo. As fendas eram feitas com um pente de alumínio. Uma faixa de 2,0 cm de gel em cada um dos dois lados menores do mesmo era coberto por flanela branca (ponte de 20 cm x 17 cm) para passagem de corrente.

A linha de fendas era colocada a 5,0 cm da ponte catódica. A faixa de gel entre a linha de aplicação dos pavios e a ponte negativa era chamada de porção anódica.

Durante o período de migração o sistema descrito era mantido dentro do refrigerador. Para evitar evaporação, era mantido o plástico cobrindo o gel e as pontes. Para atenuar o aumento de temperatura do gel, durante o processo, era colocado um recipiente com gelo sobre o gel e mantido durante toda a corrida.

Partindo-se da ponte catódica em direção à ponte anódica, a fenda número 1 era a da extrema esquerda. As fendas 1, 14 e 27 receberam cada uma, pavio embebido em homogeneizado de 1 plântula (1 plântula para cada pavio) da população G15 adotada como padrão devido a existência de maior quantidade de sementes. As bandas apresentadas pela população padrão, serviram de referência para o cálculo da mobilidade eletroforética.

Além dos 3 pavios padrões, em cada gel eram corridos 24 indivíduos, divididos em 4 lotes de 6 plântulas cada. Desta maneira considerando o gel nº 1, as "raias" de 2 a 7 (lote 1) correspondiam a 6 indivíduos da população G6, as "raias" de 8 a 13 (lote 2) a 6 indivíduos da população G12, as "raias" de 15 a 20 (lote 3) a 6 indivíduos da população G18 e as "raias" de 21 a 26 (lote 4) a 6 indivíduos da população G9, de acordo com a TABELA 4.

4.6 Montagem do equipamento de eletroforese

A fôrma de acrílico com o gel era colocada sobre duas cubas de acrílico, conectadas a uma fonte de corrente contínua. Essa conexão era feita por eletrodos existentes na tampa su-

TABELA 4 - Esquema dos lotes de 6 indivíduos analisados em cada um dos 52 geis.

número do gel	lote 1	lote 2	lote 3	lote 4
1	G6	G12	G18	G9
2	G5	G11	G17	S3
3	G4	G10	G16	S2
4	G3	G9	G15	S1
5	G2	G8	G14	G20
6	G1	G7	G13	G19
7	S3	G6	G12	G18
8	S2	G5	G11	G17
9	S1	G4	G10	G16
10	G20	G3	G9	G15
11	G19	G2	G8	G14
12	G18	G1	G7	G13
13	G17	S3	G6	G12
14	G16	S2	G5	G11
15	G15	S1	G4	G10
16	G14	G20	G3	G9
17	G13	G19	G2	G8
18	G12	G18	G1	G7
19	G11	G17	S3	G6
20	G10	G16	S2	G5
21	G9	G15	S1	G4
22	G8	G14	G20	G3
23	G7	G13	G19	G2
24	G6	G12	G18	G1
25	G5	G11	G17	S3
26	G4	G10	G16	S2
27	G3	G9	G15	S1
28	G2	G8	G14	G20
29	G1	G7	G13	G19
30	S3	G6	G12	G18
31	S2	G5	G11	G17
32	S1	G4	G10	G16
33	G20	G3	G9	G15
34	G19	G2	G8	G14
35	G18	G1	G7	G13
36	G17	S3	G6	G12
37	G16	S2	G5	G11
38	G15	S1	G4	G10
39	G14	G20	G3	G9
40	G13	G19	G2	G8
41	G12	G18	G1	G7
42	G11	G17	S3	G6
43	G10	G16	S2	G5
44	G9	G15	S1	G4
45	G8	G14	G20	G3
46	G7	G13	G19	G2
47	G6	G12	G18	G1
48	G5	G11	G17	S3
49	G4	G10	G16	S2
50	G3	G9	G15	S1
51	G2	G8	G14	G20
52	G1	G7	G13	G19

G - *E. grandis*

S - *E. saligna*

perior da cuba e ligado a um fio de aço inoxidável que ficava dentro do tampão da cuba.

A ligação entre o tampão do eletrodo e o gel era feita por um tecido de flanela (20 cm x 17 cm) cobrindo 2,0 cm de cada lado do gel. Desta maneira a 5,0 cm do catodo, situava-se a linha de aplicação dos pavios e entre as pontes havia uma distância de 15,5 cm.

4.7 Corrente elétrica e tempo de migração

Nos testes preliminares a regulagem era feita de 30 em 30 minutos. Uma vez acertada a voltagem, a amperagem e o tempo de duração do processo, a migração desejada em torno de 8,0 cm a partir da linha de aplicação dos pavios, era atingida em 3,5 a 4 horas. O caminhar desejado era indicado pela frente do borato.

O processo iniciava-se com miliamperagem constante de 57 mA, passando-se à voltagem constante quando a mesma atingia o valor "voltagem inicial + 20 %", valor este determinado nos ensaios preliminares.

4.8 Corte do gel

O gel de aproximadamente 18,8 cm x 16,8 cm x 1,0 cm era aparado em seus 4 lados, coincidindo um dos lados exatamente com a frente do borato. Em um dos cantos era feito um corte para referência. Em seguida o pedaço de gel central era retirado da fôrma e colocado em uma armação de acrílico de altura 1,6 mm. Pela passagem de um fio tensionado, eram retiradas - um de cada vez - 5 fatias de gel, cada uma delas para ser analisada em um determinado sistema enzimático.

4.9 Revelação, lavagem e fixação

Embora tenham sido revelados 4 sistemas, apenas α esterase e β esterase apresentaram boa resolução.

4.9.1 Leucina aminopeptidase (LAP)

Foi seguida a metodologia de COUTINHO*:

Solução de L leucil β naftilamina HCl
(250 mg/10 ml H₂O) 1 ml
Tampão triz-ác.malêico (24,2 g trizma base + ác. malêico
até pH = 5,2 + H₂O q.s.p. 1000 ml) 50 ml

O gel era imerso durante 15 min à temperatura ambiente nessas 51 ml. Em seguida era acrescentado 1 ml da solução de "fast black K salt" (30 mg/ml). A revelação era processada a 37°C, durante o tempo necessário para o aparecimento das bandas. Em seguida o gel era lavado em água corrente e fixado na solução fixadora (1000 ml de metanol + 1000 ml de H₂O + 200 ml de ácido acético glacial) indicada por STEINER & JOSLYN (1979), durante 30 min.

4.9.2 Alfa esterase (α EST)

Foi seguida a metodologia de STEINER & JOHNSON (1973) modificada:

50 ml tampão NaH₂PO₄ . H₂O (15,18 g /500 ml H₂O) + tampão
NaHPO₄ (26,8 g/500 ml H₂O) até pH = 6,4 25 ml
H₂O 25 ml
solução de α naftil acetato (1 g em 25 ml de acetona +
25 ml de H₂O) 1 ml
álcool N propílico 2 ml

O gel era imerso nos 53 ml, à temperatura ambiente durante 15 min. Após esse tempo eram adicionados 50 mg de "fast blue RR", revelado na estufa a 37°C, lavado e fixado de maneira usual.

4.9.3 Beta esterase (β EST)

Foi usada a mesma metodologia de α EST com a substituição de 1 ml de solução de α naftil acetato por 1 ml de solução de β naftil acetato (1 g/50 ml de acetona).

* COUTINHO, S. da C. 1981. CENARGEN. EMBRAPA. Brasília. Informação pessoal.

4.9.4 Fosfatase ácida (ACPH)

Foi seguida a metodologia de SCANDALIOS (1969).

O gel era incubado durante a noite, à temperatura ambiente em:

Tampão acetato de pH = 4,0 (410 ml de solução de ácido acético glacial 0,2 M + 90 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M + 500 ml de H ₂ O)	100 ml
ácido α naftil fosfato	100 mg
"fast garnet"	100 mg
sol. aquosa de MgCl ₂ a 10 %	10 gotas

4.10 Análise e interpretação

Seguindo a metodologia de AYALA et alii (1972 b) os alelos foram numerados de acordo com sua ordem de mobilidade em relação ao anodo (eletrodo positivo). O alelo mais lento, ou seja, aquele que migrou menos para o anodo foi chamado de alelo 1, o seguinte, alelo 2 e assim por diante.

Para o alelo mais comum que migrou 1,2 cm, foi dado valor arbitrário de 1,00. Para os demais alelos desse loco, foram dados valores baseados na sua distância em relação ao alelo 1,00. Um determinado alelo que migrou 1,5 cm, passou a ser designado como alelo 1,25, isto é, 1,5/1,2 e outro alelo com migração de 0,9 cm a alelo 0,75, isto é, 0,9/1,2.

Os resultados assim interpretados para cada indivíduo em cada sistema enzimático foram transcritos para um protocolo.

4.11 Estimativa da divergência populacional

De acordo com NEI (1972) pela eletroforese pode-se estimar a diferenciação genética de populações pois, em valores médios a diferenciação genética entre proteínas dá uma estimativa do grau de diferenciação genética entre as populações portadoras dessas proteínas. As frequências gênicas da análise de vários locos, permitem calcular a similaridade genética (S) e a distância genética (D).

Considerando-se a população X com os alelos $x_1, x_2, \dots, x_n$, que segregam ao acaso e a população Y com $y_1, y_2, \dots, y_n$ também segregando ao acaso, a probabilidade normalizada de 2 alelos, (um de cada população) tomados ao acaso, serem idênticos é

$$S_1 = \frac{\sum x_n \cdot y_n}{\sum x_n^2 \cdot \sum y_n^2}$$

onde

x_n e y_n são as frequências do enésimo alelo nas populações X e Y.

Porém quando se consideram vários locos, a similaridade genética média será definida por

$$S = \frac{J_x \cdot y}{J_x \cdot J_y}$$

onde

J_x, J_y e $J_x \cdot y$ correspondem às médias aritméticas, em relação a todos os locos analisados, das quantidades $\sum x_n, \sum y_n$ e $\sum x_n \cdot y_n$.

A distância genética D entre duas populações será

$$D = -\log_e S$$

O valor de D assim calculado varia de zero ao infinito. Isto é válido, quando se admite que as substituições de nucleotídeos em um gene, ocorrem independentemente uma da outra e que o número de substituições por loco obedece à distribuição de Poisson. D pode ser interpretado como sendo o número médio de substituições de nucleotídeos, detectados por eletroforese, que se foram acumulando durante a evolução, desde o momento em que as populações se separaram de um ancestral comum.

As frequências dos alelos estudados são utilizadas para os cálculos do coeficiente de similaridade S e a distância genética D. Os valores de S próximos de 1,00 revelam pouca diferenciação genética. Utilizando-se metodologia desenvolvida por SNEATH & SOKAL (1973) as duas populações que apresentam menor distância genética, isto é, as mais similares, são colocadas juntas, em um gráfico (fenograma), formando um aglomerado.

Os cálculos foram realizados no Centro de Computação Eletrônica da USP, utilizando-se o programa BIO CLUSTER para a obtenção do fenograma, sendo a aglomeração obtida, pela média aritmética simples (UPGMA).

5 RESULTADOS

Não foi obtido bom grau de resolução para as enzimas ADH, MDH, LAP, ACPH, TO, GDH e PRX, mesmo quando o homogeneizado das plântulas foi testado para diferentes tampões, condições de migração e coloração. Também não foi obtido bom bandejamento de SOD, GOT e AP e desta maneira somente foram analisadas α EST e β EST. A causa provável é que o 2-mercaptoetanol usado, não foi suficiente para proteger as enzimas convenientemente e outras substâncias precisariam ter sido usadas (KELLEY & ADAMS, 1977 e KUHNS & FRETZ, 1978).

Como não existem trabalhos feitos com α EST e β EST de *E. grandis* e *E. saligna* que pudessem servir de orientação, foram determinados 3 possíveis locos em α EST e 3 em β EST.

Na TABELA 6 encontra-se a frequência dos alelos 0,94, 1,00 e 1,06 do loco α EST-1, assim como o número (N) de indivíduos analisados em cada população, sendo 36 o menor, na G20 e 52 o maior nas G2, G18, G19 e S1. O alelo 0,94 somente foi detectado na população G11 (0,245). As populações G1, G2, G3, G4, G5, G7, G8, G10, G13, G16, G18, G20 e S1 apresentaram apenas o alelo 1,00. Embora as populações G6, G9, G11, G12, G14, G15, G17 e G19 apresentem este loco polimórfico, somente a G11 apresentou-o em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na FIGURA 5 é visualizada a localização das origens e as frequências observadas dos alelos do loco α EST-1.

Na TABELA 7 encontra-se a frequência dos alelos 0,93 e 1,00 do loco α EST-2, assim como o número (N) de indivíduos analisados em cada população, sendo 36 o menor, na G20 e 52 o maior, nas G2, G17, G18 e S1. As populações G2, G3, G4, G5, G6, G7, G10, G11, G12, G13, G14, G15, G17, G18, G19 e S1 apresentaram apenas o alelo 1,00. Embora as populações G1, G8, G9, G16, G20 e S3 apresentem este loco polimórfico, somente as G1, G8 e G9 apresentam-no em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na FIGURA 6 é visualizada a localização das origens e as frequências observadas dos alelos do loco α EST-2.

Na TABELA 8 é apresentada a frequência dos alelos 0,95, 1,00 e 1,03 do loco α EST-3, assim como o número (N) de indivíduos analisados em cada população, sendo 36 o menor, na G20 e 52 o maior, nas G2, G17, G18 e S1. Embora todas as populações tenham apresentado este loco polimórfico, apenas as G1, G9 e G10 apresentam-no em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na FIGURA 7 é visualizada a localização das origens e as frequências observadas dos alelos do loco α EST-3.

A frequência dos alelos 0,94 e 1,00 do loco β EST-1, assim como o número (N) de indivíduos analisados em cada população, sendo 35 o menor, na G8 e 53 o maior na S1, são apresentados na TABELA 9. As populações G3, G4, G5, G6, G7, G9, G10, G12, G13, G15, G16, G17, G20, S1 e S3 apresentaram apenas o alelo 1,00. Embora as populações G1, G2, G8, G11, G14, G18 e G19 apresentem este loco polimórfico, somente as G1, G2, G8, G18 e G19 apresentam-no em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na FIGURA 8 é visualizada a localização das origens e as frequências observadas dos alelos do loco β EST-1.

A frequência dos alelos 0,91 e 1,00 do loco β EST-2, assim como o número (N) de indivíduos analisados em cada população, sendo 35 o menor, na G8 e 53 o maior na S1 estão apresentados na TABELA 10. As populações G1, G3, G4, G5, G6, G8, G9, G10, G11, G12, G13, G14, G16, G17, G18, G19, G20 e S1 apresentam apenas o alelo 1,00. Embora as populações G2, G7, G15 e S3 apresentem este loco polimórfico, somente as G2, G15 e S3 apresentam-no em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na FIGURA 9 é visualizada a localização das origens e as frequências observadas dos alelos do loco β EST-2.

Na TABELA 11 encontra-se a frequência dos alelos 0,92, 1,00 e 1,03 do loco β EST-3, assim como o número (N) de indivíduos analisados em cada população, sendo 35 o menor, na população G8 e o maior 53 na S1. Embora todas as populações tenham apresentado este loco polimórfico, apenas as G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G15, G20 e S1 apresentam-no em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na FIGURA 10 é visualizada a localização das origens e as frequências observadas dos alelos do loco β EST-3.

Na FIGURA 3 são apresentados os padrões eletroforéticos de α EST e na FIGURA 4 os da β EST.

Na TABELA 12 é apresentada a relação das populações polimórficas e monomórficas. Considerando todas as populações analisadas de *E. grandis* a maior proporção de locos polimórficos (1,00) foi encontrada nos locos α EST-3 e β EST-3 e a menor (0,15) no β EST-2. Por outro lado, as populações de *E. grandis* com maior proporção de locos polimórficos (0,66) foram G1, G2, G8, G9, G11 e G19 e as com menor (0,33) foram G3, G4, G5, G10 e G13. Considerando-se *E. saligna*, a população australiana apresentou proporção de locos de esterase, polimórficos, muito menor (0,33) do que a da população brasileira (0,83).

Na TABELA 13 é apresentada a heterozigosidade média por loco e por população. A maior média foi observada no loco α EST-3 ($0,788 \pm 0,042$) e a menor no loco β EST-2 ($0,017 \pm 0,014$).

Na TABELA 14 é apresentada a heterozigosidade média por população. A maior heterozigosidade foi encontrada na população G11 ($0,456 \pm 0,152$) e a menor na S1 ($0,041 \pm 0,031$). As populações do planalto de Atherton (G11, G12, G13, G14, G15, G16, G17 e G18) apresentam uma heterozigosidade média de 0,267, ao passo que as populações do sul (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8 e G9) apresentam-na com valor de 0,229.

A TABELA 15 apresenta os coeficientes de distância genética (acima da diagonal) e de similaridade genética (abaixo da diagonal) segundo NEI (1972). Cotejando-se os dados de distância genética entre as diversas populações australianas de *E. grandis*, verifica-se que a média de distância entre as origens do planalto de Atherton (de G11 a G18) é de 0,035, entre as origens sulinas (de G1 a G9) de 0,0079 e entre as origens do norte e as do sul, de 0,026. A distância genética entre a população brasileira G20 e as origens do planalto de Atherton é de 0,024 e as origens sulinas de 0,0109.

A FIGURA 11 apresenta o fenograma das 20 populações de *E. grandis* e das 2 de *E. saligna*.

6 DISCUSSÃO

Foram encontrados alelos com frequências muito baixas (da ordem de 1/200), sendo considerados alelos raros e desprezados para o presente cálculo populacional. Ocorreram também

TABELA 5 - Frequência alélica do loco α EST-1 (esterase) com os 3 alelos estudados.

Populações	N	alelos		
		0,94	1,00	1,06
G1	48	0,000	1,000	0,000
G2	52	0,000	1,000	0,000
G3	46	0,000	1,000	0,000
G4	48	0,000	1,000	0,000
G5	47	0,000	1,000	0,000
G6	51	0,000	0,971	0,029
G7	41	0,000	1,000	0,000
G8	47	0,000	1,000	0,000
G9	51	0,000	0,931	0,069
G10	46	0,000	1,000	0,000
G11	51	0,245	0,735	0,020
G12	48	0,000	0,990	0,010
G13	50	0,000	1,000	0,000
G14	48	0,000	0,979	0,021
G15	47	0,000	0,968	0,032
G16	48	0,000	1,000	0,000
G17	52	0,000	0,990	0,010
G18	52	0,000	1,000	0,000
G19	46	0,000	0,913	0,087
G20	36	0,000	1,000	0,000
S1	52	0,000	1,000	0,000
S3	42	0,000	0,917	0,083

N - Número de indivíduos

G - *E. grandis*

S - *E. saligna*

TABELA 6 - Frequência alélica do loco α EST-2 (esterase) com os 2 alelos estudados.

Populações	N	alelos	
		0,93	1,00
G1	48	0,021	0,979
G2	52	0,000	1,000
G3	46	0,000	1,000
G4	48	0,000	1,000
G5	47	0,000	1,000
G6	51	0,000	1,000
G7	41	0,000	1,000
G8	47	0,022	0,978
G9	51	0,020	0,980
G10	46	0,000	1,000
G11	51	0,000	1,000
G12	48	0,000	1,000
G13	50	0,000	1,000
G14	48	0,000	1,000
G15	47	0,000	1,000
G16	48	0,010	0,990
G17	52	0,000	1,000
G18	52	0,000	1,000
G19	46	0,000	1,000
G20	36	0,069	0,931
S1	52	0,000	1,000
S3	42	0,214	0,786

N - Número de indivíduos

G - *E. grandis*

S - *E. saligna*

TABELA 7 - Frequência alélica do loco α EST-3 (esterase) com os 3 alelos estudados.

Populações	N	alelos		
		0,95	1,00	1,03
G1	48	0,281	0,625	0,094
G2	52	0,442	0,529	0,029
G3	46	0,467	0,533	0,000
G4	48	0,520	0,480	0,000
G5	47	0,447	0,542	0,011
G6	51	0,451	0,529	0,020
G7	41	0,488	0,512	0,000
G8	47	0,424	0,554	0,022
G9	51	0,206	0,510	0,284
G10	46	0,630	0,315	0,055
G11	51	0,500	0,461	0,039
G12	48	0,458	0,542	0,000
G13	50	0,469	0,531	0,000
G14	48	0,531	0,469	0,000
G15	47	0,266	0,702	0,032
G16	48	0,490	0,490	0,020
G17	52	0,490	0,471	0,039
G18	52	0,528	0,385	0,087
G19	46	0,489	0,511	0,000
G20	36	0,375	0,472	0,153
S1	52	0,837	0,154	0,009
S3	42	0,477	0,345	0,178

N - Número de indivíduos

G - *E. grandis*

S - *E. saligna*

TABELA 8 - Frequência alélica do loco β EST-1 (esterase) com os 2 alelos estudados.

Populações	N	alelos	
		0,94	1,00
G1	42	0,012	0,988
G2	48	0,010	0,990
G3	46	0,000	1,000
G4	44	0,000	1,000
G5	41	0,000	1,000
G6	42	0,000	1,000
G7	36	0,000	1,000
G8	35	0,057	0,943
G9	47	0,000	1,000
G10	47	0,000	1,000
G11	43	0,605	0,395
G12	42	0,000	1,000
G13	36	0,000	1,000
G14	41	0,024	0,976
G15	47	0,000	1,000
G16	46	0,000	1,000
G17	37	0,000	1,000
G18	40	0,012	0,988
G19	48	0,021	0,979
G20	36	0,000	1,000
S1	53	0,000	1,000
S3	30	0,000	1,000

N - Número de indivíduos

G - *E. grandis*

S - *E. saligna*

TABELA 9 - Frequência alélica do loco β EST-2 (esterase) com os 2 alelos estudados.

Populações	N	alelos	
		0,91	1,00
G1	42	0,000	1,000
G2	48	0,010	0,990
G3	46	0,000	1,000
G4	44	0,000	1,000
G5	41	0,000	1,000
G6	42	0,000	1,000
G7	36	0,014	0,986
G8	35	0,000	1,000
G9	47	0,000	1,000
G10	47	0,000	1,000
G11	43	0,000	1,000
G12	42	0,000	1,000
G13	36	0,000	1,000
G14	41	0,000	1,000
G15	47	0,011	0,989
G16	46	0,000	1,000
G17	37	0,000	1,000
G18	40	0,000	1,000
G19	48	0,000	1,000
G20	36	0,000	1,000
S1	53	0,000	1,000
S3	30	0,150	0,850

N - Número de indivíduos

G - *E. grandis*

S - *E. saligna*

TABELA 10 - Frequência alélica do loco β EST-3 (esterase) com os 3 alelos estudados.

Populações	N	alelos		
		0,92	1,00	1,03
G1	42	0,119	0,833	0,048
G2	48	0,219	0,750	0,031
G3	46	0,442	0,558	0,000
G4	44	0,295	0,693	0,012
G5	41	0,341	0,659	0,000
G6	42	0,275	0,700	0,025
G7	36	0,222	0,778	0,000
G8	35	0,243	0,757	0,000
G9	47	0,383	0,606	0,011
G10	47	0,596	0,404	0,000
G11	43	0,570	0,407	0,023
G12	42	0,405	0,583	0,012
G13	36	0,444	0,542	0,014
G14	41	0,573	0,427	0,000
G15	47	0,138	0,734	0,128
G16	46	0,426	0,574	0,000
G17	37	0,342	0,618	0,040
G18	41	0,564	0,333	0,103
G19	48	0,250	0,687	0,063
G20	36	0,319	0,528	0,153
S1	53	0,972	0,028	0,000
S3	30	0,417	0,517	0,066

N - Número de indivíduos

G - *E. grandis*

S - *E. saligna*

TABELA 11 - Relação das populações analisadas quanto ao polimorfismo.

Populações	ESTERASES						Média
	EST-1 α	EST-2 α	EST-3 β	EST-1 β	EST-2 β	EST-3	
G1	M	P	P	P	M	P	0,66
G2	M	M	P	P	P	P	0,66
G3	M	M	P	M	M	P	0,33
G4	M	M	P	M	M	P	0,33
G5	M	M	P	M	M	P	0,33
G6	P	M	P	M	M	P	0,50
G7	M	M	P	M	P	P	0,50
G8	M	P	P	P	M	P	0,66
G9	P	P	P	M	M	P	0,66
G10	M	M	P	M	M	P	0,33
G11	P	M	P	P	M	P	0,66
G12	P	M	P	M	M	P	0,50
G13	M	M	P	M	M	P	0,33
G14	P	M	P	P	M	P	0,66
G15	P	M	P	M	P	P	0,66
G16	M	P	P	M	M	P	0,50
G17	P	M	P	M	M	P	0,50
G18	M	M	P	P	M	P	0,50
G19	P	M	P	P	M	P	0,66
G20	M	P	P	M	M	P	0,50
S1	M	M	P	M	M	P	0,33
S3	P	P	P	M	P	P	0,83
Média	0,40	0,25	1,00	0,35	0,15	1,00	

G - *E. grandis*

S - *E. saligna*

M - Loco monomórfico (frequência do alelo mais comum maior do que 99 %).

P - Loco polimórfico (frequência do alelo mais comum $\leq$ 99 %).

TABELA 12 - Heterozigiosidade média H/N por loco e por população para esterases.

POPULAÇÃO	α EST-1			α EST-2			α EST-3			β EST-1			β EST-2			β EST-3		
	N	H	H/N	N	H	H/N	N	H	H/N	N	H	H/N	N	H	H/N	N	H	H/N
G1	48	0	0,000	48	2	0,042	48	35	0,729	42	1	0,024	42	0	0,000	42	12	0,286
G2	52	0	0,000	52	0	0,000	52	48	0,923	48	1	0,021	48	1	0,021	48	21	0,437
G3	46	0	0,000	46	0	0,000	46	43	0,935	46	0	0,000	46	0	0,000	46	24	0,522
G4	48	0	0,000	48	0	0,000	48	46	0,958	44	0	0,000	44	0	0,000	44	27	0,614
G5	47	0	0,000	47	0	0,000	47	43	0,915	41	0	0,000	41	0	0,000	41	20	0,488
G6	51	3	0,059	51	0	0,000	51	42	0,824	42	0	0,000	42	0	0,000	42	15	0,357
G7	41	0	0,000	41	0	0,000	41	36	0,878	36	0	0,000	36	1	0,028	36	14	0,389
G8	47	0	0,000	47	2	0,043	47	41	0,872	35	4	0,114	35	0	0,000	35	15	0,429
G9	51	6	0,118	51	2	0,039	51	34	0,667	47	0	0,000	47	0	0,000	47	28	0,596
G10	46	0	0,000	46	0	0,000	46	20	0,435	47	0	0,000	47	0	0,000	47	18	0,383
G11	51	27	0,529	51	0	0,000	51	45	0,882	43	26	0,605	43	0	0,000	43	31	0,721
G12	48	1	0,021	48	0	0,000	48	35	0,729	42	0	0,000	42	0	0,000	42	25	0,595
G13	50	0	0,000	50	0	0,000	50	47	0,940	36	0	0,000	36	0	0,000	36	32	0,889
G14	48	2	0,042	48	0	0,000	48	45	0,937	41	0	0,000	41	0	0,000	41	33	0,805
G15	47	3	0,064	47	0	0,000	47	23	0,489	47	0	0,000	47	1	0,021	47	20	0,426
G16	48	0	0,000	48	1	0,021	48	47	0,979	46	0	0,000	46	0	0,000	46	29	0,630
G17	52	1	0,019	52	0	0,000	52	38	0,731	37	0	0,000	37	0	0,000	37	19	0,514
G18	52	0	0,000	52	0	0,000	52	41	0,788	40	1	0,025	40	0	0,000	41	17	0,415
G19	46	8	0,174	46	0	0,000	46	39	0,848	48	2	0,042	48	0	0,000	48	10	0,208
G20	36	0	0,000	36	5	0,139	36	26	0,722	36	0	0,000	36	0	0,000	36	22	0,611
S1	52	0	0,000	52	0	0,000	52	10	0,192	53	0	0,000	53	0	0,000	53	3	0,057
S3	42	7	0,167	42	18	0,429	42	40	0,952	30	0	0,000	30	9	0,300	30	25	0,833
Média	0,054	±	0,025	0,032	±	0,020	0,768	±	0,042	0,038	±	0,028	0,017	±	0,014	0,509	±	0,043

N - Número de indivíduos

H - Número de heterozigotos

G - *E. grandis*

S - *E. saligna*

TABELA 13 - Heterozigosidade média total $\pm$ 1 erro padrão por população.

População	Heterozigosidade
G1	0,180 $\pm$ 0,118
G2	0,234 $\pm$ 0,154
G3	0,243 $\pm$ 0,162
G4	0,262 $\pm$ 0,171
G5	0,234 $\pm$ 0,158
G6	0,207 $\pm$ 0,136
G7	0,216 $\pm$ 0,146
G8	0,243 $\pm$ 0,142
G9	0,237 $\pm$ 0,127
G10	0,136 $\pm$ 0,086
G11	0,456 $\pm$ 0,152
G12	0,224 $\pm$ 0,140
G13	0,305 $\pm$ 0,193
G14	0,297 $\pm$ 0,182
G15	0,167 $\pm$ 0,093
G16	0,272 $\pm$ 0,174
G17	0,211 $\pm$ 0,133
G18	0,205 $\pm$ 0,134
G19	0,212 $\pm$ 0,132
G20	0,245 $\pm$ 0,136
S1	0,041 $\pm$ 0,031
S3	0,447 $\pm$ 0,182

G - *E. grandis*

S - *E. saligna*

TABELA 14 - Matriz de coeficientes de distância genética (acima da diagonal) e de similaridade genética (abaixo da diagonal), segundo NEI (1972).

	G 1	G 2	G 3	G 4	G 5	G 6	G 7	G 8	G 9	G 10	G 11	G 12	G 13	G 14	G 15	G 16	G 17	G 18	G 19	G 20	S 1	S 3	
G 1	-	0,006	0,122	0,014	0,012	0,303	0,008	0,006	0,018	0,064	0,146	0,019	0,024	0,048	0,003	0,023	0,017	0,358	0,012	0,018	0,194	0,043	G 1
G 2	0,994	-	0,509	0,002	0,002	0,301	0,001	0,001	0,018	0,035	0,121	0,006	0,010	0,025	0,008	0,508	0,004	0,034	0,002	0,010	0,137	0,027	G 2
G 3	0,977	0,991	-	0,004	0,002	0,005	0,010	0,009	0,017	0,012	0,100	0,000	0,000	0,004	0,021	0,009	0,002	0,011	0,007	0,008	0,080	0,020	G 3
G 4	0,986	0,998	0,998	-	0,001	0,001	0,001	0,003	0,021	0,022	0,113	0,003	0,005	0,015	0,016	0,513	0,031	0,023	0,002	0,010	0,107	0,022	G 4
G 5	0,988	0,997	0,998	0,999	-	0,001	0,003	0,003	0,015	0,022	0,109	0,001	0,002	0,012	0,012	0,512	0,031	0,021	0,003	0,002	0,106	0,022	G 5
G 6	0,991	0,999	0,999	0,999	0,999	-	0,001	0,001	0,016	0,027	0,115	0,003	0,006	0,016	0,009	0,504	0,032	0,026	0,001	0,008	0,120	0,024	G 6
G 7	0,992	0,999	0,999	0,998	0,998	0,998	-	0,001	0,022	0,034	0,124	0,007	0,010	0,025	0,011	0,508	0,034	0,035	0,002	0,014	0,135	0,028	G 7
G 8	0,994	0,999	0,999	0,997	0,997	0,998	0,999	-	0,018	0,036	0,119	0,007	0,010	0,025	0,018	0,508	0,035	0,035	0,003	0,012	0,139	0,029	G 8
G 9	0,982	0,982	0,982	0,980	0,980	0,984	0,978	0,982	-	0,038	0,115	0,016	0,017	0,027	0,020	0,517	0,035	0,030	0,020	0,010	0,129	0,025	G 9
G 10	0,917	0,966	0,966	0,978	0,978	0,973	0,965	0,964	0,963	-	0,099	0,015	0,012	0,004	0,063	0,511	0,037	0,033	0,029	0,023	0,032	0,041	G 10
G 11	0,864	0,886	0,886	0,893	0,893	0,891	0,883	0,882	0,882	0,906	-	0,103	0,100	0,089	0,143	0,501	0,037	0,037	0,035	0,027	0,039	0,136	G 11
G 12	0,981	0,994	0,994	0,997	0,997	0,997	0,993	0,993	0,984	0,985	0,992	-	0,000	0,006	0,017	0,500	0,031	0,014	0,005	0,007	0,089	0,020	G 12
G 13	0,976	0,993	0,993	0,995	0,997	0,994	0,990	0,990	0,983	0,988	0,995	0,995	0,996	0,994	0,992	0,500	0,032	0,010	0,008	0,008	0,078	0,019	G 13
G 14	0,953	0,976	0,976	0,981	0,988	0,982	0,975	0,976	0,973	0,976	0,986	0,993	0,996	0,996	0,996	0,505	0,030	0,004	0,019	0,016	0,047	0,022	G 14
G 15	0,997	0,992	0,992	0,994	0,998	0,991	0,989	0,992	0,980	0,988	0,987	0,983	0,978	0,957	-	0,522	0,017	0,053	0,011	0,016	0,186	0,046	G 15
G 16	0,977	0,992	0,992	0,997	0,998	0,996	0,992	0,992	0,983	0,989	0,993	0,999	1,000	0,995	0,975	-	0,011	0,011	0,006	0,007	0,079	0,017	G 16
G 17	0,983	0,995	0,995	0,999	0,999	0,998	0,996	0,993	0,984	0,984	0,988	0,999	0,998	0,990	0,983	0,999	-	0,015	0,003	0,006	0,033	0,018	G 17
G 18	0,943	0,967	0,967	0,977	0,983	0,974	0,965	0,965	0,970	0,997	0,998	0,986	0,990	0,995	0,948	0,989	0,985	-	0,028	0,015	0,038	0,021	G 18
G 19	0,968	0,998	0,998	0,998	0,997	0,999	0,997	0,997	0,980	0,972	0,895	0,995	0,992	0,981	0,989	0,993	0,997	0,973	-	0,011	0,121	0,025	G 19
G 20	0,982	0,990	0,992	0,990	0,992	0,992	0,986	0,988	0,990	0,977	0,898	0,993	0,992	0,981	0,984	0,993	0,994	0,985	0,989	-	0,192	0,014	G 20
S 1	0,623	0,872	0,923	0,938	0,939	0,886	0,874	0,870	0,879	0,969	0,870	0,915	0,925	0,954	0,830	0,924	0,911	0,962	0,886	0,903	-	0,083	S 1
S 3	0,958	0,973	0,980	0,978	0,978	0,977	0,972	0,971	0,975	0,979	0,873	0,980	0,981	0,978	0,955	0,983	0,982	0,979	0,975	0,986	0,920	-	S 3

G - E. grandes

S - E. saligna

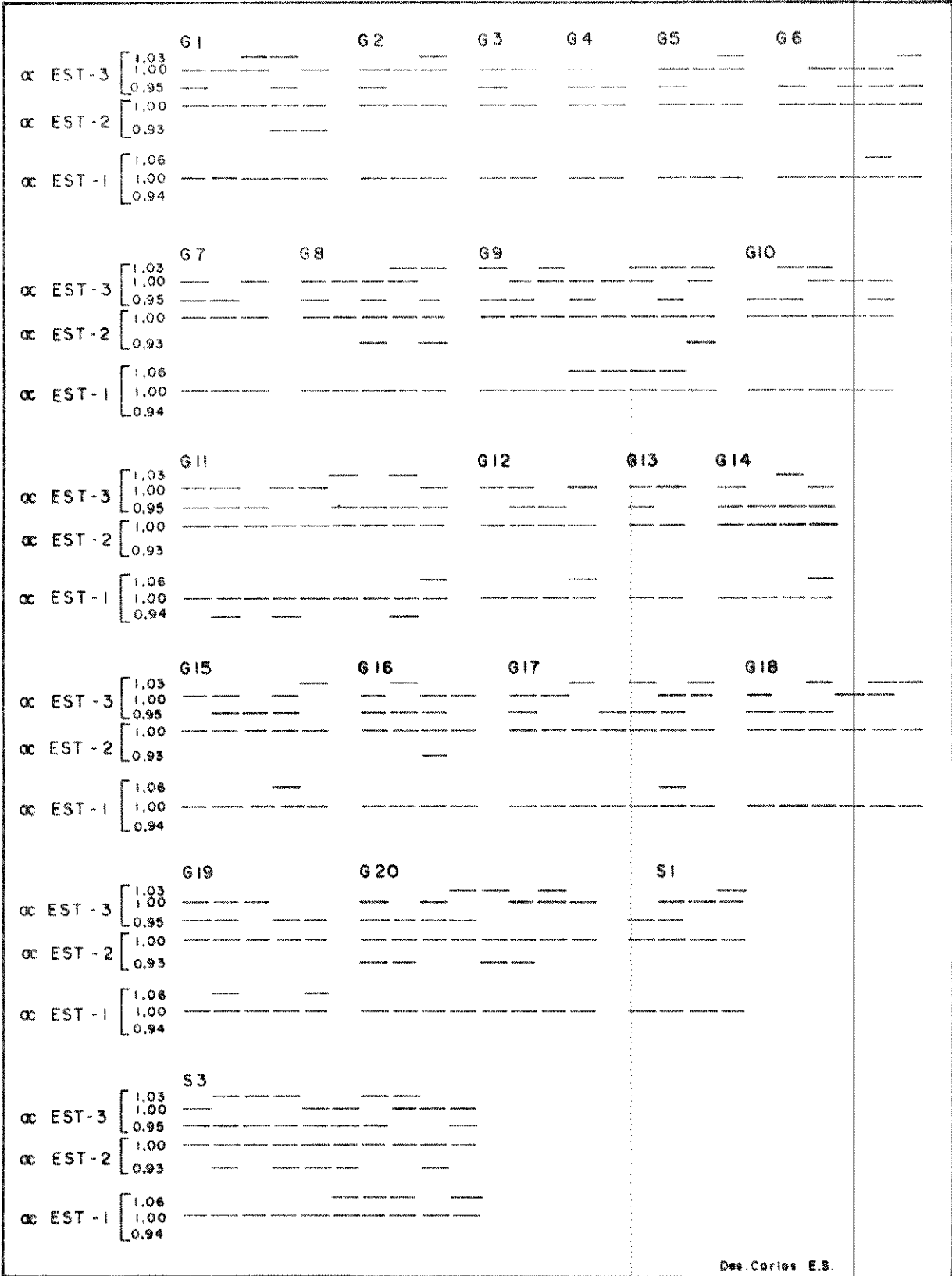


FIGURA 3 — Padrões eletroforéticos da α esterase de E. grandis (G) e E. saligna (S). EST = esterase.

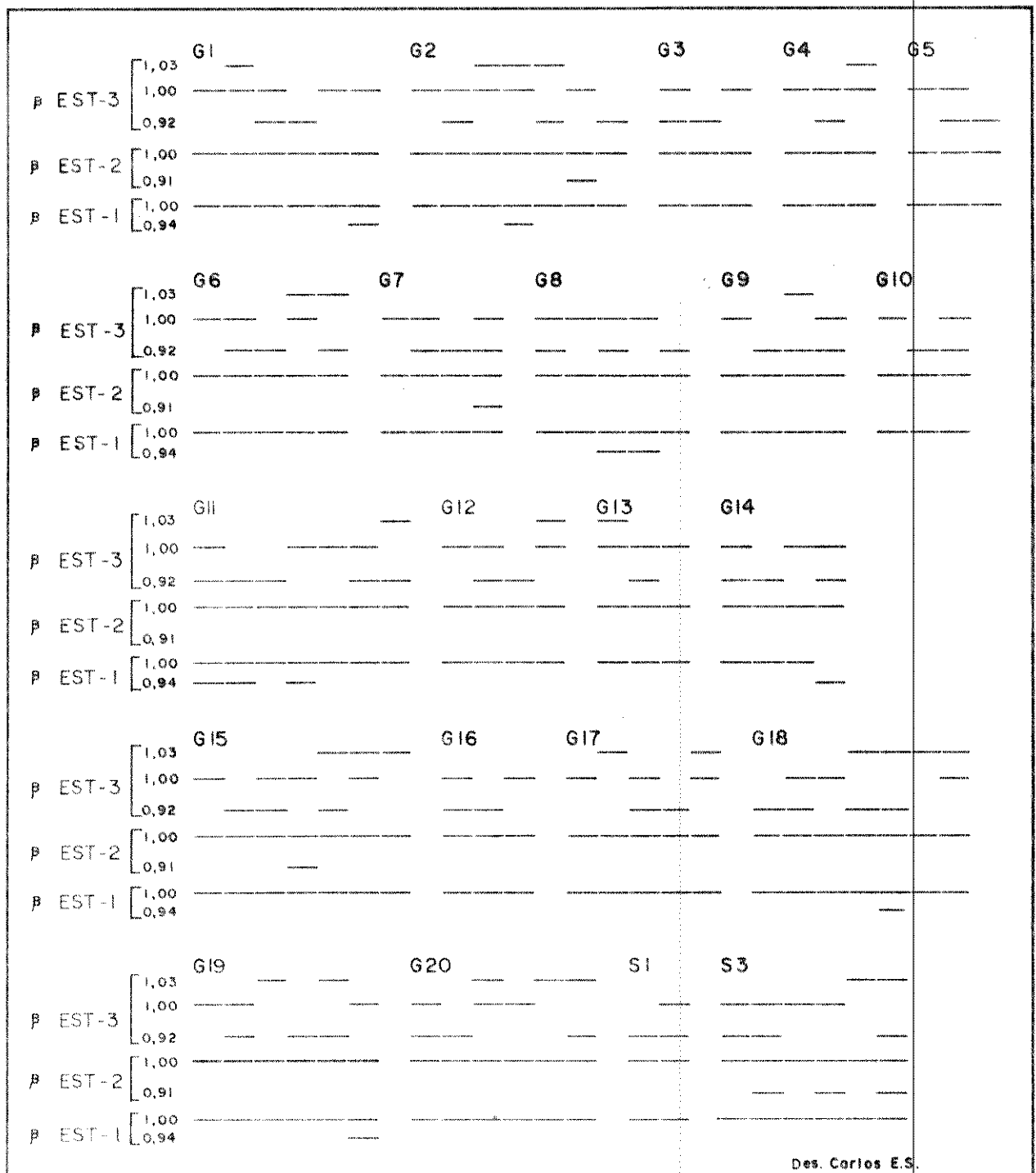


FIGURA 4 – Padrões eletroforéticos da β esterase de E. grandis (G) e E. saligna (S). EST = esterase.

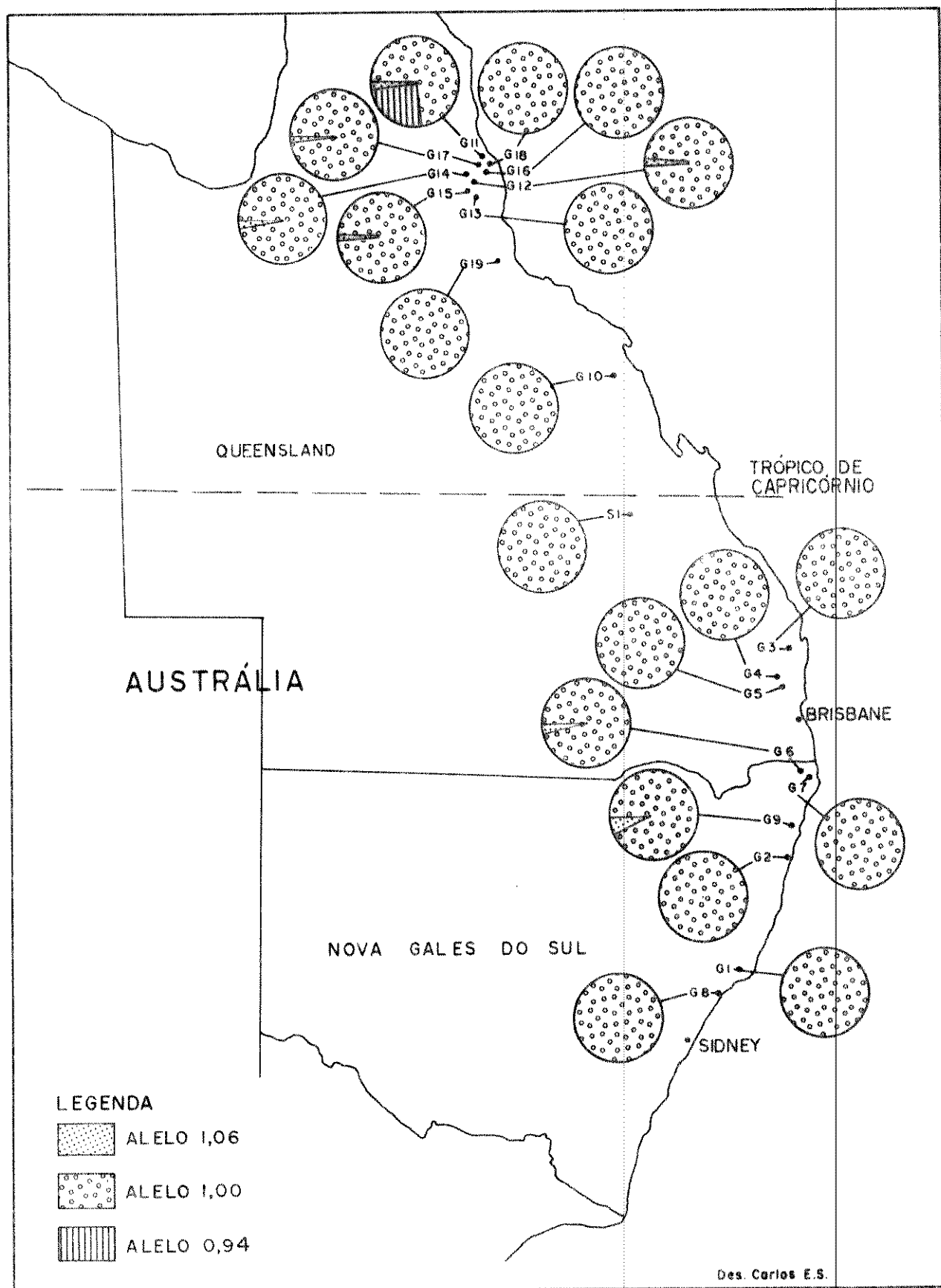


FIGURA 5 — Mapa parcial da Austrália com as frequências alélicas do loco α esterase 1 de *E. grandis* (G) e *E. saligna* (S).

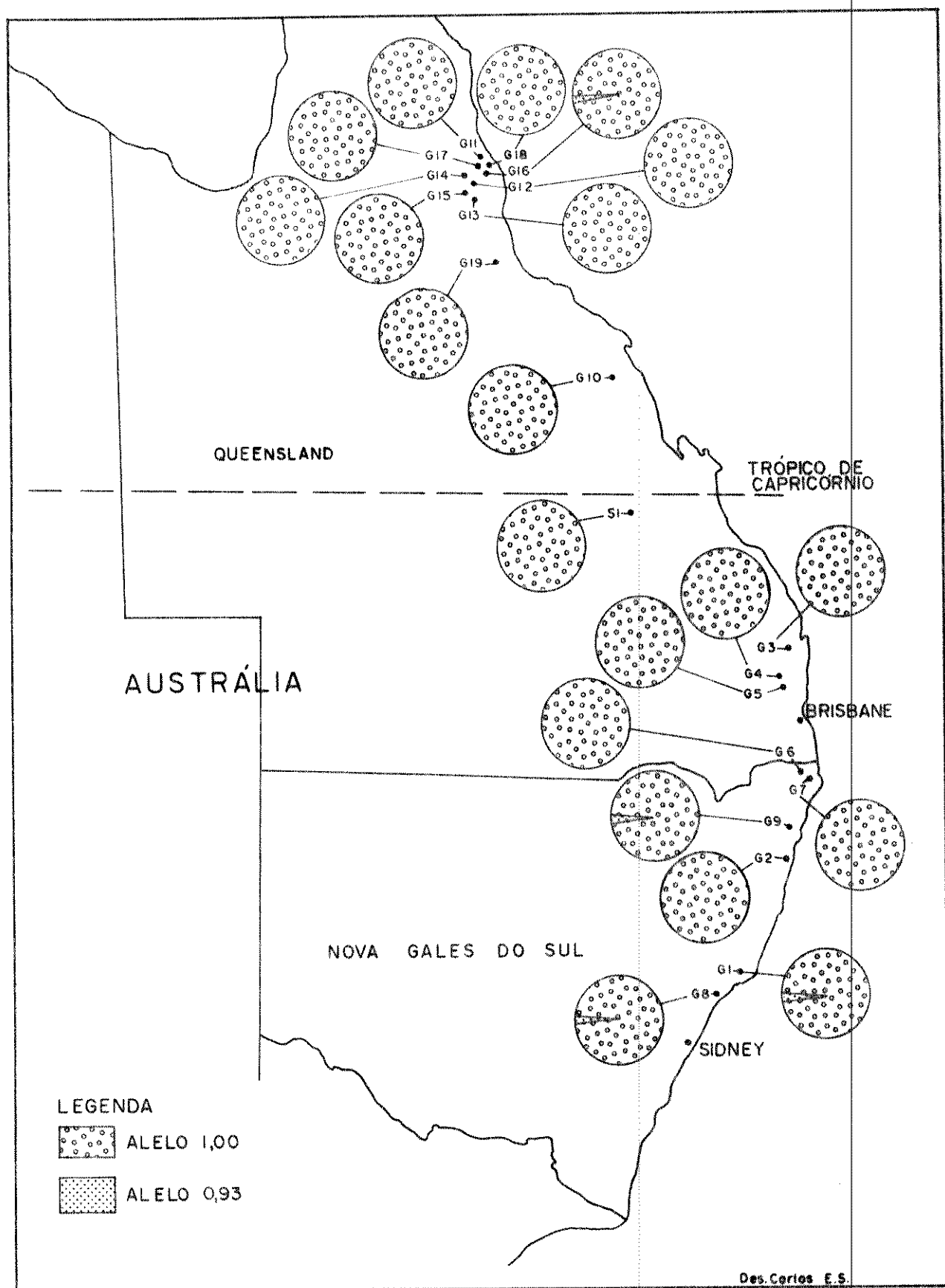


FIGURA 6 — Mapa parcial da Austrália com as frequências alélicas do loco α esterase 2 de *E. grandis* (G) e *E. saligna* (S).

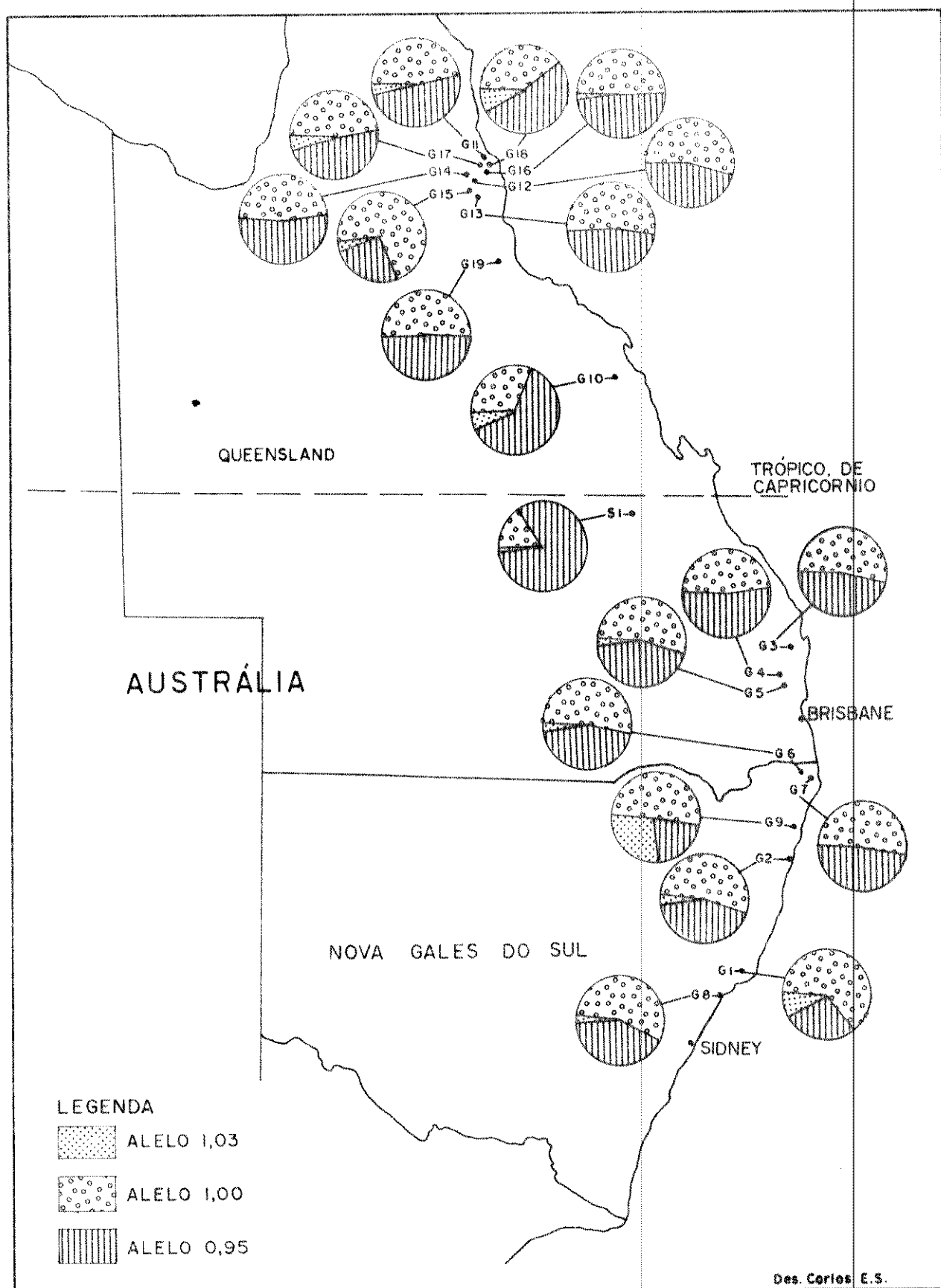


FIGURA 7 - Mapa parcial da Austrália com as frequências alélicas do loco α esterase 3 de *E. grandis* (G) e *E. saligna* (S).

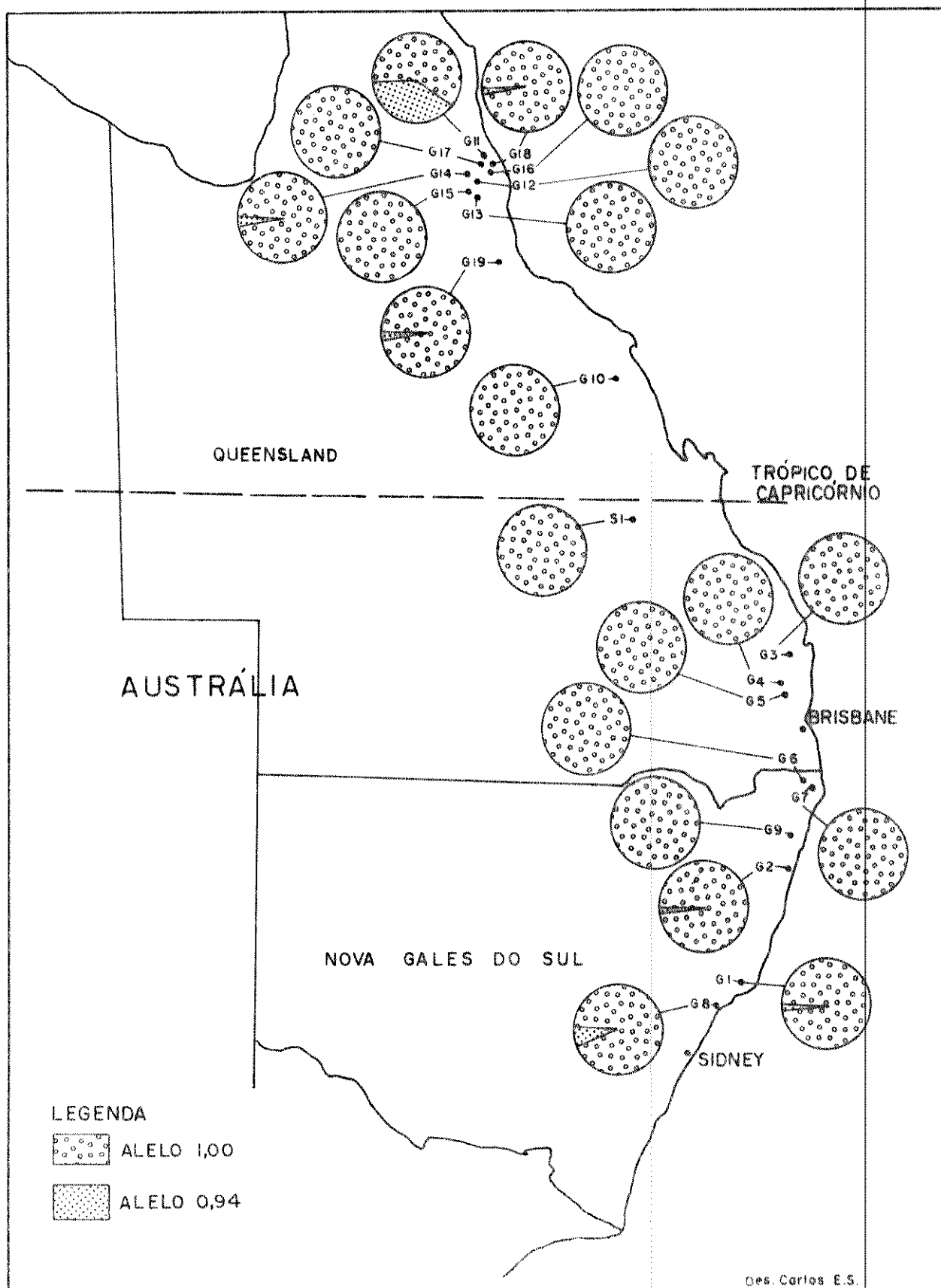


FIGURA 8 — Mapa parcial da Austrália com as frequências alélicas do loco β esterase I de *E. grandis* (G) e *E. saligna* (S).

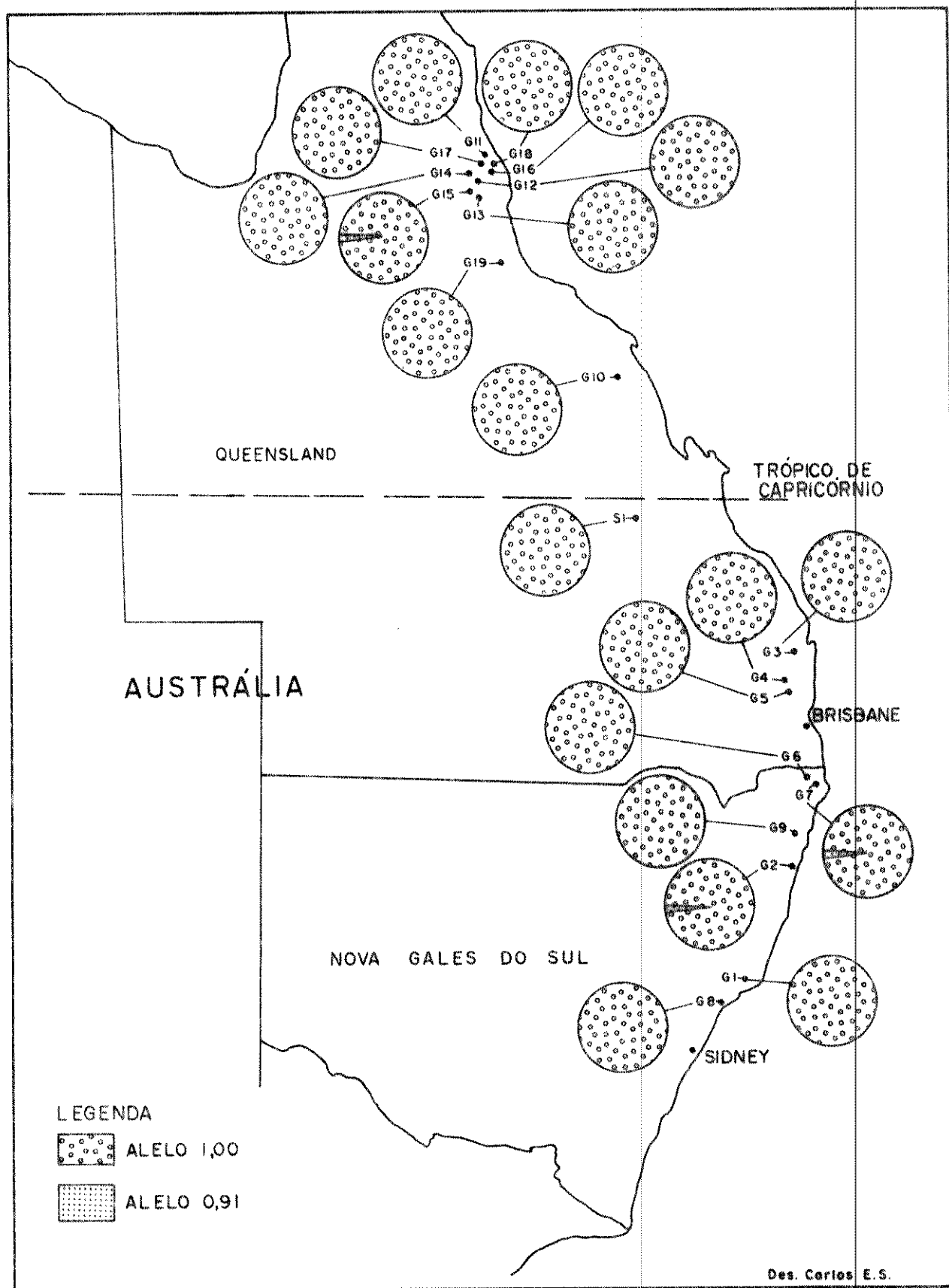


FIGURA 9 — Mapa parcial da Austrália com as frequências alélicas do loco β esterase 2 de *E. grandis* (G) e *E. saligna* (S).

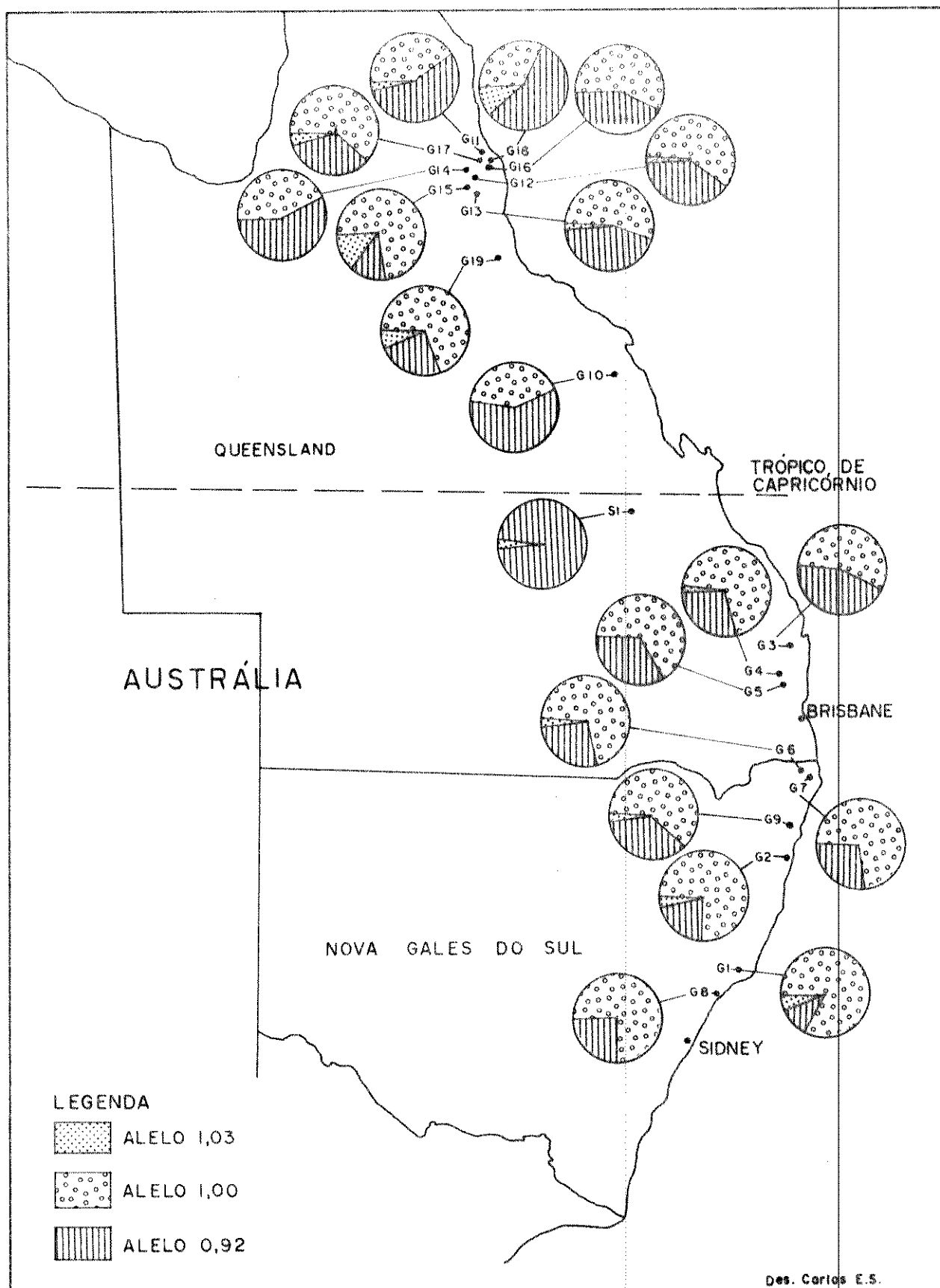


FIGURA 10 — Mapa parcial da Austrália com as frequências alélicas do loco β esterase 3 de *E. grandis* (G) e *E. saligna* (S).

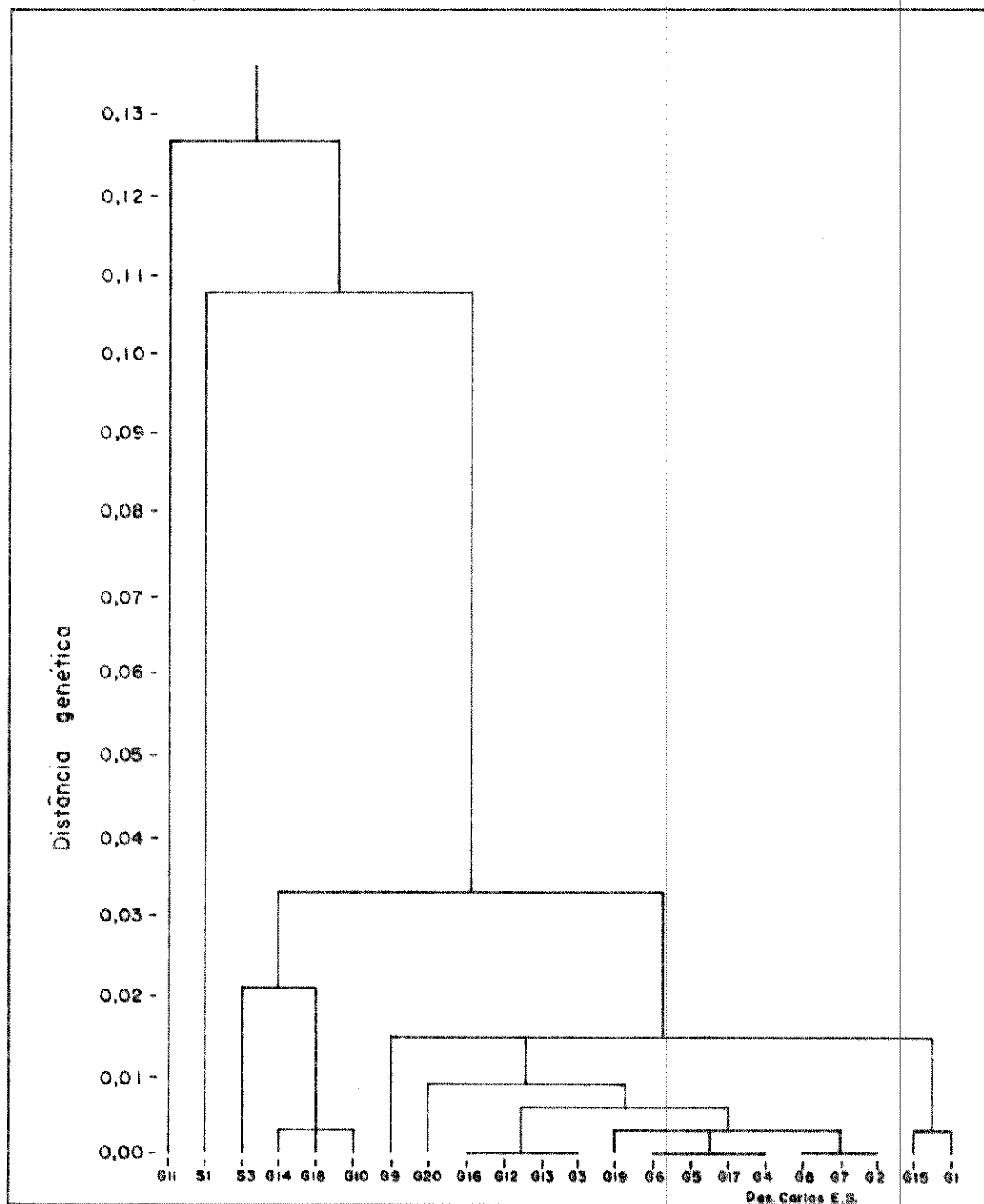


FIGURA II - Fenograma das 20 populações de E. grandis (G) e das 2 de E. saligna (S).

alguns casos de alelo nulo, tendo sido desprezados os indivíduos portadores dos mesmos. O número de indivíduos analisados por população havia sido fixado em 50, porém, como alguns locos apresentaram problemas de leitura, surgiram casos como a análise de apenas 36 indivíduos da população G20. Por outro lado a população S1 teve os locos β EST-1, β EST-2 e β EST-3 analisados em 53 indivíduos.

O estudo do polimorfismo só em esterases de *E. grandis* não permitiu a distinção das populações pesquisadas. KUHNS & FRETZ (1978) estudam a distinção de cultivares de rosas utilizando-se da proteína total e de mais 6 sistemas. Os valores do coeficiente de similaridade mostram-se úteis para o agrupamento de cultivares, mas não para a distinção de cultivares muito próximos. Se é possível o estudo de cultivares de rosas, cujas diferenças genéticas são mínimas, com vários sistemas enzimáticos seria possível a distinção das populações de *E. grandis* (com diferenças genéticas provavelmente bem maiores), principalmente a distinção das populações isoladas do planalto de Atherton, pois as origens sulinas, fazendo parte de uma área de ocorrência contínua, apresentar-se-iam com diferenças bem menores.

As esterases mostram-se com uma resolução muito boa, apresentando-se monoméricos (HARRIS & HOPKINSON, 1976) os possíveis locos estudados.

E. grandis e *E. saligna* pertencem ao subgênero *Symphomyrthus* e como tal cruzam-se entre si e com outras espécies do mesmo taxon como *E. camaldulensis* Deh., *E. tereticornis* Sm. e *E. urophylla* S. T. Bla. (PRYOR & JOHNSON, 1971 e PRYOR, 1976). Como consequência do cruzamento das espécies introduzidas no início do século, é esperada uma hibridação* nas populações originadas dessas introduções. Essa é uma razão que torna difícil o relacionamento genético da população G20 com as origens estudadas. Outra razão dessa dificuldade é o desconhecimento da ou das origens introduzidas no início do século, embora GOLFARI (1977) se refira à latitude de 349. É também desconhecido o número efetivo populacional (N_e).

* CAVALCANTE, G. 1971. FEPASA. Rio Claro (S.P.). Informação pessoal.

O problema do número efetivo populacional aparece também quando se analisa as populações estudadas neste trabalho, visto que quando o tamanho efetivo não é representativo de uma população, a mesma não estaria sendo estudada convenientemente. As evidências disponíveis sugerem que o gênero *Eucalyptus* é principalmente alógamo e, portanto, a progênie de uma determinada árvore seria o resultado da combinação do material genético de diversas árvores. Entretanto os tratamentos G4, G5, G8 e G9 - cada um com sementes de apenas duas árvores (só para citar os extremos) - não estariam sendo convenientemente amostrados.

Os coeficientes de distância genética possibilitariam comparar a distância entre as populações do planalto de Atherton - de G11 a G18 (0,0243) e as populações sulinas - de G1 a G9 (0,0109). Outra possibilidade seria a comparação da população brasileira G20 com os dois grupos australianos. Porém a diferença observada de 0,0134 não permite distinguir um grupo do outro e nem sugerir a origem dos plantios da Companhia Paulista de Estradas de Ferro. Tais fatos são sugeridos pela observação do fenograma. Por outro lado, sabendo-se que somente no sul da área de ocorrência é que *E. grandis* apresenta características fenotípicas distintas de *E. saligna*, tal fato sugere que a introdução de Navarro de Andrade foi da região sulina.

A análise da distância entre S3 (semente brasileira) e S1 (0,083) e a distância entre G20 (semente brasileira) e as populações do planalto de Atherton (0,0243) e as populações sulinas (0,0109) sugere que a S3 se afastou muito mais da sua própria espécie do que a G20 de *E. grandis*. Tal fato é confirmado também pelo fenograma obtido. É provável inclusive que, embora todas as espécies do subgênero se cruzem, *E. saligna* tenha maior facilidade de cruzamento. Analisando-se a variação genética pela heterozigosidade apresentada pelos tratamentos estudados, observa-se que realmente a população brasileira S3 apresenta um valor (0,447) muito superior ao de S1 (0,041), ao passo que a população brasileira G20 apresenta um valor (0,245) que não difere dos valores das populações australianas de *E. grandis*.

Cotejando-se os dados de distância genética entre as diversas populações australianas de *E. grandis*, verifica-se que a média de distância entre as origens do planalto de Atherton (de G11 a G18) é de 0,035 - a não consideração da população G11 conduz à média 0,012, entre as origens sulinas (de G1 a G9) de

0,0079 e entre os dois grupos acima citados 0,026. Esses dados sugerem que o isolamento das populações do planalto, forçou uma distância genética entre elas, maior do que a distância genética entre as populações do sul.

Comparando-se a média da heterozigosidade das populações do planalto com as do sul, verifica-se que a do planalto (0,267) é ligeiramente maior do que a da área sulina (0,228). Se essa diferença tivesse sido maior, poderia ser sugerida a existência de maior variação genética em *E. grandis* do planalto e neste caso, baseando-se em VAVILOV (1949/50) poderia também ser sugerido que a ocorrência de *E. grandis* no planalto seria mais antiga do que na região sul, indo de encontro com a idéia do ancestral comum. Ao caminhar para o sul, esse ancestral comum teria encontrado pressão de seleção suficiente para sofrer divergência e seleção, isto é, seleção disruptiva, sendo então fixadas as espécies *E. grandis* e *E. saligna*.

A origem G11 é aquela situada mais ao norte, no limite da área de ocorrência natural da espécie. Provavelmente as condições edafo-climáticas do nicho ecológico local (E de Mareeba), determinaram frequências bem diferentes de α EST-1 e β EST-1 (o alelo 0,94 de α EST-1 foi apenas encontrado na população G11).

De qualquer maneira as diferenças entre as populações são pequenas, fato este que sugere uma especiação recente para as duas espécies. A própria análise do fenograma permite distinguir 3 grupos apenas:

- 1- população G11
- 2- população S1
- 3- todas as 20 outras populações, cujas diferenças entre si são muito pequenas para serem consideradas.

Quando as populações são analisadas quanto ao polimorfismo, observa-se menor valor nas populações G3, G4, G5, G10, G13 e S1, ao passo que o maior valor é encontrado na população S3. As populações do sul apresentam média de locos polimórficos de 0,48 ao passo que as do planalto, média de 0,54, diferença esta pequena demais para permitir qualquer especulação.

Sugere-se a implantação de uma experimentação de campo com os mesmos tratamentos.

7 CONCLUSÕES

No estudo das esterases de *E. grandis* foram encontrados alelos raros, os quais foram desprezados para o presente cálculo populacional. Foram também encontrados alguns alelos nulos sendo então os indivíduos desprezados.

O estudo apenas de α e β esterase não permitiu a identificação das origens de *E. grandis*. Para atingir essa meta, há que se estudar vários sistemas enzimáticos, não só em plântulas mas principalmente em plantas adultas, visando a não eliminação do indivíduo. Pela análise do fenograma é possível distinguir os grupos G11, S1 e o conjunto de todos os outros tratamentos. Por outro lado a população G11 apresentou frequências alélicas bem distintas, porém as diferenças pequenas entre as populações sugerem uma especiação recente. É recomendado o estudo da variação genética das características silviculturais, tentando posteriormente relacioná-las com estudos enzimáticos.

Devido ao cruzamento do *E. grandis* introduzido no início do século, é difícil efetuar comparações e tirar conclusões. Outro fato que torna mais difícil essa tarefa é o desconhecimento do número efetivo populacional quer daquela introdução, quer das populações agora estudadas. Mesmo assim as distâncias genéticas sugerem um afastamento maior do *E. saligna* (semente nacional) do que o do *E. grandis* (semente nacional) de seus respectivos tratamentos australianos. É possível que tal fato seja devido a uma facilidade maior de cruzamento do *E. saligna*.

Outra sugestão dos dados é que a distância genética entre as populações de *E. grandis* do planalto de Atherton é maior do que entre as populações da área de ocorrência sulina.

8 RESUMO

Alfa esterase e beta esterase foram estudadas em plântulas no estádio "orelha de onça" de 20 populações de *E. grandis* (19 australianas e 1 brasileira) e 2 de *E. saligna* (1 australiana e 1 brasileira) em gel de amido.

Foi testado o estudo de 11 sistemas enzimáticos para a determinação das diferenças genéticas dos 22 tratamentos. Inicialmente foram escolhidos como os de melhor resolução a leucina aminopeptidase, alfa esterase, beta esterase e fosfatase ácida. Porém pela perfeição da resolução obtida, só foram estudadas as frequências de 3 possíveis locos de alfa esterase e 3 de beta esterase, os quais forneceram informações suficientes apenas para a identificação da população G11, da S1 e de um grupo formado por todas as outras populações. As diferenças pequenas, entre as populações sugerem uma apreciação recente.

Os dados sugerem que a população brasileira de *E. saligna* se afastou mais da espécie tipo do que *E. grandis* (da sua espécie tipo). Uma das possíveis causas seria a maior facilidade de cruzamento dentro do subgênero.

O isolamento das populações do planalto de Atherton determinou distâncias genéticas entre si maiores do que a distância entre as populações do planalto e as do sul. As distâncias entre as populações estudadas e situadas ao sul do planalto, foram bem menores. Das populações do planalto destaca-se a de E de Mareeba com frequência de alelos bem distinta.

9 SUMMARY

Alfa esterase and beta esterase were studied in seedlings (before the emergency of the first nomophyllous leaves and possessing only the pair of cotyledonary leaves) of 20 *E. grandis* populations (19 from Australia and 1 from Brasil) and 2 *E. saligna* (1 from Australia and 1 from Brasil), using the horizontal electrophoresis technique in Connaught starch gel.

Eleven enzymatic systems were tested to determine the genetic differences among the 22 populations. Leucine aminopeptidase, alfa esterase, beta esterase and acid phosphatase had reasonable good resolution. Because the perfection of the resolution, only the frequency of 3 possible alfa esterase loci and 3 possible beta esterase loci were studied which gave not sufficient information to permit a proper identification of different populations. It was possible to identify the population G11, from the S1 and from a group formed by the other populations. The small differences among the populations suggest a recent speciation.

The data suggest that the Brazilian population of *E. saligna* is genetically more distant from the typical species than *E. grandis* from its species. The possible reason is that *E. saligna* cross more easily with the other species of the subgenus.

The isolation of the populations at the Atherton table-land determined genetic distances among them greater than the distance between the Atherton populations and the southern ones. The distance among the southern populations were smaller. The population of Mareeba presented a distinct allele frequency.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, E.N. de. 1961. O eucalipto. 2.ed. S.L.p., S.c.p. 667p. (Edição Comemorativa da 2ª Conf. Mundial do Eucalipto, S.P., ago. de 1961, sob o patrocínio da F.A.O.).
- AYALA, F.J.; POWELL, J.R.; TRACEY, M.L.; MOURÃO, C.A. & SALAS, S.P. 1972a. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group IV; genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. Genetics, Texas, 70: 113-139. jan/abr.
- AYALA, F.J.; POWELL, J.R. & TRACEY, M.L. 1972b. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group V; genic variation in natural populations of *Drosophila equinoxialis*. Gen. Res., London, 20: 19-42.
- BLAKELY, W.F. 1965. A key to the Eucalypts; with description of 522 species and 150 varieties. 3.ed. Canberra, Forestry and Timber Bureau. 359p.
- BREWER, G.J. & SING, C.F. 1970. An introduction to isosyme techniques. New York, Academic Press. 186p.
- BROWN, A.H.D., MATHESON, A.C. & ELDRIDGE, K.G. 1975. Estimation of the mating system of *Eucalyptus obliqua* L'Hérit by using allozyme polymorphisms. Aust. J. Bot., Melbourne 23(6): 931-949.
- BROWN, A.H.D.; NEVO, E.; ZOHARY, D. & DAGAN, O. 1978. Genetic variation in natural populations of wild barley (*Hordeum spontaneum*). Genetica, Washington 49 (2/3): 97-108.
- BUSH, G.L. & HUETTEL, R.N. 1972. Starch gel electrophoresis of tephritid proteins; a manual of techniques (*Rhagoletis pomonella*). S.L.p., S.c.p. 38p. (xerox).
- CAVALLI, S.S. 1976. Divergência isosímica e relações evolutivas entre espécies do gênero *Relbunium* (Rubiaceae). Porto Alegre, Faculdade Federal do Rio Grande do Sul. 178p. (Dissertação de Mestrado).
- DEPARTMENT OF FORESTRY, COMMONWEALTH FORESTRY INSTITUTE. UNIVERSITY OF OXFORD. 1976. A manual on species and provenance research with particular reference to the tropics. Oxford, C.F.I., 226p. (Tropical Forestry Papers, 10).

BC/4856

- DORAN, J.C. s.d. Collection of *Eucalyptus grandis* Hill ex Mai. in North Queensland - Australia in 1977. Canberra, CSIRO. 14p. (xerox).
- ELLISON, W.L.; ALSTON, R.E. & TURNER, B.L. 1962. Methods of preservation of crude biochemical data for systematic purposes, with particular reference to the genus *Bahia* (Compositae). Am. J. Bot., Baltimore, 40(6): 599-604, jul.
- ENZYME nomenclature. 1972. Amsterdam Elsevier Scientific Publ. (Ed.), Amsterdam. 433p.
- FERET, P.P. & BERGMAN, F. 1976. Gel electrophoresis of protein and enzyme. In: MIKSCHE, J.P. Proceedings in life science. Berlin, Springer-Verlag. p.49-77.
- FERREIRA, M. 1980. Terminologia de melhoramento genético florestal. Brasília, EMBRAPA/IBDF. 88p.
- FORD, E.B. 1980. Genética e adaptação. Trad. por Geraldo Florsheim. São Paulo, EPU, Ed. da Un. de São Paulo. 69p. (Temas de Biologia, 9).
- GILLESPIE, J.H. & KOJIMA, F. 1968. The degree of polymorphisms in enzymes involved in energy productions compared to that in nonspecific enzymes in two *Drosophila ananassae* populations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 61: 582-585.
- GOLFARI, L. 1977. Problemas atuais da silvicultura brasileira. Brasília, PRODEPEF. 11p. (Comunicação Técnica, 12).
- GOMES, M.A. 1947. Silvicultura. Lisboa. Livr. Sá da Costa. 236p. (Col. de Livros Agr. A Terra e o Homem, Vol. 1).
- HALL, N.; JOHNSON, R.D. & CHIPPENDALE, G.M. 1970. Forest trees of Australia. Canberra, Aust. Gov. Publ. Ser. 334p.
- HARRIS, H. & HOPKINSON, D.A. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. N. York, Am. Elsevier Pub. Co. 320p.
- HUBBY, J.L. & LEWONTIN, R.C. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. 1. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudo-obscura*. Genetics, Texas, 54: 577-594.

- JOHNSON, G.B. 1974. Enzyme polymorphism and metabolism. Science, Washington, 184: 28-37.
- JONES, N. 1973. Seed certification, provenance nomenclature and genetics history in forestry. Silvae Gen., Frankfurt, 22: 53-58.
- KELLEY, W.A. & ADAMS, R.P. 1977. Preparation of extracts from juniper leaves for electrophoresis. Phytoch., Inglaterra, 16: 513-516.
- KIMURA, M. & OHTA, T. 1971. Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. Nature, London, 229: 467-469.
- KUHNS, L.J. & FRETZ, T.A. 1978. A study of the potential use of electrophoresis in distinguishing rose cultivars. Ohio, O.A.R.D.C., 33p. (Research Bulletin, 1094) (xerox).
- LEWONTIN, R.C. 1974. The genetic basis of evolutionary change. New York, Columbia University Press. 346p.
- MALAVASI, A. & MORGANTE, J.S. 1982. Genetic variation in natural populations of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). Rev. Bras. de Gen. 5(2): 263-278.
- MEDINA FILHO, H.P. & STEVENS, M.A. 1980. Tomato breeding for nematode resistance: survey of resistant varieties for horticultural characteristics and genotype of acid phosphatase. Acta Hortic., 100: 383-392.
- NAMKOONG, G.; BARNES, R.D. & BURLEY, J. 1980. A philosophy of breeding strategy for tropical forest trees. Oxford, C.F.I., 67p. (Tropical Forestry Papers, 16).
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat., Lancaster, 106: 283-292.
- PHILLIPS, M.A. & BROWN, A.H.D. 1977. Mating system and hybridity in *Eucalyptus pauciflora*. Aust. J. Biol. Sciences, Australia, 30: 337-344.
- PROJETO DE DESENVOLVIMENTO E PESQUISA FLORESTAL (PRODEPEF). 1978. Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil. PRODEPEF, Belo Horizonte. 66p. (Série Técnica, 11).

- PRYOR, L.D. 1976. The biology of Eucalyptus. London, Edward Arnold. 82p. (The Institute of Biology's Studies in Biology, 61).
- PRYOR, L.D. & JOHNSON, L.A.S. 1971. A classification of the Eucalyptus. Canberra, The Australian National University, 102p.
- SCANDALIOS, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants; a review. Bioch. Gen., New York, 3: 37-39.
- SCANDALIOS, J.G. 1974. Isozymes in development and differentiation. Ann. Rev. Plant Physiol., California, 25: 225-258.
- SCANDALIOS, J.G. & SORENSON, J.C. 1977. Isozymes in plant tissues culture. In: REINENT, J. & BAJAG, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Berlin, Springer-Verlag. p. 719-789.
- SHAW, C.R. & PRASAD, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes; a compilation of recipes. Bioch. Gen., New York, 4: 297-320.
- SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. 1973. Numerical Taxonomy. S. Francisco, Freeman Co. 215p.
- STEINER, W.W.M. & JOHNSON, W.E. 1973. Techniques for electrophoresis of Hawaiian *Drosophila*. S.L.p., S.c.p. 21p. (Technical Report, 30) (xerox).
- STEINER, W.W.M. & JOSLYN, D.J. 1979. Electrophoresis techniques for genetic study of mosquitoes. Mosq. News, U.S.A., 39(1): 35-54.
- TANKSLEY, D.; MEDINA FILHO, H. & RICK, C.M. 1981. The effect of isosyme selection on metric characters in an interspecific backcross of tomato - basis of an early screening procedure. Theor. Appl. Genet., Germany, 60: 291-296.
- VAVILOV, N.I. 1949/50. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Trad. K. S. Chester, Chronica Botanica, U.S.A., 13(1/6): 1-364.

WAGNER, R.P. & SELANDER, R.K. 1974. Isozymes in insects and their significance. Ann. Rev. Entomol., Inglaterra, 19: 177-138.