

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PLANTAS FORRAGEIRAS

**CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA DE OITO ESPÉCIES DO GÊNERO
TRIFOLIUM L., OCORRENTES NO RIO GRANDE DO SUL.**

OMARA LANGE
Bióloga (Ufrgs)

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de
mestre em Zootecnia - Plantas Forrageiras

Porto Alegre (RS), Brasil
Maio, 2001

AGRADECIMENTOS

- Aos financiadores: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).
- A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia (DPFA-UFRGS) por oportunizar a realização do curso de Mestrado e pelo apoio técnico e estrutural durante a execução do projeto.
- A Maria Teresa S. Wittmann, pela sugestão do tema e orientação.
- Aos Professores João Carlos Saibro e Nilton R. Paim (DPFA - UFRGS), pelas sementes de trevo branco e encarnado e sugestões durante a condução do experimento nos canteiros e na casa de vegetação.
- Ao Sr. Carlos Otávio Costa Moraes (EMBRAPA CPPSUL Bagé) e ao Prof. Miguel Dall'Agnol (DPFA-UFRGS) pelo fornecimento de sementes.
- Á Mônica Cadenazzi, pela orientação nas análises estatísticas.
- Aos ex-colegas da secretaria e do grupo do Laboratório de Citogenética e Eletroforese do DPFA pela colaboração e sugestões.
- Aos amigos e ex-colegas do Programa de Pós-graduação, especialmente a José Alexandre Agiova Costa, Julio Viégas, Jamir Luis S. da Silva, Lilian Eggers e Paulo R. O. Spannenberg por inúmeras sugestões, grandes ensinamentos e companheirismo.
- A Maurício Peroni e Joares Patines pela amizade e apoio técnico na organização do material gráfico e implementação do Programa Banda Zero.
- Especialmente a Luis Henrique Weber, Sidnei Zommer, Irani C. Mattos, Gerson Buss, Maurício Vieira de Souza, Fábio Vilella, Cristiano Silveira, Maria de Fátima M. dos Santos, Rafael Bavaresco, Rejane Fortes, Daniela Marques e Paulo Mattos cuja amizade e apoio tem sido incentivos constantes nesta e em outras importantes realizações.
- A todos que participaram direta e indiretamente desta construção.

Com carinho, dedico:

À minha família e de maneira especial, a Leonor Reis Lange e Maurício Peroni que com amor, paciência, companheirismo e muito trabalho proporcionaram as melhores condições para a realização deste trabalho (setembro de 1997);

Aos que contribuíram para a defesa desta dissertação (maio de 2001).

CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA DE OITO ESPÉCIES DO GÊNERO *TRIFOLIUM* L., OCORRENTES NO RIO GRANDE DO SUL.¹

Autora: Omara Lange

Orientadora: Prof^ª. Maria Teresa Schifino Wittmann

RESUMO

A caracterização de germoplasma é fundamental para o desenvolvimento de trabalhos de melhoramento genético. A análise eletroforética de isoenzimas é uma maneira eficiente e informativa de estimar a variabilidade genética. No presente trabalho foram avaliados os padrões de bandas de quatro sistemas isoenzimáticos, fosfoglicoisomerase (PGI), esterase (EST), malato desidrogenase (MDH) e superóxido dismutase (SOD), para 36 acessos de oito espécies do gênero *Trifolium* ocorrentes no Rio Grande do Sul: *T. incarnatum*, *T. polymorphum*, *T. pratense*, *T. repens*, *T. resupinatum*, *T. riograndense*, *T. subterraneum* e *T. vesiculosum*. A variabilidade observada em acessos e espécies foi avaliada através do cálculo de índices de similaridade, levando-se em conta a presença ou ausência de bandas. Foi utilizado o método de agrupamentos pela média (UPGMA) e os fenogramas foram constituídos com o auxílio do programa computacional NTSYS-PC. A similaridade entre espécies foi baixa ($J \leq 0.351$). Na análise de fenograma foram detectados oito grupos, que correspondem às espécies taxonômicas. A maioria dos acessos de uma mesma espécie permaneceu reunido para $J > 0.50$, com exceção de *T. riograndense*, *T. repens* e *T. pratense*. Estas três espécies apresentaram a menor similaridade entre seus acessos, refletindo elevada variabilidade intra-específica. Foram identificadas algumas bandas acesso-específicas. Os agrupamentos formados concordaram com o proposto pela taxonomia tradicional, ao nível de espécie. Os dados reforçam a utilidade e importância do uso de marcadores bioquímicos, principalmente quando são testados diversos sistemas, para a taxonomia e caracterização de germoplasma no gênero *Trifolium*.

¹Dissertação de Mestrado em Zootecnia - Plantas Forrageiras, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil (182p.) Maio, 2001.

ISOENZIMATIC CHARACTERIZATION OF EIGHT *TRIFOLIUM* SPECIES OCCURRING IN RIO GRANDE DO SUL.¹¹

Author: Omara Lange

Adviser: Maria Teresa Schifino Wittmann

ABSTRACT

Germplasm characterization is the first and essential step for plant breeding programmes. Isozyme analysis is an efficient and informative method to estimate genetic variability. In the present work isozyme patterns for PGI (phosphoglucosomerase), MDH (malate dehydrogenase), EST (esterase) and SOD (superoxide dismutase) were evaluated in 36 accessions of eight *Trifolium* species, namely *T. incarnatum*, *T. polymorphum*, *T. pratense*, *T. repens*, *T. resupinatum*, *T. riograndense*, *T. subterraneum* and *T. vesiculosum*. Similarity between species and accessions was estimated by Jaccard's similarity index based on presence or absence of bands. The UPGMA method was utilized for the groupings and dendrogram construction with the aid of the NTSYS-PC program. Interspecific similarity was low ($J \leq 0.351$). The dendrogram presented eight groups, each one corresponding to a taxonomic species. Most of the accessions of the same species grouped together at $J > 0.50$, except *T. riograndense*, *T. repens* and *T. pratense*. These three species showed the lowest similarity between their accessions, reflecting higher intraspecific variation. Some accession-specific bands were identified. The species groupings are consistent with traditional taxonomic species delimitation. Therefore isozyme patterns, especially when several systems are employed, are useful and reliable biochemical markers for the taxonomy and characterization of *Trifolium* germplasm.

¹¹ Master of Science in Forage Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (182p.) – May, 2001.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. O gênero <i>Trifolium</i> L.	4
2.1.1. Caracterização do gênero <i>Trifolium</i> L.	4
2.1.2. Importância forrageira	7
2.1.3. Caracterização das espécies estudadas.....	8
2.1.3.1. Seção <i>LOTOIDEAE</i> Crantz.	8
2.1.3.1.1. <i>Trifolium repens</i> L.....	8
2.1.3.1.2. <i>Trifolium riograndense</i> Burkart	11
2.1.3.1.3. <i>Trifolium polymorphum</i> Poir.....	13
2.1.3.2. Seção <i>MISTYLLUS</i> (C. Presl.) Godr.	16
2.1.3.2.1. <i>Trifolium vesiculosum</i> Savi.....	16
2.1.3.3. Seção <i>VESICARIA</i> Crantz.	17
2.1.3.3.1. <i>Trifolium resupinatum</i> L.....	17
2.1.3.4. Seção <i>TRIFOLIUM</i>	19
2.1.3.4.1. <i>Trifolium pratense</i> L. (2n = 14, 28, 56)	19
2.1.3.4.2. <i>Trifolium incarnatum</i> L.....	21
2.1.3.5. Seção <i>TRICHOCEPHALUM</i> Koch.	24
2.1.3.5.1. <i>Trifolium subterraneum</i> L.	24
2.2. Eletroforese de isoenzimas vegetais.....	26
2.2.1. Eletroforese de zona: princípios e procedimentos.	27
2.2.2. Isoenzimas	30
2.2.3. Utilidades das isoenzimas.....	35
2.3. Sistemas enzimáticos estudados	36
2.3.1. Fosfoglicoisomerase (PGI; E. C. 5.3.1.9).....	38
2.3.2. Malato desidrogenase - NAD dependente (MDH-E.C.1.1.1.37).....	40
2.3.3. Esterases (EST – E. C. 3.1.1._).....	44
2.3.4. Superóxido dismutase (SOD- E. C 1.15.1.1.).....	48
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.1. Material	53
3.2. Métodos	54
3.2.1. Estabelecimento e manutenção da coleção viva	54
3.2.1.1. Obtenção das sementes e germinação	54
3.2.1.2. Estabelecimento em casa de vegetação	55
3.2.1.3. Estabelecimento em canteiros	57
3.2.1.4. Manutenção da coleção viva	58
3.2.1.5. Coleta e armazenamento de sementes.....	59
3.2.2. Eletroforese de enzimas em géis de poliacrilamida	59
3.2.2.1. Pilotagem e escolha dos sistemas	60
3.2.2.2. Preparo dos géis	62
3.2.2.3. Preparo e aplicação das amostras	64

3.2.2.4. Migração	66
3.2.2.5. Coloração e revelação dos géis	67
3.2.2.6. Fixação e documentação dos géis	71
3.2.3. Medidas e cálculo das migrações relativas das bandas isoenzimáticas.....	71
3.2.4. Medidas de variabilidade genética e análises estatísticas	73
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1. Metodologia utilizada em laboratório.....	74
4.2. Análise das bandas e tratamento dos dados	77
Sistemas Enzimáticos	78
4.2.1. Fosfoglicoisomerase (PGI - E. C. 5.3.1.9).....	79
4.2.2. Malato desidrogenase NAP dependente (MDH – E. C. 1.1.1.37)	95
4.2.3. α e β Esterases (EST; E. C. 3.1.1._).....	108
4.2.4. Superóxido dismutase (SOD - E. C. 1.15.1.1).....	121
4.3. Análises inter-específicas para sistemas enzimáticos individualizados e reunindo os quatro sistemas.	134
4.3.1. Análise inter-específica ao nível de cada sistema enzimático.....	134
4.3.1.1. Análise inter-específica para PGI	134
4.3.1.2. Análise para MDH	136
4.3.1.3. Análise inter-específica para EST	138
4.3.1.4. Análise inter-específica para SOD	140
4.3.2. Análise inter-específica reunindo os quatro sistemas enzimáticos .	142
5. CONCLUSÕES	148
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
7. APÊNDICES	160

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1. Lista dos acessos estabelecidos em casa de vegetação e canteiros do DPFA - UFRGS e que foram incluídos na análise de isoenzimas de PGI, MDH, EST e SOD (1995-1997).	61
TABELA 2 – Variabilidade isoenzimática detectada em oito espécies de <i>Trifolium</i>	78
TABELA 3. Listagem das Frequências de ocorrência (f) de 16 isoenzimas de PGI, detectadas em 34 acessos do gênero <i>Trifolium</i> , incluídas nas análises intra e inter-específica e global, que reuniu os quatro sistemas enzimáticos....	84
TABELA 4. Listagem das frequências de ocorrência de 23 isoenzimas de MDH, detectadas em 36 acessos de <i>Trifolium</i> , incluídas nas análises intra e inter-específica de MDH e na análise global.	96
TABELA 5. Listagem das frequências de ocorrência (f) de 64 isoenzimas de EST, incluídas nas análises intra-específica deste sistema.	111
TABELA 6. Listagem das frequências de ocorrência (f) de 46 isoenzimas de SOD incluídas na análise intra-específica de oito espécies e 32 acessos do gênero <i>Trifolium</i>	125

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Detalhe de inflorescências de <i>Trifolium repens</i> , visitado por abelha (<i>Apis sp</i>) e de <i>Trifolium pratense</i> , nos canteiros demonstrativos do DPFA - UFRGS.	10
FIGURA 2a. Indivíduo de <i>Trifolium riograndense</i> na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	12
FIGURA 2b. Inflorescência de <i>Trifolium riograndense</i> na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	12
FIGURA 3a. Inflorescência de <i>Trifolium polymorphum</i> M1370 na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	15
FIGURA 3b. Aspecto de <i>Trifolium polymorphum</i> M1370 na casa de vegetação, DPFA-UFRGS, este material foi bienal.	15
FIGURA 4. Inflorescências de <i>Trifolium resupinatum</i> na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	18
FIGURA 5. Aspecto geral dos acessos de <i>Trifolium incarnatum</i> na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	22
FIGURA 6. Detalhe de inflorescências e folhas de um indivíduo de <i>Trifolium incarnatum</i> da cultivar AU Robin, na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	23
FIGURA 7a. Inflorescência de <i>Trifolium subterraneum</i> na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	25
FIGURA 7b. Aspecto de <i>T. subterraneum</i> na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	25
FIGURA 8. Aspecto geral de acessos de <i>Trifolium riograndense</i> (no centro) e de <i>Trifolium pratense</i> (nos cantos direito e esquerdo), na casa de vegetação do DPFA-UFRGS.	56
FIGURA 9a. Gel para avaliação de isoenzimas de PGI, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 6 e 17 do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino) as demais amostras são indivíduos da cv. Yuchi de <i>T. vesiculosum</i> , onde são observadas as bandas MR-0.28, MR-0.25 e MR-0.22.	80
FIGURA 9b. Gel para avaliação de isoenzimas de PGI, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 8, 17 e 24 do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino) as demais amostras são indivíduos do acesso Weber 1995 de <i>T. vesiculosum</i> , onde podem ser vistas as bandas MR-0.30 e MR-0.22.	80
FIGURA 10. Padrões de PGI para as oito espécies do gênero <i>Trifolium</i> analisadas.	81
FIGURA 11. Padrões de <i>Trifolium incarnatum</i> em PGI.	83
FIGURA 12. Padrões de <i>Trifolium polymorphum</i> em PGI.	86
FIGURA 13. Padrões de <i>Trifolium pratense</i> em PGI.	87
FIGURA 14. Padrões de <i>Trifolium repens</i> em PGI.	89
FIGURA 15. Padrões de <i>Trifolium resupinatum</i> em PGI.	91
FIGURA 16. Padrões de <i>Trifolium riograndense</i> em PGI.	92
FIGURA 17. Padrões de <i>Trifolium subterraneum</i> em PGI.	93
FIGURA 18. Padrões de <i>Trifolium vesiculosum</i> em PGI.	94

FIGURA 20a. Gel para avaliação de isoenzimas de MDH, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 8, 13 e 24 do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino). As demais amostras são de <i>T. repens</i> cultivar Haifa (amostras 2 a 12) e Guaíba S1 (amostras 14 a 23).	99
FIGURA 20b. Gel para avaliação de isoenzimas de MDH, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 7 e 13 do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino). As demais amostras são de <i>T. repens</i> cv. Zapican. Estas cvs. apresentaram o mesmo padrão de bandas para MDH, podendo ser observadas as bandas MR-0.34, MR-0.31, MR-0.27, MR-0.23, MR-0.14, MR-0.11 e MR-0.09.	99
FIGURA 21. Padrões de <i>Trifolium incarnatum</i> em MDH	100
FIGURA 22. Padrões de <i>Trifolium polymorphum</i> em MDH	100
FIGURA 23. Padrões de <i>Trifolium pratense</i> em MDH	101
FIGURA 24. Padrões de <i>Trifolium repens</i> em MDH	102
FIGURA 25. Padrões de <i>Trifolium resupinatum</i> em MDH	104
FIGURA 26. Padrões de <i>Trifolium riograndense</i> em MDH	105
FIGURA 27. Padrões de <i>Trifolium subterraneum</i> em MDH	106
FIGURA 28. Padrões de <i>Trifolium vesiculosum</i> em MDH	107
FIGURA 29. Padrões de EST para as oito espécies de <i>Trifolium</i> analisadas.	109
FIGURA 30. Padrões de <i>Trifolium incarnatum</i> em EST	112
FIGURA 31. Gel para avaliação de isoenzimas de EST, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 8 e 17 do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino). O acesso Imigrantes Italianos de <i>Trifolium incarnatum</i> está representado nas amostras 2 a 12 e a cv. Woogenellup de <i>T. subterraneum</i> nas amostras 13 a 23.	113
FIGURA 32. Padrões de <i>Trifolium polymorphum</i> em EST	114
FIGURA 33. Padrões de <i>Trifolium pratense</i> em EST	115
FIGURA 34. Padrões de <i>Trifolium repens</i> em EST	116
FIGURA 35. Padrões de <i>Trifolium resupinatum</i> em EST	117
FIGURA 36. Padrões de <i>Trifolium riograndense</i> em EST	118
FIGURA 37. Padrões de <i>Trifolium subterraneum</i> em EST	119
FIGURA 38. Padrões de <i>Trifolium vesiculosum</i> em EST	120
FIGURA 39. Gel para avaliação de isoenzimas de EST, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 6, 17 e 24 do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino). As demais amostras representam dez indivíduos de <i>T. vesiculosum</i> cv. Yuchi, que foram amostrados em dois pontos consecutivos do gel.	121
FIGURA 40a. Gel para avaliação de isoenzimas de SOD, da direita para a esquerda, as amostras 1, 7 e 13 são do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino). <i>T. riograndense</i> acesso Campos de Cima da Serra está representado nas amostras 2 a 12.	122
FIGURA 40b. Gel para avaliação de isoenzimas de SOD, da direita para a esquerda as amostras 1, 8, 17 e 24 são do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino). <i>T. vesiculosum</i> está representado pelas amostras 2 a 12 (cv. Yuchi) e amostras 13 a 23 (acesso Weber 1995). Cada acesso teve cinco indivíduos amostrados em dois pontos consecutivos do gel.	122
FIGURA 41. Padrões de SOD para as oito espécies de <i>Trifolium</i> analisadas	124
FIGURA 42. Padrões de <i>Trifolium incarnatum</i> em SOD	126
FIGURA 43. Padrões de <i>Trifolium polymorphum</i> em SOD	127

FIGURA 44. Padrões de <i>Trifolium pratense</i> em SOD	128
FIGURA 45. Padrões de <i>Trifolium repens</i> em SOD	129
FIGURA 46. Padrões de <i>Trifolium resupinatum</i> em SOD	130
FIGURA 47. Padrões de <i>Trifolium riograndense</i> em SOD	131
FIGURA 48. Padrões de <i>Trifolium subterraneum</i> em SOD	132
FIGURA 49. Padrões de <i>Trifolium vesiculosum</i> em SOD	133
FIGURA 50. Resultado da análise da variabilidade, ao nível do sistema enzimático de PGI e reunindo 34 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.	135
FIGURA 51. Resultado da análise da variabilidade, ao nível do sistema enzimático de MDH e reunindo 36 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.	137
FIGURA 52. Resultado da análise da variabilidade, ao nível do sistema enzimático de EST e reunindo 36 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.	139
FIGURA 53. Resultado da análise da variabilidade, ao nível do sistema enzimático de SOD e reunindo 32 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.	141
FIGURA 54. Resultado da análise da variabilidade, reunindo os quatro sistemas enzimáticos (PGI, MDH, EST e SOD) e 34 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.	144

1. INTRODUÇÃO

O Estado do Rio Grande do Sul apresentava cerca de 60 % de sua área ocupada por campos. Praticamente toda a atividade pecuária gaúcha (carne, leite, lã, couro e produtos secundários) fundamenta-se na exploração destas formações vegetais.

Nas pastagens naturais, a produtividade dos rebanhos está sujeita às variações sazonais da oferta de forragem. A maior limitação na dieta animal ocorre no inverno, pois as espécies que predominam nos campos nativos apresentam crescimento primavera-estival e, em consequência, baixa produção de forragem hibernal.

Para elevar a qualidade e produtividade das pastagens têm-se buscado identificar e/ou desenvolver espécies forrageiras adaptadas às condições climáticas e edáficas do estado.

As leguminosas são espécies de interesse forrageiro, que constituem uma alternativa para o enriquecimento da dieta animal, além de contribuírem com a manutenção da capacidade produtiva dos solos, possibilitando a fixação de nitrogênio atmosférico, através da simbiose com bactérias nitrificadoras do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

Entre as leguminosas destacam-se as do gênero *Trifolium* L. (trevos) como importantes forrageiras cultivadas, como *Trifolium repens* L., *Trifolium pratense* L e *Trifolium vesiculosum* Savi, e três espécies nativas *Trifolium riograndense* Burkart, *Trifolium polymorphum* Poir e *Trifolium argentinense* Speg.

Os trevos apresentam elevado potencial para uso em pastagens, pois têm: boa qualidade nutritiva; permitem a utilização sob pastejo direto ou como forragem conservada; podem ser cultivados isolados, consorciados ou em sobressemeadura em pastagens naturais.

A ampla variabilidade genética presente neste gênero oferece extensa fonte de materiais para trabalhos de melhoramento genético, justificando os esforços para a sua caracterização, seleção, avaliação e reprodução.

Estudos para caracterização de germoplasma podem apresentar diversas abordagens: morfológica, anatômica, fisiológica, citológica, agrônômica, ecológica, genética, bioquímica, todas fundamentais para o conhecimento dos materiais e implantação de programas de melhoramento genético.

As isoenzimas, desde sua descoberta há quase quatro décadas, vem colaborando para o esclarecimento de muitos aspectos da biologia das espécies, mostrando-se eficaz para estudos de variabilidade genética, modos reprodutivos, aspectos filogenéticos, caracterização e identificação de materiais entre outros.

As isoenzimas são formas moleculares múltiplas de enzimas, com afinidade pelo mesmo substrato ou muito similar. Podem ser utilizadas como marcadores genéticos, pois, sendo proteínas, são portadoras da informação dos genes ou da transcrição dessa informação.

As bandas isoenzimáticas visualizadas nos géis compõem zimogramas, que fornecem informações sobre a constituição genotípica dos indivíduos e variabilidade das populações.

O presente estudo tem como objetivos: contribuir para o conhecimento de oito espécies do gênero *Trifolium* L., *Trifolium incarnatum* L., *Trifolium polymorphum* Poir., *Trifolium pratense* L., *Trifolium repens* L., *Trifolium resupinatum* L., *Trifolium riograndense* Burkart, *Trifolium subterraneum* L. e *Trifolium vesiculosum* Savi, através da caracterização da variabilidade isoenzimática presente em quatro sistemas enzimáticos, Fosfoglicoisomerase (PGI), Esterase (EST), Malato desidrogenase (MDH) e Superóxido dismutase (SOD) e fornecer subsídios para futuros trabalhos de melhoramento de plantas forrageiras.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O gênero *Trifolium* L.

2.1.1. Caracterização do gênero *Trifolium* L.

O gênero *Trifolium* L. é constituído por aproximadamente 240 espécies e 80 taxa infra-específicos, fazendo parte da família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*, tribo *Trifolieae*, (Zohary & Heller, 1984).

Zohary (1972) analisando dados biogeográficos e a distribuição das espécies propõe que este gênero tenha sua origem na região Mediterrânea, havendo migrado durante o Terciário do norte da Ásia para a América do Norte, via Estreito de Bering e, posteriormente, da região Mediterrânea para a África via rota Mediterrâneo-Afro-Alpina, provavelmente no começo do Mioceno. Os três centros de diversidade do gênero, propostos pelo autor, são o continente Eurásiano (59 % das espécies), a América do Norte (26 % das spp) e a África (19 % das spp).

Do ponto de vista botânico e levando em conta a distribuição geográfica das espécies, Zohary (1972) apresenta o gênero *Trifolium* dividido em oito seções: *Lotoideae* (90 spp), *Paramesus* (duas2 spp), *Mistyllus* (nove

spp), *Vesicaria* (sete spp), *Chronosemium* (21 spp), *Trifolium* (cerca de 73 spp), *Trichocephalum* (oito spp) e *Involucrarium* (17 spp). A seção *Lotoideae* é a mais primitiva, tem a maior distribuição geográfica, com espécies nativas nos continentes Eurásiano, Africano e Americano. A partir desta teriam se originadas todas as outras sete seções, com centros de diversidade mais restritos. As seções *Mistyllus* e *Trifolium* ocorrendo na Eurásia e África, *Involucrarium* somente na América, e as demais com todos os representantes na Eurásia.

A maioria das espécies americanas está concentrada nos EUA, principalmente na região da Califórnia, na Costa Oeste. Na América do Sul há apenas 13 espécies nativas que ocorrem no Peru, Bolívia, Chile, Uruguai, Argentina e sul do Brasil.

O gênero *Trifolium* apresenta ampla distribuição geográfica podendo ser encontrado nos dois hemisférios, em diferentes zonas climáticas (sub-árticas, temperadas, subtropicais, tropicais e equatoriais) nos mais variados habitats, desde a altitude de 4000 m em altas florestas, montanhas rochosas, florestas abertas, ambientes campestres e costeiros, até ao nível do mar (Zohary & Heller, 1984).

No gênero *Trifolium*. Encontram-se plantas herbáceas eretas, procumbentes ou decumbentes, estoloníferas, glabras até altamente pubescentes, anuais, bienuais e perenes. Apresentam folhas geralmente alternas e digitado-trifolioladas, raro pinado-trifolioladas ou digitadas, com 5-9 folíolos, na seção *Lotoideae*, subseções *Lupinaster* e *Ochreata*. Os folíolos são ovados, obovados ou elípticos, as estípulas, soldadas ao pecíolo, são em

geral inteiras, raro dentadas, lobadas ou laciniadas, na seção *Involucrarium* e *Paramesus*. Apresentam raízes pivotantes, adventícias ou tuberosas. As espécies são principalmente alógamas, outras autógamias, não sendo raras as que necessitam de "tripped". Podem ocorrer formas de propagação vegetativa. As flores podem ser brancas, amarelas, rosadas até violáceas e vermelhas. O cálice geralmente é simétrico, tubular ou campanulado com cinco ou mais lobos ou dentes, que originalmente tem a função de proteger os elementos florais, evoluindo para formas de proteção do fruto até constituir-se em acessório para a dispersão das sementes. A corola papilionácea apresenta cinco pétalas e nectário, podendo ser caduca ou persistente. As brácteas são conspícuas ou inexistentes, em alguns casos podem estar reunidas na base da inflorescência formando um involúcro. As flores originam-se de gemas axilares, raro basilares, geralmente são pedunculadas, raro sésseis. Geralmente estão reunidas em inflorescências, que vão de formas mais primitivas, como os racemos, até formas mais evoluídas do tipo espiga, geralmente apresentam muitas flores por inflorescência, raramente poucas ou flores solitárias. Os estames são diadelfos, as anteras uniformes. O ovário é sésil ou estipitado com um a 12 óvulos. A flor tipicamente papilionácea está adaptada para a polinização por insetos, destacando-se os dos gêneros *Apis* e *Bombus* e alguns *Lepidopteraea*. O fruto vai de um legume típico com sutura, deiscente e várias sementes passando por vários estágios de redução (folículo) até legume membranáceo, com uma semente sem sutura (utrículo) e abertura irregular. As sementes variam de tamanho, cor e formato, geralmente são ovóides, elípticas ou oblongo-elípticas, comprimidas lateralmente, usualmente 1-2 sementes e

raro 4-9 por legume, a superfície pode ser lisa, rugosa ou tuberculada (Zohary & Heller, 1984; Izaguirre, 1995).

2.1.2. Importância forrageira

Algumas espécies do gênero *Trifolium* ocorrem naturalmente em pastagens, outras são cultivadas mundialmente. Vinte e cinco espécies são consideradas forrageiras importantes, entre estas se destacam dez, com especial atenção para *Trifolium repens*, *T. pratense* e *T. subterraneum* (Zohary & Heller, 1984).

No Rio Grande do Sul existem três espécies nativas, *T. riograndense* Burkart, *T. polymorphum* Poir. e *T. argentinense* Speg., da seção *Lotoideae*. As cultivadas mais utilizadas no Estado são *T. repens* L., *T. pratense* L. e *T. vesiculosum* Savi (Paim, 1995 c. p.). Existem ainda espécies adventícias como *T. dubium* Sibth. e *T. campestre* Schreb.

T. repens destaca-se, entre as cultivadas, por ser amplamente utilizada e estudada, diversas cultivares já foram avaliadas quanto à matéria seca, conteúdo de ácido cianídrico, digestibilidade, precocidade, nodulação, persistência, efeito de corte, resposta a nutrientes, florescimento, consorciação com gramíneas entre outros (Gomes, 1984; Andrade, 1978; Aragão, 1978; Dall'Agnol *et al.*, 1982; Franke, 1987; Domingues, 1989; Moraes *et al.*, 1989; Moraes, 1991; Eisinger, 1993; Silva, 1993; Paim & Riboldi, 1994).

A partir da seleção de materiais mais adaptados às condições do Estado foram desenvolvidas as cultivares BR1 Bagé, Guaíba S1, Jacuí S2 de *T. repens* (Moraes, 1986).

As espécies nativas *T. riograndense* e *T. polymorphum* apresentam potencial forrageiro, tendo sido foco de trabalhos de avaliação agronômica, aspectos reprodutivos, citogenética, entre outros (Schifino, 1985; Becker *et al.*, 1987; Souza *et al.*, 1988; Moraes *et al.*, 1989).

2.1.3. Caracterização das espécies estudadas

2.1.3.1. Seção *LOTOIDEAE* Crantz.

2.1.3.1.1. *Trifolium repens* L.

$2n = 28, \underline{32}^2, 48, 64$ (Zohary & Heller, 1984); $2n = \underline{32}$ (Cleveland, 1985)

Leguminosae; Seção *Lotoideae* Crantz; Subseção *Lotoidea*; Série *Lotoidea*

Conhecido como trevo-branco, pode ser considerada uma espécie cosmopolita, tendo em vista que ocorre em todas as regiões do mundo que tenham condições climáticas adequadas (temperadas e úmidas). É encontrada das regiões árticas da Rússia e Canadá até as subtropicais da Austrália e América do Sul (Taylor, 1985; Woodfield & Caradus, 1994).

É perene, mas em regiões com verão quente e seco pode comportar-se como anual, apresenta desenvolvimento vegetativo hibernal. Tem hábito rasteiro apresentando talos estoloníferos e radicantes, prostrados, com

² O número cromossômico citado mais freqüentemente, para cada espécie, vem sublinhado.

ápices ascendentes, com comprimento entre 10-35 (40) cm. As folhas são digitado-trifolioladas com pecíolos glabros e longos (7-35 cm), os folíolos obovados a obcordados, de base aguda e ápice emarginado a arredondado, com margem denteada, comprimento de 1,5 (4,5) cm e 1,3 (3,8) cm de largura, são verdes, podendo apresentar na face superior mancha em forma de “V” branca ou, mais raramente, violácea. As estípulas são membranáceas, amplamente lanceoladas de ápice agudo, com até 1,5 cm de comprimento. As inflorescências desenvolvem-se a partir de nós axilares e são sustentadas por pedúnculos florais, mais robustos que os pecíolos. As inflorescências são solitárias, semiglobosas a globosas do tipo glomérulo a corimbo laxo, multifloras (20-150 flores), com 1,5-2,5 (3,5) cm de diâmetro. As flores apresentam cálice e corola com pétalas brancas a rosadas, são pediceladas e têm brácteas membranáceas, triangulares e muito pequenas. O ovário contém de 3-7 óvulos. As flores amadurecem da base em direção ao ápice e são reflexas na maturidade. O florescimento vai do inverno até o início do verão, mas ocorre principalmente na primavera. Apresenta fecundação cruzada obrigatória, com mecanismos de auto-incompatibilidade. A polinização pode ser realizada por abelhas do gênero *Apis* ou por *Bombus* (FIGURA 1). O fruto é um folículo linear-oblongo levemente comprimido entre as sementes, que são ovóides a reniformes pequenas, em número de 3-5 por fruto e coloração que varia, com a maturação, de amarelo, castanho-claro a alaranjado.

O trevo branco é uma forrageira de elevado potencial, apresenta boa qualidade de forragem, é adequado ao pastejo direto, tem razoável adaptação edáfica e possibilita, quando bem manejado e em condições climáticas

favoráveis, persistência nas pastagens através de ressemeadura natural e/ou multiplicação de clones. Existem mais de 250 cultivares e ecótipos de *T. repens* (Caradus, 1986 *apud* Woodfield & Caradus, 1994).

No Rio Grande do Sul cultiva-se *T. repens* as cultivares Yi, Bayucúá e Zapican. As maiores dificuldades para o estabelecimento de *T. repens* no Estado são a seca, as temperaturas elevadas e os solos ácidos, que comprometem a sua persistência nas pastagens. Com o objetivo de desenvolver materiais mais adequados às condições do Estado foram selecionadas as cultivares BR1 Bagé pela EMBRAPA - Bagé e Guaíba S1 pelo DPFA - UFRGS (Moraes, 1986; Paim, 1995, comentário pessoal).

FIGURA 1. Detalhe de inflorescências de *Trifolium repens*, visitado por abelha (*Apis sp*) e de *Trifolium pratense*, nos canteiros demonstrativos do DPFA - UFRGS.

2.1.3.1.2. *Trifolium riograndense* Burkart

$2n = 16$, (Cleveland, 1985); $2n = 16$, (Zohary & Heller, 1984)

Leguminosae; Seção *Lotoideae* Crantz; Subsecção *Platystylium* Wilk.

É uma espécie endêmica do sul do Brasil, ocorre freqüentemente na metade norte do Rio Grande do Sul, nos Campos de Cima da Serra, Planalto Médio, Encostas Superior e Inferior do Nordeste, sendo conhecido como trevo serrano (Kappel, 1967; Burkart, 1987).

É uma planta perene, rasteira, com talos estoloníferos longos e radicantes, com até 30-50 cm de comprimento e 0,15 cm de diâmetro (FIGURA 2a) (Kappel, 1967; Izaguirre, 1995).

As folhas jovens são densamente pubescentes, as adultas só na face abaxial, estando inseridas nos nós, que podem ser densamente pilosos. Os folíolos não têm manchas, são obcordados com base cuneada, denteados nas porções laterais e lisos no ápice emarginado (1-2 cm de comprimento e 1-1,5 cm de largura). As estípulas são membranosas, lanceoladas, agudas (0,35 cm de comprimento), com pêlos longos e ralos, soldadas aos pecíolos que têm até 12 cm de comprimento (Izaguirre, 1995).

Os pedúnculos florais são axilares, mais longos que os pecíolos. As inflorescências são solitárias e densas (20-50 flores) do tipo corimbo, ovóides a esféricas (semiglobosas a globosas) com 1-1,5 cm de diâmetro. As flores são curto-pediceladas (1,5 mm) e têm brácteas menores nas flores superiores (3,5 mm) do que nas inferiores (6 mm). A corola é persistente, com coloração vermelha e rosada a lilás (FIGURA 2b).

FIGURA 2a. Indivíduo de *Trifolium riograndense* na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.

FIGURA 2b. Inflorescência de *Trifolium riograndense* na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.

Florescem de agosto a novembro, na maturidade a inflorescência é ascendente. Podem ser autogâmicas ou com fecundação cruzada, necessitando de estímulo mecânico para a produção de sementes. O fruto é um legume elíptico, deiscente (2-3 mm de comprimento) com uma a duas (3) sementes cordiformes, amarelo-claras a esverdeadas (1-1,3 mm de comprimento e 0,5-0,6 mm de largura) (Kappel, 1967; Zohary & Heller, 1984; Becker *et. al.* 1987; Izaguirre, 1995).

2.1.3.1.3. *Trifolium polymorphum* Poir

$2n = \underline{16}, 32$, (Zohary & Heller, 1984)

Leguminosae; Seção *Lotoideae* Crantz; Subsecção *Oxalioideae* (Gillett) Heller

É uma espécie característica da estepe pampeana, ocorrendo na região central e sul do Rio Grande do Sul, Uruguai, Argentina, Paraguai e Chile Central, geralmente em solos altos, pedregosos ou arenosos e húmidos (Burkart, 1987).

No Rio Grande do Sul, geralmente é anual e às vezes bienal, mas nas demais regiões da “estepe pampeana” têm ciclo de vida perene. É estolonífera, com hastes delgadas e prostradas, com até 40 cm de comprimento e cerca de 15 cm de altura. Apresenta raízes tuberosas, fusiformes para reserva (Cabrera, 1967; Zohary & Heller, 1984; Coll & Zarza, 1992).

As folhas apresentam pecíolos com até 7 cm de comprimento, as estípulas são amplas (3-5 mm), membranosas, 4-6 nervadas e envolvem a

base do pecíolo. Os folíolos são longos e iguais entre si, obcordados de base aguda, na porção superior são denteados com até 1,5 cm de comprimento e mesma largura, geralmente são mais pubescentes na face abaxial, tem nervura central saliente e secundárias paralelas (Izaguirre, 1995).

Apresenta flores subterrâneas e aéreas, as primeiras formam-se a partir de gemas basais e são cleistógamas, as segundas de gemas axilares e são alógamas, polinizadas por insetos (Zohary & Heller, 1984; Coll & Zarza, 1992; Izaguirre, 1995).

As flores subterrâneas são globosas, com cálice membranáceo, corola com pétalas rudimentares, são solitárias ou de duas a oito por nó estolonífero, formam-se no inverno e na primavera ao nível do solo, produzindo sementes por autogamia. O fruto é um legume subgloboso, coriáceo com 2-3(4) sementes obovóides a reniformes (2mm de diâmetro), têm maturidade tardia em relação às sementes produzidas nas flores aéreas. As flores aéreas são desde quase brancas a rosadas com base roxa, ou raramente totalmente roxas, agrupadas em inflorescências do tipo racemo-corimbosas com cinco a 45 flores, tem pedúnculos florais longos com mais de 20 cm. Geralmente florescem de outubro a novembro e, em anos mais úmidos, até janeiro. As flores são reflexas na maturidade (FIGURAS 3a e 3b). O fruto é um legume ovóide a sub-esférico, glabro a pubescente com 2-4(6) sementes com cerca de 1,5 mm de diâmetro (Zohary & Heller, 1984; Coll & Zarza, 1992; Izaguirre, 1995).

Zohary & Heller (1984) descrevem esta espécie como a única do gênero *Trifolium* que apresenta anficarpia, ou seja, produz frutos de dois tipos:

FIGURA 3a. Inflorescência de *Trifolium polymorphum* M1370 na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.

FIGURA 3b. Aspecto de *Trifolium polymorphum* M1370 na casa de vegetação, DPFA-UFRGS, este material foi bienal.

aéreos e subterrâneos. Com relação a esta característica, Coll & Zarza (1992) ressaltam que produzir sementes por autofecundação e por fecundação cruzada é uma vantagem em trabalhos de melhoramento genético que busquem a criação de variedades.

Segundo estes autores as sementes de frutos aéreos e subterrâneos, bem como as raízes tuberosas constituem importantes elementos para aumentar a persistência desta espécie.

Zohary & Heller (1984) consideram *T. polymorphum* uma espécie bastante variável, e reúnem neste táxon outras espécies de *Trifolium*, entre elas *T. argentinensis*, outra espécie nativa do Rio Grande do Sul.

2.1.3.2. Seção *MISTYLLUS* (C. Presl.) Godr.

2.1.3.2.1. *Trifolium vesiculosum* Savi

Leguminosae; Seção *Mistyllus* (C. Presl.) God.

$2n = 16$, (Zohary & Heller, 1984); $2n = 16$, (Cleveland, 1985)

O trevo-vesiculososo é uma espécie anual, hiberna, glabra, cespitosa, com hastes eretas ou ascendentes, de 15 a 70 cm de altura, com origem na região Mediterrânea.

As folhas superiores são as maiores, têm pecíolos curtos a subsésseis, as inferiores são menores e tem pecíolos mais longos.

Os folíolos são longos, glabros, com venação bem definida e com a presença de mancha branca em forma de "V". As estípulas são longas, lanceoladas e esbranquiçadas. As hastes podem apresentar cor roxa. As

inflorescências são axilares ou terminais, constituindo-se de espigas robustas ovóides a globulares, que alongam durante a frutificação. As flores são brancas a rosadas, sésseis, em número maior que 30 (150-170). As brácteas são lanceoladas e acuminadas, tão longas quanto o cálice, que tem 6-7 mm de comprimento. O ovário forma um tipo de vesícula. Floresce de setembro a janeiro. O legume é membranáceo, com 2-3 sementes de cor marrom, ovóides com 1-1,2 mm de comprimento (Zohary & Heller, 1984).

As vantagens apresentadas por esta espécie forrageira são: maturidade tardia, elevada produção de forragem, boa produção de sementes duras e ressemeadura natural. São três as cultivares disponíveis desta espécie, Anclo, Yuchi e Meechee, que diferem principalmente quanto à maturidade (Hoveland & Evers, 1995).

No Rio Grande do Sul tem sido utilizada a cultivar Yuchi.

2.1.3.3. Seção *VESICARIA* Crantz.

2.1.3.3.1. *Trifolium resupinatum* L.

2n = 14, Wolf, 1939 *apud* Zohary & Heller (1984); 2n = 14, 16, Cleveland (1985)

Leguminosae; Seção *Vesicaria* Crantz.

O trevo-resupinado ou trevo-pérsico é uma espécie nativa do centro e sul da Europa, ocorrendo em todos os países do Mediterrâneo e sudoeste da Ásia, em campos úmidos e no litoral. Foi introduzida na região do Mediterrâneo a partir do oeste e centro da Europa, naturalizando-se em Portugal e costa sul,

onde ocorrem em campos úmidos, terrenos arenosos, vales e montanhas (Gillett, 1985).

É anual ou bienal, glabra ou pubescente, decumbente com ápices ascendentes, hastes fistulosas (ocas) com costelas marcadas, ramificadas, sem enraizamento nos nós e 20 a 60 cm de comprimento (Zohary & Heller, 1984; Gillett, 1985).

Os folíolos são menores na base da planta do que no ápice, apresentam forma variada, de obovados a amplamente cuneados (7-20 mm de comprimento), na face abaxial apresentam nervuras longitudinais bem definidas. As folhas basais têm pecíolos, com 2-9 cm de comprimento, que encurtam em direção ao ápice da planta, onde são subsésseis (FIGURA 4).

FIGURA 4. Inflorescências de *Trifolium resupinatum* na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.

As estípulas são membranosas, esbranquiçadas, com 6-10 mm de comprimento, soldadas ao pecíolo na metade inferior (Izaguirre, 1995). As inflorescências são axilares, densas e do tipo corimbo, com brácteas membranosas muito pequenas e soldadas, formando um involúcro curto, que dá aspecto estrelado à inflorescência na maturidade e auxilia a dispersão das sementes pelo vento. As flores são ressupinadas, subsésseis (5-6 mm de comprimento), de cor rosada a violácea, com perfume adocicado bastante característico. Floresce de setembro a novembro, é autogâmica. O fruto é um legume ovóide ou elíptico, com 2,5 mm de comprimento e 2 mm de largura, o cálice é acrescentado, inflado, com forma globular ou estrelada, com 1-2 sementes ovóides lustrosas marrom-esverdeadas ou preto-esverdeadas e cerca de 1,2 mm de comprimento (Zohary & Heller, 1984; Izaguirre, 1995).

2.1.3.4. Seção *TRIFOLIUM*

2.1.3.4.1. *Trifolium pratense* L. (2n = 14, 28, 56)

2n = 14, Cleveland (1985); 2n = 14, 28, 56, Zohary & Heller (1984)

2n = 28, 56, Taylor & Smith, (1995)

Leguminosae; Seção *Trifolium*; Subsecção *Trifolium*

O trevo-vermelho é uma espécie amplamente cultivada, tem origem Euro-asiática ocorrendo naturalmente na maior parte da Europa, Ásia Menor, Rússia e Índia, em campos e margens de florestas (Gillett, 1985).

Zohary & Heller (1984) a consideram uma planta perene que pode se comportar como anual a bienal, em climas quentes com baixa umidade, no período estival.

Para Izaguirre (1995) é bienal, trienal ou perene de vida curta. Apresenta hábito cespitoso, pubescente, com hastes eretas, ascendentes ou descendentes, com cerca de 20-80 cm de comprimento. As folhas são digitado-trifolioladas, os pecíolos têm 8-25 cm de comprimento, encurtando gradualmente em direção ao ápice. As estípulas são membranosas, longas e triangulares, 2/3 soldadas ao pecíolo. Os folíolos são obovados a elíptico-lanceolados, denteados, com até 4 cm de comprimento e 2-3 cm de largura, apresentam mancha mais clara em forma de “V” na face adaxial e pubescência mais acentuada na face abaxial.

As inflorescências são terminais, solitárias ou em pares, globulares ou ovóides (1-3 cm de comprimento e 2-4 cm de diâmetro), sésseis ou levemente pedunculadas. Apresentam involúcro formado por duas ou mais folhas curto-pecioladas opostas (Kappel, 1967; Zohary & Heller, 1984).

A coloração das flores varia de rosada a lilás, raramente branca, o cálice é tubular-campanulado com 1,3-1,8 mm de comprimento, com brácteas triangulares e membranosas maiores que o pedicelo (Izaguirre, 1995).

A floração inicia na primavera e pode se estender até o outono. A fecundação é cruzada e a polinização realizada por insetos, principalmente dos gêneros *Apis* e *Bombus* (FIGURA 1). O fruto é oval, engrossado no ápice, com 2-3 sementes ovóides, assimétricas, bicolores com a porção caulinar amarela

ou castanho-clara e a radicular violeta, quando velhas têm cor de tijolo (Zohary & Heller, 1984; Izaguirre, 1995).

No Rio Grande do Sul, a baixa ressemeadura natural desta espécie, associada à falta de resistência à seca dificulta a permanência desta forrageira em pastagens.

2.1.3.4.2. *Trifolium incarnatum* L.

$2n = 14, 16$, Cleveland (1985); $2n = 14$, Zohary & Heller (1984)

Leguminosae; Seção *Trifolium*; Subsecção *Stellata* Gib. e Belli

O trevo-encarnado inicialmente foi descrito para a Itália, é uma espécie nativa do oeste e sul da Europa e região Caucásiana, ocorrendo em campos e beiras de estrada. É utilizada como forragem e adubo verde desde o século XVIII (Gillett, 1985; Knight, 1985 *apud* Hoveland & Evers, 1995).

Trata-se de uma planta anual, raramente bienal, pubescente, cespitosa, com hastes eretas (20-60 cm de comprimento), sem ramificações laterais, algumas vezes ramificam na base, podendo apresentar manchas purpúreas (Kappel, 1967; Zohary & Heller, 1984; Gillett, 1985).

Os pecíolos das folhas superiores são menores que os das folhas médias e basais, não têm manchas. Os folíolos são obovados com 10-30 cm de comprimento (FIGURA 5). Apresentam estípulas longas e membranáceas (Zohary & Heller, 1984; Gillett, 1985).

Os folíolos são pubescentes em ambas as faces, com borda inteira e nervura central da face dorsal bem marcada (Kappel, 1967).

FIGURA 5. Aspecto geral dos acessos de *Trifolium incarnatum* na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.

O pedúnculo floral é longo, a inflorescência é terminal do tipo espiga cilíndrico-cônica, com 2-7 cm de comprimento e 1,2-5 cm de largura (Kappel, 1967). O número de flores por inflorescência vai de 75 a 125 (Hoveland & Evers, 1995).

As flores têm a corola vermelha, algumas vezes com manchas de cor amarelo-creme a esbranquiçadas, usualmente a corola é maior que o cálice, que apresenta longos pelos (FIGURA 6). A fecundação geralmente é cruzada. A polinização é entomófila (Kappel, 1967).

Para Hoveland & Evers (1995) é uma espécie de fecundação cruzada, com mecanismos de auto-incompatibilidade e polinizada por abelhas.

FIGURA 6. Detalhe de inflorescências e folhas de um indivíduo de *Trifolium incarnatum* da cultivar AU Robin, na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.

O fruto é um legume ovóide com uma semente inclusa, as sementes são elíptico-ovóides, brilhantes, cor castanho-clara, o comprimento de 2-2,7 mm e o diâmetro de 1,4-1,6 mm (Kappel, 1967, Zohary & Heller, 1984).

As vantagens desta espécie são a boa produção de sementes, as sementes vigorosas com estabelecimento fácil, a produção precoce de forragem, a adaptação a diferentes solos. Apresenta, entretanto, limitações principalmente quanto à ressemeadura natural, pois produz baixa quantidade de sementes duras, e não suporta solos com drenagem deficiente (Hoveland & Evers, 1995).

2.1.3.5. Seção *TRICHOCEPHALUM* Koch.

2.1.3.5.1. *Trifolium subterraneum* L.

2n = 12, 16, Cleveland (1985)

Leguminosae; Seção *Trichocephalum* Koch.

O trevo-subterrâneo é uma espécie originária de locais secos e arenosos do sul e oeste da Europa até a Inglaterra, Países Baixos e o sudeste da Hungria (Izaguirre, 1995).

É uma planta anual, pubescente a hirsuta, decumbente ou prostrada. Apresenta hastes delgadas, com 10-30 (80) cm de comprimento, formando touceiras circulares. Os folíolos são obcordados com base cuneada, podendo apresentar uma mancha triangular com coloração verde mais clara na parte superior, ou ainda uma zona de cor púrpura na base, os pecíolos são longos (1-20 cm de comprimento). As estípulas são semi-ovadas com 0,5-3 cm de comprimento. As inflorescências são inconspícuas (cerca de 1 cm) com flores férteis e estéreis, são deflexas, enterrando-se no solo (FIGURA 7a e 7b) (Kappel, 1967; Zohary & Heller, 1984; Gillett, 1985).

Segundo Izaguirre (1995) as inflorescências podem apresentar 2-5 (7) flores férteis, de cor branca a rosada, de acordo com a variedade, o cálice é multinervado com um anel de pêlos longos e ralos na garganta do tubo, a corola com 0,8-1,4 cm tem aproximadamente o dobro do comprimento do cálice. As flores estéreis são numerosas, não têm corola, desenvolvem-se após a antese das férteis, formando um tubo composto pelos cálices acrescentes, estrutura que auxilia na dispersão do fruto.

FIGURA 7a. Inflorescência de *Trifolium subterraneum* na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.

FIGURA 7b. Aspecto de *T. subterraneum* na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.

Zohary & Heller (1984) dividem *T. subterraneum* em duas subespécies e oito variedades.

Hoveland & Evers (1995) apresentam esta espécie dividida em três espécies ou subespécies, que se diferenciam por aspectos genéticos, morfológicos e edáficos: *T. subterraneum* que se caracteriza por ter sementes pretas, pubescência nas folhas e hastes, que são compactas com 10-30 cm de comprimento; *T. yanninicum* Katzn & Morley, apresenta sementes cor de creme e é glabra, com exceção da parte superior das folhas; *T. brachycalycinium* Katzn & Morley, tem estípulas triangulares, curtas, é glabra e cresce em solos úmidos.

2.2. Eletroforese de isoenzimas vegetais

Vários autores ressaltam a importância da utilização multidisciplinar de informações (morfologia, ecologia, genética, fisiologia, bioquímica, estatística, matemática, entre outras) para a caracterização de germoplasma e implementação de programas de melhoramento genético (Hunziker, 1971; Heidrich-Sobrinho, 1974; Steiner, 1993).

Os avanços das últimas quatro décadas permitiram o desenvolvimento de novas metodologias genéticas e bioquímicas. Entre estas, a utilização da eletroforese no estudo de enzimas tem sido uma ferramenta muito útil em estudos de sistemática, biologia evolutiva e de aspectos agrônômicos (Tanskey & Orton, 1983).

2.2.1. Eletroforese de zona: princípios e procedimentos.

A eletroforese consiste na separação de moléculas ionizadas conforme um gradiente de cargas. Através do estabelecimento de um campo elétrico pode-se promover a migração de moléculas com carga positiva em direção ao pólo negativo, ou pólo catódico, enquanto que as com carga negativa migram para o pólo positivo ou pólo anódico (Lehninger, 1991).

A eletroforese de zona em gel é um processo simples, versátil e amplamente utilizado no estudo de proteínas. Surgiu da associação de técnicas de eletroforese de zona em gel de amido (Smithies, 1955), com processos histoquímicos de coloração (Hunter & Markert, 1957) e permite a identificação de proteínas de acordo com suas cargas, formas e tamanho (Peirce & Brewbaker, 1973; Markert, 1975; Scandalios, 1975).

A migração dá-se em campo elétrico constante e sobre um meio suporte inerte, que permite a separação das moléculas de acordo com o gradiente de cargas e por peneiramento molecular. O peneiramento ocorre porque moléculas de peso e/ou tamanhos maiores têm mais dificuldades para migrarem através dos poros do gel do que outras mais leves e/ou menores. Os meios suportes mais utilizados são o amido e a poliacrilamida (Hames & Rickwood, 1990).

O amido tem sido muito utilizado, por apresentar custo reduzido, facilidade no preparo e aplicação das amostras, não ser tóxico e, principalmente, por permitir o fatiamento do gel possibilitando o teste simultâneo de várias enzimas nas diferentes fatias. Por outro lado, o amido sendo um polímero natural, apresenta variações em seu teor de pureza que

alteram as suas propriedades de geleificação e revelação (Alfenas *et al.* 1991; Ballve *et al.* 1995).

Os géis de poliacrilamida por sua vez são mais onerosos e não permitem o fatiamento. Entretanto, apresentam vantagens em relação aos géis de amido, principalmente sua maior transparência e elevada pureza química, pois, trata-se de um polímero sintético e por permitir ampla faixa de tamanhos de poros no gel quando comparados aos géis de amido (Hames & Rickwood, 1990).

Ampla bibliografia apresenta os procedimentos necessários para o preparo dos géis de amido e poliacrilamida, como Brewer & Sing (1970), Feret & Bergmann (1976), Shields *et al.* (1983), Vallejos (1983), Hames & Rickwood (1990), Weeden & Wendel (1990), entre outros.

As enzimas podem ser separadas por eletroforese porque são substâncias ionogênicas, que apresentam cargas, parte determinada pela sua composição de aminoácidos, parte conferida pela estrutura conformacional. Existem 20 aminoácidos diferentes, destes apenas cinco têm carga elétrica. A carga é determinada por radicais livres que estão envolvidos nas ligações polipeptídicas e que podem ser de dois tipos, amino e carboxila. O grupo amino (R-NH₂) confere carga positiva e está presente na arginina, histidina e lisina. O grupo carboxila (R-COOH), com carga negativa, ocorre no ácido aspártico e glutâmico (Lehninger, 1991).

A mobilidade eletroforética das enzimas não se deve unicamente aos aminoácidos que estão ligados na cadeia polipeptídica (estrutura primária), mas também à sua conformação que é determinada por: estrutura secundária,

que resulta da relação entre os aminoácidos próximos, que determina a forma que os resíduos dos aminoácidos sucessivos estão arrançados no espaço; estrutura terciária, representada pela interação entre aminoácidos de uma mesma cadeia polipeptídica, que resulta nos dobramentos tridimensionais; estrutura quaternária, presente em proteínas compostas por duas ou mais cadeias polipeptídicas, determinadas pela forma que as subunidades estão reunidas e ajustadas (Lehninger, 1991).

As enzimas são compostos anfóteros, com a capacidade de dispor as cargas positiva ou negativa de acordo com a interação entre o pH do meio em que se encontram e sua estrutura (primária, secundária, terciária e quaternária). A carga elétrica final de uma proteína em solução, carga elétrica líquida, é determinada por: capa elétrica plana (íons que se posicionam na superfície da molécula); capa de hidratação (moléculas de água que formam um dipolo ao redor da molécula protéica); capa elétrica difusa (formada por íons da solução tampão). A sua mobilidade está relacionada ao pH e concentração dos tampões utilizados no gel e nas cubas, e pela intensidade do campo elétrico estabelecido (Cavalli-Molina, 1995, c. p.).

A escolha do sistema de tampões é fundamental na eficiência da separação eletroforética, pois o pH do tampão e sua concentração iônica são determinantes na mobilidade das enzimas. Podem ser utilizados: sistemas contínuos, quando os tampões utilizados nas cubas e para o preparo do gel têm a mesma composição, podendo variar quanto à concentração e/ou pH; e sistemas descontínuos, quando se utilizam tampões diferentes. A composição dos tampões, sua concentração e pH variam muito, sendo determinados de

acordo com o material testado e enzima analisada (Hames & Rickwood, 1990; Weeden & Wendel, 1990; Alfenas *et al.*, 1991).

A migração pode ser realizada sob voltagem (V) constante, corrente (I) constante ou potência (W) constante. Normalmente é utilizada voltagem, constantes em torno de 100 a 200 V. A corrente elétrica gera calor (C), definido por $C = V.I.t / 4,18$; onde: C = calorias; V = voltagem ; I = intensidade da corrente; t = tempo em segundos. Quanto maior a V ou I, maior será a produção de calor. Para que a temperatura não se eleve a ponto de ocorrer a desnaturação das proteínas ou perda de atividade enzimática é necessário que se realize a migração em câmara fria ou geladeira doméstica, com temperaturas em torno de 4 °C (Alfenas *et al.*, 1991).

A revelação das enzimas ocorre por processos de coloração histoquímica, que se baseiam em algumas propriedades das enzimas. Elas são catalisadores protéicos das reações bioquímicas, apresentam especificidade de grupo óptica absoluta por pelo menos uma porção da molécula de seu substrato, podendo necessitar de cofatores (coenzimas e/ou íons metálicos). Durante a revelação, o gel é incubado na solução de coloração contendo substrato, cofator, corante e tampão apropriados. A reação enzimática expressa na forma de bandas de atividade, correspondem as isoenzimas (Vallejos, 1983).

2.2.2. Isoenzimas

A associação de técnicas de separação de proteínas, por eletroforese de zona em gel de amido de Smithies (1955), com métodos de

coloração histoquímicas de Hunter & Markert (1957) permitiram apurada identificação de proteínas. As formas moleculares múltiplas de uma enzima com mesma atividade catalítica ou muito similar, existentes dentro do mesmo organismo, foram denominadas isozimas por Markert & Moller, 1959 (Scandalios, 1969; Markert, 1975). O termo foi modificado para isoenzimas de acordo com sugestão do “Standing Committee on Enzyme of International Union of Biochemistry” (Webb, 1965 *apud* Oliveira, 1976).

Desde a descoberta das isoenzimas, no final da década de 50 até o momento, foram identificadas enzimas com formas múltiplas em diferentes sistemas enzimáticos e taxa, comprovando a utilidade de estudos com isoenzimas na compreensão de muitos aspectos da biologia vegetal, como variabilidade genética, crescimento e diferenciação celular, modo de reprodução e adaptação ambiental (Stebbins, 1990; Weeden & Wendel, 1990).

As isoenzimas são proteínas, portanto, produto quase direto de genes estruturais. Alterações na seqüência de DNA refletem-se em mudança na composição de aminoácidos. Estas mudanças sendo substitutivas ou conformacionais manifestam-se através de diferentes mobilidades eletroforéticas (Harris & Hopkinson, 1977; Brown & Weir, 1983; Weeden & Wendel, 1990).

As isoenzimas expressas nos géis, como um conjunto de bandas com intensidade e mobilidade características, constituem os zimogramas, que expressam o polimorfismo genético (Alfenas *et al.*, 1991).

Segundo Weeden & Wendel (1990), o número de bandas detectadas em géis é determinado principalmente pelo número de genes codificadores

envolvidos, se os organismos são homocigotos ou heterocigotos para a característica em questão, pela estrutura quaternária das proteínas produzidas e pela compartimentalização subcelular das enzimas.

Diversos estudos têm demonstrado existir variabilidade significativa entre os padrões isoenzimáticos, quando são considerados diferentes compartimentos celulares (citoplasma, mitocôndria, cloroplastos, etc.), tecidos ou estágios de desenvolvimento de uma mesma planta, assim como indivíduos de uma mesma espécie (Scandalios, 1969; Gottlieb & Weeden, 1981).

As múltiplas isoenzimas apresentam diferentes origens, podendo ser evolutivamente não relacionadas, de evolução convergente, quando as enzimas codificadas por locos gênicos distintos convergem para uma mesma função. No caso de serem evolutivamente relacionadas, de evolução divergente, podem resultar da duplicação de genes com pequenas modificações estruturais, mas que codificam isoenzimas com função semelhante, ou originadas pela divergência evolutiva de alelos de um mesmo loco, neste caso são denominadas de aloenzimas.

Análises eletroforéticas têm demonstrado que os padrões de bandas isoenzimáticas e também a intensidade destas bandas são específicos para órgão, tecidos e estágio de desenvolvimento. Estes padrões estão relacionados com o controle genético das isoenzimas, que pode ser realizado por locos gênicos múltiplos, codificadores de cadeias polipeptídicas enzimáticas distintas, ou com a existência de alelos múltiplos em um único loco, que determinam versões estruturais distintas de uma cadeia polipeptídica particular. Podem ocorrer interações entre os polipeptídeos codificados por um mesmo loco ou,

mais raramente, por locos diferentes, sendo produzidas isoenzimas heteroméricas. O número de isoenzimas heteroméricas depende do número de polipeptídeos da enzima, do número de alelos e da relação entre os diferentes produtos alélicos. Geralmente apresentam mobilidade eletroforética intermediária a das isoenzimas homoméricas (Scandalios, 1974; Harris & Hopkinson, 1977).

A ocorrência de isoenzimas pode ainda estar associada a modificações pós-síntese, não refletindo diferenças genéticas, mas mudanças na estrutura primária e/ou conformacional da enzima. Neste caso, as isoenzimas são denominadas secundárias ou conformacionais, podendo ser formadas pela adição de compostos como açúcares, lipídeos ou radicais químicos, por oxidação de ligações sulfidríla nos polipeptídeos, por desaminação de determinados aminoácidos, por clivagens ocasionadas por enzimas como proteases, glicosidases ou lipases e por polimerização de enzimas (Harris & Hopkinson, 1977; Cavalli-Molina & Winge, 1988).

O nível de ploidia dos organismos (haplóide, diplóide, tetraplóide...) determina menor ou maior número de locos e/ou alelos, estando conseqüentemente relacionado ao grau de complexidade dos padrões isoenzimáticos com relação ao número e intensidade de bandas (Alfenas *et al.*, 1991).

A ocorrência de isoenzimas tem indicado a necessidade de formas enzimáticas mais adaptadas a determinadas situações metabólicas que podem diferir no tempo e/ou espaço. Aparentemente todos os organismos empregam

múltiplas formas moleculares de certas enzimas para maximizar sua capacidade adaptativa (Markert, 1975).

A manifestação de isoenzimas ao longo do desenvolvimento das plantas relaciona-se com a ativação e inativação de genes que controlam ou modificam a síntese das enzimas (Scandalios, 1974).

Dados experimentais, obtidos nos últimos 30 anos, têm comprovado propriedades já conhecidas das isoenzimas, como a herança Mendeliana, a expressão usualmente co-dominante, a penetrância completa, a ausência de efeitos epistáticos ou ambientais e a especificidade enzimática, que permite atribuição de alelos aos locos e comparações de locos em diferentes populações ou espécies (Gottlieb & Weeden, 1981; Heidrich-Sobrinho, 1982; Brown & Weir, 1983; Ballve *et al.*, 1995;). Além destas, outras propriedades foram descobertas e são subsídios para a ampla utilização de isoenzimas como marcadores genéticos. As duas mais importantes estão relacionadas à estabilidade do número de locos para sistemas enzimáticos específicos e a compartimentalização subcelular consistente das isoenzimas. (Weeden & Wendel, 1990).

Segundo Brown & Weir (1983) existem algumas limitações na técnica de eletroforese, que podem causar super ou subestimativa da variabilidade, como modificações pós-tradução, que produzem isoenzimas secundárias sem significância genética, a poliploidia, ou duplicação do material genético, a existência de alelos crípticos, que não são detectáveis por eletroforese comum e modificações na seqüência de DNA que não são traduzidas.

Mesmo considerando os avanços na área de marcadores de DNA, como RAPDS, AFLPS e RFLPS, as isoenzimas continuam sendo muito úteis para a caracterização de germoplasma.

2.2.3. Utilidades das isoenzimas

As isoenzimas são marcadores moleculares, amplamente utilizados em estudos taxonômicos, citogenéticos, genéticos, bioquímicos, ecológicos, fisiológicos, identificação de cultivares e linhagens, entre outros (Peirce & Brewbaker, 1973; Gorman & Kiang, 1977; Cardy & Beversdorf, 1984; Hamrick *et al.*, 1991).

No Brasil, os trabalhos com isoenzimas iniciaram na década de 70 e desde então têm sido utilizados para diversos fins, como a identificação de fungos (Moreira & Alfenas, 1985; Alfenas *et al.*, 1984 e 1987a), identificação de patógenos (Kimura & Dianese, 1983; Alfenas *et al.*, 1987b; Brommonschenkel *et al.*, 1987; Valim-Labres, 1995), estudos de variabilidade intra e inter-populacional (Cavalli-Molina & Winge, 1988; Tavares, 1991; Brondani, 1995; Coelho & Lopes, 1995; Torggler *et al.*, 1995; Winge *et al.*, 1995), estudos de formas de reprodução (Hickenbick *et al.*, 1992; Ferreira & Cavalli-Molina, 1994; Silveira & Moraes, 1995), estudos de híbridos (Schifino-Wittmann & Schlegel, 1990; Schifino-Wittmann *et al.*, 1996) e identificação de cultivares e de linhagens (Oliveira, 1976; Heidrich-Sobrinho, 1982).

2.3. Sistemas enzimáticos estudados

Estudos têm indicado que algumas proteínas geralmente são mais polimórficas enquanto que outras raramente o são (Selander, 1976).

Weeden & Wendel (1990), referindo-se ao polimorfismo observado em milho, tomate e ervilha-de-jardim, as três espécies geneticamente mais investigadas, relatam que, em plantas diplóides de cerca de 70 locos avaliados, 40 a 50 apresentaram polimorfismo.

Segundo Weeden & Wendel (1990), para as enzimas com funções bioquímicas bem definidas e, especialmente as envolvidas com o metabolismo principal (e.g. rotas de Embden - Meyerhof e das fosfato pentoses, ciclos de Krebs e de Calvin, e biossíntese de aminoácidos), um número previsível de locos é expresso em plantas diplóides. Cada isoenzima expressa tem uma localização subcelular característica e estrutura de subunidades conservativa. O que difere dos sistemas enzimáticos como esterases, fosfatases ácidas e peroxidases, que apresentam variações consideráveis quanto ao número total de isoenzimas expressas, de isoenzimas por compartimento subcelular e de subunidades por enzima.

Gillespie & Langley (1974) classificaram as enzimas, quanto à natureza e diversidade de seus substratos, em enzimas do Grupo I, geralmente associadas ao metabolismo energético central e com substratos específicos e enzimas do Grupo II, com substratos múltiplos e relacionadas ao metabolismo periférico, apresentando maior influência ambiental. As enzimas do grupo I geralmente são menos polimórficas.

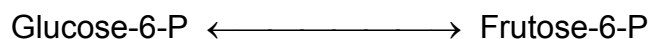
De maneira geral, pode-se afirmar que vários sistemas enzimáticos já foram avaliados em algumas das espécies do gênero *Trifolium*, entretanto relativamente pouco é sabido sobre o controle gênico envolvido na maior parte dos casos, exceção para alguns sistemas já bem avaliados, como fosfoglicoisomerase e esterases. Também são restritas as espécies do gênero *Trifolium* avaliadas quanto a suas isoenzimas, visto que o gênero compreende cerca de 240 espécies e foram encontradas referências somente para *T. ambiguum*, *T. hirtum*, *T. hybridum*, *T. uniflorum*, *T. occidentale*, *T. pratense*, *T. subterraneum* e *T. repens*; destaque para as duas últimas, que têm sido as mais estudadas, o que pode ser explicado por serem importantes espécies forrageiras, com utilização mundial.

Para exemplificar, as isoenzimas avaliadas no gênero *Trifolium*, podem ser citados estudos envolvendo diferentes sistemas enzimáticos. Collins *et al.* (1984), analisando 22 cultivares de *T. subterraneum*, testaram 15 enzimas com o objetivo de utilizá-las para a identificação das cultivares, obtendo os melhores resultados com esterase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase e álcool desidrogenase. Considerando os sistemas enzimáticos analisados, estes autores observaram elevado polimorfismo entre cultivares e baixa ou nenhuma variabilidade dentro de cada cultivar. Martins & Jain (1980), para avaliar variações inter-populacionais em *T. hirtum*, obtiveram os melhores resultados com esterase, fosfoglicoisomerase e leucina aminopeptidase. Gibson *et al.* (1971), avaliando a hibridação entre *T. uniflorum*, *T. repens* e *T. occidentale* através de caracteres morfológicos, citológicos e químicos, testaram sete enzimas, destacando-se entre elas esterase. Williams

(1980), em estudo de híbridos de *T. ambiguum* e *T. hybridum*, analisou com sucesso esterase, fosfatase ácida e peroxidase. Williams & Verry (1981), trabalhando com híbridos de *T. ambiguum* e *T. repens*, utilizaram esterase, obtendo bons resultados. Molina-Freaner & Jain (1992), comparando 48 populações de *T. hirtum*, cultivadas e nativas, segundo 12 sistemas enzimáticos, obtiveram maior polimorfismo para fosfoglicoisomerase, esterase e enzima málica.

2.3.1. Fosfoglicoisomerase (PGI; E. C. 5.3.1.9)

Este sistema enzimático está relacionado com a reação reversível de isomerização da frutose-6-fosfato e glucose-6-fosfato, que pode ser representada pela equação de Vallejos (1983):



Diversos estudos em plantas revelam que PGI é uma enzima funcional dimérica, mediadora do metabolismo intermediário, com compartimentação específica e ocorrendo no citosol e plastídeos (mitocôndria e/ou cloroplasto) (Weeden & Gottlieb, 1980; Weeden & Wendel, 1990).

Sobre este assunto, Gottlieb & Weeden (1981) apresentam o número total de isoenzimas de PGI, presentes no cloroplasto e no citoplasma de dez gêneros de plantas (*Chenopodium*, *Clarkia*, *Fragaria*, *Gaura*, *Lolium*, *Oenothera*, *Plhox*, *Pinus*, *Solanum* e *Stephanomeria*). Na maioria destes gêneros as formas de PGI do cloroplasto apresentam a migração mais rápida, sendo codificadas pelo loco Pgi1 com baixo polimorfismo. Somente uma

isoenzima de PGI foi observada para sete destes gêneros. O loco Pgi2 mostra-se mais polimórfico, exceção para uma espécie do gênero *Oenothera*. O loco Pgi2 é responsável por formas isoenzimáticas de PGI do citoplasma.

Sucessivos estudos realizados com azevém perene (*Lolium perenne*), avaliaram as isoenzimas do loco Pgi2, utilizando os genótipos e as frequências alélicas para a identificação de cultivares ou em estudos de dinâmica de pastagens permanentes (Nielsen, 1980; Gilliland *et al.*, 1982; Kennedy *et al.*, 1985; Sanders *et al.*; 1989).

Michaelson-Yeates (1986), avaliando 45 famílias de policruzamentos entre populações de cultivares de *T. repens*, encontrou em PGI duas regiões de atividade enzimática que correspondem aos dois locos já relacionados para *Lolium perenne* e outros gêneros citados por Gottlieb & Weeden (1981). O autor observou que o loco Pgi1 foi monomórfico e Pgi2 polimórfico com cinco alelos que denominou A, B, C, D e F. Segundo este autor, sendo *T. repens* um tetraplóide e estando envolvidos cinco alelos para o loco Pgi2, co-dominantes e codificadores de enzima dimérica, poderia ser prevista a ocorrência de 70 fenótipos isoenzimáticos para este loco. Isso ocorreria se os cinco alelos estivessem distribuídos aleatoriamente nos dois conjuntos gênicos deste tetraplóide. Entretanto, o autor observou somente nove padrões isoenzimáticos, pois o alelo C sempre ocorreu em homozigose em pelo menos um dos conjuntos gênicos. Para o autor, este resultado comprova a origem anfidiplóide de *T. repens*, onde um parental teria o alelo C em homozigose e o outro seria multialélico.

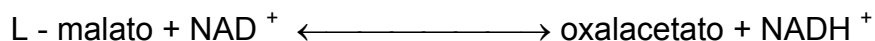
Prins *et al.* (1989), estudando a persistência de *T. repens* cv. Grasslands Kopu em pastagens implementadas há dez anos, avaliaram as isoenzimas do loco Pgi2 obtendo cinco alelos (a, b, c, d, e), os quatro correspondendo aos descritos por Michaelson-Yeates (1986). Neste estudo todos os indivíduos analisados também apresentaram no mínimo dois alelos do tipo “c” e o segundo alelo com frequência alélica mais alta foi o “b”.

2.3.2. Malato desidrogenase - NAD dependente (MDH-E.C.1.1.1.37)

O sistema enzimático malato desidrogenase dependente de NAD, nas plantas, está envolvido com a oxidação de malato a oxalacetato. Constituindo-se em elemento chave de rotas metabólicas no citosol, mitocôndria, glioxissomos e peroxissomos (Weeden & Wendel, 1990).

A forma mitocondrial (m-MDH) está relacionada com o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. A forma citosólica (c-MDH) participa da neoglucogênese, podendo estar relacionada à transferência de equivalentes redutores entre o citoplasma e a mitocôndria. Durante a germinação, os ácidos graxos são convertidos a carboidratos nos glioxissomos, e MDH é uma enzima importante no ciclo do glicolato. Com o desenvolvimento das plantas os glioxissomos são convertidos a peroxissomos e em conjunção com os cloroplastos e mitocôndrias participam da fotorespiração (Hedges & Palmer, 1992).

Segundo Vallejos (1983), a reação bioquímica pode ser representada pela equação:



O sistema enzimático MDH pode ocorrer em diferentes tecidos vegetais, flores, frutos, sementes e raízes, sendo encontrado principalmente nas folhas, devido a sua relação com a fotorrespiração. Participa do metabolismo principal das plantas, estando relacionado com o vigor e a capacidade de adaptação aos fatores de estresse ambiental. Sendo uma enzima do grupo I, com substrato específico, é mais conservativa quanto à composição molecular e ao número de locos expressos do que enzimas do metabolismo periférico, como esterase ou peroxidase (Weeden & Wendel, 1990; Hedges & Palmer, 1992).

Segundo Weeden & Wendel (1990) na maioria das plantas MDH é uma enzima dimérica, que pode ser codificada por um ou mais locos. Os heterozigotos para um loco polimórfico ou com locos duplicados e alelos divergentes podem produzir duas subunidades diferenciadas que interagem para formar uma molécula dimérica. Associação destas subunidades podem formar três isoenzimas, duas homoméricas da reunião de subunidades semelhantes e uma heteromérica, resultado da associação de subunidades diferenciadas. Estas são visualizadas como três bandas dispostas de acordo com suas respectivas mobilidades.

Hedges & Palmer (1992), buscando esclarecer a herança nula de m-MDH em soja (*Glycine max*), relatam que as formas mitocondriais de MDH (m-MDH) são codificadas por dois locos duplicados cada um com três isoenzimas

e que existem quatro alelos nulos. A ocorrência de homozigotos para os alelos nulos em um loco resulta na produção de somente uma subunidade e conseqüentemente uma isoenzima em vez de três. Segundo estes autores a ausência de formas de m-MDH pode produzir efeitos negativos na produção de energia nas mitocôndrias, reduzindo o vigor das plantas e podendo produzir coloração amarelo-esverdeada.

Brammer (1993) encontrou, em *Hordeum vulgare* cv. MN-599, oito bandas anódicas para MDH, quatro principais e quatro secundárias, com o controle genético estabelecido por quatro locos. Para *Hordeum stenostachyis*, a autora descreve oito locos, destes apenas Mdh1 foi polimórfico com dois alelos, um deles com menor atividade enzimática e baixa freqüência de ocorrência, identificando neste loco a ação de modificadores pós-síntese. A autora, citando Pedersen & Simonsen (1987), destaca que algumas enzimas caracterizam-se por apresentarem alterações devido a diversos fatores, entre eles a ação de genes modificadores. Nas duas espécies avaliadas, a autora encontrou isoenzimas com atividades enzimáticas diferenciadas, de acordo com sua localização tissular e loco codificador.

Segundo Newton (1983), análises genéticas têm demonstrado que algumas isoenzimas, localizadas na mitocôndria, são especificadas por mais de um gene estrutural. Nestes casos, os produtos de genes múltiplos são funcionalmente equivalentes e se são ativos como multímeros, as subunidades especificadas por genes diferenciados associam-se, formando multímeros intergênicos. Também tem sido demonstrado que algumas isoenzimas mitocondriais são conformacionais, podendo resultar da ação de locos

modificadores específicos e refletir diferentes níveis de ligação com coenzimas ou com outros metabólitos.

Brammer (1993), ainda ressalta a importância do estudo de enzimas mitocondriais, dado que estas afetam o vigor e a resistência das plantas a condições de estresse ambiental.

González (1994), analisando dois gêneros de leguminosas forrageiras, observou baixa variabilidade nos padrões isoenzimáticos em MDH de folhas. Em *Lathyrus* L. (cinco espécies) obteve sete bandas e encontrou quatro locos por espécie, com exceção de *L. sativus* que teve um loco a mais, este o único com isoenzima espécie-específica. Em *Vicia* L. (nove espécies), obteve maior número de bandas no total, mas o número presente por espécie (três a cinco) foi semelhante. A autora relaciona os resultados obtidos ao fato de MDH pertencer ao metabolismo energético (ciclo de Krebs), com baixa variabilidade enzimática esperada.

Molina-Freaner & Jain (1992), estudando o polimorfismo existente em populações naturais e introduzidas de *T. hirtum*, analisaram 12 sistemas enzimáticos, entre eles MDH que não apresentou polimorfismo e para o qual são sugeridos quatro locos.

Sawada & Yamauchi (1994), testaram 21 sistemas enzimáticos, buscando, através de isoenzimas, a identificação de clones de *T. repens* cv. Grasslands Huia (a cultivar mais comum no Japão), MDH não apresentou bons resultados para este fim.

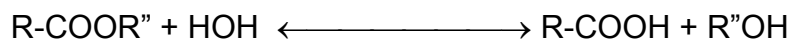
Para Gibson *et al.* (1971), este sistema também não foi adequado para identificar a hibridação inter-específica entre *T. uniflorum* e *T. occidentale*, pois os padrões das espécies e híbridos foram muito similares.

Collins *et al.* (1984), procurando a identificação de 22 cultivares de *T. subterraneum* através de isoenzimas, obtiveram 13 bandas para MDH, três dessas foram monomórficas. Os autores apresentam três locos possivelmente envolvidos no controle genéticos desta enzima e três padrões isoenzimáticos, o padrão "P2", presente em 20 das cultivares, constituído por oito bandas, os outros dois padrões "P1" (dez bandas) e "P3" (seis bandas) são cultivar-específicos e ocorrem nas cultivares Seaton Park e Woogenellup respectivamente. Os padrões "P1" e "P2" são similares, diferindo quanto à presença de duas bandas com migração mais rápidas em "P1" e uma banda com coloração mais intensa em "P2". O padrão "P3" apresentou menor número de bandas e diferenças quanto à intensidade destas. Os autores não definem os locos ou alelos envolvidos na codificação das isoenzimas obtidas para MDH.

2.3.3. Esterases (EST – E. C. 3.1.1.)

As esterases fazem parte de um grupo de enzimas complexo e heterogêneo, que apresentam baixa especificidade por substratos (Scandalios, 1969). Conforme "International of Biochemistry"- IUPAC (1979) *apud* Cavali-Mollina (1984), as esterases são hidrolases que atuam nas ligações ésteres e estão divididas em sete subgrupos, de acordo com o substrato sobre o qual atuam. As hidrolases de ésteres carboxílicos estão relacionadas com o

metabolismo dos ácidos graxos, agindo sobre ésteres carboxílicos na presença de água e produzindo compostos alcoólicos e ânions de ácido carboxílico. Na reação bioquímica indicada por Scandalios (1969):



As esterases estão presentes em numerosos tecidos, de plantas e animais, e têm importante papel fisiológico, pois, originam ácidos livres e compostos alcoólicos, essenciais em processos metabólicos oxidativos, como transporte de ácidos, ressíntese de compostos alcoólicos e fosfóricos, entre outros (Oliveira, 1976).

O polimorfismo das EST deve-se à ampla especificidade de substratos sob os quais podem atuar e por pertencerem ao metabolismo periférico. São classificadas por Gillespie & Langley (1974) no grupo II, com especificidade por múltiplos substratos e pertencentes ao metabolismo periférico com maior variabilidade genética. As esterases têm sido amplamente estudadas, estando entre as enzimas com maior polimorfismo observado. Em plantas, geralmente apresentam estrutura funcional monomérica e/ou dimérica, com duas a dez isoenzimas, localizadas no citosol (Weeden & Wendel, 1990).

Segundo revisão de Scandalios (1969), os primeiros estudos de isoenzimas em plantas, foram realizados por Schawartz (1960) com esterases em milho (*Zea mays*), que observou a existência de diferentes isoenzimas de EST controladas por três locos, quando analisava esterases com maior afinidade por substrato α nafil acetato. Schawartz (1965) *apud* Scandalios (1969) identificou a estrutura funcional destas isoenzimas como dimérica, devido à ocorrência de isoenzimas com migração intermediária em

heterozigotos, quando eram cruzados indivíduos com padrões isoenzimáticos distintos. Também foram observadas, em milho, diferenças entre as isoenzimas de EST relacionadas a diferentes tecidos ou estágios do desenvolvimento ontogenético (Scandalios, 1969; Scandalios, 1974;).

Heidrich-Sobrinho (1982), analisando os sistemas de álcool desidrogenase, catalase, peroxidase, fosfatase ácida e esterase, conseguiu identificar nove cultivares de milho utilizando apenas quatro locos de EST. Estes locos (E1, E3, E4 e E11) apresentaram de duas a quatro isoenzimas associadas. O autor já havia observado a ocorrência de 11 locos controlando 26 isoenzimas de EST em milho (Heidrich-Sobrinho, 1974), um loco a mais (E11) do que havia sido encontrado por MacDonald & Brewbaker (1972) *apud* Heidrich-Sobrinho (1974).

Darmency & Gasquez (1983), estudando oito populações semipermanentes e oportunistas de *Poa annua* L., detectaram 17 locos em EST, oito locos foram polimórficos, destes cinco foram incluídos na análise das populações. Os autores encontraram 26 isoenzimas, dessas, oito estavam sempre presentes e as outras 16 variavam. Analisando isoesterases com especificidade α e β , detectaram que as bandas de α EST tinham coloração preta ou verde, enquanto que as β EST eram vermelhas ou violetas. Os autores observaram que o loco Est1 apresentava dois alelos (A e B), associados às formas vegetais, prostradas ou eretas. Os indivíduos prostrados eram homozigotos do tipo "AA" e caracterizavam-se pelo florescimento tardio e enraizamento nos nós. Os tipos eretos foram "BB", com florescimento precoce e sem enraizamento nos nós. A proporção de tipos prostrados foi inferior em

todas as populações estudadas, sendo menor ainda nas populações oportunistas do que nas semipermanentes. Não observaram heterozigotos para o loco Est1, o que eles associaram à espécie ser autogâmica com baixa ocorrência de fecundação cruzada, baixo florescimento em ambientes naturais e ao fato dos tipos, prostrado e ereto, florescerem em períodos distintos. Os autores desta forma chegaram a conclusão que a coexistência de plantas, com diferentes formas de explorar o ambiente, não interferia no polimorfismo observado em EST.

Cavalli-Molina & Winge (1988), estudando esterases em cinco populações naturais de *Relbunium hypocarpium*, detectaram 57 isoenzimas controladas por 33 locos. Analisando diferentes tecidos de plântulas (raiz, hipocótilo e folhas cotiledonares), encontraram maior atividade esterásica no hipocótilo, enquanto que as isoesterases de folhas cotiledonares apresentaram as bandas mais anódicas e com a coloração mais intensa. Os indivíduos de uma mesma população, e, os de populações distintas, diferiram quanto à presença e ausência de bandas em seus zimogramas.

Brammer (1993), analisando raiz, endosperma e coleótilo de *Hordeum stenostachys*, observou 37 isoenzimas, 19 secundárias e 18 principais, controladas por 11 locos, destes nove relacionados a 13 isoenzimas com especificidade α EST, um loco controlador de três isoenzimas β EST e outro de duas $\alpha\beta$ EST. A autora detectou a ação de um loco modificador específico para raízes com ação sobre as isoenzimas do loco Est10, e diferenças na intensidade de algumas bandas quando analisados diferentes

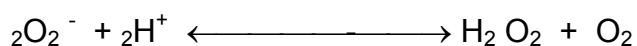
tecidos. Estes resultados indicam a ativação tecido-específica das EST nesta espécie.

Ferreira & Cavalli-Molina (1994), estudando três populações naturais de *Hordeum euclaston*, encontraram 24 isoenzimas para EST, 20 com atividade α esterásica, três com β e uma com α e β esterásica. Segundo estes autores, estão envolvidos no controle genético 11 locos, sendo dois polimórficos (Est7 e Est11). Para o loco Est7 foram detectados dois alelos e atividade enzimática em todos os tecidos testados (endosperma, raiz e coleóptilo). O loco Est11 também apresentou dois alelos, mas teve a atividade restrita ao endosperma e à raiz. Os produtos do loco Est11 apresentaram alterações pós-síntese em sua mobilidade, quando analisados tecidos distintos (raiz e endosperma). Os nove locos monomórficos, detectados por estes autores, nem sempre estiveram ativos nos mesmos tecidos, seis ocorreram na raiz e no coleóptilo, enquanto que três somente no coleóptilo.

2.3.4. Superóxido dismutase (SOD- E. C 1.15.1.1.)

Segundo revisão de Bowler *et al.* (1992), as superóxido dismutases foram descobertas por McCord e Fridovich em 1969. São enzimas relacionadas ao metabolismo periférico. Pertencem ao grupo das oxi-redutases, encontradas em praticamente todos os organismos aeróbicos, em compartimentos celulares sujeitos ao estresse oxidativo. As SOD são componentes centrais do mecanismo de defesa contra a toxicidade potencial do oxigênio, em suas formas ativas, ou de radicais livres de oxigênio produzidos durante o

metabolismo celular aeróbico. Nas plantas, tem a importante função de prevenir os efeitos oxidativos tóxicos dos radicais superóxido, provenientes da redução de oxigênio molecular pela ação da luz nos cloroplastos. A reação catalisada é de oxirredução, em que radicais superóxido são transformados em peróxido de hidrogênio e oxigênio, podendo ser representada por:



Segundo estes autores, os três tipos de SOD estão relacionados ao tipo de atividade catalítica e diferem quanto aos cofatores metálicos específicos, compartimentalização celular e sensibilidade aos inibidores. Conforme seus cofatores metálicos e sua distribuição nos tecidos, as SOD são classificadas em três grupos, MnSOD, FeSOD e Cu/ZnSOD. Geralmente, nas plantas a forma MnSOD é encontrada na matriz mitocondrial, FeSOD no estroma dos cloroplastos, onde também pode ocorrer Cu/ZnSOD, que ainda está presente no citoplasma mitocondrial. Estudos de frações subcelulares identificaram diversas isoenzimas de SOD, havendo variações de planta para planta quanto ao número de isoenzimas de cada forma, bem como na abundância de cada uma. As formas MnSOD e FeSOD são estruturalmente semelhantes, ocorrendo em procariontes e eucariontes, enquanto Cu/ZnSOD só ocorre em eucariontes. Para os autores, isso poderia ser um indicativo que, filogeneticamente, MnSOD e FeSOD são formas mais antigas, que evoluíram antes da divergência procariontes/eucariontes, enquanto que Cu/ZnSOD é mais recente e independente, com surgimento relacionado ao início da evolução dos eucariontes.

Bridges & Salin (1981) *apud* Griffin & Palmer (1989) informam que FeSOD é raro na maioria das plantas embora haja citação de sua ocorrência em *Ginkgoaceae*, *Nymphaeaceae* e *Brassicaceae*.

Newton (1983) cita estudo em *Zea mays*, de Baum & Scandalios (1981), demonstrando que as formas mitocondrial e citosólica de SOD diferem quanto a uma série de propriedades químicas, como distinta estabilidade frente ao aquecimento, sensibilidade a peróxido de hidrogênio, peso molecular (SOD mitocondrial apresentou maior peso estimado que SOD citosólica) e tamanho das subunidades. Estes estudos sugerem que as formas de SOD citosólicas são estruturalmente ativas como dímeros enquanto as formas de SOD mitocondriais são tetrâmeros.

Em estudo pioneiro, Larsen & Benson (1970), já procuravam identificar cultivares de soja (*Glycine max*) através da análise de enzimas oxidativas (INT) em sementes. Os autores conseguiram agrupar as cultivares de acordo com três padrões de bandas, que diferiam quanto ao número de bandas presentes, P1 (2), P2 (4) e P3 (5).

Gorman & Kiang (1977), analisando 113 cultivares comerciais de soja, observaram variabilidade expressa por presença ou ausência de bandas em TO (=SOD), encontrando quatro padrões fenotípicos, P1 e P3 (11 bandas), P2 (9) e P4 (13). Os autores também encontraram variabilidade relacionada a mobilidades diferenciadas, quando os padrões P1 e P3 diferiam quanto às bandas nove e dez, que em P3 eram um pouco mais lentas. O padrão P4 foi atribuído a prováveis heterozigotos entre P1 e P3, pois apresentou todas as bandas características destes padrões.

Schifino-Wittmann *et al.* (1996), com extratos de folhas de duas espécies de *Leucaena* e seus híbridos, encontraram até três bandas por indivíduos em *Leucaena leucocephala* e no máximo quatro para *Leucaena diversifolia ssp diversifolia*. Os híbridos apresentaram quatro bandas paternas e uma nova que, conforme as autoras sugerem, seria produto da interação de cadeias polipeptídicas codificadas pelo parental. Embora tenham observado diferenças morfológicas, a variabilidade isoenzimática foi baixa e associada à pequena base genética presente em cultivares deste gênero. Para as diferenças intra-específicas devido à ausência de bandas, sugeriram a existência de alelos nulos.

González (1994), estudando leguminosas forrageiras dos gêneros *Lathyrus* (cinco espécies) e *Vicia* (nove), utilizando extratos de folhas, observou 11 bandas isoenzimáticas para cada gênero, duas a cinco por espécie. A autora observou maior polimorfismo intra e inter-específico para SOD do que para MDH e enzima málica, relacionando esse polimorfismo a SOD ser uma enzima do metabolismo periférico.

Ferreira & Cavalli-Molina (1994), estudando três populações de *Hordeum euclaston*, uma gramínea nativa no Rio Grande do Sul, testaram diferentes tecidos e encontraram 16 bandas de SOD, nove anódicas e provavelmente controladas por cinco locos, sendo que quatro destes foram monomórficos e um polimórfico, com dois alelos e restrito à raiz. Neste estudo, SOD foi a enzima mais polimórfica. Embora os autores tenham observado alguma variabilidade intra-populacional quanto à presença de bandas, não

encontraram padrões heterozigotos, reafirmando o caráter autogâmico desta espécie.

Brammer (1993), estudando *Hordeum stenostachys*, obteve para SOD 18 bandas anódicas, 12 isoenzimas principais e relacionadas a 11 locos e seis secundárias. Destas, uma com ocorrência relacionada à ação de modificadores. A autora encontrou diferenças tissulares e sugere 15 locos.

Bowler *et al.* (1992) sugerem que os mecanismos envolvidos na regulação de SOD devam ser governados por sítios subcelulares, localizados em ambientes celulares em que ocorre estresse oxidativo. Os autores fazem referência a um grande número de estudos onde foi observado que o número de locos ativados (números de formas de SOD detectadas) esteve relacionado a respostas a fatores de estresse ambiental, como altas e baixas temperaturas, aplicação de herbicidas, ataque de patógenos, seca ou alagamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

O presente estudo faz parte de Programa desenvolvido no Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (DPFA – UFRGS), para a caracterização de germoplasma e melhoramento genético, que vem trabalhando com aspectos agronômicos, morfofisiológicos, citogenéticos, fenológicos e isoenzimáticos.

Foram analisados 36 acessos de plantas do gênero *Trifolium* distribuídos em oito espécies, das quais seis são cultivadas (*T. incarnatum*, *T. pratense*, *T. repens*, *T. resupinatum*, *T. subterraneum* e *T. vesiculosum*) e duas nativas no Rio Grande do Sul (*T. polymorphum* e *T. riograndense*).

As plantas analisadas foram obtidas a partir de sementes de cultivares comerciais, materiais experimentais e populações naturais, provenientes do Brasil e de outros países.

A coleção viva foi mantida em casa de vegetação e canteiros, no Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia (DPFA), Faculdade de Agronomia da UFRGS, de junho de 1995 a fevereiro de 1997.

3.2. Métodos

3.2.1. Estabelecimento e manutenção da coleção viva

3.2.1.1. Obtenção das sementes e germinação

A partir de fevereiro de 1995 foram adquiridas sementes de dez espécies e 80 acessos do gênero *Trifolium*, provenientes da EMBRAPA Bagé CPPSUL - RS, EPAGRI Lages - SC e outras procedências, conforme APÊNDICE 1, onde estão listados os acessos, os respectivos fornecedores e a procedência ou local de coleta.

Com o auxílio de lupa foi efetuada a seleção visual do material, sendo descartadas as sementes que apresentavam má formação, ataque de fungos ou de insetos. Após, as sementes foram tratadas contra fungos com *Captan* 750 TS em pó.

Para a germinação, as sementes foram colocadas em placa de petri de 9 cm de diâmetro, distribuídas sobre três folhas de papel filtro, sobrepostas e previamente sulcadas em aparelho sulcador, e embebidas com 4 ml de água destilada.

Os conjuntos das placas de petri com os papéis filtro foram autoclavados com antecedência para reduzir a contaminação por fungos durante o processo de germinação. Foram dispostas 50 a 100 sementes por placa.

As placas preparadas foram colocadas em incubadora do tipo BOD com fotoperíodo (12h luz/12 h escuro), disponível no laboratório de sementes do DPFA-UFRGS.

O material foi acompanhado diariamente e a umidade do papel filtro mantida com água destilada.

Na primeira repetição do processo de germinação (23/05/1995), todas as espécies foram postas a germinar a 20° C, sem passarem por tratamentos para quebra de dormência ou escarificação. Nas demais repetições foram realizados os tratamentos indicados para germinação por BRASIL (1992): *T. pratense* e *T. resupinatum* foram escarificados com auxílio de lixa fina (n. ° 120), delicadamente para evitar danos aos embriões. *T. repens* e *T. dubium* passaram por tratamento a frio, estratificação, ficando cinco dias em geladeira doméstica (5° C).

Até cinco repetições do processo de germinação foram realizadas para alguns acessos e os materiais que, mesmo assim, não germinaram foram abandonados.

3.2.1.2. Estabelecimento em casa de vegetação

O primeiro transplante (09/06/1995) foi realizado para copos plásticos de 250 ml, a identificação foi feita com o auxílio de placas plásticas. Cada acesso ficou constituído de 24 indivíduos, sendo que os copos plásticos foram organizados em bandejas plásticas para facilitar a rega, transporte e manutenção.

Quando as plantas estavam bem estabelecidas, com cerca de dois a três meses, foram transferidas para vasos plásticos de 1 litro (FIGURA 8). O solo utilizado em copos e vasos no primeiro plantio e nas repetições e para

suplementações foi o mesmo, proveniente da Estação Experimental Agronômica da UFRGS e peneirado antes da utilização (Veja a análise do solo no APÊNDICE 2).

FIGURA 8. Aspecto geral de acessos de *Trifolium riograndense* (no centro) e de *Trifolium pratense* (nos cantos direito e esquerdo), na casa de vegetação do DPFA-UFRGS.

Todas as espécies anuais, *T. incarnatum*, *T. polymorphum*, *T. resupinatum*, *T. subterraneum* e *T. vesiculosum*, foram estabelecidas em duas ocasiões, 1995 e 1996. O mesmo ocorreu para os acessos danificados durante o transplante e os perdidos por ataque de insetos ou doentes.

As espécies perenes, *T. repens*, *T. pratense* e *T. riograndense*, e um indivíduo de *T. polymorphum*, que se comportou como bienal, foram mantidas em casa de vegetação de junho/1995 até fevereiro de 1997, quando foram descartadas.

As espécies anuais permaneceram em casa de vegetação durante todo o seu ciclo, tanto as populações de 1995/96 quanto as repetições de 1996/97.

3.2.1.3. Estabelecimento em canteiros

Foram transferidas para canteiros, 160 plantas pertencentes a oito acessos (20 indivíduos por acesso) de *Trifolium repens*. O local escolhido para o plantio foi uma área disponível no DPFA, UFRGS, junto aos canteiros demonstrativos, realizando-se preparo da área e posteriormente a amostragem e análise de solo (Veja a análise do solo no APÊNDICE 3).

Como a área estava sem uso há bastante tempo, foi necessária a realização de aração (27/09/1995), discagem (09/10/1995) e aplicação de herbicida (11/10/1995). Brometo de Metila foi fumegado, cobrindo-se a área com lonas plásticas, segundo recomendação de Petry (1995, comentário pessoal). Após, a área foi nivelada e os canteiros preparados.

O transplante ocorreu em duas etapas, a primeira em 07/11/1995 (cultivares Yi, Tamar, El Lucero, BR1 Bagé) e a segunda em 21/11/1995 (cultivares Lirepa, Arcadia, NGF Grant, Nora). As plantas transferidas para os canteiros estavam na casa de vegetação, foram desbastadas e dispostas com

espaçamento entre linhas de 1 metro e entre plantas de 0,60 m, segundo recomendação de Paim (1995, comentário pessoal).

3.2.1.4. Manutenção da coleção viva

A partir de 27/10/1995 as plantas, em vaso, receberam adubação foliar mensal no primeiro ano e quinzenal no segundo ano. Empregou-se adubo orgânico foliar (Nutrifolia-Samaritá CRP 9592 - macro e micro elementos), utilizando a dosagem de 4 ml por 1 litro de água. O controle de inços e a adição de solo foram realizados sempre que necessário, semanal ou até mensalmente.

Inicialmente, o controle de insetos e fungos foi realizado com aspersões de óleo mineral e calda de fumo, mas com o aumento da população de plantas e moléstias, estes deixaram de ser eficazes. A partir de 05/09/1995 até o descarte do material em fevereiro de 1997, foram efetuadas aplicações mensais, e até mesmo semanais, de fungicida e/ou inseticidas. As aplicações geralmente eram precedidas de cortes, para diminuir a massa vegetal e facilitar o controle de pragas e doenças. Foram utilizados inseticidas (Malatiol - 3ml/l; Cyhexatin 500 - 0,5 g/l) e fungicida (Kumulus - 4g/l), aplicados com maior frequência na primavera e verão, quando ocorreram as infestações mais sérias de ácaros vermelhos, pulgões e insetos minadores.

Na primavera de 1996 perdeu-se praticamente toda a população de *T. riograndense*. As plantas e o solo foram analisados e, segundo Porto (1996,

comentário pessoal) a morte das plantas ocorreu devido à infestação por *Rhizotonia sp* (Veja a análise do solo no APÊNDICE 4).

As plantas estabelecidas nos canteiros, de maneira geral, não apresentaram problemas sérios de pragas ou doenças. O controle de invasoras foi feito, quinzenal ou mensalmente, através de capinas. As plantas eram molhadas diariamente, durante a primavera/1995 e verão de 1996 e no restante do período sempre que necessário. A manutenção destas plantas foi realizada até outubro de 1996. Na área utilizada para os canteiros ainda persistem materiais procedentes de estolões (reprodução vegetativa) e ressemeadura dos acessos de *T. repens* estabelecido em 1995.

3.2.1.5. Coleta e armazenamento de sementes

Durante o desenvolvimento do presente estudo foi realizada a coleta, processamento, identificação e estocagem das sementes produzidas. As sementes dos materiais da casa de vegetação foram coletadas por vaso (individualizadas) e as sementes das plantas estabelecidas nos canteiros por acesso (em lotes). Todas as sementes coletadas, após o devido processamento, foram estocadas em vidros com identificação e guardadas em geladeira doméstica no DPFA – UFRGS.

3.2.2. Eletroforese de enzimas em géis de poliacrilamida

A eletroforese, para a identificação de isoenzimas, compreende uma seqüência de procedimentos relacionados com o preparo das soluções

tampões das cubas e gel, polimerização do gel, homogeneização e aplicação das amostras, migração eletroforética, revelação, fixação e documentação dos resultados. A separação e nítida visualização das isoenzimas é determinada pelo somatório dos procedimentos envolvidos.

3.2.2.1. Pilotagem e escolha dos sistemas

Para a escolha dos sistemas enzimáticos e metodologias mais apropriadas, foram testadas enzimas indicadas por vários autores devido a seu polimorfismo e por apresentarem definição adequada das bandas (Scandalios, 1969; Weeden & Wendel, 1990; Alfenas *et al.*, 1991).

Foram priorizados os sistemas enzimáticos e procedimentos já testados para o gênero *Trifolium* (Collins *et al.* 1984; Michaelson-Yeates, 1986; Molina-Freaner & Jain, 1992).

Durante a pilotagem foram testados oito sistemas enzimáticos, fosfatase ácida (ACP), álcool desidrogenase (ADH), α e β esterases (EST), isocitrato desidrogenase (IDH), malato desidrogenase (MDH), enzima málica (ME), fosfoglicoisomerases (PGI) e superóxido dismutase (SOD), utilizando diversos procedimentos.

A concentração do gel testada foi de 6% e 8%. Também foram testadas diferentes concentrações das amostras.

Os acessos incluídos na análise de isoenzimas de PGI, MDH, EST e SOD estão listados na TABELA 1.

TABELA 1. Lista dos acessos estabelecidos em casa de vegetação e canteiros do DPFA - UFRGS e que foram incluídos na análise de isoenzimas de PGI, MDH, EST e SOD (1995-1997).

Espécie	Acesso	Origem/Remetente	Fornecedor no Brasil **	Ano
1 <i>T. incarnatum</i>	Imigrantes Italianos	Bagé	EMBRAPA Bagé	---
2	cv. Dixie	Alabama USA	Saibro 95	1994
3	cv. AU Robin	Alabama USA	Saibro 95	1994
4 <i>T. polymorphum</i>	cv. 019	Lages - SC	EMBRAPA Bagé	1994
5 <i>T. pratense</i>	cv. Alpilles	França	EPAGRI Lages - SC(4001)	1976*
6	EEA 1992	EEA - UFRGS	Paim 1995	1992
7	cv. El Sureño	EE Pergamino Argentina	EPAGRI Lages-SC(4585)	1983*
8	cv. E116	Desconhecida	Agronatura	1995
9	Bagé P3	Potreiro 3	EMBRAPA Bagé, RS	1994
10	Renato Kallil	Propriedade Renato Kallil - Bagé	EMBRAPA Bagé, RS	1994
11	Trigolândia	Bagé	EMBRAPA Bagé, RS	94/95
12	cv. Violetta Rup	GNIS - França	EPAGRI Lages - SC (4245)	1977*
13 <i>T. repens</i>	cv. BR1 Bagé	EMBRAPA	Paim 1995	1988
14	cv. El Lucero	EMBRAPA Bagé	EMBRAPA Bagé, RS	93/94
15	cv. Guaíba EEA	EEA - UFRGS	Paim 1995	1989
16	cv. Guaíba S1	EEA - UFRGS	Paim 1995	1992
17	cv. Haifa LP 113648	WS - Austrália	EPAGRI Lages - SC (4733)	1984*
18	cv. Ladino	GTZ - Itália	EPAGRI Lages - SC (4261)	1977*
19	cv. Lirepa	GTZ - Alemanha	EPAGRI Lages - SC (4262)	1977*
20	cv. Nora	GTZ - desconhecida	EPAGRI Lages - SC (4263)	1977*
21	cv. Pitau (C8817)	DSIR Grasslands- N. Z	Paim 1995	---
22	cv. Tamar	África do Sul	EPAGRI Lages - SC (4596)	1983*
23	cv. Zapican	Desconhecida	Agronatura	1995
24 <i>T. Resupinatum</i>	cv. La Yapa -INTA	EE Pergamino Argentina	EPAGRI Lages - SC (4587)	1983*
25	Schifino 1994	Fac. Agronomia - UFRGS	Schifino -Wittmann	1994
26 <i>T. riograndense</i>	C. de C. da Serra	Campos de Cima da Serra - RS	Schifino 1995	91/93
27	Lages	Lages - SC	EPAGRI Lages - SC (4859)	1994*
28	Vacaria	Vacaria - RS Paim 1991	Schifino 1995	1991
29	São Joaquim	São Joaquim - SC	EPAGRI Lages - SC (4572)	1983*
30 <i>T. subterraneum</i>	cv. Larisa	(BFG) Bagé Parcela 67	EMBRAPA Bagé, RS	1985
31	cv. Mount Barker	(BFG) Bagé Parcela 43	EMBRAPA Bagé, RS	1987
32	cv. Seaton Park	(BFG) Bagé Parcela 160	EMBRAPA Bagé, RS	1986
33	cv. Woogenellup	(BFG) Bagé Parcela 29	EMBRAPA Bagé, RS	1990
34 <i>T. vesiculosum</i>	Weber 1995	Fac. Agronomia UFRGS	Weber 1995	1994
35	cv. Yuchi	Desconhecida	CRA	1994
36	cv. Santa Tecla	Bagé	EMBRAPA Bagé, RS	93/94

* Ano em que as sementes foram recebidas pela EPAGRI Lages. Nas demais o ano foi indicado pelo fornecedor.

** Entre parênteses número de identificação para EPAGRI Lages – SC

Foram escolhidos quatro sistemas enzimáticos, malato desidrogenases (MDH), fosfoglicoisomerasas (PGI), α e β esterases (EST) e superóxido dismutases (SOD), que apresentaram bandas nítidas, repetibilidade e maior polimorfismo.

3.2.2.2. Preparo dos géis

Os quatro sistemas enzimáticos foram analisados em géis de poliacrilamida 8%, a migração eletroforética foi horizontal.

O preparo dos géis sempre ocorreu em dois blocos, um constituído por géis para os sistemas MDH e PGI e outro por EST e SOD. Para a análise dos sistemas de MDH e PGI utilizou-se os tampões para cuba e gel de Fildes & Harris (1966) *apud* Weeden & Wendel (1990) com modificações.

- Tampão dos géis para MDH e PGI (Histidina 0,005M, pH 8,0):

L-Histidina anidra 0,776 g

Água destilada até..... 1000 ml

O pH é medido e ajustado em 8,0 com NaOH 1 N

- Tampão das cubas de MDH e PGI (Citrato de sódio 0,41 M, pH 8,0):

Citrato de sódio tribásico di-hidratado.....78,77 g

Água destilada até1000 ml

O pH é ajustado em 8,0 com ácido cítrico 0,41M.

Nos géis para análise de EST e SOD foram utilizados os tampões para cuba e gel de Scandalios (1969), sem modificações.

A solução utilizada nos géis é preparada misturando-se nove partes de Tampão B em uma parte de Tampão A. Nas cubas foi utilizado o Tampão A.

Tampão A (Tampão Borato de Lítio 0,24 M, pH 8,3):

Hidróxido de lítio anidro.....1,20 g
 Ácido bórico anidro.....11,89 g
 Água destilada até1000 ml

Tampão B (Tampão Tris-citrato 0,0595 M, pH 8,3):

Tris hidroximetil-aminometano anidro.....6,297 g
 Ácido cítrico anidro.....1,537 g
 Água destilada até1000 ml

Para preparar a solução estoque para géis de poliacrilamida a 8%, foram diluídos os seguintes componentes em 1 litro de solução tampão:

Acrilamida.....76,00 g
 Bis-acrilamida.....4,00 g
 TEMED.....1,00 ml

Para o preparo de cada gel misturavam-se 75 ml de solução estoque para gel de poliacrilamida a 8 % específica com 0,75 ml de peróxido de amônio (PA 10%), que desencadeia a polimerização por processo químico. A mistura era vertida em uma canaleta de vidro, com dimensões 180 mm x 140 mm X 1 mm, que era fechada com a placa de vidro previamente untada com óleo mineral (Nujol), para evitar a adesão do gel. A polimerização ocorre na ausência de ar e em temperatura ambiente, demorando cerca de 20 minutos. Após, o conjunto era envolvido em plástico, para evitar o ressecamento ou

contaminação, e resfriado a 4°C em geladeira doméstica, ficando estocado no máximo por 72 h até sua utilização.

3.2.2.3. Preparo e aplicação das amostras

O preparo das amostras deve ser muito criterioso, pois dele depende a concentração e integridade das proteínas. O calor e/ou a oxidação das amostras causam a desnaturação das proteínas, modificando a sua mobilidade e atividade enzimática. As amostras devem ser preparadas sobre gelo e podem ser utilizados componentes químicos que reduzam a oxidação e o efeito dos compostos fenólicos presentes nos organismos.

Os compostos fenólicos são descompartimentalizados durante a maceração e, oxidados ou não, podem formar complexos com as proteínas, desativando as enzimas. A utilização de agentes complexantes de compostos fenólicos (Polivinilpirrolidona-PVPL, Albumina de soro bovino-BSA e Cisteína), antioxidantes (DTT e Mercaptoetanol-MTT), estabilizantes osmóticos de enzimas (Glicerol) e mesmo detergentes (Triton-X100), permitem maior estabilidade das proteínas do extrato. Deve-se ter o cuidado com a possibilidade de ocorrerem respostas genótipo específicas a estes compostos. Diversos autores sugerem tipos de soluções para serem adicionadas aos extratos de tecidos vegetais (Weeden & Wendel, 1990; Alfenas *et al.*, 1991).

As amostras foram obtidas a partir de extratos de folhas, coletadas no momento da avaliação, mantidas em vidros numerados dentro de caixa de isopor com gelo. Foram utilizadas somente folhas jovens sadias e que

estivessem, no máximo, iniciando a abertura dos folíolos, coletando-se uma folha por indivíduo e dez indivíduos por acesso.

Através de testes, a quantidade de material verde necessária para obtenção de extrato com concentração adequada à visualização das bandas foi padronizada em 30-40 mg. As porções apicais, cerca de 1/3 da folha, eram picadas com tesoura e colocadas em uma canaleta de vidro contendo 40-50 μ l de solução extratora de Collins *et al.* (1984) modificada. O material era macerado com o auxílio de bastão de vidro com ponta esmerilhada, até que formasse um homogeneizado. Para evitar a desnaturação das proteínas, realizava-se a maceração e aplicação das amostras no gel sobre placa de gelo, com temperatura ambiente controlada.

- Solução extratora, pH 8,0:

Fosfato de sódio dibásico anidro	0,355 g
Ditiotreitol (DTT)	0,075 g
Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)	0,085 g
Tritox-100	1 ml
Água destilada até	50 ml

Antes de iniciar o preparo das amostras, os géis eram deixados prontos para a sua aplicação. O preparo consistia em retirar a placa de vidro, fazer as perfurações com o auxílio de pente de aço (22 dentes) à distância padrão de 2 cm da borda inferior (do lado de maior comprimento), cobrir com plástico filme e colocá-los novamente na geladeira a 4° C.

Para a obtenção das amostras, absorviam-se os extratos individuais em quadrinhos de papéis filtro do tipo Whatman 3 MM (1mm x 4mm). Em cada

gel eram aplicadas 24 amostras, quatro delas correspondiam ao controle. O indivíduo escolhido para ser o controle foi amostrado em todos os géis e pertencia a cv. Ladino de *T. repens*.

Para marcar a linha de frente da migração, foi adicionado azul de bromofenol (0,1% em etanol) nas amostras controles das bordas e aleatoriamente em dois indivíduos do centro.

3.2.2.4. Migração

As pontes eletroforéticas entre o gel e a solução das cubas foram estabelecidas utilizando quadrados de tecidos de algodão (do tipo "Perfex"), molhados na solução das cubas. As pontes catódicas (ligadas ao pólo negativo) eram cuidadosamente posicionadas a 1 cm dos pontos de aplicação no gel e as pontes anódicas (ligadas ao pólo positivo) a 10 cm das primeiras. O conjunto de gel e pontes era coberto com filme plástico para evitar a desidratação do gel.

Os conjuntos gel e cubas correspondentes eram então ligados às fontes de eletroforese e a migração realizada com o controle da tensão, com o objetivo de manter a diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo de, no máximo, 100 Volts, (10 V/cm). Durante a "corrida", a tensão foi medida com voltímetro, em intervalos de 25 a 35 minutos, efetuando-se o ajuste da tensão, sempre que necessário.

A corrida foi realizada dentro de geladeira doméstica com temperatura de 4° C. A migração chegava ao fim quando a porção mais central

da linha de frente, marcada pelo azul de bromofenol (0,1%), atingia a distância de 8 cm da linha de aplicação, o que ocorria em torno de duas a três horas após o início da eletroforese.

3.2.2.5. Coloração e revelação dos géis

Finalizada a migração, preparava-se o gel para receber as soluções de coloração, específicas para cada sistema enzimático.

Os papéis de aplicação das amostras eram retirados com o auxílio de uma pinça, depois com o estilete era cortada uma faixa com 1 cm de largura nas margens superior e inferior do gel.

Os reagentes utilizados na coloração eram previamente pesados e misturados aos respectivos tampões no momento de adicioná-los ao gel. Somente os tampões utilizados nas soluções de coloração eram preparados com, no máximo cinco dias, de antecedência e estocados em geladeira, como os demais tampões do gel e cubas.

Durante a revelação, os géis foram incubados a 37 °C em banho maria e corados segundo as metodologias citadas abaixo.

Buscando a obtenção de melhor resultado foram realizadas algumas modificações nos protocolos originais.

-Coloração para PGI (Vallejos, 1983), modificada:

Frutose-6-P.....	0,080 g (30 units)
β -NADP.....	0,014 g
MTT.....	0,021 g

PMS	0,004 g
Glucose-6 fosfato desidrogenase (NAD)	10 µl (42 units)
Tampão para MDH (0,1M Tris + 0,04 M MgCl ₂ , pH 8,0)	50 ml

Os reagentes eram misturados ao tampão, deixando-se por último o PMS e a Glucose-6 fosfato desidrogenase (NAD), que era adicionada somente no momento de colocar o gel na solução de coloração. O gel ficava em banho-maria durante 45 minutos a uma hora, até a visualização das bandas azuis.

- Coloração para MDH (Weeden & Wendel, 1990), modificada:

DL-Ácido málico	5 ml
β-NAD	0,033 g
MTT	0,0175 g
PMS	0,003 g
Tampão para MDH	50 ml

- Tampão para MDH (0,1M Tris + 0,04 M MgCl₂, pH 8,0):

Tris	6,055 g
MgCl ₂	1,904 g
Água destilada até	500ml

O pH foi ajustado com HCl - 3 N. Misturava-se tudo, na ausência de luz, incubando o gel no escuro durante 30 a 45 min, até que as bandas de cor azul estivessem bem nítidas.

- Ácido málico, pH 8,0:

DL-ácido málico anidro.....	10 g
Água destilada até	100 ml

Primeiro ajustava-se o pH em 8,0 com NaOH 2 N e depois se completava o volume com água destilada.

- Coloração para EST (Scandalios, 1969), modificada:

α -naftil acetato.....0,055 g

β -naftil acetato.....0,045 g

Fast blue BB salt0,060 g

Tampões de coloração C (50 ml) + D (10 ml) + água até 100 ml.

- Tampão C (Fosfato de sódio monobásico 0,2 M, pH 4,3):

Fosfato de sódio monobásico anidro.....6,8995 g

Água destilada até.....250 ml

- Tampão D (Fosfato de sódio dibásico 0,2 M, pH 9,2):

Fosfato de sódio dibásico anidro2,84 g

Água destilada.....100 ml

Primeiro realizava-se a diluição do α e β -naftil acetato em 5 ml de acetona mais 5 ml de água destilada, que junto com *fast blue BB salt* era adicionado à solução tampão sob agitação. Vertia-se parte da mistura na cuba, colocava-se o gel e então o restante da solução. Desta forma, evita-se que o gel cole na cuba ou que fiquem bolhas de ar. A cuba era tapada e colocada no banho-maria até o aparecimento das bandas isoenzimáticas, o que normalmente ocorria entre uma e duas horas, dependendo do material testado.

As bandas correspondentes as isoenzimas α EST apresentaram coloração marrom-acinzentada a preta, enquanto que as isoenzimas com maior afinidade com β EST tiveram coloração vermelha a bordo.

- Coloração para SOD (Harris & Hopkinson, 1976 *apud* González, 1994), modificada:

MTT0,01g
 PMS.....0,01g
 Tampão 0,2 M HCl pH 9,00.....50 ml

- Coloração para SOD (Brewer & Sing, 1970), modificada:

β -NAD.....0,030 g
 NBT.....0,015 g
 PMS.....0,010 g
 Tampão para SOD.....50 ml

- Tampão para SOD, pH 8,2:

Fosfato de sódio dibásico4,425 g
 L-ácido glutâmico.....10,563 g
 Água destilada100 ml

Ajustava-se o pH com NaOH 1 N. Misturava-se os reagentes ao tampão em copo Becker envolvido por papel alumínio para reduzir a ação da luz, adicionava-se a mistura ao gel em cuba isolada da luz, que permanecia no banho-maria durante 20 a 30 minutos. Na segunda etapa da coloração, o gel era exposto à luz fluorescente da mesa de luz e de *spot* colocado à cerca de 20 cm, durante 30 a 50 minutos, até que as bandas, transparentes, fossem visualizadas com nitidez sobre o fundo azul escuro do gel.

3.2.2.6. Fixação e documentação dos géis

Após a revelação, os géis eram enxaguados em água destilada uma vez e fixados durante 15 min em solução de Ayala.

- Solução Fixadora de Ayala:

Álcool metílico450 ml

Ácido acético.....110 ml

Água destilada até.....900 ml

A solução de Ayala era preparada na hora de ser utilizada.

Após a fixação, enxaguavam-se os géis em água destilada três vezes, enrolando-os com filme plástico, para evitar a desidratação excessiva. A identificação foi realizada com etiqueta contendo data, sistema enzimático e numeração correspondente ao protocolo dos géis.

O registro dos géis foi realizado através da marcação cuidadosa dos pontos de aplicação das amostras, das bandas e da linha de frente, em plástico transparente colocado sobre o gel, logo após sua revelação, sobre a mesa de luz. Os géis foram fotografados, envolvidos por plástico filme e estocados em caixas plásticas em geladeira doméstica 4° C.

3.2.3. Medidas e cálculo das migrações relativas das bandas isoenzimáticas

Apesar da distância de migração da linha de frente ter sido padronizada em 8 cm houveram variações, associadas a problemas técnicos que ocorrem durante o processo de eletroforese, como oscilações na tensão da

rede elétrica, diminuição da força iônica dos tampões, contatos desiguais nas pontes eletroforéticas e resfriamento desigual do gel (Alfenas *et al.*, 1991). Estas perdas de potencial no sistema podem ocasionar a migração desigual de uma mesma isoenzima em géis diferentes. Para contornar estes problemas, optou-se por calcular a mobilidade das bandas em relação a uma banda do indivíduo controle, escolhida por apresentar nitidez, identificação segura e com migração intermediária entre o ponto de aplicação e a linha de frente.

Foram analisadas somente as bandas de migração anódica. Com o auxílio de uma régua milimetrada, para cada indivíduo, inicialmente foi medida a distância em milímetros percorrida por cada banda a partir do ponto de aplicação da amostra, bem como a distância migrada pela banda controle.

Primeiro os valores de migração relativa (mr) das bandas foram calculados dividindo-se o valor de migração de cada uma (em mm) pelo valor de migração da banda controle (em mm) do indivíduo controle mais próximo. Desta forma a banda controle tem $mr = 1$.

Foram calculados os valores de migração relativa real (MR) da banda controle, que é dado pelo valor de migração da banda controle (em mm) dividido pelo valor de migração do marcador de linha de frente (em mm). A partir da média destes valores estabelecemos a MR média da banda controle, que foi o índice utilizado para converter e normalizar os valores de migração relativa (mr) de todas as bandas em MR , ou seja, mobilidade em relação à linha de frente.

Esta conversão, como ressalta González (1994), permite a localização de bandas homólogas e a comparação dos resultados obtidos com

os de outros autores, apresentando a desvantagem de subestimar parte da variabilidade intra-específica existente no loco correspondente a banda escolhida como controle.

3.2.4. Medidas de variabilidade genética e análises estatísticas

A comparação entre os acessos foi realizada ao nível de espécie, em cada sistema enzimático e ao nível de sistemas.

Os acessos constituíram as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e a presença (1) ou ausência de bandas (0) foram as variáveis.

A medida de variabilidade utilizada foi o índice de similaridade de Jaccard (J) (Digby & Kempton, 1994).

O índice de similaridade de Jaccard é utilizado para fenótipos não interpretáveis ao nível de locos e alelos. Este índice estima a proporção de bandas isoenzimáticas que são compartilhadas entre as unidades taxonômicas (Alfenas *et al.*, 1991).

O método utilizado para os agrupamentos foi pela média, “Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages – UPMGA. Para o cálculo do índice de similaridade, agrupamentos e construção dos fenogramas, contou-se com o auxílio do programa computacional “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System / NTSYS-PC –(Rohlf, 1989).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Metodologia utilizada em laboratório

A identificação de isoenzimas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida de migração horizontal permite precisão de resultados, desde que sejam escolhidos os sistemas enzimáticos e os procedimentos mais adequados ao material analisado e aos objetivos do estudo (Weeden & Wendel, 1990).

A pilotagem, realizada entre novembro de 1995 e fevereiro de 1996, permitiu a definição de sistemas enzimáticos polimórficos e de procedimentos eficazes para sua detecção. Exceção à enzima málica (ME) que, inicialmente, havia sido selecionada por apresentar bandas nítidas, mas com o decorrer dos testes exibiu reduzido polimorfismo, sendo substituída por fosfoglicoisomerase (PGI), que também havia sido testada durante a pilotagem.

As espécies, de maneira geral, tiveram comportamento muito similar quanto à concentração e estabilidade das isoenzimas nos homogenados, com exceção de *T. pratense*, que apresentou rápida oxidação dos extratos, dificultando a sua análise. O aumento da concentração dos tamponantes, como

antioxidantes e estabilizantes, e a variação nos tipos de tampões de extração não solucionou o problema de oxidação dos extratos nesta espécie, o que terminou impedindo a análise de vários acessos.

Os resultados, no que se referem à nitidez e à constância das bandas isoenzimáticas, foram aprimorados com o transcorrer dos testes em laboratório. Estas melhorias deveram-se ao: aumento na concentração de reagentes das soluções de coloração para esterase (EST), fosfoglicoisomerase (PGI) e malato desidrogenase (MDH); mudança da coloração para superóxido dismutase (SOD); controle permanente da diferença de potencial elétrico através de medidas tomadas sobre o gel durante a migração; manutenção e melhoria da qualidade dos equipamentos disponíveis; familiarização do pesquisador com a rotina experimental.

Através de ajustes nas concentrações dos reagentes para a coloração das enzimas citadas, permitiu-se a melhor visualização de bandas relacionadas as isoenzimas com baixa atividade catalítica, ou com concentração reduzida no homogenado de extração (amostra).

Com a redução do tempo necessário para a coloração das bandas isoenzimáticas, diminuíram as manchas nos géis, melhorando o contraste destes.

Para MDH e PGI foram realizados incrementos graduais na concentração dos reagentes até a obtenção de resultados satisfatórios, o que ocorreu com um aumento de 50 % nas concentrações dos reagentes utilizados na solução de coloração. O pH ficou padronizado em pH = 8,0.

Para futuras análises sugere-se que se realizem novos ajustes nos procedimentos utilizados em laboratório para MDH e PGI, buscando aprimorar a qualidade dos géis e permitir que a identificação das bandas seja mais simples e precisa.

As modificações na solução de coloração para EST incluíram aumento de 50% na concentração dos substratos enzimáticos e a utilização do corante *BB salt* em substituição a *RR salt*, o que permitiu géis mais contrastados, com bandas nítidas e fundo claro.

Entre as colorações, a de SOD sofreu as mudanças mais acentuadas, trocando-se a coloração indicada por Harris & Hopkinson (1976) *apud* González (1994) pela indicada por Brewer & Sing (1970). A primeira foi descartada porque, utilizando-se os mesmos materiais e procedimentos, obtinham-se resultados ora positivos ora negativos, que oscilavam da total ausência de isoenzimas ou bandas que desapareciam durante ou após a coloração. A coloração de Brewer & Sing (1970), em contrapartida, foi mais estável durante e após a coloração.

No decorrer das análises em laboratório, foram observadas oscilações na rede elétrica. Estas afetam a migração isoenzimática de duas formas, através da instabilidade do campo elétrico estabelecido e, principalmente, pela perda de eficiência do equipamento de resfriamento (geladeira). Estes problemas podem causar migrações desiguais de uma mesma isoenzima ou até mesmo a perda de atividade enzimática, devido à desnaturação por aquecimento do gel. As oscilações na rede elétrica foram parcialmente controladas a partir do monitoramento da tensão aplicada sobre o

gel, através da tomada de medidas, da diferença do potencial elétrico, diretas sobre o gel com a utilização de multímetro e pela disponibilidade de equipamentos novos e mais adequados.

4.2. Análise das bandas e tratamento dos dados

As espécies e respectivos acessos foram polimórficos para os sistemas isoenzimáticos analisados (TABELA 2).

A análise dos sistemas enzimáticos foi realizada com base nas MR médias obtidas para cada acesso. Desta maneira, são apresentadas isoenzimas observadas em cada acesso e não os padrões isoenzimáticos individuais.

Durante a escolha da metodologia para a análise estatística dos dados, foram testadas diferentes medidas de similaridade (Distância Euclidiana, *Simple Matching* e Índice de Jaccard). Os grupos formados na análise de agrupamentos foram mais consistentes e representativos dos padrões isoenzimáticos observados quando se utilizou como medida de similaridade o índice de Jaccard (J).

Primeiro são descritos os padrões isoenzimáticos obtidos para as oito espécies e seus respectivos acessos, enquanto que as frequências de ocorrência das isoenzimas nos acessos foram indicadas em tabelas.

A ordenação dos locos iniciou pela região mais anódica do gel.

TABELA 2 – Variabilidade isoenzimática detectada em oito espécies de *Trifolium*.

Espécies/ acessos	Sistemas Enzimáticos											
	PGI (34a-16i)			MDH (36a-23i)			EST (36a-64i)			SOD (32a-46i)		
	LS	BA	AS	LS	BA	AS	LS	BA	AS	LS	BA	AS
1. INC AU Robin	3	3	3	3	3	3	5	7	7	6	12	11
2. INC Dixie	3	3	3	3	3	3	5	6	6	6	13	11
3. INC Imigr. Italianos	3	4	4	3	4	4/3	6	12	12/10	6	13	11
4. POL CV 019	2	5	4	3	5	5/4	4	7	5	2	2	2
5. PRA Alpilles	2	4	3	3	4	4	4	7	7	---	---	---
6. PRA EEA 1992	2	4	3	3	4	4	6	11	11	4	6	6
7. PRA E116	---	---	---	3	3	3	5	9	9	---	---	---
8. PRA El Sureño	2	3	3	3	3	3	5	10	10	4	6	6
9. PRA Bagé P3	2	5	4	3	4	4	5	10	10	4	5	5
10. PRA Renato Kallil	2	5	4	3	3	3	4	7	7	4	5	5
11. PRA Trigolândia	---	---	---	3	4	4	5	8	8	3	3	3
12. PRA Violeta Rup	2	3	3	3	3	3	4	5	5	---	---	---
13. REP BR1 Bagé	2	4	4	3	8	8	5	9	9	4	4	4
14. REP El Lucero	2	3	3	3	7	7	6	12	12	5	5	5
15. REP Guaíba EEA	2	4	4	3	8	8	6	13	13	7	8	8
16. REP Guaíba S1	2	5	4	3	8	8	6	12	12	7	9	9
17. REP Haifa	2	4	3	3	7	7	5	8	8	7	10	10
18. REP Ladino	2	4	3	3	7	7	5	11	11	7	10	10
19. REP Lirepa	2	4	4	3	6	6	5	11	11	7	8	8
20. REP Nora	2	4	4	3	4	4	4	9	9	7	9	9
21. REP Pitau	2	4	3	3	6	6	6	11	11	7	9	9
22. REP Tamar	2	2	2	3	7	7	5	8	8	---	---	---
23. REP Zapican	2	5	4	3	7	7	5	10	10	7	8	8
24. RES La Yapa	2	4	4	3	3	3	5	8	7	5	9	7
25. RES Schifino 1994	2	4	4	3	3	3	5	10	9	5	8	6
26. RIO C.Cima Serra	2	4	3	3	4	4	5	8	8	6	9	8
27. RIO Lages	2	5	4	3	3	3	5	6	6	2	3	3
28. RIO Vacaria	2	3	3	3	3	3	4	6	6	2	2	2
29. RIO São Joaquim	2	3	3	3	3	3	4	6	6	2	2	2
30. SUB Larisa	2	4	3	3	5	5	5	8	8	7	9	9
31. SUB Mont Barker	2	5	4	3	7	7	5	8	8	7	9	9
32. SUB Seaton Park	2	4	3	3	6	6	5	7	7	7	10	10
33. SUB Woogenellup	2	4	3	3	4	4	5	8	8	7	9	9
34. VES Santa Tecla	2	4	3	3	5	4	5	8	8	7	8	8
35. VES Weber 1994	2	2	2	3	5	4	5	9	9	7	8	8
36. VES Yuchi	2	3	2	3	5	4	5	8	8	7	8	8

Abreviações: a = acessos; i = isoenzimas; **LS** = locos sugeridos; **BA** = bandas Analisadas; **AS** = alelos sugeridos; **INC** = *T. incarnatum*; **POL** = *T. polymorphum*; **PRA** = *T. pratense*; **REP** = *T. repens*; **RES** = *T. resupinatum*; **RIO** = *T. riograndense*; **SUB** = *T. subterraneum*; **VES** = *T. vesiculosum*

Em seguida são apresentadas as análises de agrupamento ao nível intra-específico, para cada sistemas enzimáticos (PGI, MDH, EST, SOD), e os resultados das análises inter-específicas, ao nível de cada sistema e da análise global, que reuniu 120 isoenzimas dos quatro sistemas.

4.2.1. Fosfoglicoisomerase (PGI - E. C. 5.3.1.9)

PGI demonstrou ser uma enzima bastante suscetível ao aquecimento, perdendo a atividade catalítica com pequenas elevações da temperatura, aparentemente causadas por resfriamento não uniforme dos géis.

O aumento na concentração da solução de coloração para revelação de PGI proporcionou melhor visualização das bandas, mas não foi o suficiente para que estas estivessem totalmente nítidas o que, associado as isoenzimas de PGI que apresentaram migrações muito próximas, dificultou a leitura dos géis.

PGI é uma enzima funcionalmente dimérica, com formas que ocorrem no citosol e/ou plástideos (Weeden & Wendel, 1990). Como o presente estudo utilizou a coloração para PGI de Vallejos (1983), as formas detectadas são de isoenzimas PGI NADP dependentes. A reação que ocorre nestes casos, segundo Vallejos (1983), é representada por:



Nos 34 acessos analisados detectaram-se 16 bandas com coloração azulada e relacionadas ao sistema PGI (FIGURAS 9a e 9b).

FIGURA 9a. Gel para avaliação de isoenzimas de PGI, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 6 e 17 do indivíduo controle (*T. repens* cv. Ladino) as demais amostras são indivíduos da cv. Yuchi de *T. vesiculosum*, onde são observadas as bandas MR-0.28, MR-0.25 e MR-0.22.

FIGURA 9b. Gel para avaliação de isoenzimas de PGI, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 8, 17 e 24 do indivíduo controle (*T. repens* cv. Ladino) as demais amostras são indivíduos do acesso Weber 1995 de *T. vesiculosum*, onde podem ser vistas as bandas MR-0.30 e MR-0.22

O número total de bandas por espécie variou entre quatro e nove, em *T. incarnatum* (cinco bandas), *T. polymorphum* (cinco), *T. pratense* (nove), *T. repens* (nove), *T. resupinatum* (quatro), *T. riograndense* (sete), *T. subterraneum* (cinco) e *T. vesiculosum* (cinco) (FIGURA 10).

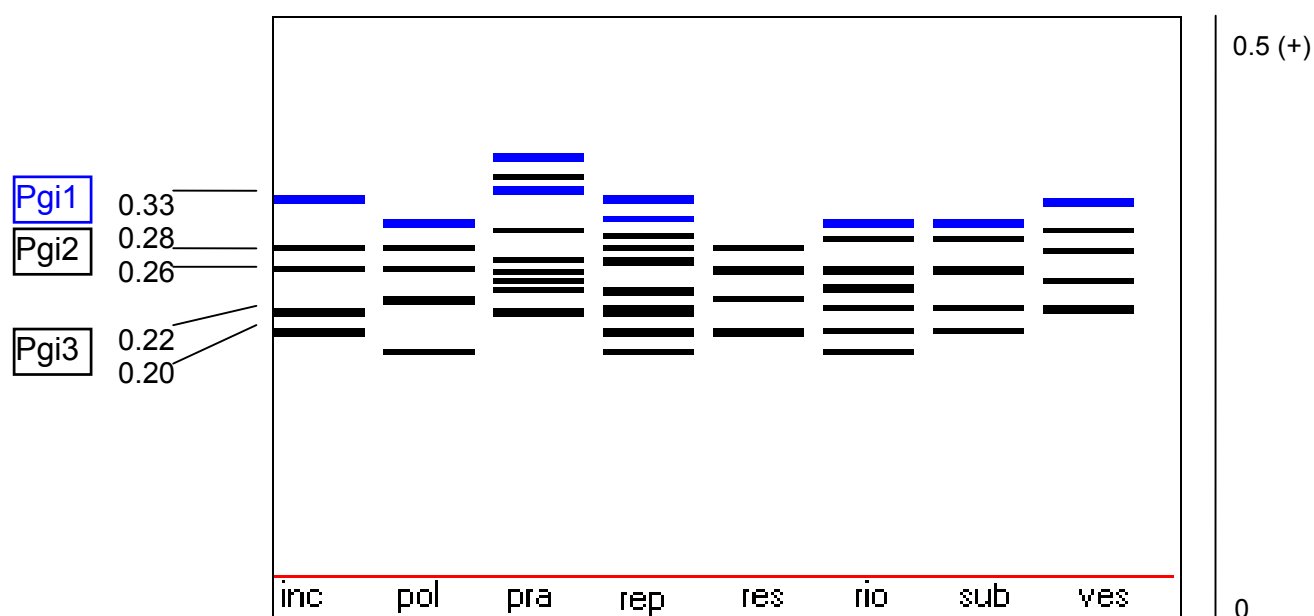


FIGURA 10. Padrões de PGI para as oito espécies do gênero *Trifolium* analisadas

Na maioria das espécies, PGI apresentou isoenzimas, possivelmente, relacionadas a dois ou três locos. O loco Pgi1, aparentemente, condicionando as isoenzimas com migração mais anódicas e apresentando o menor polimorfismo (no máximo duas isoenzimas por espécie), concordando com o descrito para vários gêneros (Gottlieb & Weeden, 1981; Weeden & Wendel, 1990) e para todas as espécies do gênero *Trifolium* que se tem

referência, como *T. hirtum* (Molina-Freaner & Jain, 1992), *T. repens* (Kennedy *et al.* 1985; Michaelson-Yeates, 1986) e *T. subterraneum* (Collins *et al.*, 1984).

O loco Pgi1, em vários gêneros é responsável por isoenzimas de PGI do cloroplasto e que tem migração mais anódica que as formas do citosol (Gottlieb & Weeden, 1981; Weeden & Wendel, 1990). Entretanto, isso não é uma regra, pois em *Phaseolus vulgaris* e em alguns licopódios ocorre o oposto (Weeden & Wendel, 1990).

No presente estudo, as isoenzimas aparentemente codificadas por alelos do loco Pgi1 estão presentes em praticamente todos os acessos e sua ausência, em alguns casos, poderia estar relacionada a problemas de revelação e/ou baixa concentração das isoenzimas no homogenado.

As bandas condicionadas pelo loco Pgi1 sempre se apresentaram mais difusas, tendo sido representadas em cor azul (FIGURAS 10 a 18). O loco Pgi2 foi polimórfico, variando o número de isoenzimas relacionadas a este loco. Algumas espécies ainda apresentaram isoenzimas que poderiam ser codificadas por alelos de um terceiro loco, denominado Pgi3.

Segundo Gottlieb & Weeden (1981) o loco Pgi2 geralmente apresenta maior polimorfismo, estando relacionado as isoenzimas de PGI do citosol.

Cabe ressaltar que, em alguns casos, não pode ser descartada a possibilidade de sobreposição de bandas, isoenzimas conformacionais ou secundárias ou a não detecção de isoenzimas com concentrações muito baixas nos extratos. A fim de melhorar a definição das bandas de PGI, futuros estudos

poderiam testar outras metodologias para a coloração de PGI ou diferentes concentrações de poliacrilamida no gel.

As isoenzimas de PGI, detectadas, têm suas freqüências de ocorrência indicadas na TABELA 3.

As espécies analisadas, na maioria de seus acessos, distinguiram-se por seus padrões de isoenzimas.

Somente *T. pratense* apresentou isoenzimas espécie-específicas (MR-0.37, MR-0.35 e MR-0.34).

T. incarnatum apresentou cinco bandas isoenzimáticas, três ou quatro por acesso (FIGURA 11). Duas hipóteses foram formuladas para sugerir os locos envolvidos no controle genético das isoenzimas de PGI nesta espécie. Na primeira hipótese é sugerida a existência dois locos: o primeiro seria Pgi1 representado pela isoenzima de migração mais anódica (MR-0.33).

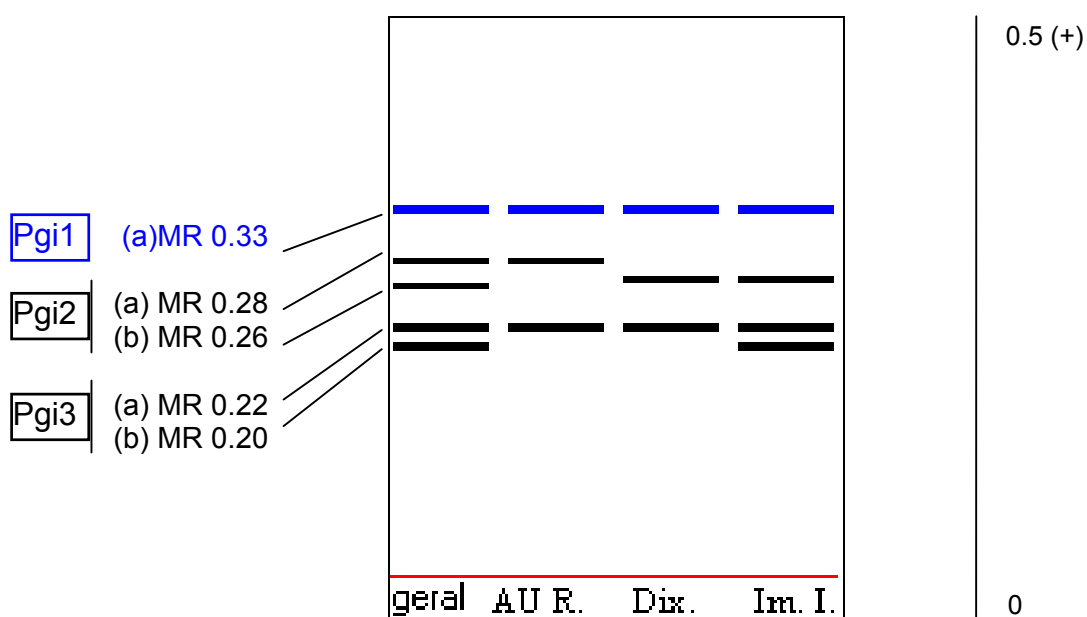


FIGURA 11. Padrões de *Trifolium incarnatum* em PGI

TABELA 3. Listagem das Frequências de ocorrência (f) de 16 isoenzimas de PGI, detectadas em 34 acessos do gênero *Trifolium*, incluídas nas análises intra e inter-específica e global, que reuniu os quatro sistemas enzimáticos.

O segundo loco, Pgi2, estaria relacionado às bandas distribuídas na região menos anódica (MR-0.22 e MR-0.20). As isoenzimas da região de migração intermediária (MR-0.28 e MR-0.26) apresentaram frequência de ocorrência máxima, $f = 0.40$, poderiam ser secundárias ou heteroméricas.

Na segunda hipótese há três locos: o primeiro seria Pgi1, monomórfico, representado pela isoenzima MR-0.33. Os outros dois locos seriam polimórficos com duas aloenzimas cada: Pgi2 (MR-0.28 e MR-0.26) e Pgi3 (MR-0.22 e MR-0.20). Não foram encontrados indivíduos heterozigotos para estes possíveis locos. A banda mais intensa (MR-0.22) esteve presente em todos os indivíduos da espécie, com exceção de dois que, em substituição a esta, apresentaram uma banda com migração mais lenta (MR-0.20). Caso fossem descartadas as bandas isoenzimáticas de migração intermediária, por considerá-las secundárias, e concordando com a primeira hipótese, o resultado teria sido bem diferente, ficando as cultivares AU Robin e Dixie agrupadas com similaridade máxima ($J = 1$), enquanto o acesso Imigrantes Italianos se distingue destas por apresentar no loco Pgi2 uma aloenzima de migração mais lenta (APÊNDICE 5).

T. polymorphum (FIGURA 12) apresentou cinco isoenzimas distintas.

A isoenzima (MR-0.18) também foi observada em *T. riograndense* e *T. repens*, mas com frequências de ocorrência inferiores as de *T. polymorphum* ($f = 0.80$).

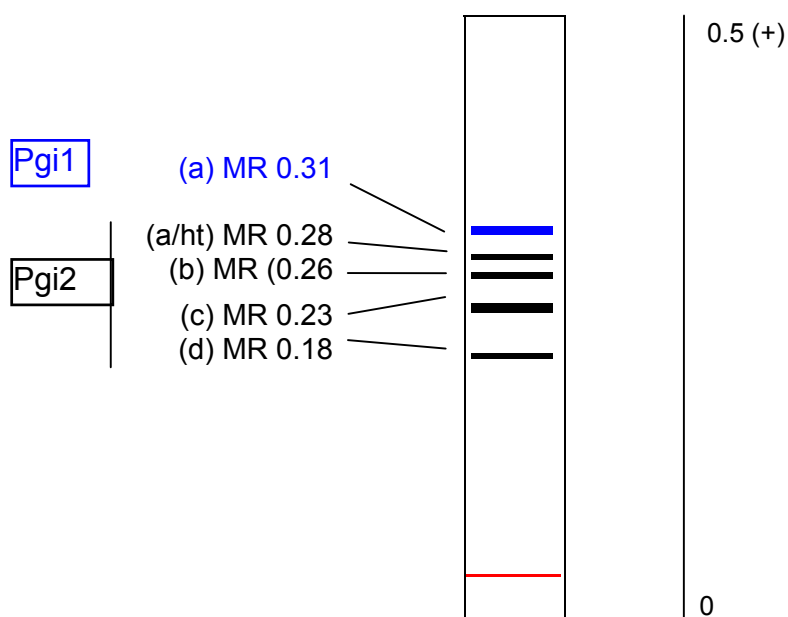


FIGURA12. Padrões de *Trifolium polymorphum* em PGI

Cabe ressaltar que somente um acesso de *T. polymorphum* foi analisado neste e nos outros sistemas enzimáticos. Mesmo assim, optou-se por incluí-la, por ser uma espécie nativa e a respeito da qual não se tem nenhum conhecimento nesta área.

T. pratense (FIGURA 13) apresentou nove isoenzimas (três a cinco por acesso) possivelmente relacionadas a dois locos.

As isoenzimas MR-0.37, MR-0.35 e MR-0.34 só ocorreram nesta espécie e, portanto, são espécie-específicas. As duas primeiras (MR-0.37 e MR-0.35) tiveram presença simultânea enquanto que MR-0.34 ocorreu na ausência destas.

O fenograma (APÊNDICE 5) apresenta dois grupos com similaridade máxima ($J = 1$), o primeiro formado pelos acessos Bagé P3 e Renato Kallil com

cinco isoenzimas em comum, o segundo pelas cultivares El Sureño e Violetta Rup que compartilharam três isoenzimas. O acesso EEA 1992 e a cv. Alpilles ficaram isolados, para $J \geq 0.50$.

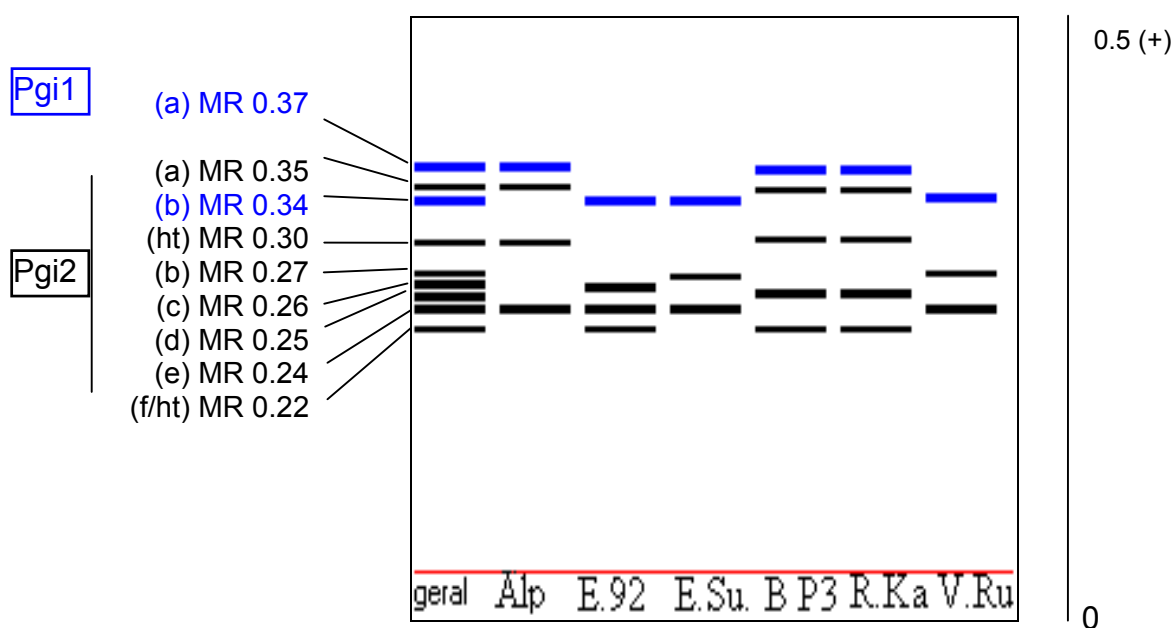


FIGURA 13. Padrões de *Trifolium pratense* em PGI

T. repens teve o maior número de acessos analisados (11). Para a maioria dos acessos e mesmo para os lotes de sementes mais antigas (1977 e 1983), uma repetição da germinação foi suficiente para a obtenção de plântulas saudias.

A diversidade dos materiais, aliada ao nível tetraplóide desta espécie, dificultou a análise dos padrões. Por outro lado, a disponibilidade de informações sobre o controle genético de PGI em *T. repens* possibilitou uma avaliação mais precisa.

O loco Pgi1 é conhecido como o monomórfico e o loco Pgi2 por apresentar polimorfismo, geralmente com quatro a cinco alelos associados (Kennedy *et al.*, 1985; Michaelson-Yeates, 1986; Prins *et al.*, 1989; Sawada & Yamauchi, 1994).

T. repens (FIGURA 14) apresentou nove bandas isoenzimáticas, cada acesso com duas a cinco isoenzimas.

A banda com a coloração mais intensa e que esteve presente em todos os indivíduos foi MR-0.22 certamente é codificada pelo alelo “c” de Pgi2. Corresponde à banda controle que foi utilizada para o cálculo das migrações relativas ($mr = 1$).

O loco Pgi2 é descrito para esta espécie por diversos autores que têm encontrado o alelo “c”, no mínimo em “dose dupla”, ou seja, todos os indivíduos apresentam no mínimo dois “c”, o que explica a maior intensidade da aloenzima codificada por este loco. Como o alelo “c” ocorre em homozigose, em pelo menos um dos conjuntos gênicos, há redução nos padrões de bandas observados.

Os outros alelos têm apresentado frequências de ocorrências que variam nas cultivares. O alelo “b”, geralmente, é o mais comum enquanto que os codificadores das aloenzimas de migração mais rápida (alelo “a”) e de migração mais lenta (alelo “F” ou “e”) têm sido os mais raros (Michaelson-Yeates, 1986; Prins *et al.*, 1989; Sawada & Yamauchi, 1994).

A partir da localização segura da aloenzima MR-0.22, codificada pelo alelo “c” do loco Pgi2, foi facilitada a interpretação dos outros alelos envolvidos na codificação das aloenzimas observadas nos acessos.

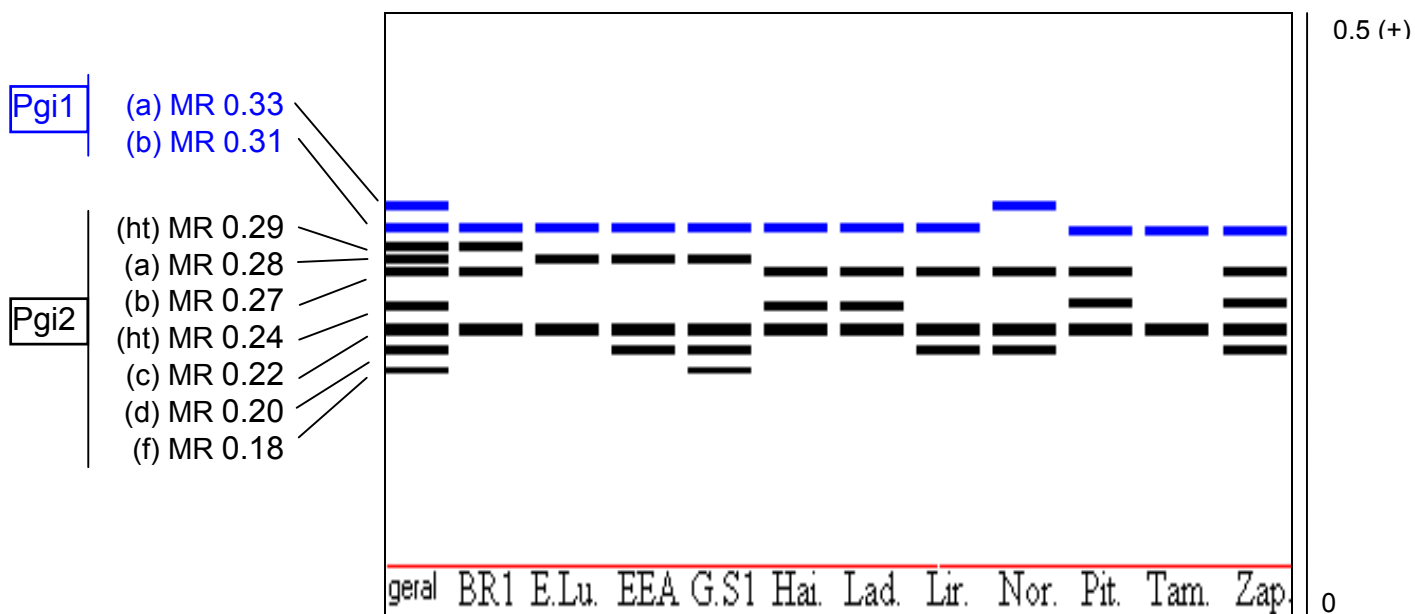


FIGURA 14. Padrões de *Trifolium repens* em PGI

Apenas a cv. Tamar foi, totalmente, homocigota para o alelo “c” do loco Pgi2. No caso das cultivares Haifa, Ladino, Pitau e Zapican fica evidente a manifestação do alelo “b” na forma de uma isoenzima homomérica (MR-0.27) e outra heteromérica (MR-0.24), possivelmente, produto da associação de subunidades codificadas por alelos “b” e “c”. Na cv. Zapican ainda ocorreu uma banda (MR-0.20) com migração mais lenta que a da homomérica MR-0.22.

No caso de *T. repens*, ficou evidente que pode ter ocorrido subestimativa da variabilidade, devido à sobreposição de bandas e à dificuldade de visualizá-las. Alguns autores já descreveram a ocorrência de sobreposição de bandas (Nielsen, 1980) e de mudanças conformacionais relacionadas aos tampões e meios utilizados (Michaelson-Yeates, 1986; Prins *et al.*, 1989).

Na análise de agrupamentos (APÊNDICE 5) houve formação de dois grupos para $J = 0.60$. O primeiro composto pelas cultivares Haifa, Ladino, Pitau, Zapican e Lirepa, sendo que as quatro primeiras compartilharam quatro isoenzimas, MR-0.31, MR-0.27, MR-0.24 e MR-0.22. Destas Haifa, Ladino e Pitau apresentaram similaridade máxima ($J = 1$), visto que tiveram os mesmos padrões isoenzimáticos. O segundo grupo, foi formado entre as cultivares El Lucero, Guaíba EEA, e Guaíba S1 com três isoenzimas em comum (MR-0.31, MR-0.28 e MR-0.22). As cultivares Nora, BR1 Bagé e Tamar ficaram isoladas para $J > 0.60$, pois apresentaram padrões bem distintos. As duas primeiras tiveram isoenzimas acesso-específicas (MR-0.33 e MR-0.29), quando considerada só esta espécie, enquanto que a cv. Tamar apresentou o menor número de isoenzimas, MR-0.31 e MR-0.22.

T. resupinatum (FIGURA 15) apresentou nos dois acessos analisados as mesmas quatro isoenzimas. Se nesta espécie o loco Pgi1 apresenta a isoenzima com a coloração mais fraca e migração mais anódica, como ocorreu nas demais, talvez a isoenzima desse loco não tenha sido detectada.

Considerando-se esta possibilidade, as isoenzimas observadas seriam produto de alelos de dois locos polimórficos, Pgi2 e Pgi3 com a banda de coloração mais intensa.

Os dois acessos apresentaram os mesmos padrões e estão agrupados com similaridade máxima ($J = 1$) (APÊNDICE 5).

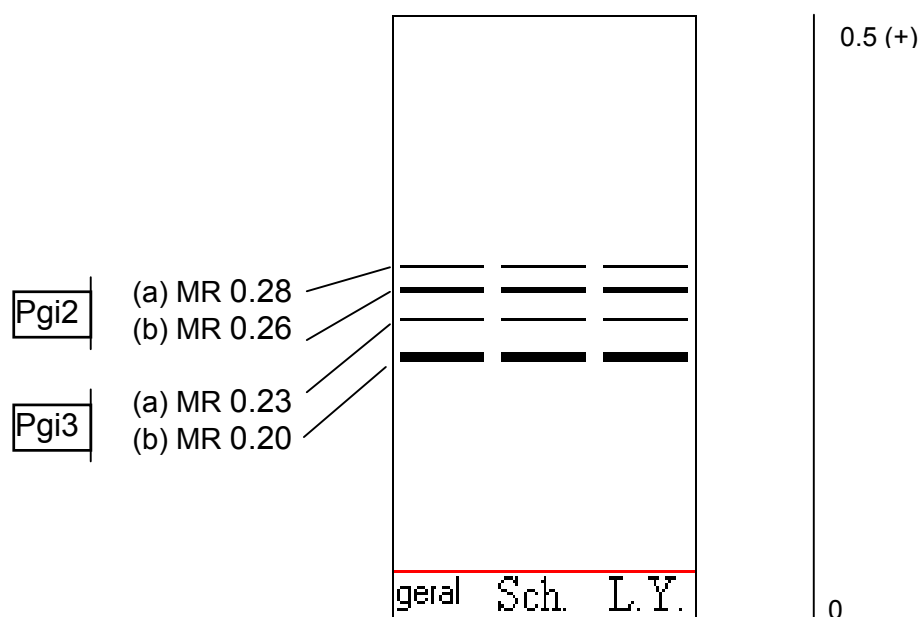


FIGURA 15. Padrões de *Trifolium resupinatum* em PGI

T. riograndense (FIGURA 16) apresentou sete isoenzimas, três a cinco por acesso, que podem estar relacionadas a dois locos, Pgi1 e Pgi2. A aloenzima MR-0.18 foi observada, somente, nas espécies nativas, *T. riograndense* e *T. polymorphum*, e em *T. repens* cv. Guaíba S1, como já foi comentado.

O fenograma (APÊNDICE 5) não apresentou agrupamentos para $J \geq 0.60$. A baixa similaridade intra-específica pode estar refletindo o elevado polimorfismo desta espécie. Para níveis inferiores de similaridade, $J < 0.50$, houve formação de dois grupos: o primeiro constituído por acessos Campos de Cima da Serra e Lages, com três isoenzimas em comum (MR-0.31, MR-0.26 e MR-0.24); no outro grupo, estão os acessos Vacaria e São Joaquim, que compartilharam duas isoenzimas, MR-0.26 e MR-0.18, a primeira presente em todos os acessos.

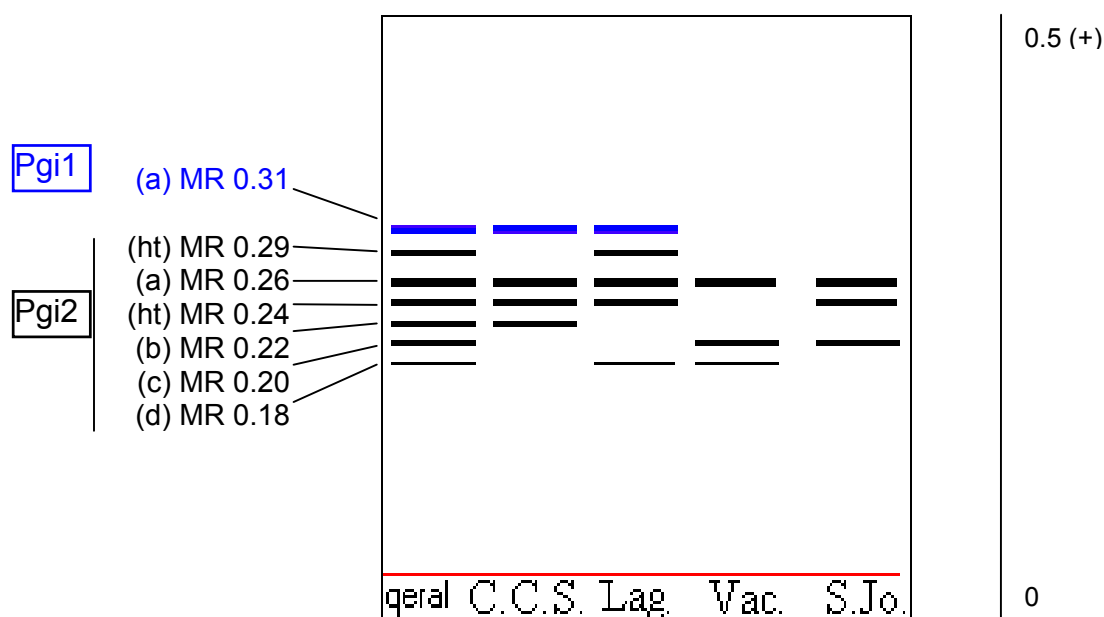


FIGURA 16. Padrões de *Trifolium riograndense* em PGI

T. subterraneum (FIGURA 17) apresentou cinco isoenzimas, quatro a cinco por acesso. Há manifestação de três alelos (“a”, “b” e “c”) do loco Pgi2, concordando com o proposto para esta espécie por Collins *et al.* (1984).

As isoenzimas MR-0.29 e MR-0.26 ocorreram em todos os indivíduos analisados desta espécie.

O fenograma (APÊNDICE 5) apresenta, para $J > 0.60$, o agrupamento de todas as cultivares. As cultivares Larisa, Seaton Park e Woogenellup estão agrupadas com similaridade máxima ($J = 1$) pois apresentaram as mesmas quatro isoenzimas, MR-0.31, MR-0.29, MR-0.26 e MR-0.22. A cv. Mount Barker reúne-se a estas com menor similaridades, pois apresentou mais uma isoenzima com migração mais lenta (MR-0.20).

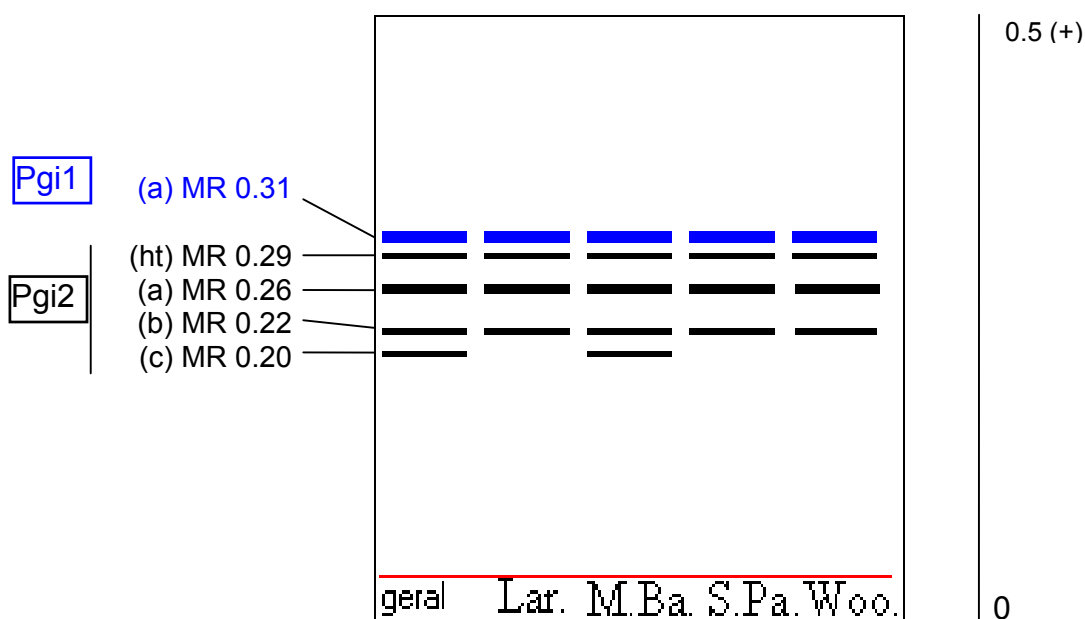


FIGURA 17. Padrões de *Trifolium subterraneum* em PGI

É interessante fazer um paralelo entre os resultados do presente trabalho com os obtidos por Collins *et al.* (1984), que estudando 22 cultivares de *T. subterraneum* encontraram quatro bandas para PGI, distribuídas em três padrões, P1 que ocorreram em 11 cultivares, P2 (oito cvs.) e P3 (três cvs.), todos padrões com duas bandas cada. A banda mais rápida é monomórfica. Nenhuma cultivar apresenta padrão único e não foi observada variabilidade intra-cultivar.

Levando em conta apenas as quatro cultivares analisadas tanto por Collins *et al.* (1984) como pelo presente trabalho, observam-se similaridades, como as cvs. Larisa e Seaton Park que apresentam padrões idênticos em ambos os trabalhos, da mesma forma que a cv. Mount Barker distingue-se das outras três por apresentar uma banda mais lenta. Todas cultivares apresentam uma banda mais rápida monomórfica. As diferenças encontradas entre os trabalhos, que são migrações relativas diferenciadas, o número de bandas total

e por padrão e o número total de padrões, poderiam ser explicadas pelo fato que, mesmo que o presente estudo tenha utilizado o sistema de tampões muito similares ao de Collins *et al.* (1984), os géis utilizados por eles foram de amido a 13%, e no presente trabalho de poliacrilamida 8 %.

T. vesiculosum (FIGURA18) apresentou cinco isoenzimas, duas a quatro por acesso, que parecem relacionadas a dois locos. A isoenzima MR-0.22 esteve presente em todos os indivíduos analisados nesta espécie.

O acesso Weber 1995 e a cv. Yuchi (FIGURA 9a e 9b) apresentaram padrões bem distintos. Como pode ser visto no fenograma (APÊNDICE 5), o acesso Weber 1995 ficou isolado e teve o menor número de isoenzimas (duas), sendo que uma acesso-específica (MR-0.30) e a outra comum a todos os materiais (MR-0.22). As outras cultivares, Santa Tecla e Yuchi agruparam para $J > 0.6$, tendo compartilhado três isoenzimas.

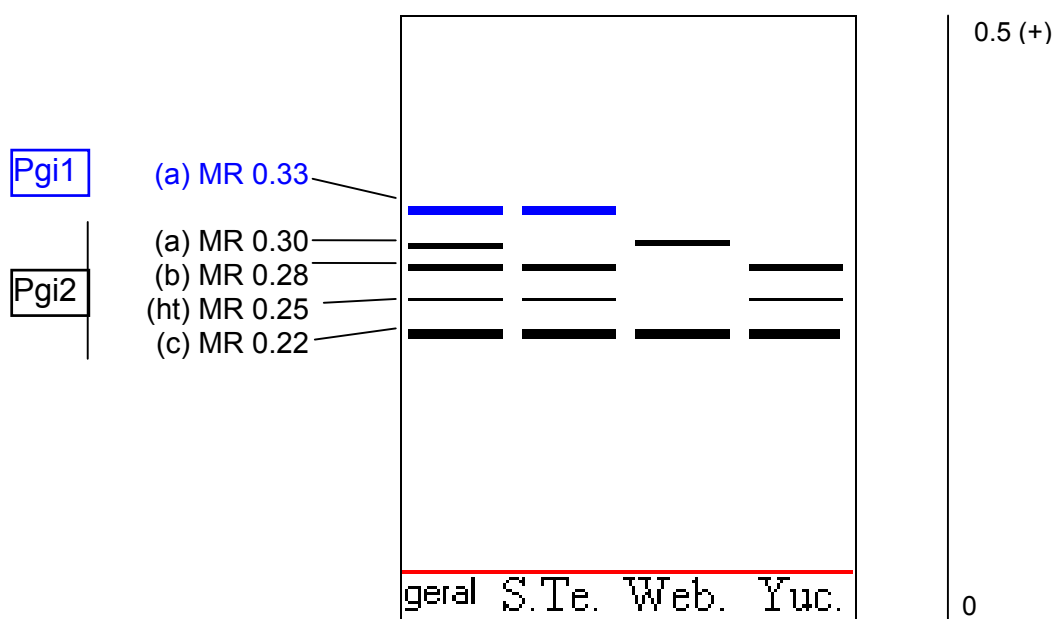


FIGURA 18. Padrões de *Trifolium vesiculosum* em PGI

4.2.2. Malato desidrogenase NAP dependente (MDH – E. C. 1.1.1.37)

Para a melhor compreensão dos resultados obtidos na análise de bandas isoenzimáticas de MDH, é necessário ressaltar algumas das características deste sistema que, reconhecidamente, possibilita a formação de isoenzimas secundárias, conformacionais ou mesmo multiméricas, que podem “mascarar” os zimogramas (Newton, 1983). Outros autores, como Goodman *et al.* (1980), Hedges & Palmer (1992) e Brammer (1993) apontam dificuldades na interpretação das bandas visualizadas nos géis, pois as isoenzimas podem estar sujeitas à ação de locos modificadores e à presença de alelos nulos.

MDH apresenta formas diméricas na maioria das plantas, estando relacionado à oxidação de malato a oxalacetato (Weeden & Wendel, 1990). No presente estudo foram incluídas na análise 23 isoenzimas de MDH das detectadas em 36 acessos. Outras bandas foram descartadas, pois seguramente eram bandas secundárias. Análises complementares seriam necessárias para determinar com mais segurança quais são as aloenzimas e seus respectivos locos, quais as isoenzimas heteroméricas de associação de produtos inter-locos e se houve a inclusão de isoenzimas secundárias ou conformacionais nos padrões descritos.

A maioria das isoenzimas de MDH teve freqüência de ocorrência (f) superior a 50 % (FIGURA 19), (TABELA 4).

TABELA 4. Listagem das frequências de ocorrência de 23 isoenzimas de MDH, detectadas em 36 acessos de *Trifolium*, incluídas nas análises intra e inter-específica de MDH e na análise global.

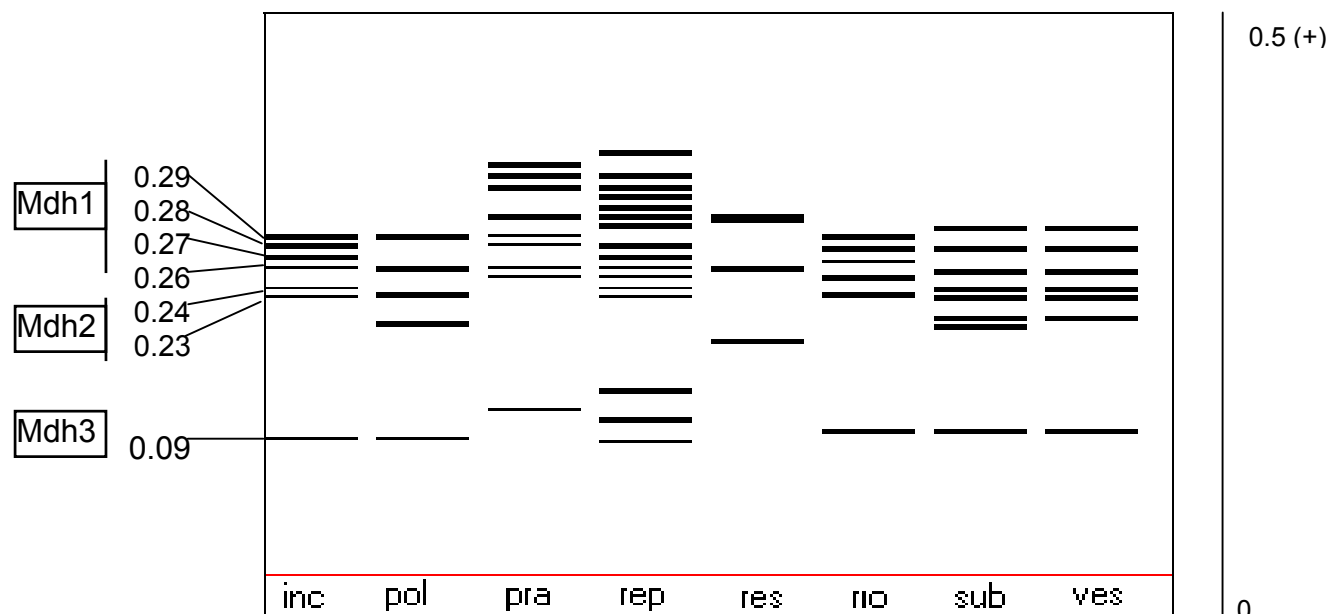


FIGURA 19. Padrões de MDH para as oito espécies de *Trifolium* analisadas

As isoenzimas de MDH, de maneira geral, distribuíram-se em duas regiões. Na região mais anódica, encontrou-se o maior número de bandas e as mais intensas. Estas parecem ser produtos de alelos de um ou dois locos diferentes. Podem estar ocorrendo isoenzimas heteroméricas resultantes de associações entre aloenzimas, ou entre isoenzimas de locos diferentes. Na segunda região, menos anódica, geralmente foi detectada uma isoenzima, que não apresentou variação em sua mobilidade, quando analisados os acessos de uma mesma espécie, sugerindo um loco monomórfico. Somente *T. repens* apresentou três isoenzimas em vez de uma. Estas parecem relacionadas a locos diferentes, sugerindo-se três locos, dois para o caso de estar havendo a formação de uma isoenzima heteromérica (FIGURA 20a e 20b).

Segundo Hock (1973) *apud* (Newton, 1983) e Longo & Scandalios (1968) *apud* Scandalios (1969), as isoenzimas da região mais anódica podem estar associadas às formas de MDH encontradas no citosol e mitocôndria.

Hedges & Palmer (1992) encontraram isoenzimas de migração mais anódica e ausência de formas lentas, analisando MDH mitocondrial em *Glycine max*. As isoenzimas da região menos anódica seriam as compartimentalizadas nos microcorpos (glioxissomos e peroxissomos).

No presente estudo os indivíduos de cada acesso geralmente apresentaram as mesmas bandas. Os 36 acessos das oito espécies apresentaram entre três a 16 isoenzimas (FIGURA 19), *T. incarnatum* (sete), *T. polymorphum* (cinco), *T. pratense* (nove), *T. repens* (16), *T. resupinatum* (três), *T. riograndense* (seis), *T. subterraneum* (oito) e *T. vesiculosum* (sete).

Foi identificada uma isoenzima acesso e espécie-específica (MR-0,37), presente na cv. Bagé BR1 de *T. repens* e outras sete bandas espécie-específicas, ocorrentes em três espécies, *T. repens* (MR-0.33, MR-0.32, MR-0.14 e MR-0.11), *T. pratense* (MR-0.12 e MR-0.36) e *T. resupinatum* (MR-0.19).

T. incarnatum (FIGURA 21) apresentou sete isoenzimas.

Os acessos com três ou quatro bandas cada compartilharam no máximo duas isoenzimas e no mínimo a de migração mais lenta (MR-0.09). As isoenzimas com migração mais rápida e coloração mais intensa (MR-0.29, MR-0.28 e MR-0.27) foram acesso-específicas e tiveram $f = 1.00$.

As cultivares AU Robin e Dixie apresentaram a maior similaridade ($J = 0.40$), compartilhando duas bandas (MR-0.24 e MR-0.09).

FIGURA 20a. Gel para avaliação de isoenzimas de MDH, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 8, 13 e 24 do indivíduo controle (*T. repens* cv. Ladino). As demais amostras são de *T. repens* cultivar Haifa (amostras 2 a 12) e Guaíba S1 (amostras 14 a 23).

FIGURA 20b. Gel para avaliação de isoenzimas de MDH, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 7 e 13 do indivíduo controle (*T. repens* cv. Ladino). As demais amostras são de *T. repens* cv. Zapican. Estas cvs. apresentaram o mesmo padrão de bandas para MDH, podendo ser observadas as bandas MR-0.34, MR-0.31, MR-0.27, MR-0.23, MR-0.14, MR-0.11 e MR-0.09.

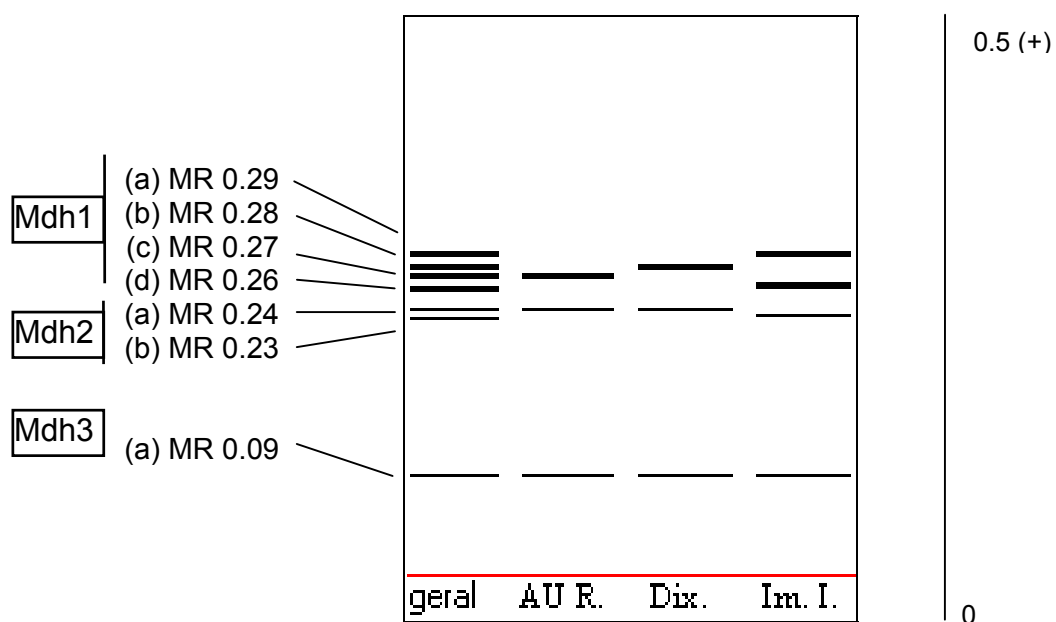


FIGURA 21. Padrões de *Trifolium incarnatum* em MDH

T. polymorphum apresentou cinco bandas (FIGURA 22). Somente uma isoenzima (MR-0.29) teve frequência inferior a 80% ($f = 0.20$).

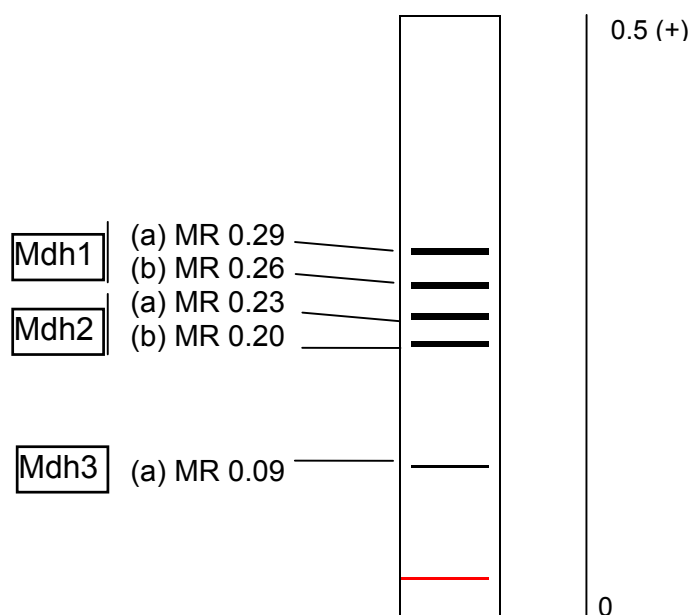


FIGURA 22. Padrões de *Trifolium polymorphum* em MDH

T. pratense (FIGURA 23) totalizou nove isoenzimas que tiveram frequência superior a 70% ($f > 0.70$).

Foram detectadas três ou quatro bandas por acesso. A isoenzima com a migração mais lenta (MR-0.12) ocorreu em todos os acessos e, como MR-0.36, foi espécie-específica.

Na análise de agrupamentos (APÊNDICE 5) as cultivares El Sureño e Violetta Rup, com as mesmas isoenzimas (MR-0.34, MR-0.28 e MR-0.12) apresentaram similaridade máxima ($J = 1$).

O mesmo ocorreu entre os acessos EEA 1992 e Bagé P3, que com duas isoenzimas em comum com o acesso Trigolândia, formaram um grupo, para $J = 0.60$. Os acessos Renato Kallil, e cvs. Alpillés e E116 tiveram baixa similaridade com os demais acessos desta espécie.

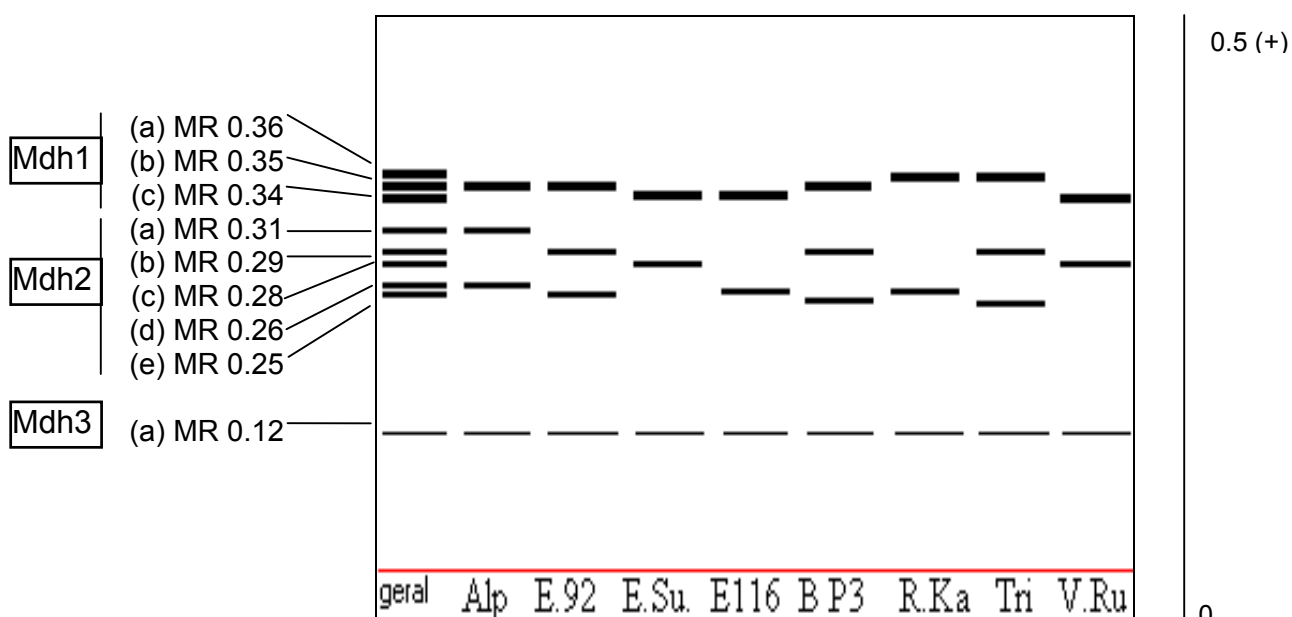


FIGURA 23. Padrões de *Trifolium pratense* em MDH

T. repens apresentou o maior número de isoenzimas (16), quatro a oito por acesso, distribuídas em duas regiões (FIGURA 24).

Na região das migrações mais lentas, foram detectadas três isoenzimas presentes em todos acessos, exceto na cv. Nora que não apresentou a isoenzima de migração mais lenta.

Na região de migração mais anódica, ocorreram 13 isoenzimas, as com as migrações mais rápidas apresentaram a coloração mais intensa, MR-0.37, MR-0.35, MR-0.34, MR-0.33, MR-0.32, MR-0.31 e MR-0.30, sendo que as três primeiras foram raras.

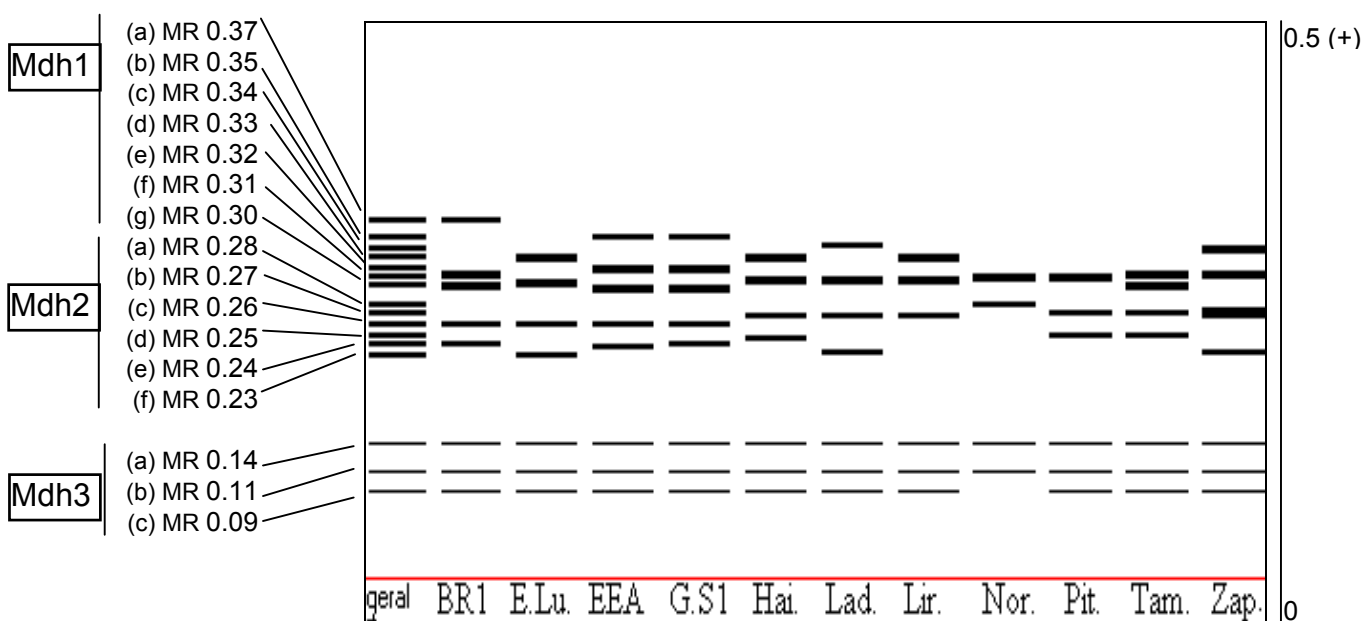


FIGURA 24. Padrões de *Trifolium repens* em MDH

A isoenzima MR-0.31 corresponde à banda controle neste sistema. Foi a mais freqüente, ausente apenas em três cultivares (El Lucero, Guaíba S1 e Guaíba EEA), que apresentaram a MR-0.30 em seu lugar. A segunda isoenzima mais freqüente (MR-0.27) ocorreu em seis dos 11 acessos, enquanto que os outros apresentaram no lugar desta isoenzima a de migração mais lenta (MR-0.26) ou a mais rápida (MR-0.28).

Considerando-se apenas esta espécie, três cultivares tiveram isoenzimas acesso-específicas, a cv. BR1 Bagé (MR-0.37), a cv. Guaíba S1 (MR-0.35 e MR-0.32) e a cv. Nora (MR-0.28).

No fenograma (APÊNDICE 5) os dois acessos da cv. Guaíba S1 (Guaíba S1 e Guaíba EEA) reuniram-se em um grupo com similaridade máxima ($J = 1$), o mesmo ocorreu entre as cultivares Ladino e Zapican, que também compartilharam todas as isoenzimas. Para $J > 0.60$, houve agrupamento entre as cultivares Haifa e Lirepa com Pitau e Tamar, mais similares ao grupo das cultivares Ladino e Zapican. A cv. BR1 Bagé agrupou, para $J \leq 0.60$, com a cv. Guaíba S1 (acessos Guaíba EEA e Guaíba S1). As cultivares El Lucero e Nora ficaram isoladas dos demais.

T. resupinatum (FIGURA 25) apresentou as mesmas três isoenzimas nos dois acessos analisados.

A banda com coloração mais intensa (MR-0.31) ocorreu em todos os indivíduos. A isoenzima com a migração mais lenta (MR-0.19) foi espécie-específica. Como os acessos apresentaram as mesmas isoenzimas, ficaram reunidos para $J = 1.00$ (APÊNDICE 5).

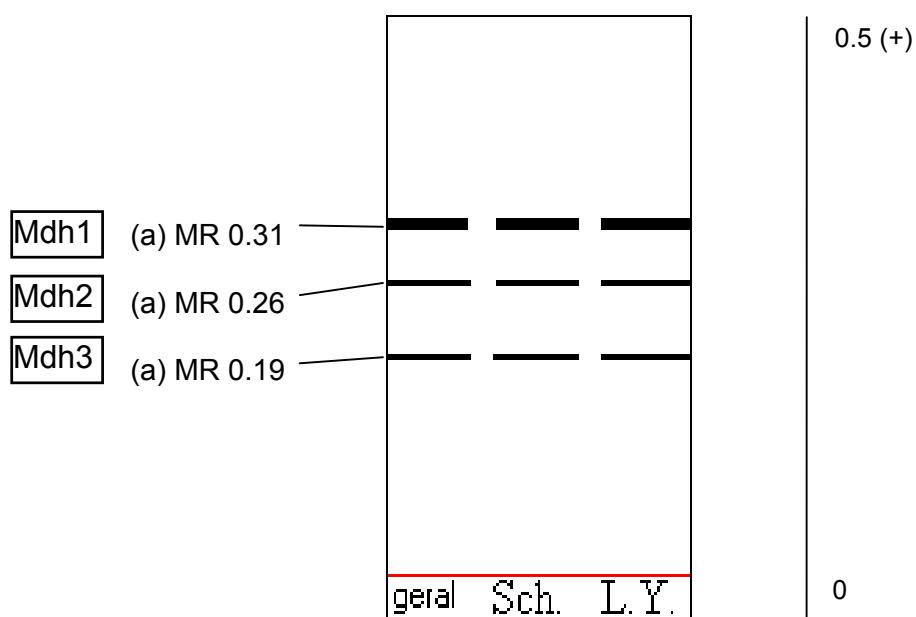


FIGURA 25. Padrões de *Trifolium resupinatum* em MDH

T. riograndense (FIGURA 26) apresentou seis isoenzimas (três a quatro por acesso) distribuídas em duas regiões. A isoenzima com a migração mais lenta ocorreu em todos os acessos, as outras cinco distribuíram-se na região de migração mais rápida, destas apenas a MR-0.28 apresentou $f < 1.00$. Os acessos Lages e São Joaquim, com as mesmas isoenzimas, agruparam-se (APÊNDICE 5) com similaridade máxima ($J = 1$), os acessos Campos de Cima da Serra e Vacaria ficaram isolados dos primeiros e apresentaram similaridade inferior ($J < 0.40$).

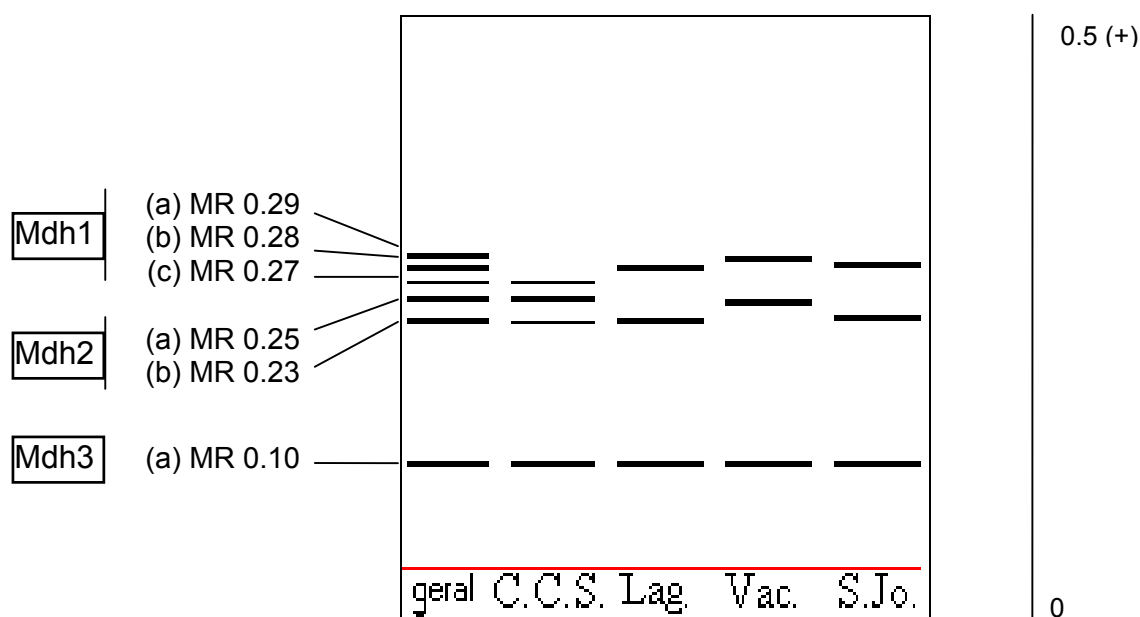


FIGURA 26. Padrões de *Trifolium riograndense* em MDH

T. subterraneum (FIGURA 27) totalizou oito isoenzimas, quatro a sete por acesso. Duas isoenzimas foram compartilhadas por todos os acessos, MR-0.10 e MR-0.28. Também estiveram bem representadas MR-0.24 e MR-0.23, que ocorreram em três acessos cada. As bandas com migração mais rápida apresentaram coloração mais intensa.

No fenograma (APÊNDICE 5) as cultivares Mount Barker e Seaton Park, que compartilharam cinco isoenzimas, apresentaram a maior similaridade, diferindo apenas pela presença de uma isoenzima a mais em Mount Barker (MR-0.26). As cultivares Larisa e Woogenellup ficaram isoladas para $J > 0.60$, apresentando o menor número de isoenzimas e padrões bem diferenciados dos anteriores.

Collins *et al.* (1984) para *T. subterraneum* obtiveram 13 isoenzimas de MDH, três foram monomórficas, inclusive a que apresentou a migração mais

lenta. As 22 cultivares analisadas foram agrupadas em apenas três padrões enzimáticos distintos

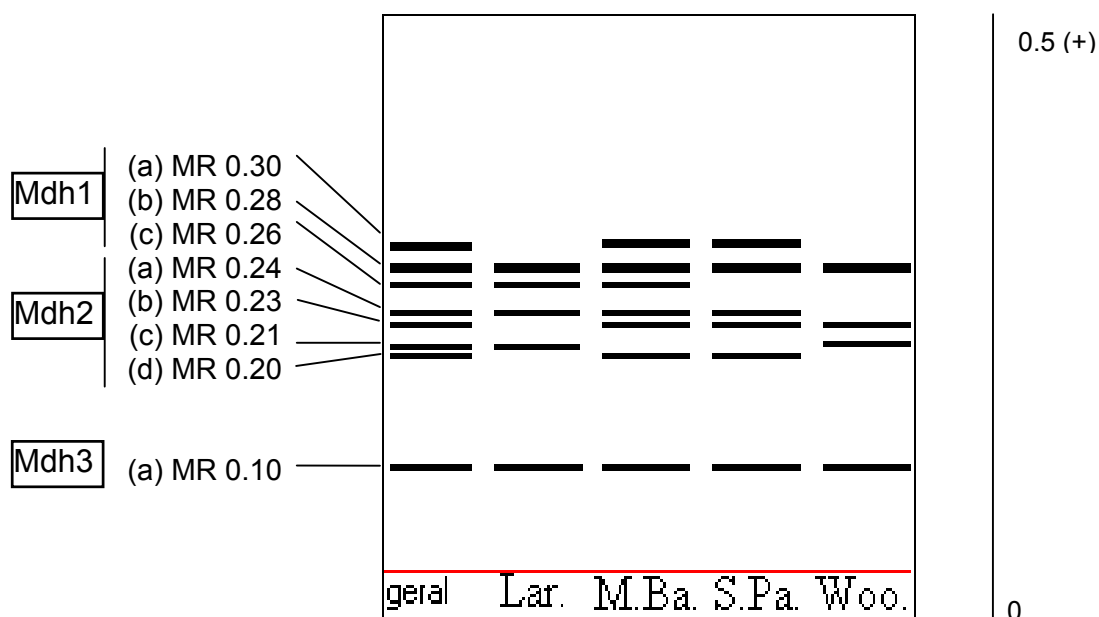


FIGURA 27. Padrões de *Trifolium subterraneum* em MDH

Apenas duas cultivares tiveram padrões únicos, Seaton Park (P1 com dez bandas) e Woogenellup (P3 com seis bandas), as outras 20, entre eles as cvs. Larisa e Mount Barker, apresentaram o mesmo padrão (P2 com oito bandas). Não foi detectada variabilidade intra-cultivar. Segundo os autores, são três os locos responsáveis pelo controle genético das isoenzimas de MDH, os dois primeiros Mdh1 e Mdh2 são polimórficos, com dois alelos cada e isoenzimas na região de migração mais rápida, enquanto que o loco Mdh3 é monomórfico, representado pela isoenzima de migração mais lenta. Apesar de algumas semelhanças entre os resultados obtidos por estes autores e os do

presente estudo, como isoenzimas distribuídas em duas regiões de migração, o polimorfismo dos locos relacionados as isoenzimas com migração mais rápida (Mdh1 e Mdh2), o monomorfismo do loco Mdh3 e o menor número de bandas na cv. Woogenellup. Os resultados de Collins *et al.* (1984) foram obtidos em gel de amido 13% e utilizando tampões diferentes dos aqui empregados.

Em *T. vesiculosum* (FIGURA 28) foram observadas sete isoenzimas. A banda de migração mais lenta e mais outras duas (MR-0.28 e MR-0.26) ocorreram em todos os acessos. No fenograma (APÊNDICE 5) as cultivares Santa Tecla e Yuchi, com as mesmas isoenzimas (MR-0.30, MR-0.28, MR-0.26, MR-0.24 e MR-0.10) ficaram agrupadas para $J = 1$. O acesso Weber 1995 com duas isoenzimas acesso-específicas (MR-0.23 e MR-0.21), apresentou baixa similaridade com os demais acessos ($J < 0.50$), considerando-se apenas esta espécie.

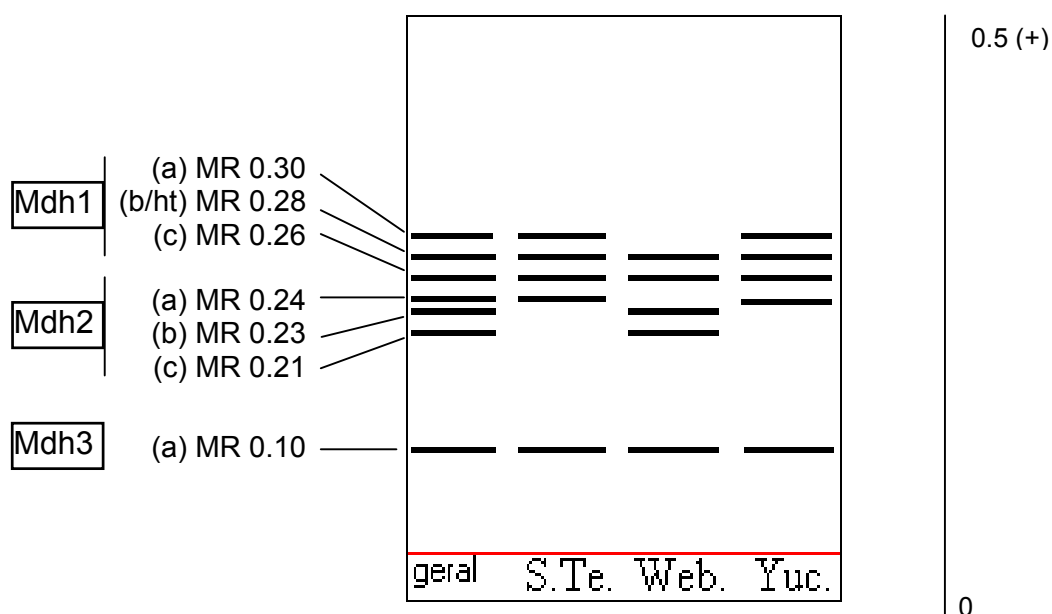


FIGURA 28. Padrões de *Trifolium vesiculosum* em MDH

4.2.3. α e β Esterases (EST; E. C. 3.1.1.)

Os géis para a análise de EST apresentaram os melhores resultados quanto à nitidez das bandas e ao polimorfismo encontrado nos padrões.

Para a revelação das esterases foram utilizados como substratos ésteres naftílicos sintéticos, α e β naftil acetato, e o sal *BB salt*.

Os ésteres naftílicos, quando incubados com um sal diazônico, liberam pela ação da enzima, o naftil das ligações ésteres que se liga ao sal produzindo um corante escuro e insolúvel (Shaw, 1965 *apud* Oliveira, 1976). Desta forma, a revelação permite localização das zonas de atividade enzimática com maior especificidade *in vitro* para estes substratos.

As esterases são um grupo complexo de enzimas com múltiplos substratos de especificidade (Scandalios, 1969). Nas plantas, geralmente, são monoméricas e diméricas (Weeden & Wendel, 1990), com ampla variabilidade genética (Gillespie & Langley, 1974) e uma dos sistemas enzimáticos mais polimórficos em plantas (Weeden & Wendel, 1990).

No presente estudo, as isoenzimas com maior especificidade para o substrato α naftil acetato foram identificadas como as bandas de cor marrom-acinzentada a preta (α EST) e as isoenzimas com maior afinidade ao substrato β naftil acetato foram identificadas como as bandas de cor vermelha clara a bordô (β EST). Ainda foram observadas isoenzimas com especificidade α e β EST e coloração intermediária ($\alpha\beta$ EST), que ocorreram em *T. polymorphum*, *T. riograndense* e *T. subterraneum* (FIGURA 29).

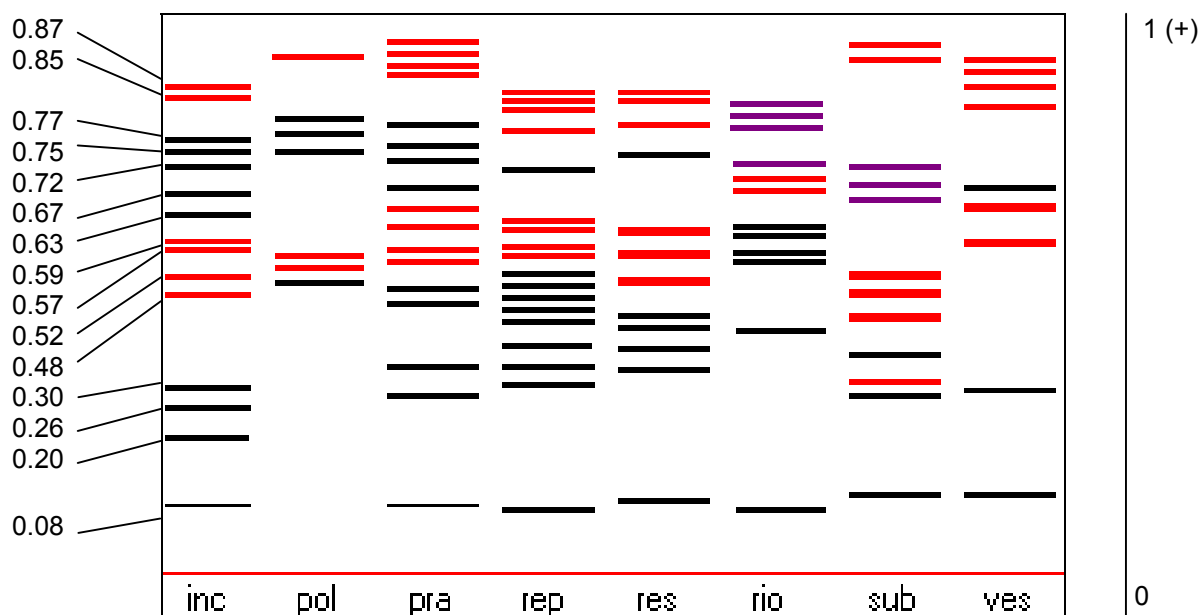


FIGURA 29. Padrões de EST para as oito espécies de *Trifolium* analisadas

As bandas β EST, geralmente, apresentaram maior nitidez. O mesmo foi constatado por Sawada & Yamauchi (1994) que, para a análise de *T. repens* cv. Grasslands Huia, utilizaram a coloração para EST de Weeden & Wendel (1990).

A análise de padrões complexos, com elevado número de bandas e diferentes especificidades, é informativa e útil para a caracterização dos materiais. As isoenzimas com maior especificidade por substratos α ou β naftil acetato, reuniram-se em regiões. A disposição das regiões foi similar nas espécies, as β EST, geralmente, estiveram localizadas na região mais anódica do gel, seguidas de uma região de α EST ou $\alpha\beta$ EST, e de outra região β EST

O número de α e β regiões e de isoenzimas associadas variou com as espécies.

A maioria das bandas α EST se distribuíram nas regiões de migração mais lenta e intermediária

Foi detectada elevada variabilidade isoenzimática dentro e entre os acessos. O número total de isoenzimas por espécie variou entre sete e 18 (TABELA 5), *T. incarnatum* (15 isoenzimas), *T. polymorphum* (7), *T. pratense* (17), *T. repens* (18), *T. resupinatum* (12), *T. riograndense* (12), *T. subterraneum* (12) e *T. vesiculosum* (9).

Nas oito espécies analisadas foram detectadas 64 isoenzimas, levando-se em conta migração relativa (MR) e especificidade distintas, dessas 34 isoenzimas foram α EST, 24 β EST e seis $\alpha\beta$ EST.

Considerando-se apenas as mobilidades diferenciadas (MR) foram identificadas 53 isoenzimas, 24 com maior especificidade α EST, 18 com β EST e duas com α e β EST.

A sugestão dos possíveis locos e alelos, envolvidos na codificação das isoenzimas observadas, foi realizada através da análise dos padrões individuais e detecção constante de certos tipos de padrões.

T. incarnatum apresentou 15 isoenzimas, seis a 12 por acesso, possivelmente, controladas por seis locos, desses quatro com nove isoenzimas com especificidade α EST e dois locos com seis isoenzimas β EST (FIGURA 30).

TABELA 5. Listagem das freqüências de ocorrência (f) de 64 isoenzimas de EST, incluídas nas análises intra-específica deste sistema.

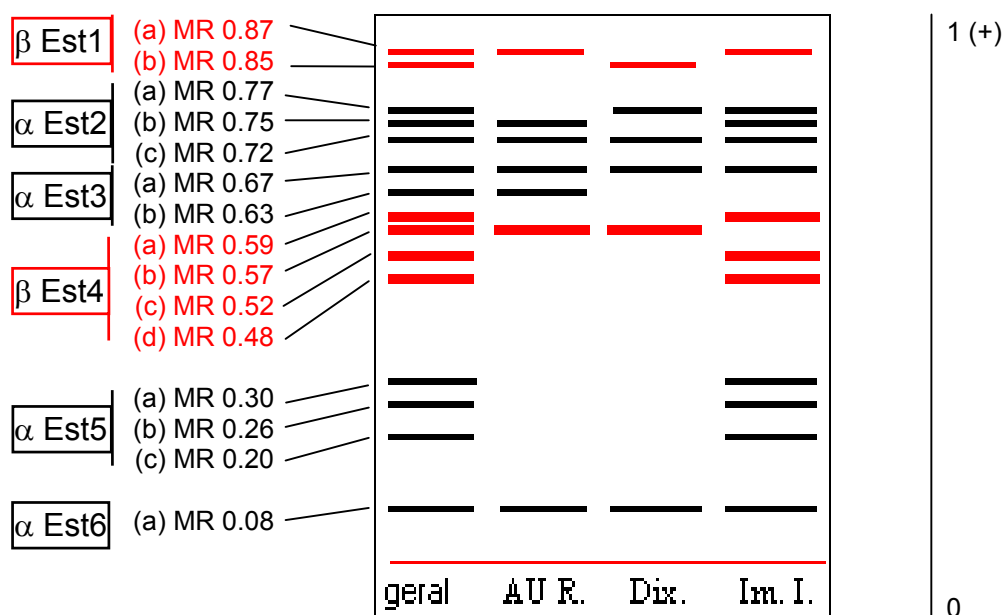


FIGURA 30. Padrões de *Trifolium incarnatum* em EST

As isoenzimas do loco β Est4 (MR-0.52 e MR-0.48) só foram encontradas no acesso Imigrantes Italianos, assim como as isoenzimas do loco α Est5 (MR-0.30, MR-0.26 e MR-0.20) (FIGURA 31).

A isoenzima com menor mobilidade foi a única que ocorreu em todos os indivíduos. As isoenzimas MR-0.67, MR-0.63, MR-0.26 e MR-0.20 foram espécie-específicas.

O fenograma, obtido na análise intra-específica (APÊNDICE 5) reflete a variabilidade dos padrões. Não houve agrupamento para $J > 0.60$. As cultivares AU Robin e Dixie, com o menor número de isoenzimas, sete e seis respectivamente, apresentaram a maior similaridade ($J = 0.44$).

FIGURA 31. Gel para avaliação de isoenzimas de EST, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 8 e 17 do indivíduo controle (*T. repens* cv. Ladino). O acesso Imigrantes Italianos de *Trifolium incarnatum* está representado nas amostras 2 a 12 e a cv. Woogenellup de *T. subterraneum* nas amostras 13 a 23.

T. polymorphum (FIGURA 32) apresentou sete isoenzimas possivelmente controladas por quatro locos, destes dois locos com quatro isoenzimas α EST, os outros com duas β EST. A isoenzimas MR-0.55 ocorreu em todos os indivíduos.

A ocorrência da isoenzima $\alpha\beta$ EST MR-0.53 esteve condicionada à presença simultânea das bandas α EST MR-0.50 e β EST MR-0.55. Assim esta isoenzima seria uma heteromérica, resultado da associação de produtos de locos diferentes.

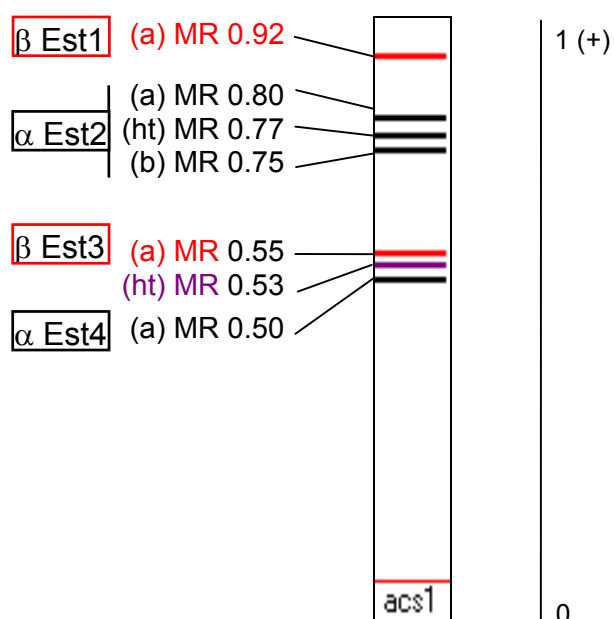


FIGURA32. Padrões de *Trifolium polymorphum* em EST

T. pratense (FIGURA 33) apresentou 17 isoenzimas distintas, cinco a 11 por acesso, destas três ocorreram em todos os acessos (MR-0.73, MR-0.60 e MR-0.08) e sete foram espécie específicas (MR-0.94, MR-0.76, MR-0.60, MR-0.54, MR-0.46, MR-0.34 e MR-0.08).

Foram sugeridos seis locos, quatro deles condicionando nove isoenzimas α EST e dois locos com oito isoenzimas β EST. Nos padrões individuais, as isoenzimas do loco β Est1 ocorreram sozinhas ou no máximo duas a duas, quando apresentaram a mesma intensidade. O segundo loco, α Est2, teve comportamento similar. O loco β Est3 nos padrões individuais sempre apresentou no máximo duas aloenzimas simultaneamente. O quarto estaria representado por duas aloenzimas que ocorreram uma em cada indivíduo.

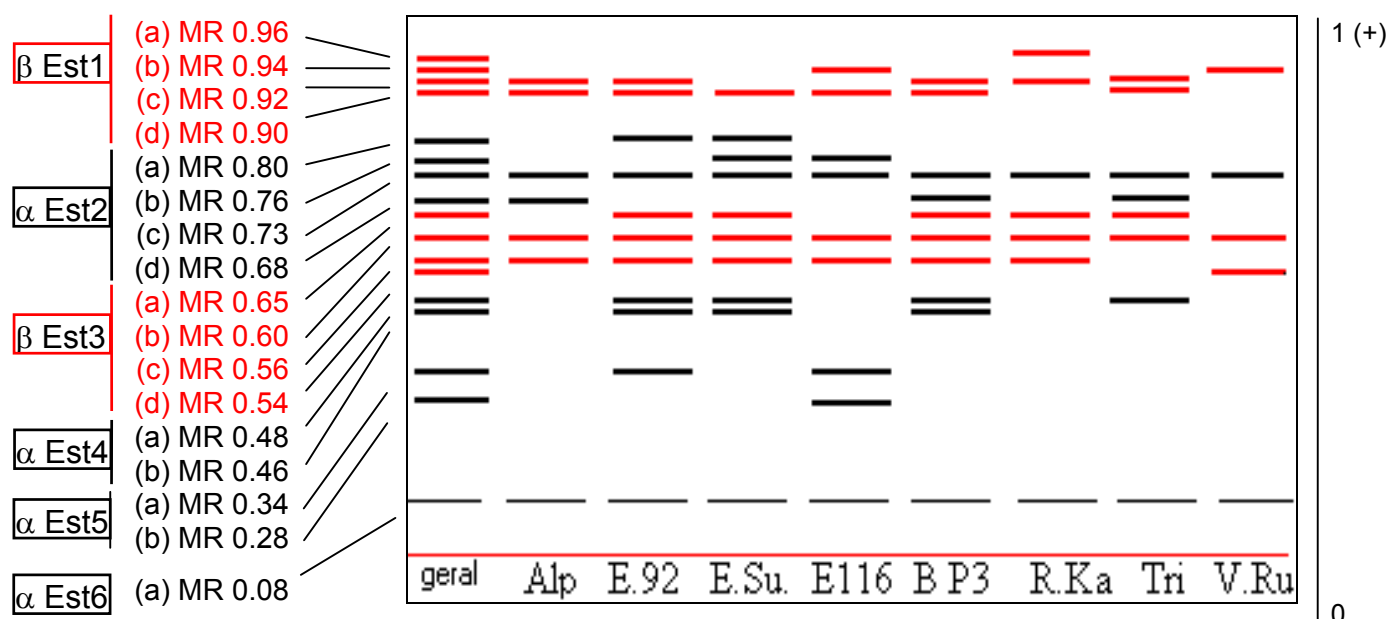


FIGURA 33. Padrões de *Trifolium pratense* em EST

Analisando o fenograma (APÊNDICE 5) e considerando $J > 0.6$, houve a formação de dois grupos, o primeiro constituído por acessos e Bagé P3 e Trigolândia que apresentaram a maior similaridade ($J = 0.80$) e pela cv. Alpillles que se une aos primeiros com menor similaridade. O segundo grupo ficou constituído pela cv. El Sureño e acesso EEA 1992 ($J > 0.70$). Para menor similaridade ($J = 0.5$) somente ficaram isoladas as cultivares E116 e Violetta Rup.

T. repens (FIGURA 34) apresentou o maior número de isoenzimas com 18 no total, de oito a 13 por acesso. Quatro destas foram espécie-específicas (MR-0.62, MR-0.45, MR-0.39 e MR-0.35). Sugere-se que seis locos estejam envolvidos no controle genético, quatro locos relacionados a dez isoenzimas α EST e dois locos a oito isoenzimas β EST.

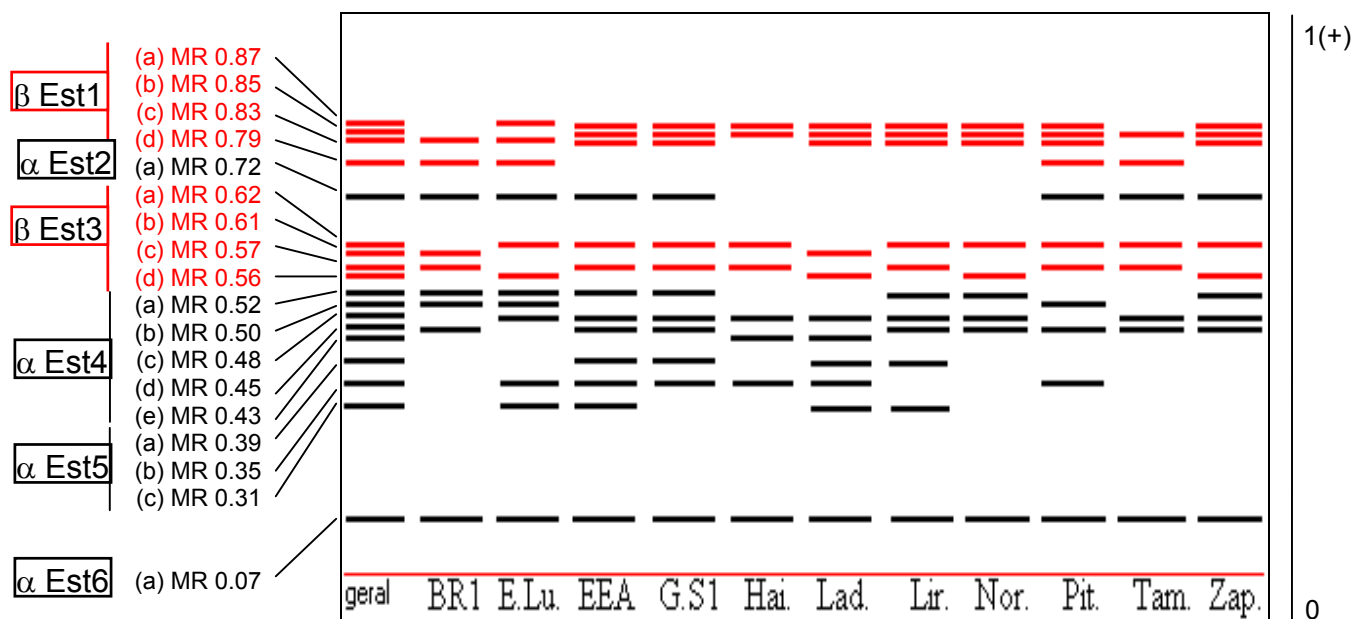


FIGURA 34. Padrões de *Trifolium repens* em EST

A única isoenzima presente em todos os acessos foi a com menor mobilidade (MR-0.07).

Sawada & Yamauchi (1994), analisando as isoesterases presentes em clones *T. repens* cv. Grasslands Huia, observaram sete isoenzimas β EST detectadas em gel de amido. Os autores não incluíram na análise as isoenzimas α EST por não terem apresentado boa definição. A análise dos zimogramas possibilitou a distinção dos clones em 29 padrões fenotípicos.

As isoenzimas de β EST observadas por Sawada & Yamauchi (1994) são similares às detectadas pelo presente estudo, estando relacionadas aos locos β Est1 e β Est3.

No fenograma (APÊNDICE 5) para $J > 0.60$, houve agrupamento dos acessos da cv. Guaíba S1 (Guaíba S1 e Guaíba EEA), que tiveram a maior similaridade observada ($J > 0.90$). À cv. Guaíba S1 unem-se à cv. Lirepa, e as

cultivares Nora e Zapican que foram mais similares entre si do que as demais. Para $J > 0.60$, ficaram isoladas as cultivares BR1 Bagé, El Lucero, Pitau, Tamar, Haifa e Ladino.

T. resupinatum (FIGURA 35) apresentou 12 isoenzimas, oito ou dez por acesso, relacionadas a cinco locos enzimáticos, três deles responsáveis por seis isoenzimas α EST e os outros dois locos por seis isoenzimas β EST. A banda MR-0.83 ocorreu associada à presença de MR-0.85 e MR-0.79 e poderia ser uma heteromérica. As isoenzimas MR-0.37 e MR-0.33 foram espécie-específicas. Diferente dos resultados obtidos para *T. resupinatum* nos outros sistemas enzimáticos, o fenograma de EST (APÊNDICE 5) para $J > 0.6$ não apresentou a formação de grupos, o que certamente está relacionado a seis das 12 isoenzimas terem sido acesso-específicas (MR-0.59, MR-0.50, MR-0.43, MR-0.41, MR-0.37 e MR-0.33).

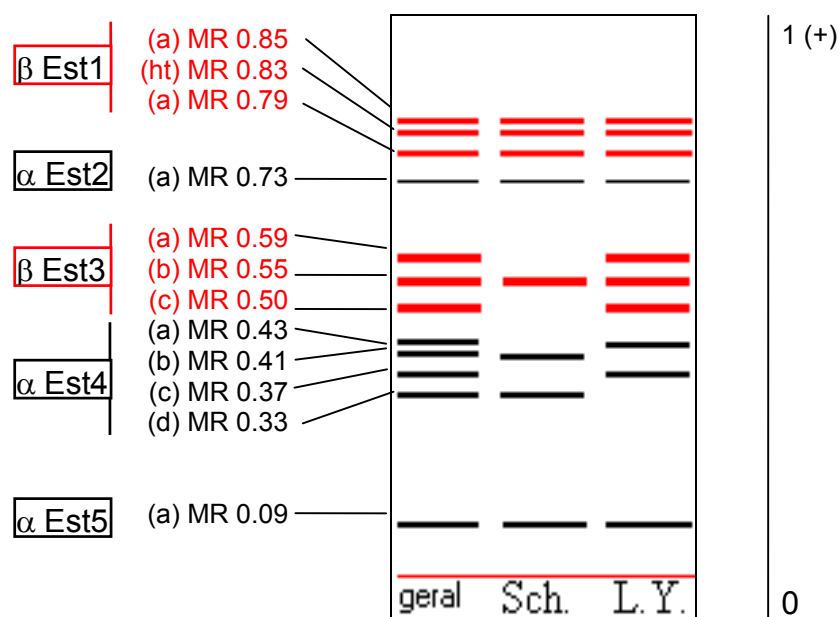


FIGURA 35. Padrões de *Trifolium resupinatum* em EST

T. riograndense (FIGURA 36) apresentou 12 isoenzimas, seis ou oito por acesso. Aparentemente, cinco locos estão envolvidos no controle destas isoenzimas, três locos com seis isoenzimas α EST, um loco com duas isoenzimas com β EST e um loco com quatro isoenzimas $\alpha\beta$ EST.

A isoenzima MR-0.41 ocorreu em todos os acessos.

O fenograma (APÊNDICE 5) não mostrou agrupamentos para $J > 0.60$, confirmando o já reconhecido polimorfismo das populações naturais. A maior similaridade ocorreu entre os acessos Campos de Cima da Serra e Lages.

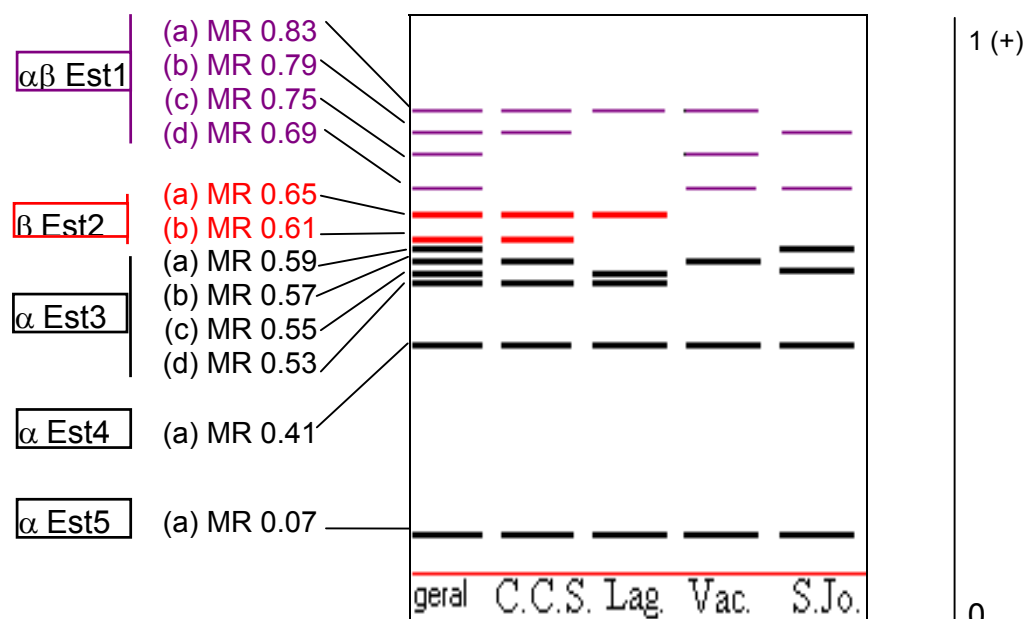


FIGURA 36. Padrões de *Trifolium riograndense* em EST

T. subterraneum (FIGURA 37) apresentou 12 isoenzimas, sete ou oito por acesso.

São sugeridos cinco locos, dois locos α EST com três isoenzimas, dois locos β EST com seis isoenzimas, um loco $\alpha\beta$ EST com seis isoenzimas. Cinco isoenzimas foram espécie-específicas, MR-0.93, MR-0.66, MR-0.51, MR-0.44 e MR-0.36. A banda de migração mais lenta ocorreu em todas as cultivares.

No fenograma (APÊNDICE 5) observa-se a formação de um grupo entre as cultivares Seaton Park e Woogenellup ($J > 0.85$), reunidos à cv. Larisa com menor similaridade. A cv. Mount Barker ficou isolada das demais, para $J > 0.60$, pois apresentou o maior número de isoenzimas acesso-específicas, MR-0.72, MR-0.31 e MR-0.28.

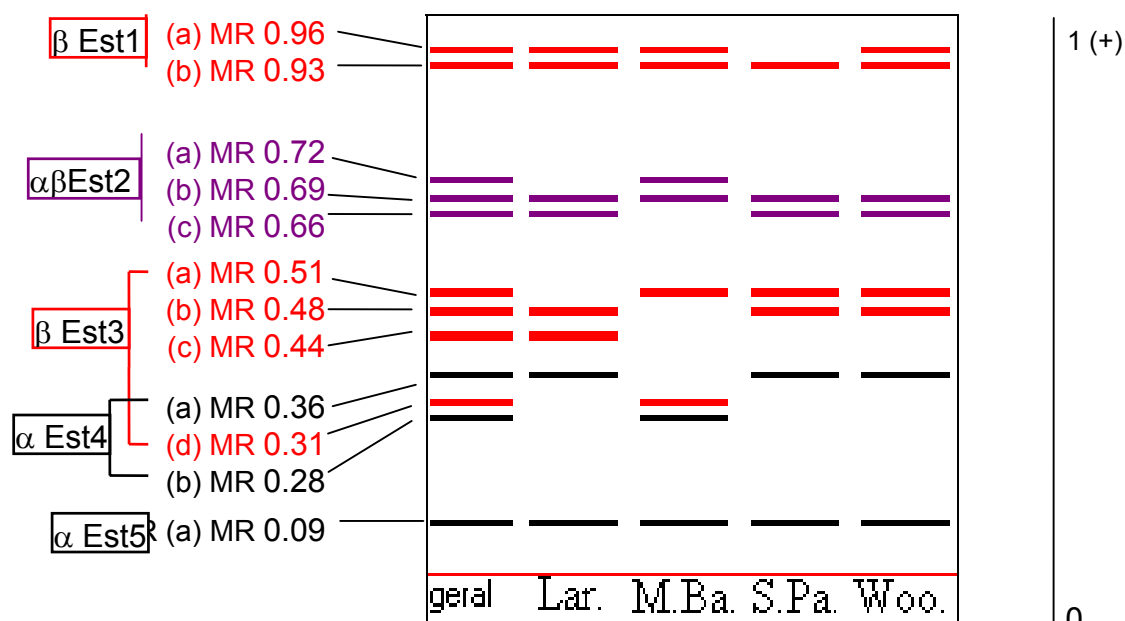


FIGURA 37. Padrões de *Trifolium subterraneum* em EST

Collins *et al.* (1984), analisando arilesterases em *T. subterraneum*, detectaram 17 bandas em 14 padrões enzimáticos. Entre as 22 cultivares estudadas, nove apresentaram padrão cultivar-específico, entre estes as cvs. Seaton Park, Woogenellup, Mount Barker Larisa, analisadas no presente trabalho, que tratou de esterases com especificidades distintas.

T. vesiculosum (FIGURA 38) apresentou nove isoenzimas, oito ou nove por acesso. São sugeridos seis locos, três locos com três isoenzimas α EST e dois com seis isoenzimas β EST. A isoenzima MR-0.65 só ocorreu no acesso Weber 1995 e foi a única que não esteve presente em todos os acessos (FIGURA 39). No fenograma (APÊNDICE 5) os três acessos reuniram-se em um grupo com elevada similaridade ($J > 0.88$).

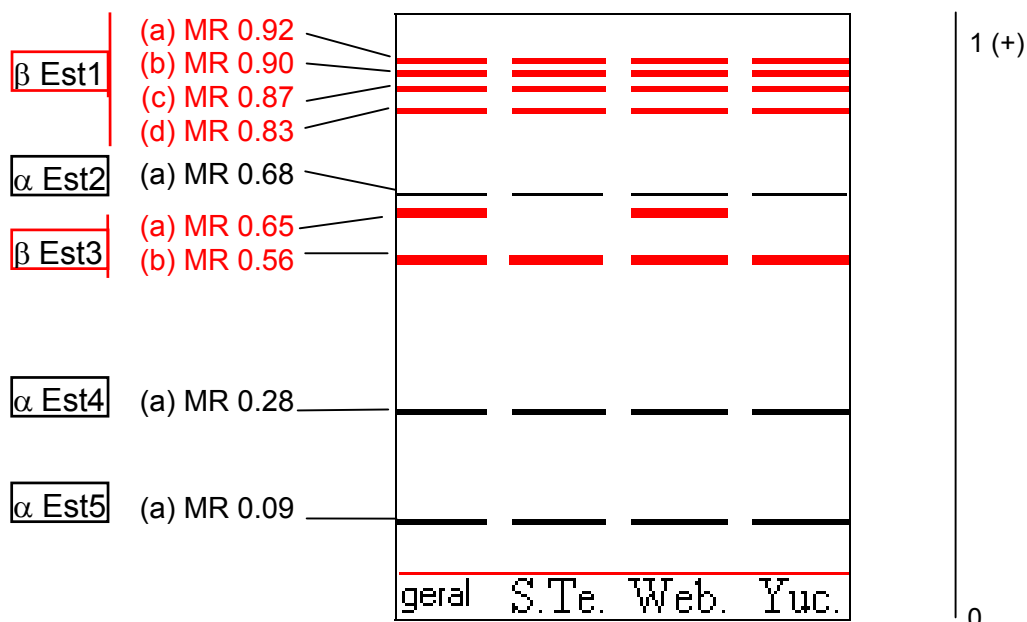


FIGURA 38. Padrões de *Trifolium vesiculosum* em EST

FIGURA 39. Gel para avaliação de isoenzimas de EST, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 6, 17 e 24 do indivíduo controle (*T. repens* cv. Ladino). As demais amostras representam dez indivíduos de *T. vesiculosum* cv. Yuchi, que foram amostrados em dois pontos consecutivos do gel.

4.2.4. Superóxido dismutase (SOD - E. C. 1.15.1.1)

Duas metodologias foram utilizadas para revelação de SOD.

A primeira, indicada por Harris & Hopkinson (1976) *apud* González (1994) e utilizada por González (1994) e Schifino *et al.* (1996), foi aprovada na pilotagem, mas no decorrer das análises apresentou falta de repetibilidade, ora corando satisfatoriamente ora apresentando ausência total de coloração, bandas que desapareciam, manchas brancas em algumas regiões do gel ou mesmo totais. Estes problemas inviabilizavam a leitura das bandas, causando elevado descarte de materiais. Como não foram detectados, exatamente, que fatores geravam as oscilações optou-se por trocar a metodologia durante o processo de análise, visto que os resultados obtidos com a segunda coloração (Brewer & Sing, 1970) foram satisfatórios (FIGURAS 40a e 40b).

FIGURA 40a. Gel para avaliação de isoenzimas de SOD, da direita para a esquerda, as amostras 1, 7 e 13 são do indivíduo controle (*T. repens* cv. Ladino). *T. riograndense* acesso Campos de Cima da Serra está representado nas amostras 2 a 12.

FIGURA 40b. Gel para avaliação de isoenzimas de SOD, da direita para a esquerda as amostras 1, 8, 17 e 24 são do indivíduo controle (*T. repens* cv. Ladino). *T. vesiculosum* está representado pelas amostras 2 a 12 (cv. Yuchi) e amostras 13 a 23 (acesso Weber 1995). Cada acesso teve cinco indivíduos amostrados em dois pontos consecutivos do gel.

Os acessos corados de acordo com Harris & Hopkinson (1976) *apud* González (1994) e incluídos foram *T. polymorphum*, *T. pratense* (Alpilles, E116, Trigolândia, Violetta Rup), *T. repens* (BR1 Bagé) e *T. riograndense* (Lages, Vacaria e São Joaquim). Todos estes acessos apresentaram menor número de bandas que os corados segundo Brewer & Sing (1970).

Para a interpretação de zimogramas, é necessário dispor de informações sobre a estrutura e o controle genético da enzima em questão. É importante ressaltar a existência comprovada de isoenzimas de SOD em compartimentos subcelulares específicos e que distintas formas isoenzimáticas podem ser ativadas nos estágios de desenvolvimento das plantas. Assim, ao analisar os resultados, deve-se ter presente que alguns fatores podem estar envolvidos, como ocorrência de isoenzimas conformacionais produzidas pela associação de isoenzimas codificadas por locos diferentes, plantas em diferentes estágios de desenvolvimento e com regulação gênica diferenciada quando comparadas espécies diferentes, regulação gênica associada a condições de estresse por altas temperaturas ou a efeitos de inseticidas e até mesmo ao ataque de patógenos.

Não estando disponíveis informações sobre isoenzimas de SOD no gênero *Trifolium*, estudos disponíveis para outros gêneros, como *Glycine* (Larsen & Benson, 1970; Gorman & Kiang, 1977; Griffin & Palmer, 1989), *Hordeum* (Brammer, 1993; Ferreira & Cavalli-Molina, 1994), e *Vicia* e *Lathyrus* (González, 1994), foram muito úteis e auxiliaram na sugestão de locos relacionados às bandas isoenzimáticas de SOD observadas.

Analisando 32 acessos, foram detectadas 46 isoenzimas de SOD, o que não é um número tão elevado, tendo em vista que a presente análise inclui oito espécies e que diversos autores, analisando SOD, obtiveram elevado número de isoenzimas, como Griffin & Palmer (1989), Brammer (1993) e Ferreira & Cavalli-Molina (1994).

Entre as espécies analisadas, duas apresentaram o maior número de bandas, *T. incarnatum* e *T. repens* (15 isoenzimas), seguidas por *T. subterraneum* (12), *T. riograndense* (11), *T. resupinatum* (9), *T. vesiculosum* (9), *T. pratense* (7) e *T. polymorphum* (2). (FIGURA 41 e TABELA 6).

Em relação aos outros sistemas analisados, a variabilidade dentro dos acessos foi geralmente baixa e a maioria dos indivíduos dos acessos apresentaram os mesmos padrões.

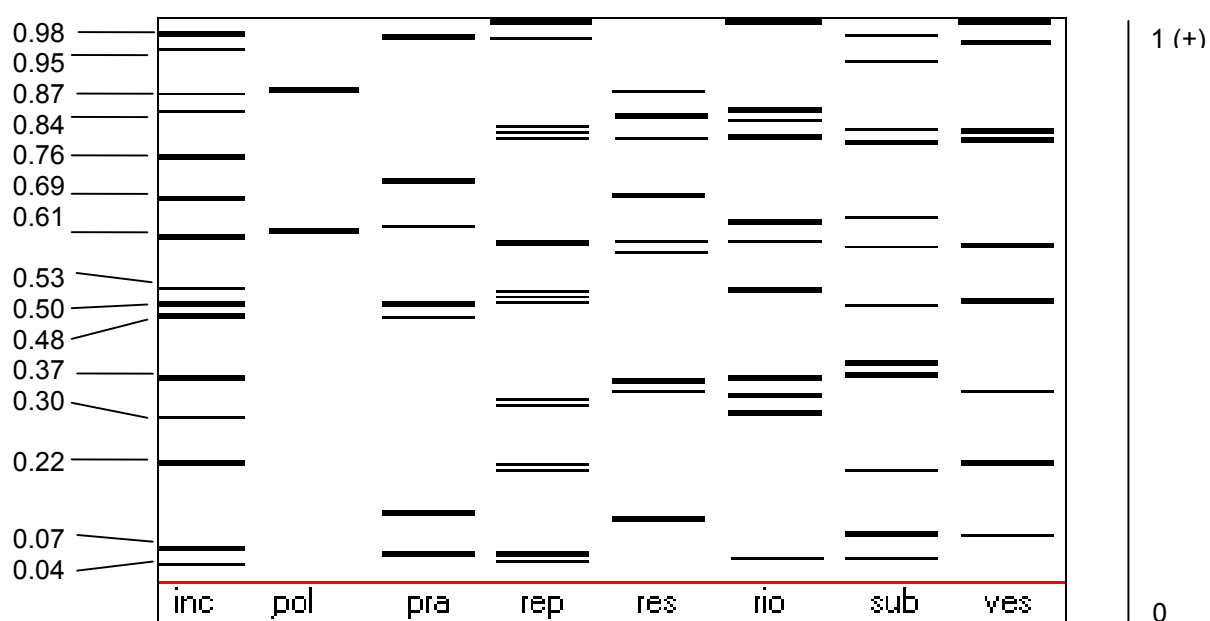


FIGURA 41. Padrões de SOD para as oito espécies de *Trifolium* analisadas

TABELA 6. Listagem das frequências de ocorrência (f) de 46 isoenzimas de SOD incluídas na análise intra-específica de oito espécies e 32 acessos do gênero *Trifolium*.

T. incarnatum (FIGURA 42) apresentou 15 isoenzimas, 12 ou 13 por acesso. Entre estas, seis isoenzimas ocorreram somente nesta espécie (MR-0.95, MR-0.76, MR-0.69, MR-0.53, MR-0.30 e MR-0.07), a maioria delas com $f > 0.80$. Os padrões dos acessos foram similares e a variabilidade deveu-se, principalmente, à presença ou ausência de bandas isoenzimáticas, o mesmo ocorrendo dentro dos acessos. Foram sugeridos seis locos.

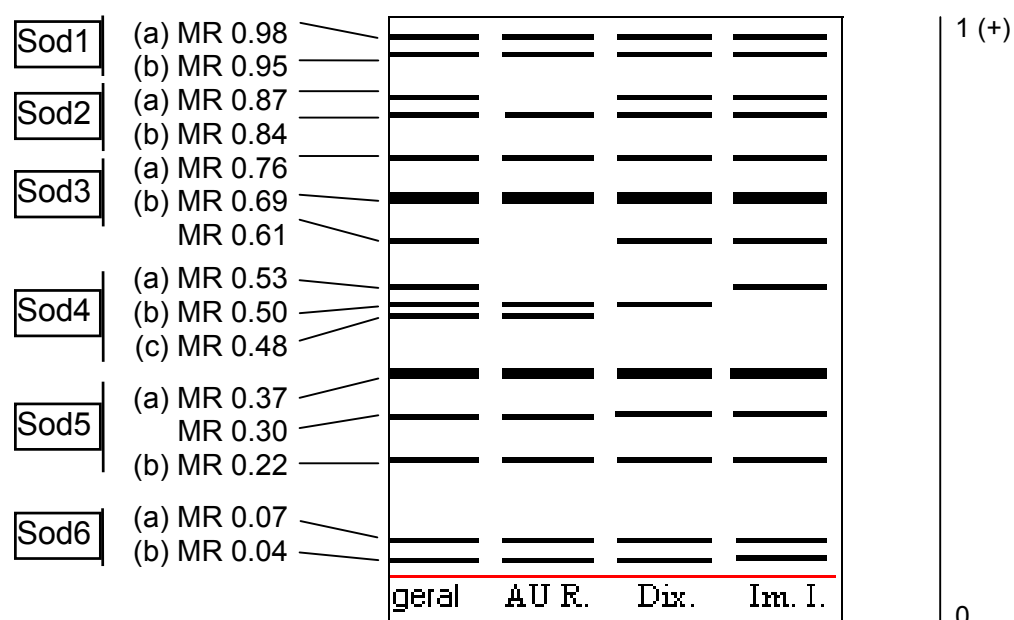


FIGURA 42. Padrões de *Trifolium incarnatum* em SOD

As isoenzimas MR-0.53 e MR-0.48 foram acesso-específicas. A isoenzima MR-0.48 também ocorreu em *T. pratense*, o que é interessante, tendo em vista que estas espécies são da mesma seção *Trifolium*.

O fenograma (APÊNDICE 5) reuniu todos os acessos em um grupo para $J > 0.60$. A cv. Dixie e o acesso Imigrantes Italianos apresentaram a maior similaridade ($J > 0.80$).

T. polymorphum (FIGURA 43) apresentou duas isoenzimas, a MR-0.88 foi espécie-específica e, aparentemente, condicionada pelo loco Sod1. A MR-0.63 representaria o loco Sod2 e foi compartilhada com *T. riograndense* acesso São Joaquim.

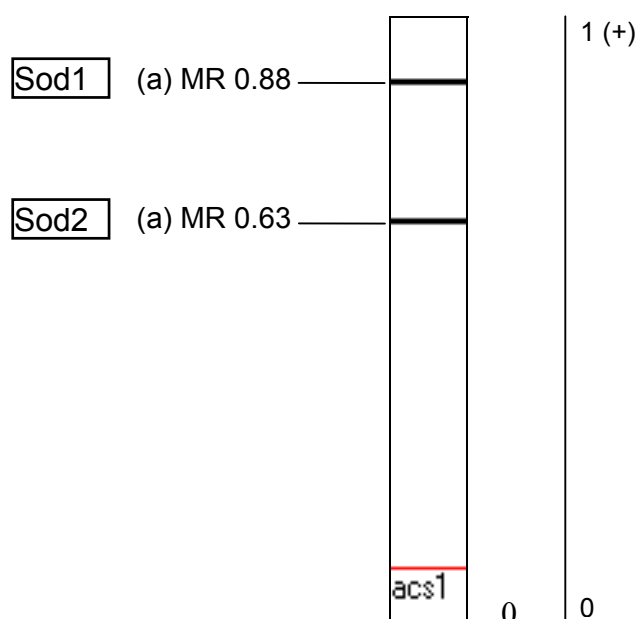


FIGURA 43. Padrões de *Trifolium polymorphum* em SOD

Em *T. pratense* (FIGURA 44) foram detectadas sete isoenzimas, de três a seis por acesso, aparentemente, controladas por quatro locos. A isoenzima MR-0.98, com a maior mobilidade, ocorreu em todos os indivíduos.

As bandas MR-0.72 e MR-0.64 foram as mais intensas, espécie-específicas e presentes em todos os indivíduos, com exceção do acesso Trigolândia. A MR-0.12 também foi espécie-específica.

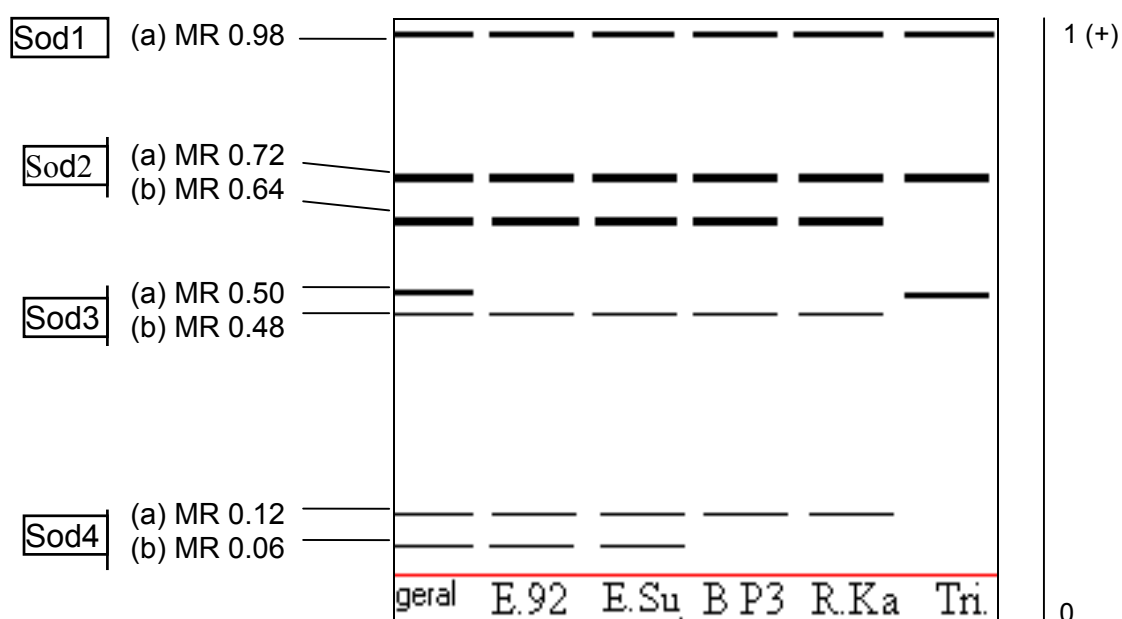


FIGURA 44. Padrões de *Trifolium pratense* em SOD

Na análise de agrupamentos (APÊNDICE 5), para $J > 0.80$, houve a formação de um grupo constituído por acessos EEA 1992 e Bagé P3 com padrões idênticos ($J = 1$), reunidos à cv. El Sureño e acesso Renato Kallil, que também tiveram similaridade máxima. O acesso Trigolândia ficou isolado dos demais para $J > 0.30$, pois, mesmo com o menor número de isoenzimas teve a única acesso-específica (MR-0.50).

Em *T. repens* (FIGURA 45) foram detectadas 15 isoenzimas, de quatro a dez por acesso e, aparentemente, relacionadas a sete locos.

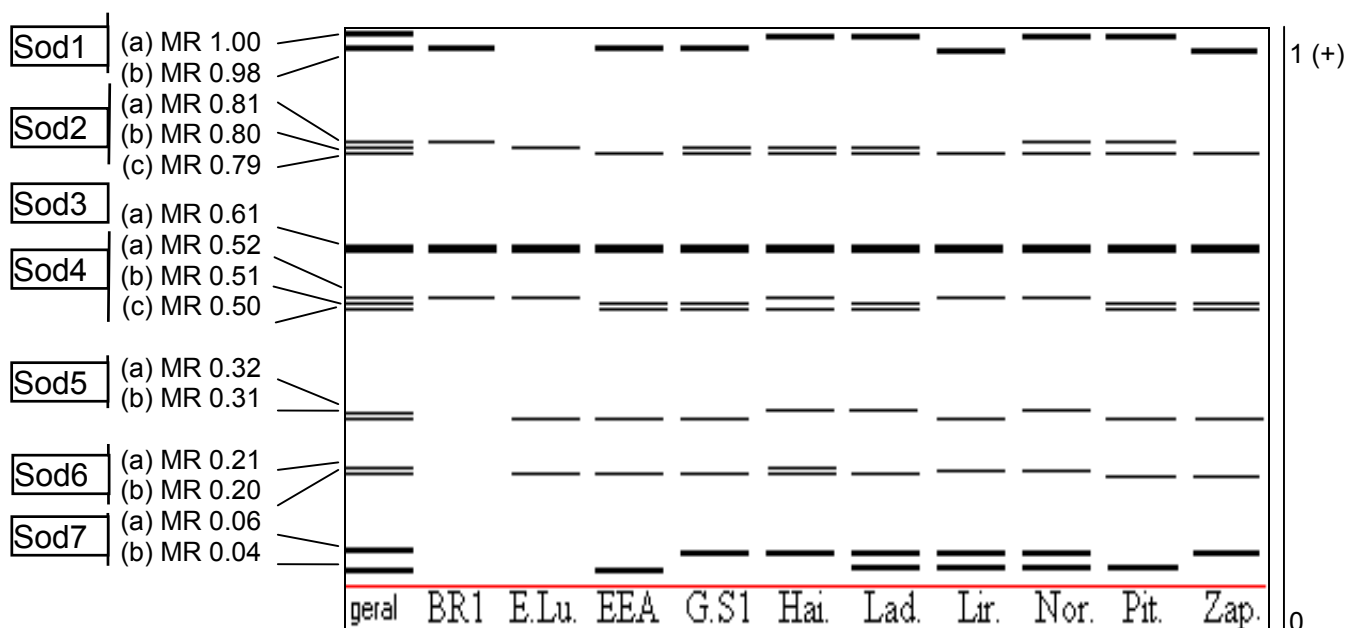


FIGURA 45. Padrões de *Trifolium repens* em SOD

Comparando os padrões dos acessos, encontram-se diferenças relacionadas à mobilidade e a presença/ausência de isoenzimas. Os indivíduos de um mesmo acesso apresentaram padrões muito similares.

Em alguns acessos ocorreram duas bandas muito próximas que, inicialmente, foram consideradas como uma isoenzima principal e uma secundária. Posteriormente, optou-se por tratá-las como duas principais, pois ocorriam em indivíduos determinados e repetidamente.

As isoenzimas MR-1.00 e MR-0.98 não ocorreram juntas em um mesmo acesso. A banda mais intensa, MR-0.61, presente em todos os indivíduos analisados, corresponde à banda controle utilizada para o cálculo de MR neste sistema. As isoenzimas MR-0.52, MR-0.32 e MR-0.21 foram espécie-específica. O fenograma (APÊNDICE 5), para $J > 0.60$, apresentou a formação

de dois agrupamentos, o primeiro com os acessos Guaíba S1 e a cv. Zapican, que foram os acessos mais similares ($J = 0.90$), reunidos a Guaíba EEA. Resultado semelhante foi observado em EST, quando estes três acessos também ficaram reunidos para $J > 0.60$. O segundo grupo ficou com as cultivares Haifa e Ladino enquanto as outras cultivares ficaram isoladas.

T. resupinatum (FIGURA 46) totalizou nove isoenzimas, oito ou nove por acesso e, aparentemente, controladas por cinco locos. A banda mais intensa foi MR-0.70. A maioria das isoenzimas foi espécie-específica (MR-0.83, MR-0.70, MR-0.59, MR-0.33 e MR-0.09). Os acessos foram muito similares e somente a isoenzima MR-0.59 teve $f < 1.00$, além de ter sido a única acesso-específica. No fenograma (APÊNDICE 5) os acessos ficaram agrupados com elevada similaridade ($J > 0.80$).

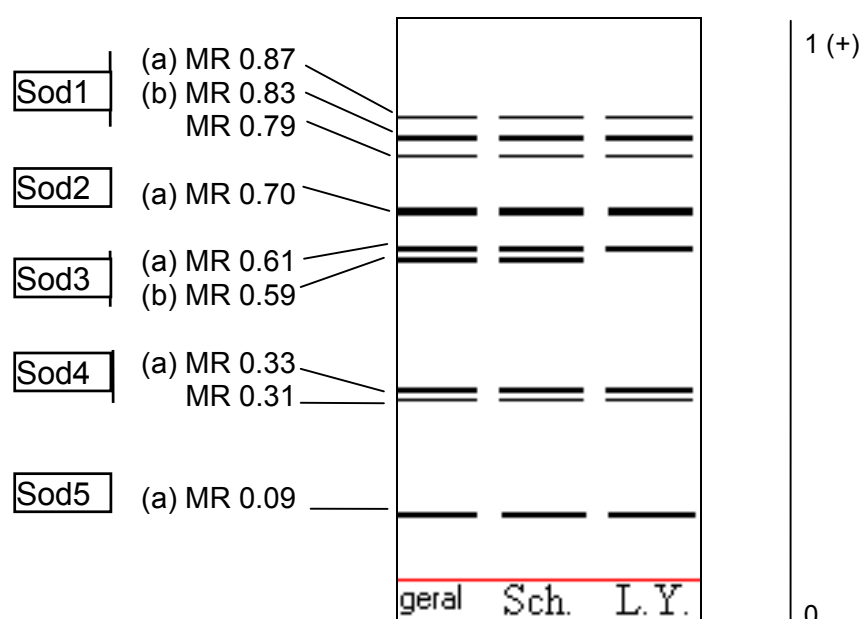


FIGURA 46. Padrões de *Trifolium resupinatum* em SOD

T. riograndense (FIGURA 47), foram detectadas 11 isoenzimas, duas a nove por acesso, aparentemente, relacionadas a seis locos. Destes, três locos seriam monomórficos, cada um com uma isoenzima.

Apenas a banda MR-0.28 foi espécie-específica, enquanto que a banda MR-0.63 foi compartilhada com a outra espécie nativa (*T. polymorphum*).

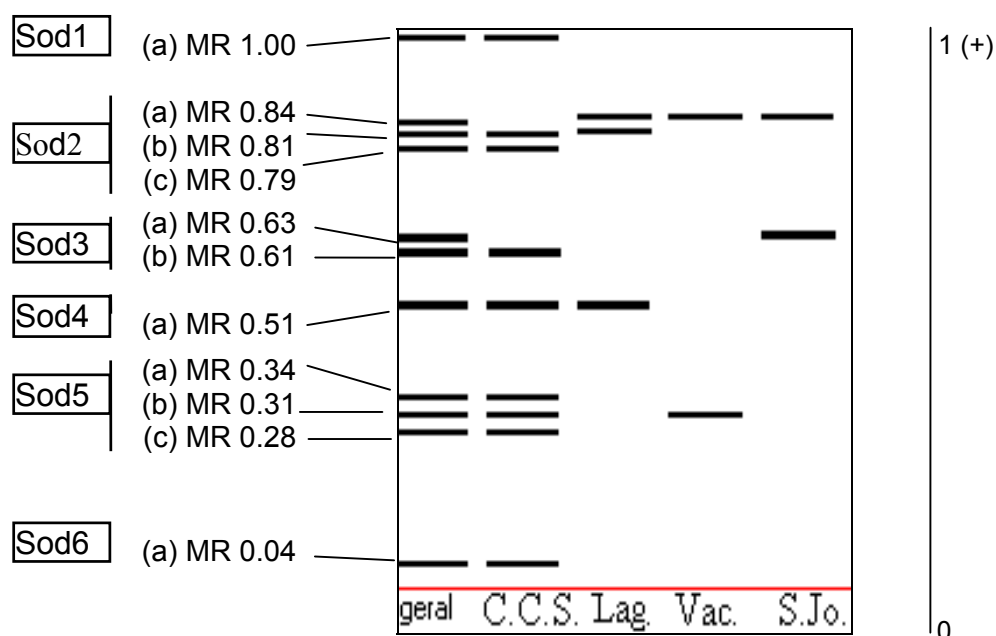


FIGURA 47. Padrões de *Trifolium riograndense* em SOD

A principal diferença observada entre os acessos foi o número reduzido de isoenzimas (duas ou três) nos três acessos corados segundo Harris & Hopkinson (1976) *apud* González (1994), enquanto o acesso Campos de Cima da Serra, o único com coloração de Brewer & Sing (1970), teve maior

número de isoenzimas (FIGURA 40a). Entre as nove bandas detectadas para Campos de Cima da Serra, seis foram acesso-específicas (MR-1.00, MR-0.79, MR-0.61, MR-0.34, MR-0.28 e MR-0.04), as outras três (MR-0.81, MR-0.51 e MR-0.31) ocorreram em pelo menos outros dois acessos.

Na análise de agrupamento foram reunidos acessos corados segundo metodologias distintas (Harris & Hopkinson, 1976 *apud* González, 1994 e Brewer & Sing, 1970). Para $J > 0.60$, não houve formação de grupos (APÊNDICE 5).

T. subterraneum (FIGURA 48) apresentou 12 isoenzimas, nove ou dez por acesso, aparentemente, relacionadas a sete locos, destes dois monomórficos e cinco polimórficos.

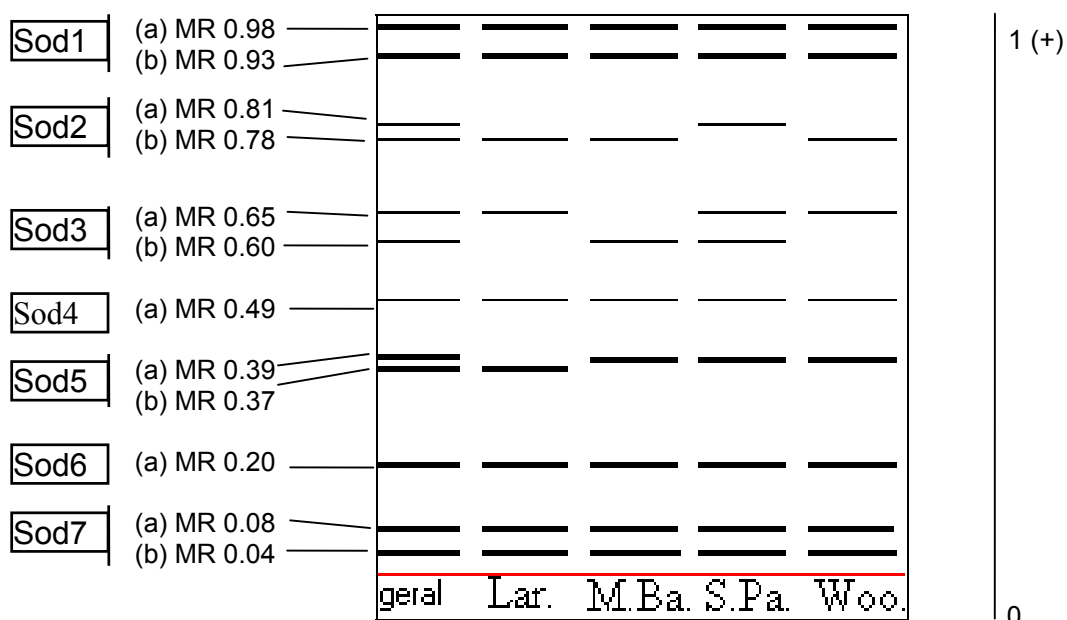


FIGURA 48. Padrões de *Trifolium subterraneum* em SOD

Os indivíduos do mesmo acesso tiveram padrões muito semelhantes, diferindo quanto à presença/ausência de bandas. Duas isoenzimas foram acesso-específicas (MR-0.81 e MR-0.37) e cinco restritas a esta espécie (MR-0.93, MR-0.78, MR-0.65, MR-0.49 e MR-0.39).

T. vesiculosum (FIGURA 49) apresentou nove isoenzimas, oito ou nove por acessos, aparentemente, controladas por sete locos, destes dois polimórficos com duas aloenzimas cada. Os outros dois locos foram monomórficos.

Não foi detectada variabilidade intra-cultivar, ou seja, os padrões individuais dentro de cada acesso foram iguais. As cultivares Santa Tecla e Yuchi também apresentaram padrões iguais (APÊNDICE 5), diferindo do acesso Weber 1995 pela banda MR-0.80, que foi a única acesso-específica.

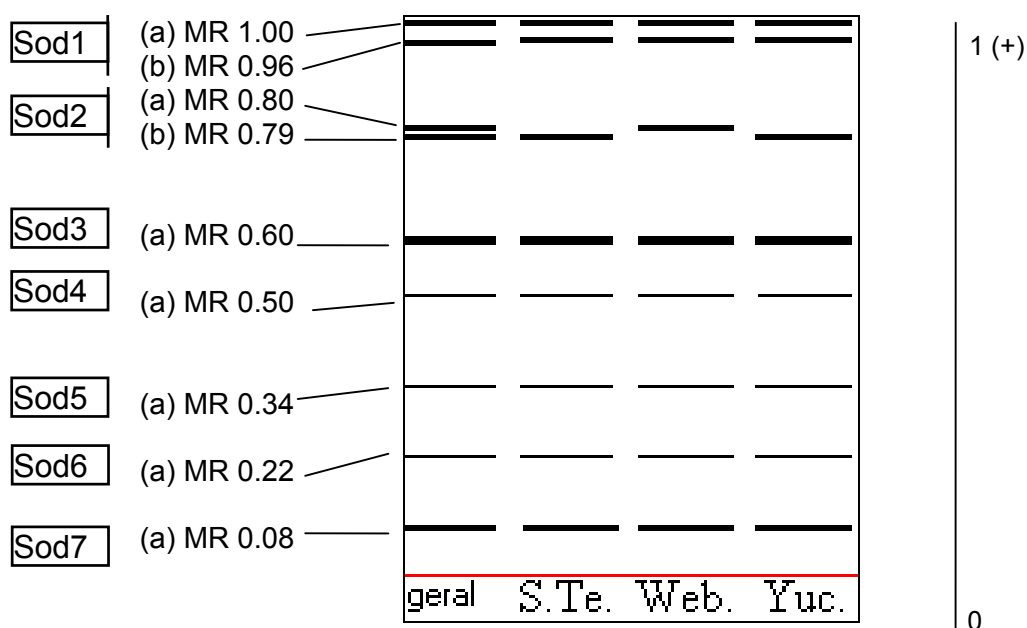


FIGURA 49. Padrões de *Trifolium vesiculosum* em SOD

4.3. Análises inter-específicas para sistemas enzimáticos individualizados e reunindo os quatro sistemas.

Para a análise de agrupamentos ao nível inter-específico, procedeu-se como para a análise intra-específica, a diferença foi a reunião das bandas isoenzimáticas de todas as espécies detectadas em cada sistema enzimático (PGI ou MDH ou EST ou SOD). Para a análise global foram agrupadas as bandas detectadas nos quatro sistemas enzimáticos e todas as oito espécies.

4.3.1. Análise inter-específica ao nível de cada sistema enzimático

Para a comparação dos resultados das análises de agrupamentos realizadas para cada sistema em particular, tomou-se um mesmo valor de similaridade ($J = 0.60$). Procedendo desta forma, observa-se que os sistemas diferem entre o número de grupos formados e por suas composições, como por quantos e quais os acessos isolados. Geralmente não ocorreram agrupamentos entre os acessos de espécies diferentes.

4.3.1.1. Análise inter-específica para PGI

Em PGI foram analisados 34 acessos que apresentaram 16 isoenzimas diferentes (TABELA 3). Nos 34 acessos, para as isoenzimas de PGI, foram detectados 27 padrões isoenzimáticos para $J = 1.0$, como pode ser visto no fenograma (FIGURA 50 e APÊNDICE 6).

FIGURA 50. Resultado da análise da variabilidade, ao nível do sistema enzimático de PGI e reunindo 34 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.

Vinte e dois acessos tiveram padrões distintos, enquanto que os outros 12 acessos compartilham cinco padrões. Os acessos com padrões isoenzimáticos similares ocorreram em *T. repens* (cultivares Haifa, Ladino e Pitau), em *T. subterraneum* (cultivares Larisa, Woogenellup e Seaton Park), em *T. pratense* (cv. El Sureño com Violetta Rup, e entre os acessos Bagé P3 e Renato Kallil) e em *T. resupinatum* (Schifino 1994 e La Yapa).

Para $J = 0.60$, houve 19 agrupamentos, com a formação de nove grupos incluindo 24 acessos de sete das espécies analisadas. *T. incarnatum*, *T. subterraneum*, *T. vesiculosum* e *T. resupinatum* tiveram todos seus respectivos acessos agrupados em um grupo cada. *T. repens* e *T. pratense* ficaram divididas em dois grupos. Houve o agrupamento de espécies distintas, *T. pratense* acesso EEA 1992 agrupou com *T. riograndense* acesso Campos de Cima da Serra. Os outros 10 agrupamentos foram de acessos isolados de seis espécies. Ficaram isolados 12 acessos pertencentes a seis espécies: *T. incarnatum* (cv. AU Robin); *T. repens* (cultivares Nora, BR1 Bagé, Tamar); *T. pratense* (cv. Alpillles); *T. polymorphum*; quase todos os acessos de *T. riograndense* (Lages, São Joaquim e Vacaria); *T. vesiculosum* (Weber 1995).

4.3.1.2. Análise para MDH

Na análise de MDH foram incluídas 23 isoenzimas de 36 acessos (TABELA 4).

Para $J = 1$ (FIGURA 51 e APÊNDICE 7), 22 acessos tiveram padrões isoenzimáticos únicos, enquanto que os outros sete padrões foram compartilhados por 14 acessos de cinco espécies.

FIGURA 51. Resultado da análise da variabilidade, ao nível do sistema enzimático de MDH e reunindo 36 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.

Cada uma destas cinco espécies com dois ou mais acessos representados, *T. repens* (Guaíba EEA com Guaíba S1 e cv. Ladino com cv. Zapican), *T. riograndense* (entre os acessos Lages e São Joaquim), *T. vesiculosum* (cv. Santa Tecla com cv. Yuchi), *T. resupinatum* (acesso Schifino 1994 com cv. La Yapa) e *T. pratense* (cv. El Sureño com cv. Violetta Rup e entre os acessos EEA 1992 e Bagé P3).

Para $J = 0.60$, houve a formação de dez agrupamentos reunindo 27 acessos pertencentes as oito espécies estudadas. *T. repens* ficou dividida em três grupos, *T. pratense* em dois, *T. subterraneum* e *T. resupinatum* com um grupo cada.

Três agrupamentos reuniram acessos de espécies distintas: *T. riograndense* (acessos Lages e São Joaquim) com *T. subterraneum* (cv. Woogenellup) e *T. vesiculosum* (acesso Weber 1995); *T. incarnatum* (acesso Imigrantes Italianos) com *T. polymorphum*; *T. subterraneum* (cv. Larisa) com *T. vesiculosum* (cultivares Santa Tecla e Yuchi).

Os outros nove agrupamentos estão representados por acessos isolados de quatro espécies (*T. incarnatum*, *T. repens*, *T. pratense* e *T. riograndense*).

4.3.1.3. Análise inter-específica para EST

Para EST também foram analisados 36 acessos, sendo incluídas 44 das 64 isoenzimas observadas neste sistema (TABELA 5 e FIGURA 52).

FIGURA 52. Resultado da análise da variabilidade, ao nível do sistema enzimático de EST e reunindo 36 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.

Foram descartadas todas as isoenzimas que apresentavam migração relativa idêntica, mas com especificidades distintas, α EST, β EST ou $\alpha\beta$ EST.

Como apresenta o fenograma, para $J = 1$ (FIGURA 52 e APÊNDICE 8), os 36 acessos analisados para EST apresentaram 32 padrões isoenzimáticos acesso-específicos e quatro acessos compartilharam dois padrões isoenzimáticos: *T. vesiculosum* (cv. Santa Tecla com cv. Yuchi) e *T. riograndense* (Vacaria com São Joaquim).

Para $J = 0.60$, houve a formação de 22 agrupamentos, destes oito reunindo 22 acessos de seis espécies. *T. repens* com Guaíba EEA, cv. Guaíba S1, cv. Lirepa, cv. Nora e cv. Zapican. *T. pratense* representado por dois agrupamentos, o primeiro reunindo cv. Alpillles, Bagé P3 e Trigolândia e o segundo com EEA 1992 e cv. El Sureño.

As outras quatro espécies representadas em um grupo cada: *T. resupinatum* (Schifino 1994 e La Yapa); *T. vesiculosum* (Santa Tecla, Yuchi e Weber 1995); *T. riograndense* (acessos Campos de Cima da Serra e Lages); *T. subterraneum* (cultivares. Larisa, Mount Barker, Woogenellup e Seaton Park),

Para $J = 0.60$, os outros 14 agrupamentos ficaram constituídos por acessos isolados de seis espécies (*T. incarnatum*, *T. repens*, *T. polymorphum*, *T. pratense*, *T. subterraneum* e *T. riograndense*). Não ocorreram agrupamentos entre espécies distintas.

4.3.1.4. Análise inter-específica para SOD

Para a análise de SOD foram incluídas 46 bandas enzimáticas de 32 acessos (TABELA 6). Para $J = 1$ ocorreram 29 padrões enzimáticos distintos (FIGURA 53 e APÊNDICE 9).

FIGURA 53. Resultado da análise da variabilidade, ao nível do sistema enzimático de SOD e reunindo 32 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.

Vinte e seis acessos tiveram padrões únicos, enquanto que três padrões foram compartilhados por seis acessos de duas espécies, *T. vesiculosum* (cultivares Santa Tecla e Yuchi) e *T. pratense* (EEA 1992 com Bagé P3 e a cv. El Sureño com Renato Kallil).

Para $J= 0.60$ houve a formação de 17 agrupamentos, destes nove apresentaram acessos isolados de quatro espécies. Entre os outros oito agrupamentos, somente um reuniu espécies diferentes: *T. repens* cv. Pitau com *T. riograndense* Campos de Cima da Serra. Todos os acessos de *T. incarnatum* ficaram reunidos, o mesmo ocorreu com *T. subterraneum*, *T. vesiculosum* e quase todos os acessos de *T. pratense*. *T. repens* esteve representado em dois agrupamentos.

4.3.2. Análise inter-específica reunindo os quatro sistemas enzimáticos

Optou-se por reunir as isoenzimas dos quatro sistemas enzimáticos em busca de informações mais completas sobre as espécies e acessos testados.

Os agrupamentos obtidos na análise global foram mais estruturados, não havendo a formação de fenogramas múltiplos, com alguns agrupamentos distintos, o que foi observado nas análises por sistema para PGI, MDH e SOD.

Na análise global foram reunidas 120 bandas dos quatro sistemas enzimáticos, detectadas em 31 acessos. O número total de isoenzimas incluídas nas análises ao nível de cada sistemas e global foi diferente. Na

análise global foram incluídas todas as isoenzimas de PGI (16) e MDH (23), diferente de EST (39) e SOD (42), que sofreram reduções.

As reduções decorreram de limitações do programa estatístico utilizado (NTSYS-PC)

Além das isoenzimas suprimidas na análise inter-específica do sistema EST, outras cinco foram excluídas, uma vez que estas ocorreram em uma espécie somente e tiveram baixa frequência nos acessos, MR-0.76 (*T. pratense* cultivares El Sureño e E116), MR-0.53 (*T. riograndense* acessos Campos de Cima da Serra e Lages), MR-0.46 (*T. pratense* cv. El Sureño e acessos EEA 1992 e Bagé P3), MR-0.34 (*T. pratense* cv. E116 e acesso EEA 1992) e MR-0.31 (*T. repens* cv. El Lucero, cv. Ladino e acesso Guaíba EEA). Assim, das 64 isoenzimas de EST detectadas, foram consideradas 39, entre estas duas com especificidade $\alpha\beta$ EST, 18 com β EST e 19 com α EST (APÊNDICE 10).

Do sistema SOD foram excluídas quatro isoenzimas, detectadas em um acesso cada, MR-0.88 de *T. polymorphum*, MR-0.59 de *T. resupinatum* acesso Schifino 1994, MR-0.53 de *T. incarnatum* acesso Imigrantes Italianos e MR-0.28 de *T. riograndense* acesso Campos de Cima da Serra (APÊNDICE 11).

A análise dos agrupamentos observados no fenograma é muito informativa quanto à variabilidade inter e intra-específica (FIGURA 54). As espécies apresentaram baixa similaridade inter-específica, ocorrendo agrupamentos entre espécies distintas apenas para $J \leq 0.351$.

FIGURA 54. Resultado da análise da variabilidade, reunindo os quatro sistemas enzimáticos (PGI, MDH, EST e SOD) e 34 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.

As maiores similaridades intra-específicas ocorreram entre o acesso Campos de Cima da Serra de *T. riograndense* e três cultivares de *T. repens*, Pitau (J = 0.351), Ladino (J=0.308) e Zapican (J = 0.25). Agrupamentos formados com tão baixa similaridade podem ser ocasionais e não estarem representando relações entre espécies, mas neste caso estas duas espécies fazem parte da mesma seção *Lotoidea*, que é a maior, mais primitiva e amplamente distribuída no gênero *Trifolium* (Zohary, 1972; Zohary & Heller, 1984).

Nos agrupamentos entre os acessos de uma mesma espécie, os valores de similaridade intra-específica variaram ($0.24 \leq J \leq 0.96$), o mais baixo em *T. riograndense* e o mais alto em *T. vesiculosum* (Veja a matriz de similaridade no APÊNDICE 12).

Para J = 0.30 houve a formação de oito grupos, cada um correspondendo a uma das unidades taxonômicas específicas estudadas. A maioria dos acessos de uma mesma espécie permaneceu reunido para J = 0.50, com exceção de *T. riograndense*, *T. repens* e *T. pratense*, que apresentaram os menores índices de similaridades entre seus acessos, confirmando sua elevada diversidade intra-específica.

Apenas seis acessos tiveram similaridade superior a J > 0.80: as duas cultivares de *T. vesiculosum* (Santa Tecla e Yuchi, J = 0.96), acessos de *T. repens* (Guaíba EEA e Guaíba S1, J = 0.886) e os dois acessos de *T. resupinatum* (La Yapa e Schifino 1994, J = 0.875).

O primeiro grupo revelado nos agrupamentos reúne os acessos de *T. incarnatum*. As cultivares Dixie e AU Robin apresentaram a maior

similaridade ($J = 0.655$). A cv. AU Robin foi selecionada a partir de Dixie, que é a primeira cultivar de *T. incarnatum* selecionada para os EUA (Hoveland & Evers, 1995). O acesso Imigrantes Italianos, um material naturalizado em campos do Rio Grande do Sul, apresentou maior similaridade com a cv. Dixie ($J = 0.645$), mas é desconhecido de que cultivar deriva o acesso Imigrantes Italianos.

No segundo agrupamento, a maioria das cultivares de *T. repens* está reunida em dois grupos. O primeiro constituído por Guaíba EEA, Guaíba S1, Lirepa e Zapican e o segundo por Haifa, Ladino e Pitau. As similaridades entre Zapican (primeiro grupo), Ladino e Pitau (segundo grupo) são altas. As cultivares BR1 Bagé e El Lucero apresentaram as menores similaridades com os demais acessos de *T. repens*. A altíssima similaridade entre os acessos Guaíba EEA e Guaíba S1 ($J = 0.886$) pode ser explicada por estes materiais apresentarem origem comum.

A elevada variabilidade encontrada entre as cultivares de *T. repens*, contrastou com a uniformidade dos padrões isoenzimáticos dos indivíduos amostrados dentro de cada uma das cultivares.

No terceiro agrupamento ficou *T. polymorphum*, com baixa similaridade com as outras espécies ($0.0 \leq J \leq 0.167$). Somente um acesso de *T. polymorphum* foi analisado, o que não representa a variabilidade total desta espécie.

O quarto agrupamento apresenta os dois acessos de *T. resupinatum* com elevada similaridade, cv. La Yapa e Schifino 1994, ($J = 0.875$), mas baixa similaridade com acessos de outras espécies ($J \leq 0.174$).

Mesmo apresentando elevada similaridade intra-específica, na maioria dos sistemas enzimáticos, estes dois acessos podem ser distinguidos por suas isoenzimas de EST e por caracteres morfológicos como o porte da planta, o tamanho dos folíolos e a cor e tamanho das inflorescências.

No quinto agrupamento, com baixa similaridade ($0.240 \leq J < 0.471$), estão reunidos os acessos de *T. riograndense*, a espécie com a maior variabilidade intra-específica. *T. riograndense* apresentou maior similaridade inter-específica com *T. repens* e *T. polymorphum*, todas espécies da seção *Lotoidea*.

No sexto agrupamento estão as quatro cultivares de *T. subterraneum*, em dois grupos, o primeiro reúne as cvs. Larisa e Woogenellup com a maior similaridade ($J = 0.778$), no segundo estão as cvs. Mount Barker e Seaton Park ($J = 0.688$). A cv Woogenellup apresentou similaridade com a cv. Seaton Park ($J = 0.655$).

No sétimo agrupamento reuniram-se os acessos de *T. vesiculosum*. As cvs. Santa Tecla e Yuchi apresentaram o maior índice de similaridade entre os acessos de *Trifolium* analisados ($J = 0.96$).

O oitavo agrupamento corresponde aos acessos de *T. pratense*, a maior similaridade ocorreu entre os acessos EEA 1992 e Bagé P3 ($J = 0.679$). Foram testados outros quatro acessos de *T. pratense*, os quais foram excluídos pelas dificuldades metodológicas encontradas para analisar esta espécie, como a rápida oxidação dos homogeneizados e, a conseqüente desnaturação das isoenzimas.

5. CONCLUSÕES

A eletroforese de isoenzimas de MDH, PGI, EST e SOD em gel de poliacrilamina é útil para a caracterização taxonômica e da variabilidade genética do gênero *Trifolium*.

Há variabilidade genética inter e intra-específica, para padrões de isoenzimas, nas oito espécies de *Trifolium* analisadas. A similaridade entre as espécies é baixa. *T. riograndense*, *T. repens* e *T. pratense* têm a maior variabilidade intra-específica. .

O sistema PGI é o mais conservativo, com o menor número de isoenzimas e de locos por espécie, seguido de MDH. Os sistemas EST e SOD apresentam o maior polimorfismo.

A similaridade de Jaccard e o método de agrupamentos pela média são eficazes para a análise da variabilidade isoenzimática.

A análise de sistemas enzimáticos isolados apresenta resultados distintos da análise que reúne bandas de todos os sistemas em conjunto.

Análises reunindo diversos sistemas enzimáticos fornecem subsídios para caracterizações mais completas da variabilidade genética em plantas.

Os agrupamentos intra e inter-específicos das isoenzimas de PGI, MDH, EST e SOD formados concordaram com o proposto pela taxonomia

tradicional, ao nível de espécie. Demonstram que os padrões de isoenzimas, principalmente quando vários sistemas enzimáticos são utilizados, são marcadores bioquímicos úteis e confiáveis para a taxonomia e caracterização de germoplasma de *Trifolium*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; JENG, R.; HUBBES, M. Isoenzyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.62, n.8, p.1756-1762, 1984.
- ALFENAS, A.C.; MOREIRA, M.A.; BROMMONSCHENKEL, S.H. *et al.* Eletroforese de proteínas e isoenzimas para a identificação de fungos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 14., 1987. Viçosa. **Resumos...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1987a. Não numeradas.
- ALFENAS, A.C.; MOREIRA, M.A.; BROMMONSCHENKEL, S.H. *et al.* Variabilidade isoenzimática entre culturas fúngicas com diferentes níveis de patogenicidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 14., 1987. Viçosa. **Resumos...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1987b. Não numeradas.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W. *et al.* **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991.242 p.
- ANDRADE, R. P. **Efeito de formas e intensidades de utilização da forragem sobre componentes da produção de sementes de *Trifolium vesiculosum* Savi cv. YUCHI em áreas de ressemeadura natural.** 117f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1978. Não publicada.
- ARAGÃO, W.M. **Testes de progênies de plantas cianogênicas, não cianogênicas e cultivares de trevo branco (*T. repens* L.) consorciadas com gramíneas.** 1979. 114f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1978.
- BALLVE, R.M.L.; MEDINA, H.P.; BORDIGNON, R. *et al.* Methodology for starch gel electrophoresis and protocols for isozymes of 32 plant genera. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.3, n.18, p.491-502, 1995.

- BECKER, L.C.M.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; PAIM, N.R. *et al.* Observation on the mode of reproduction of *Trifolium riograndense* Burkart (Leguminosae). **Ciência e Cultura**, Brasília, v.39, n.3, p.304-306, mar.1987.
- BOWLER, C.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. **Annual Review Plant Physiology**, Standford, v.43, p.83-116, 1992.
- BRAMMER, S.P. **Variabilidade isoenzimática em Populações Naturais de *Hordeum stenostachys* (Poaceae)**. 264f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993. Não publicada.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília: M.A.R.A., 1992. 365p.
- BREWER, G.J; SING, C.F. **An introduction to Isozyme Techniques**. New York: Academic, 1970.
- BROMMONSCHENKEL, S.H.; ALFENAS, A.C.; MATSUOKA, K. Análise genética de padrões isoenzimáticos de isolados de *Phytophthora infestans*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.12, n.2, p.155, 1987.
- BRONDANI, C. Variabilidade isoenzimática entre populações de três espécies de *Manihot* (Euphorbiaceae) relacionadas à mandioca (*M. esculenta* Crantz.) **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.18, n.3, p.265, 1995.
- BROWN, A.H.D.; WEIR, B.S. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANSKEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding**: Part A. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.219-239.
- BURKART, A. *Trifolium* L., en Troncoso. In: FLORA Ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Buenos Aires: I.N.T.A., v.6, n.3, p.656-662.
- CABRERA, A.L. **Flora de la Provincia de Buenos Aires**. Buenos Aires: I.N.T.A., 1967. p.570-579.
- CARDY, B.J.; BEVERSDORF, W.P. Identification of soybean cultivars using isoenzyme electrophoresis. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.12, n.3, p.943-954, 1984.
- CAVALLI-MOLINA, S.; WINGE, H. Phenetic relationships among populations of autogamous plant *Relbunium hypocarpium* (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.11, n.2, p.401-418, 1988.

- CLEVELAND, R. W. Reproductive Cycle and Cytogenetics. In: TAYLOR, L.N. **Clover science and technology**, Wisconsin: Taylor. 1985. p.71-110. (Series Agronomy, v.25).
- COELHO, P.J.A.; LOPES, C.R. Caracterização da variabilidade quatro populações de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) com isoenzimas. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.18, n.3, p.267, 1995. (Resumo)
- COLL, J.; ZARZA, A. **Leguminosas nativas promisorias: trébol polimorfo y babosita**. Montevideo: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, 1992. 19p. (Boletín de Divulgación, v.22)
- COLLINS, W. J.; ROSSITER, R.C.; HAYNES, Y. *et al.* Identification of Subterranean Clover Cultivars and their Relationships by Isosyme Analysis. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.35, n.3, p.399-411, 1984.
- DALL'AGNOL, M.; PAIM, N.R.; RIBOLDI, J. Cultivares e progênies de policruzamento de trevo branco (*T. repens* L.) consorciados com gramíneas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.11, p.1591-1598, 1982.
- DARMENCY, H.; GASQUEZ, J. Esterases polymorphism and growth form differentiation in *Poa annua* L. **New Phytologist**, Cambridge, v.95, N.2, p.289-297, 1983.
- DIGBY, P.G.N.; KEMPTON, R.A., **Multivariate analysis of ecological communities**. New York: Chapman and Kall, 1994. 206 p.
- DOMINGUES, H.G. **Efeito de florescimentos sucessivos no rendimento de sementes de trevo branco (*T. repens* L.)**. 1991. 97f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1989.
- EISINGER, S.M. **Avaliação da variabilidade genética em trevo branco (*Trifolium repens* L. cv. Jacui S₂) sob diferentes níveis de calcário e fósforo do solo**. 1994. 137f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.
- FERET, P.P.; BERGMANN, F. Gel Eletrophoresis of Proteins and Enzymes. In: MIKSCHE, J.P. **Modern Methods in Forest Genetics**. New York: Spring-Verlang, 1976. p.49-77.
- FERREIRA, C.A.S.; CAVALLI-MOLINA, S. Self-fertilization and absence of heterozygotes in *Hordeum euclastum* (Gramineae). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.17, n.1, p.89-95, 1994.

- FRANKE, L. B. **Dinâmica do florescimento de cinco cultivares de trevo branco (*Trifolium repens*)**. 1991. 141f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1987.
- GIBSON, P.B.; CHEN, C.C.; GILLINGHAM, J.T. *et al.* Interspecific Hybridization of *Trifolium uniflorum* L. **Crop Science**, Madison, v.11, n.6, p.895-899, nov./dec.1971.
- GILLESPIE, J.H.; LANGLEY, C.H. A general model to account for enzyme variation in natural populations. **Genetics**, Austin, v.76, n.4, p.837-848, 1974.
- GILLETT, J.M. Taxonomy and Morphology. In TAYLOR, L.N. (Editors) **Clover science and technology**. Wisconsin: (s.n.). 1985. p.7-69. (Series Agronomy, n.25)
- GILLILAND, T.J.; CAMLIN, M.S.; WRIGHT, C.E. Evaluation of phosphoglucosomerase allozyme electrophoresis for the identification and registration of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). **Seed Science and Technology**, Zurich, v.10, n.3, p.415-430, 1982.
- GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W.; LEE, C.N. Genetic control of malate deshydrogenase isozymes in maize. **Genetics**, Chapel Hill, v.94, n.1, p.153-168, 1980.
- GOMES, K.E. **Avaliação de pastagens modificadas pelo preparo de solo e introdução de espécies de inverno**. 121f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1984. Não publicada.
- GONZÁLEZ, M.C. **Caracterização isoenzimática de algumas espécies de *Lathyrus* L. e *Vicia* L. ocorrentes no Rio Grande do Sul**. 1996. 89f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.
- GORMAN, M.B.; KIANG, Y.T. Variety-Specific Electrophoretic Variants of Four Soybean Enzymes. **Crop Science**, Madison, v.17, n.6, p.963-965, nov./dec. 1977.
- GOTTLIEB, L.D.; WEEDEN, N.F. Correlation between subcellular location and phosphoglucose isomerase variability. **Evolution**, Boulder, v.35, n.5, p.1019-1022, 1981.
- GRIFFIN, J.D.; PALMER, R. G. Genetic Studies with Two Superoxide Dismutase Loci in Soybean. **Crop Science**, Madison, v.29, n.4, p.968-971, jul./aug.1989.

- HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of Proteins: A Practical Approach**. New York: Oxford University, 1990. 383p. (The Practical Approach Series)
- HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; MURAWSKI *et al.* Correlations between species traits and allozyme diversity: Implications for conservation biology. In: FALK, D.E.; HOLSINGER, **Genetics and conservation of rare plants**. Oxford: University Press, 1991. p.75-86.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. **Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics**. Amsterdam: North-Holland, 1977. 24p. Introduction and Use of thiol reagents. (Supplement)
- HEDGES, B.R.; PALMER, R.G. Inheritance of Malate Dehydrogenase Nulls in Soybean. **Biochemical Genetics**, New York, v.30, n.9/10, p.491-502, 1992.
- HEIDRICH-SOBRINHO, E. **Diversidade Enzimática em Zea mays L. e sua correlação com heterose**. 1982. 95f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1974.
- HEIDRICH-SOBRINHO, E. Isoenzimas como marcadores genéticos na identificação de 9 linhagens de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.2, p.281-286, fev. 1982.
- HICKENBICK, M.C.M.; FLORES, A.I.P.; CAVALLI-MOLINA, S. *et al.* Mode of reproduction and seed production in *Paspalum dilatatum* Poir. virasoro biotype Dilatata group (Gramineae). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.15, n.1, p.85-102, 1992.
- HOVELAND, C.S.; EVERS, G.W. Arrowleaf, Crimson, and other annual clovers. In: BARNES, R. F.; DARRELL, A. M.; NELSON, C. J. **An introduction to grass agriculture**. Iowa: Iowa University Press, 1995. p. 249-260.
- HUNZIKER, J.H. El uso Simultáneo de dados citogenéticos y moleculares en taxonomía experimental. In: RECIENTES Adelantes en Biología. (s.n.): (s.n.), 1971. p.129-137.
- IZAGUIRRE, P. Especies indígenas y subespontaneas del genero *Trifolium* L. (Leguminosae) en el Uruguay. Montevideo: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, 1995. 22p. (Série Técnica, v.58)
- KAPPEL, A. **Os trevos: espécies do gênero Trifolium L.** Porto Alegre: Secretaria da Agricultura do Estado do RS - Depto. Produção animal, 1967. 48p. (Boletim Técnico, v.9).
- KENNEDY, S.J.; GARDINER, S.J.; GILLILAND, T.J. *et al.* The use of eletrophoretic techniques to distinguish perennial ryegrass cultivars when

- sown in mixtures. **Journal of Agriculture Science Cambridge**, Wellington, v.104, p.1-9, feb-1985.
- KIMURA, O.; DIANESE, J.C. Caracterização protéica e isoenzimática das patovares de *Xanthomonas campestris* que atacam a mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.18, n.11, p.1215-1228, 1983.
- LARSEN, A.L.; BENSON, W.C. Variety-Specific Variants of Oxidative Enzymes from Soybean Seed. **Crop Science**, Madison, v.10, n.5, p.493-95, set./out. 1970.
- LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. 2ed. São Paulo: Sarvier, 1991 p.151-183
- MARKERT, C.L. Biology of isozymes. In: INTERNACIONAL CONFERENCE ON ISOZYMES, 1975, New York. **Molecular Structure**. New York: Yale University and Marker, 1975. p.1-9
- MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes tissue, ontogenetic and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.45, n.5, p.753-763, 1959.
- MARTINS, P.S.; JAIN, S.K. Interpopulation variation in rose clover. **The Journal of Heredity**, Washington, v.71, n.1, p.29-32, 1980.
- MICHAELSON-YEATES, T.P.T. Phosphoglucoisomerase variation in *Trifolium repens*. **Genetica**, Dordrecht, v.70, p.53-58, 1986.
- MOLINA-FREANER, F.; JAIN, K. Isozyme Variation in Californian and Turkish Populations of the Colonizing Species *Trifolium hirtum*. **The Journal of Heredity**, Washington, v.83, n.6, p.423-430, 1992.
- MORAES, A. **Produtividade animal e dinâmica de uma pastagem de pangola (*Digitaria decumbens* Stent.), Azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e trevo-branco (*Trifolium repens* L.), submetida a pressões de pastejo**. 1993. 200f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.
- MORAES, C.O.C. **Avaliação agrônômica de espécies, cultivares e formas de *Trifolium* L.** 1989. 149f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.
- MORAES, C.O.C.; PAIM, N.R.; NABINGER, C. Avaliação de leguminosas do gênero *Trifolium* L.. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.7, p.813-818, jul. 1989.

- MOREIRA, A.M.; ALFENAS, A.C. Diferenciação de espécies de *Cylindrocladium* por meio de análise eletroforética de proteínas e isoenzimas em géis de poliacrilamida. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, n.2, p.258, 1985.
- NEWTON, K.J. Genetic of Mitochondrial Isozymes In: TANSKEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding: Part A**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.157-176.
- NIELSEN, G. Identification of all genotypes in tetraploid ryegrass (*Lolium* spp.) segregation for four alleles in a PGI-enzyme locus. **Hereditas**, Lund, v.92, n.1, p.49-52, 1980.
- OLIVEIRA, H.A. **Padrões Eletroforéticos e Genética de Isoenzimas na Identificação de Cultivares e Linhagens de *Pisum sativum* L. e sua Utilização no Melhoramento Genético**. 136f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1976.
- PAIM, N.R.; RIBOLDI, J. Duas novas cultivares de trevo-branco comparadas com outras disponíveis no Rio Grande do Sul, em associação com gramíneas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.1, p.43-53, jan.1994.
- PEIRCE, L.C.; BREWBAKER, J.L. Applications of Isozyme Analysis in Horticultural Science. **Hortscience**, Alexandria, v.8, n.1, p.17-22, feb.1973.
- PRINS, E.; SANDERS, P.M.; LYONS, T.B. Use of eletrophoretic techniques to identify the proportion of na improved white clovers cultivar (Grasslands Kopu) in a mixed sward. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v.32, n.4, p.515-520, 1989.
- ROHLF, P.J. NTSYS-PC. **Numerical taxonomic and multivariate analisys systems version 1.50**. New York: Exeter, 1989.
- SANDERS, P.M.; BARKER, D.J.; WEWALA, G.S. Phosphoglucoisomerase-2 allozymes for distinguishing perennial ryegrass cultivars in binary mixtures. **Journal Agriculture Science Cambridge**, Wellington, v.112, p.179-184, apr-1989.
- SAWADA, H.; YAMAUCHI, K. Identification of White Clover (*Trifolium repens* L.) Clones Using Isozymes. **Japanese Journal of Grassland Science**, Shizuoka, v.39, n.4, p. 488-496, 1994.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic Control of Multiple Molecular Forms of Enzymes in Plants: A Rewiew. **Biochemical Genetics**, New York, v.3, n.1, p.37-79, 1969.

- SCANDALIOS, J.G. Isozymes in development and differentiation. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.225-258, 1974.
- SCANDALIOS, J.G. Genes, Isozymes and Evolution In: MARKERT, C.L. **Isozymes: Part IV: Genetics and Evolution**. New York: Academic, 1975. p.1-7.
- SELANDER, R.K. Genetic variation in natural populations. In: AYALA, F.J. **Molecular evolution**. Massachusetts: Sinauer, 1976. p.21-45.
- SHIELDS, C.R.; ORTON, T.J.; STUBER, C.W. An outline of general resource needs and procedures for eletrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: TANSKEY, S.D.; ORTON, T. J. **Isozymes in plant genetics and breeding: Part A**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.443-468.
- SCHIFINO, M.T. **Estudos citogenéticos em *Trifolium riograndense* Burkart, *T. polymorphum* Poir e *T. repens* L.: Indução de Poliplodia, Número Cromossômico, Cariótipo, Comportamento Meiótico**. 1988. 255f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1985.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; FREITAS, L.H.C.; SIMIONI, C. Isoenzymatic characterization of hybrids between *Leucaena leucocephala* and *L. diversifolia* ssp. *diversifolia* grown in Rio Grande do Sul (Southern Brazil). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.19, n.3, p.475-478, 1996.
- SILVA, L.F.A. **Efeito do nível de oferta de forragem sobre a resposta animal em pastagem de pangola (*Digitaria decumbens* Stent.) e trevo branco (*Trifolium repens* L.) durante a estação quente**. Porto Alegre, 84f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993. Não publicada.
- SILVEIRA, L.R.M.; MORAES, C.F. Determinação da apomixia em capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.) por padrões isoenzimáticos. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.18, n.3, p.156, 1995. (Resumo)
- SMITHIES, O. Zone eletrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. **The Biochemical Journal**, London, v.61, n.4, p.629-640, 1955.
- SOUZA, E.H.; PAIM, N.R.L.; SCHIFINO, M.T. *et al.* Caracterização morfológica e fisiológica das formas diplóide e tetraplóide de *Trifolium riograndense* em comparação com *T. repens* e *T. polymorphum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.23, n.6, p.599-607, jun.1988.
- STEBBINS, G.L. Introduction. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. **Isozymes in Plant Biology**. London: Chapman e Hall, 1990. p.1-4.

- STEINER, J.J. Eletrophoretic Techniques for Evaluating Forage Germplasms. **INTERNATIONAL HERBAGE SEED PRODUCTION RESEARCH GROUP.**, Newsletter v.19, p.5-7, 1993.
- TANSKEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding: Part A.** Amsterdam: Elsevier, 1983.
- TAVARES, M.J.C.M. **Variabilidade genética em *Avena sativa* L., *A. sterilis* e em seus híbridos: avaliações agronômicas, morfológicas, citogenéticas e eletroforéticas.** 1992. 139f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.
- TAYLOR, L.N. **Clover science and technology.** Wisconsin: Taylor, 1985. 616 p. (Series Agronomy, v.25)
- TAYLOR, N.; SMITH, R.R. Red Clover. In: BARNES, R.F.; DARRELL, A.M.; NELSON, C. J. **An introduction to grass agriculture.** Iowa: Iowa University Press, 1995. p. 217-226.
- TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; KAGEYAMA, P.Y. Caracterização da variabilidade isoenzimática de *Mimosa scabrella* Benth (Bracatinga). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.18, n.3, p.270, 1995. (Resumo)
- VALIM-LABRES, M.E. **Variabilidade intra-específica em *Bipolaris sorokiana*, Análise Morfológica, Isoenzimática e de Patogenicidade.** 1996. 90f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.
- VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. In: TANSKEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding: Part A.** Amsterdam: Elsevier, 1983. p.469-515.
- ZOHARY, M. Origins and Evolution in the Genus *Trifolium*. **Botanical Notiser**, Lund, v.125, n.4, p.501-511, 1972.
- ZOHARY, M.; HELLER, D. **The genus *Trifolium* L.** Jerusalem: Israel Academy of Sciences and Humanities, 1984. 606p.
- WEEDEN, N.F; GOTTLIEB, L.D. The genetics of chloroplast enzymes. **The Journal of Heredity**, Washington, v.71, n.6, p.392-396, 1980.
- WEEDEN, N.F.; WENDEL, J.F. Genetics of plant isozymes. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS P.S. **Isozymes in plant Biology.** London: Chapman e Hall, 1990. p.46-72.

- WINGE, H.; WOLLHEIM, C.; CAVALLI-MOLINA, S. *et al.* Variabilidade genética em populações nativas de erva-mate e a implantação de bancos de germoplasma. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E.A.; TARASCONI, L.C. (eds.). **Erva-mate: biologia e cultura no ConeSul**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1995.
- WILLIAMS, E.G. Hybrids between *Trifolium ambiguum* and *Trifolium hybridum* obtained with the aid of embryo culture. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v.18, n.2, p.215-220, 1980.
- WILLIAMS, E.G.; VERRY, I. M. A partially fertile hybrid between *Trifolium repens* and *Trifolium ambiguum*. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v.19, n.1, p.1-7, 1981.
- WOODFIELD, D.R.; CARADUS, J.R.. Genetic Improvement in white clover representing six decades of plant breeding. **Crop Science**, Madison, v.34, n.5, p.1205-1213, set-oct1994.

7. APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Lista do material obtido para germinação

Espécie	Acesso	Origem / Remetente	Fornecedor no Brasil **	Ano
<i>T. incarnatum</i> 1	Imigrantes Italianos	EMBRAPA Bagé	EMBRAPA Bagé	---
2	Dixie	Alabama USA	Saibro 1995	1994
3	AU Robim	Alabama USA	Saibro 1995	1994
<i>T. campestris</i> 1	Lages	Lages - SC	EMBRAPA Lages -SC (4845)	1985*
<i>T. dubium</i> 1	Lages	Lages - SC	EMBRAPA Lages -SC (4570)	1983*
<i>T. polymorphum</i> 1	Viamão	Viamão - RS	Schifino 1995	nov/dez 89
2	EEA UFRGS	EEA UFRGS	Schifino 1995	94
3	CV019	Lages - SC	EMBRAPA Bagé	27/10/94
<i>T. pratense</i> 1	cv. E 116	desconhecida	Agronatura	05/95
2	El Sureño	EE - Pergamino-Argentina	EMBRAPA Lages-SC (4585)	1983*
3	Aberystwyth S123	GTZ - Inglaterra	EMBRAPA Lages-SC (4257)	1977 *
4	Aberystwyth S151	GTZ - Inglaterra	EMBRAPA Lages-SC (4256)	1977 *
5	Pales	Embrapa Bagé-França	EMBRAPA Lages-SC (4098)	1976*
6	Triel	GNIS - França	EMBRAPA Lages-SC (4244)	1977*
7	NGF-Mekra	GTZ - Alemanha	EMBRAPA Lages-SC (4199)	1977*
8	Odenwalder	GTZ - Alemanha	EMBRAPA Lages-SC (4197)	1977*
9	Olvi	GTZ - desconhecida	EMBRAPA Lages-SC (4255)	1977*
10	Poli Hungaro	GTZ - Hungria	EMBRAPA Lages-SC (4194)	1977*
11	Angeliter Elbo	GTZ - Alemanha	EMBRAPA Lages-SC (4198)	1977*
12	Levezou	GNIS - França	EMBRAPA Lages-SC (4246)	1977*
13	Tetri	GTZ- desconhecida	EMBRAPA Lages-SC (4259)	1977*

Espécie	Acesso	Remetente/ Origem	Fornecedor no Brasil **	Ano
14	EEA	EEA UFGRS	Paim 1995	1989
15	EEA 1992	EEA UFGRS	Paim 1995	Jan 1992
16	Perenta	GTZ - Alemanha	EMBRAPA Lages-SC (4195)	1977*
17	Violetta Rup	GNIS - França	EMBRAPA Lages-SC (4245)	1977*
18	Heges Hohenheimer	GTZ - Alemanha	EMBRAPA Lages-SC (4196)	1977*
19	Alpilles	Embrapa Bagé- França	EMBRAPA Lages-SC (4001)	1976*
20	Bagé P3	Potreiro 3	EMBRAPA Bagé	1994
21	Renato Kallil	Prop. Renato Kallil	EMBRAPA Bagé	07/02/9 4
22	HM.124	---	EMBRAPA Bagé	13/04/9 2
23	cv Margarato La Corunã	-Espanha	EMBRAPA Bagé	27/06/8 5
24	Trigolândia		EMBRAPA Bagé	safra94 /95
<i>T. repens</i>	BR1 Bagé	Embrapa CNPq	Paim 1995	safra 88
2	NGF - Giant	GTZ - Alemanha	EMBRAPA Lages-SC (4227)	1977*
3	Tamar	África do Sul	EMBRAPA Lages-SC (4596)	1983*
4	Nora	GTZ - desconhecida	EMBRAPA Lages-SC (4263)	1977*
5	Haifa LP 113648	WS - Austrália	EMBRAPA Lages-SC (4733)	1984*
6	Lirepa	GTZ - Alemanha	EMBRAPA Lages-SC (4262)	1977*
5	Haifa LP 113648	WS - Austrália	EMBRAPA Lages-SC (4733)	1984*
6	Lirepa	GTZ - Alemanha	EMBRAPA Lages-SC (4262)	1977*
7	Arcadia	África do Sul	EMBRAPA Lages-SC (4598)	1983*
8	Milkanova	GTZ - Alemanha	EMBRAPA Lages-SC (4229)	1977*
9	Zapican	desconhecida	Agronatura	05/95
10	Daeno	GTZ - desconhecida	EMBRAPA Lages-SC (4260)	1977*

(Continuação do APÊNDICE 1)

Espécie	Acesso	Remetente/ Origem	Fornecedor no Brasil **	Ano
11	Ladino	GTZ - Itália	EMBRAPA Lages-SC (4261)	1977*
12	Guaíba EEA	EEA UFGRS	Paim 1995	Mar. 89
13	Guaíba S1	EEA UFGRS	Paim 1995	Jan. 92
14	Jacuí	EEA UFGRS	Paim 1995	Dez 90
15	Jacuí	EEA UFGRS	Paim 1995	Jan 92
16	C 8817	DSIR Grasslands Nova Zelândia	Paim 1995	
17	BR1	EMBRAPA Bagé	EMBRAPA Bagé	safra 91
18	Caxias	EMBRAPA Bagé	EMBRAPA Bagé	05/01/8 7
19	El Lucero	EMBRAPA Bagé	EMBRAPA Bagé	safra 93/94
20	Rema	EMBRAPA Bagé - Polônia	EMBRAPA Bagé	1985
21	Haifa	Israel	EMBRAPA Bagé	04/85
22	Alda	Polônia	EMBRAPA Bagé	04/85
<i>T. resupinatum</i> 1	Schifino 1994	Fac. Agr. UFRGS	Schifino -Wittmann	1994
2	La Yapa -INTA	EE Pergaminho - Argentina	EMBRAPA Lages-SC (4587)	1983*
<i>T. riograndense</i> 1	2n = 32 ♣7	Vacaria	Schifino 1995	
2	Schifino 89		Schifino 1995	1989
3	2n = 32 ♣1	Vacaria	Schifino 1995	12 / 1982
4	2n = 32 ♣2	Vacaria	Schifino 1995	12 / 1982
5	2n = 32 ♣5	Vacaria	Schifino 1995	12 / 1982
6	cf. Identificação		Schifino 1995	1993
7	São Joaquim	EMBRAPA Lages -S. Joaquim-SC	EMBRAPA Lages -SC (4572)	1983*
8	Lages	EMBRAPA Lages -Lages - SC	EMBRAPA Lages-SC (4859)	1994*
9	Vacaria 1991	Vacaria	Paim 1991	1991
10	Barra do Ouro	Barra do Ouro, Rincão dos Kroeff	Schifino 1995	15/12/8 4

(Continuação do APÊNDICE 1)

Espécie	Acesso	Remetente/ Origem	Fornecedor no Brasil **	Ano
11	Rio fão	Schifino - Rio Fão	Schifino 1995	
12	Vacaria 91/92	Paim 91/92 - Vacaria	Schifino 1995	1991/92
13	+2n = 32	Canteiros 4	Schifino 1995	12/82
14	Vacaria	Vacaria	Schifino 1995	1991
15	2n= 32 ♣ 4 21 infloresc	Vacaria	Schifino 1995	12/82
<i>T. subterraneum</i> 1	cv. Larisa BAG-For- (BFG)	Parcela 67	EMBRAPA Bagé	18/11/85
2	cv. vermelho (BFG)	Parcela 29	EMBRAPA Bagé	23/01/87
3	cv. Mount Barker (BFG)	Parcela 43	EMBRAPA Bagé	23/01/87
4	cv. Clare (BFG)	Parcela 136	EMBRAPA Bagé	19/12/90
5	cv. Seaton Park (BFG)	Parcela 160	EMBRAPA Bagé	18/12/86
<i>T. vesiculosum</i> 1	Weber 1995	Fac. Agr. UFRGS	Weber	1995
2	Yuchi	EMBRAPA Bagé -COTRIJUI	EMBRAPA Bagé	1991
3	Yuchi	desconhecida	CRA	1994
4	Santa Tecla		EMBRAPA Bagé	1993/94

* Ano em que as sementes foram recebidas pelos órgãos fornecedores, isso para EMBRAPA Lages,

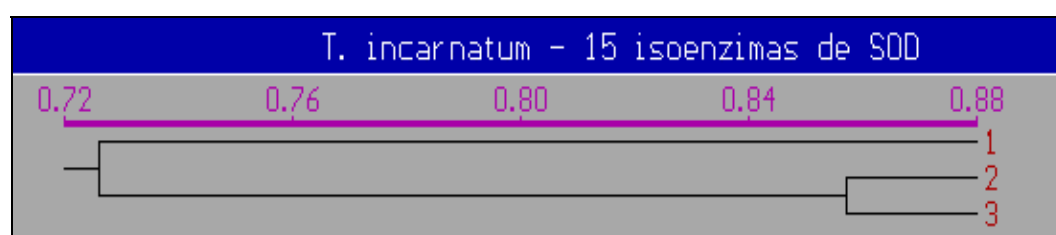
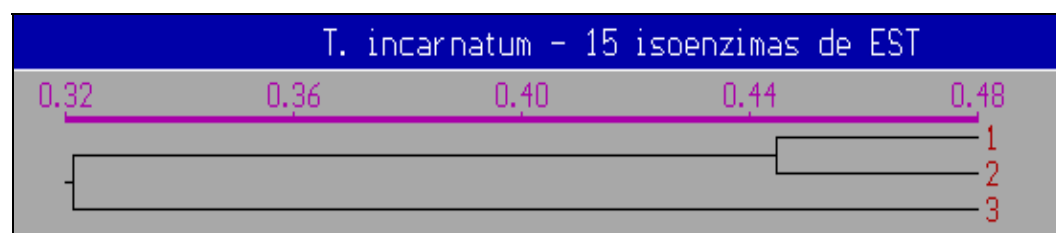
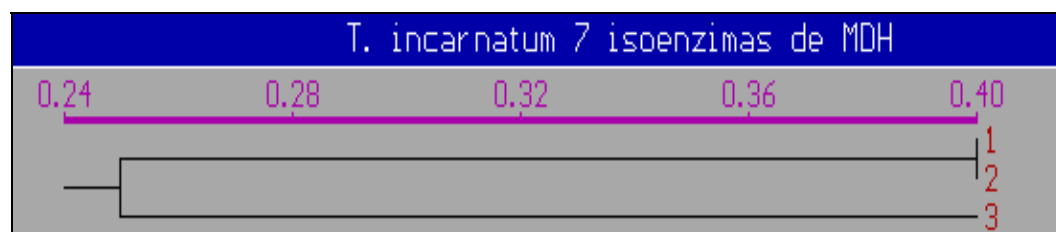
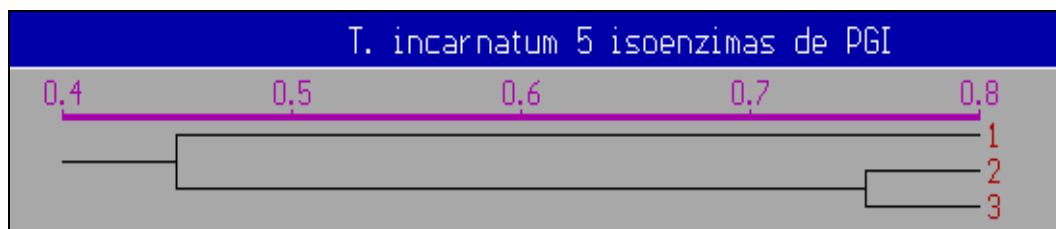
** Entre parênteses número para EMBRAPA Lages
(Continuação do APÊNDICE 1)

APÊNDICE 2 Análise do solo utilizado em copos e vasos durante o estudo

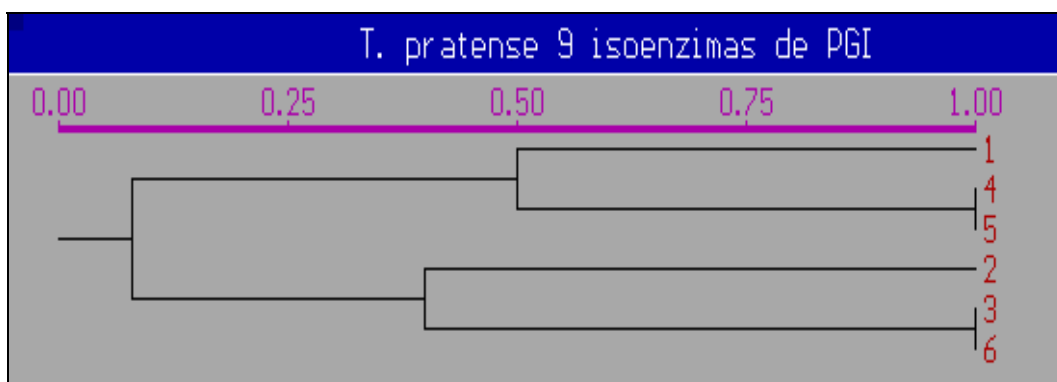
APÊNDICE 3 Análise do solo dos canteiros onde foi estabelecido *T. repens*

APÊNDICE 4 Análise do solo provenientes de vasos de *T. riograndense* que foram perdidos devido a *Rhizothonia*, (Porto, c. p. 1996)

APÊNDICE 5. Resultado da análise da variabilidade intra-específica, para cada um dos sistemas enzimáticos (PGI, MDH, EST e SOD), pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.

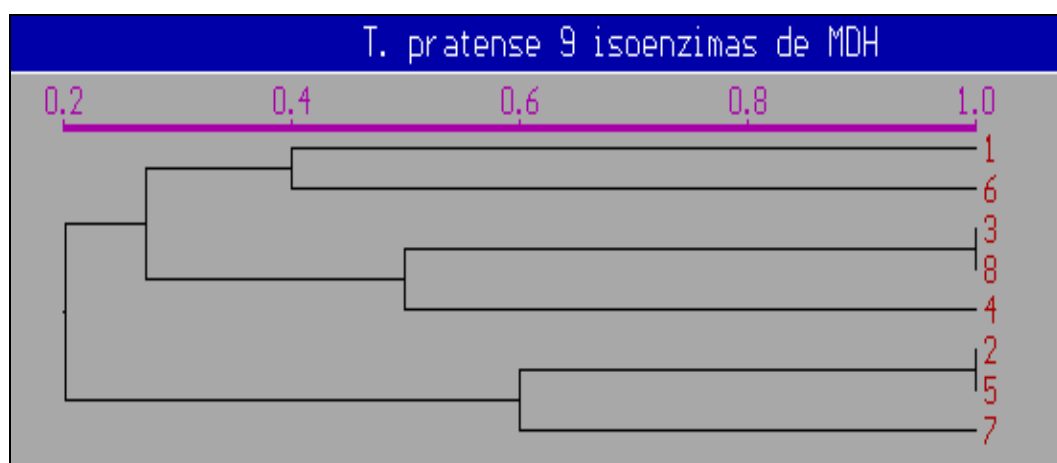


Ordenação	Acessos de <i>T. incarnatum</i>	Nº de Indivíduos
1	AU Robim	8
2	Dixie	10
3	Imigrantes Italianos	10



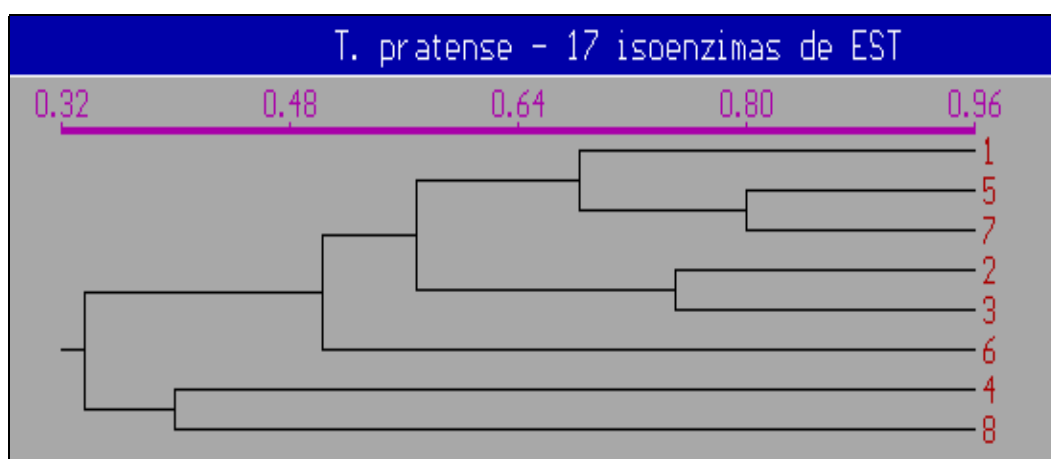
Ordenação para PGI	Acessos de <i>T. pratense</i>	Nº de Indivíduos
1	Alpilles	10
2	EEA 1992	8
3	El Sureño	7
4	Bagé P3	10
5	Renato Kallil	10
6	Violetta Rup	9

r

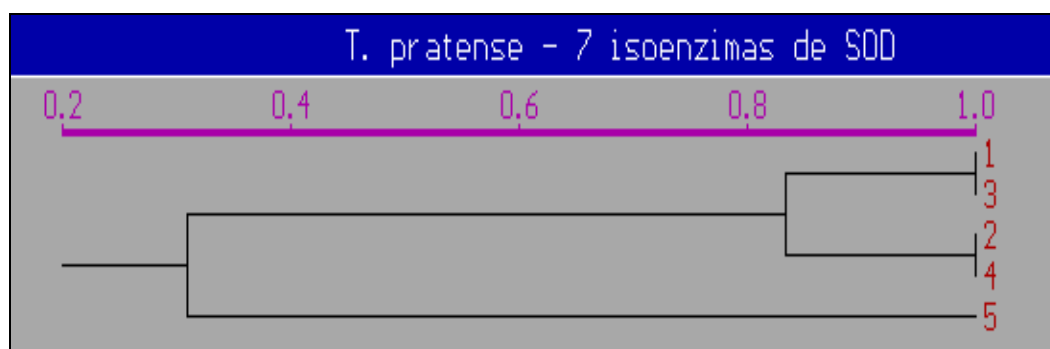


Ordenação para MDH	Acessos de <i>T. pratense</i>	Nº de Indivíduos
1	Alpilles	6
2	EEA 1992	10
3	El Sureño	6
4	E 116	10
5	Bagé P3	9
6	Renato Kallil	6
7	Trigolândia	10
8	Violetta Rup	5

(Continuação do APÊNDICE 5)

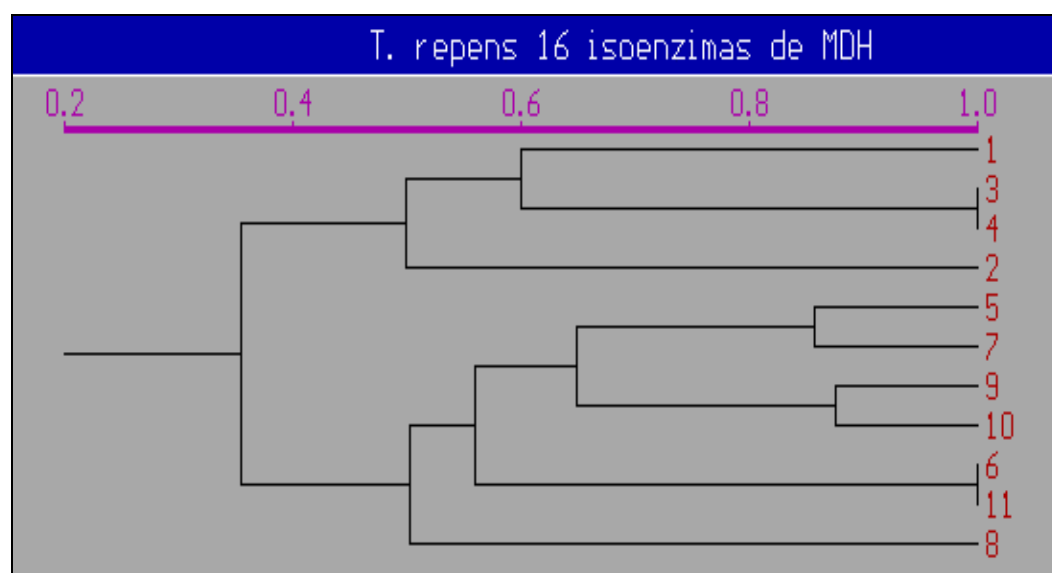
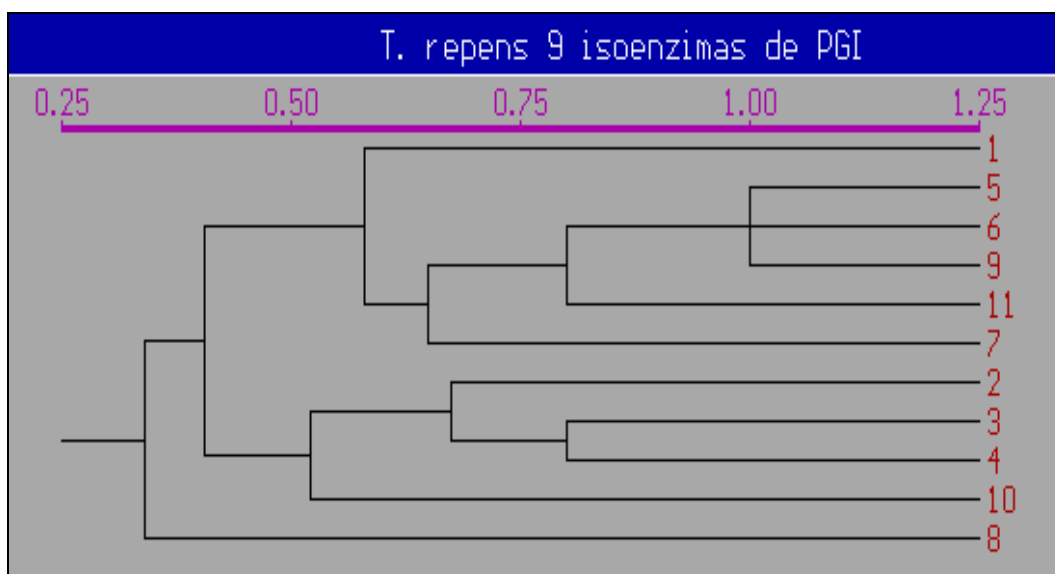


Ordenação para EST	Acessos de <i>T. pratense</i>	Nº de Indivíduos
1	Alpilles	6
2	EEA 1992	10
3	El Sureño	6
4	E 116	10
5	Bagé P3	9
6	Renato Kallil	6
7	Trigolândia	10
8	Violetta Rup	5



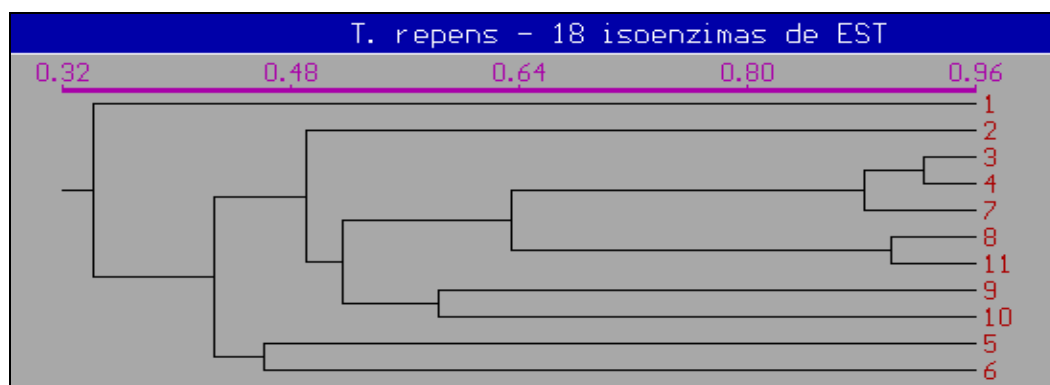
Ordenação para SOD	Acessos de <i>T. pratense</i>	Nº de Indivíduos
1	EEA 1992	10
2	El Sureño	7
3	Bagé P3	7
4	Renato Kallil	8
5	Trigolândia	10

(Continuação do APÊNDICE 5)

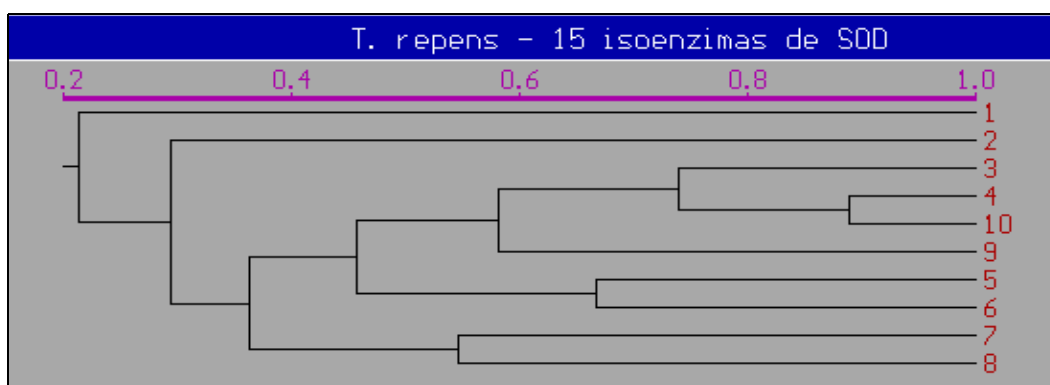


Ordenação para PGI e	Acessos de <i>T. repens</i>	Nº de indivíduos
1	BR1 Bagé	10
2	El Lucero	10
3	Guaíba FFA	10
4	Guaíba S1	10
5	Haifa	10
6	Ladino	10
7	Lirepa	10
8	Nora	10
9	Pitau	10
10	Tamar	10
11	Zapican	10

(Continuação do APÊNDICE 5)

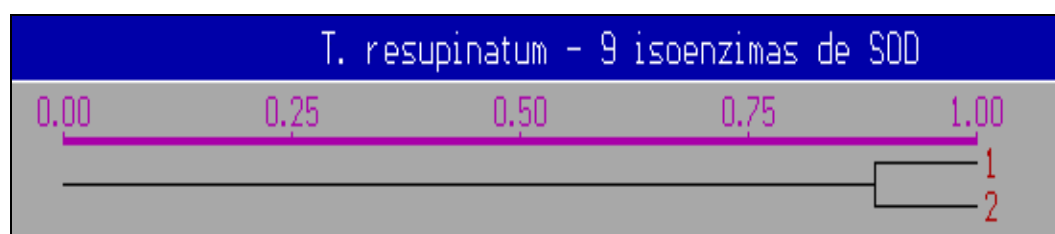
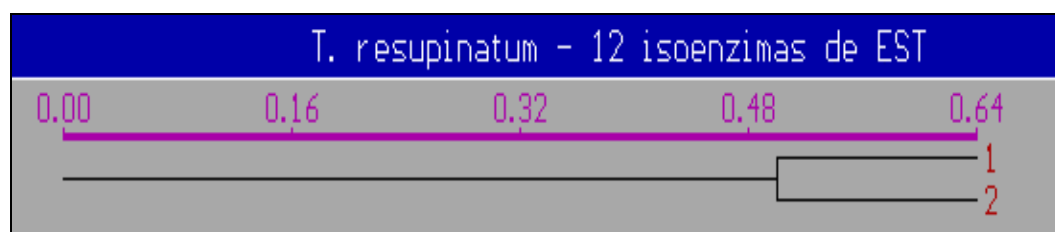
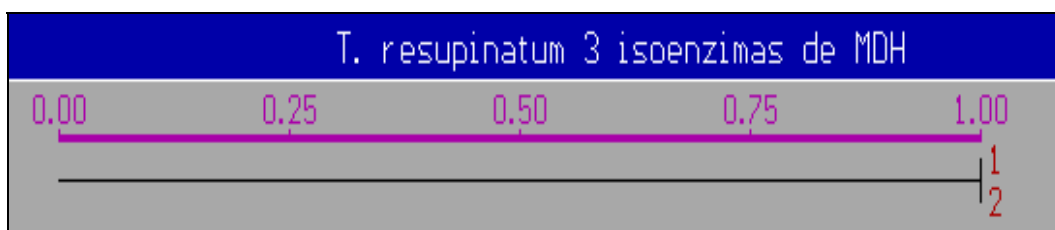
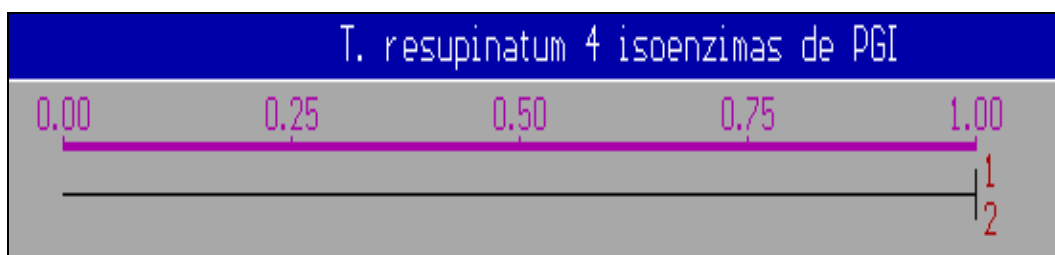


Ordenação para EST	Acessos de <i>T. repens</i>	Nº de Indivíduos
1	BR1Badé	10
2	El Lucero	10
3	Guaíba FFA	10
4	Guaíba S1	10
5	Haifa	10
6	Ladino	10
7	Lirepa	10
8	Nora	10
9	Pitau	10
10	Tamar	10
11	Zapican	10



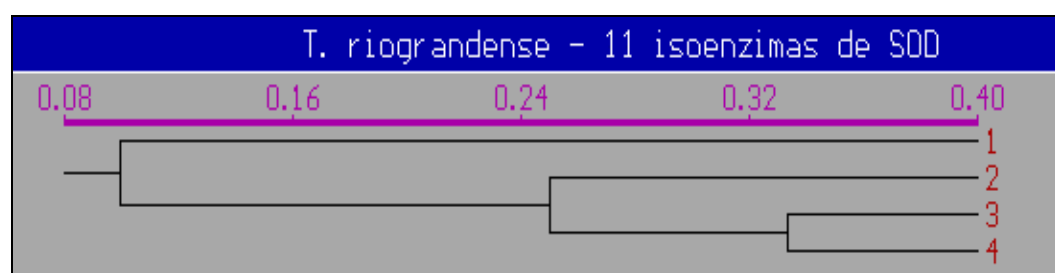
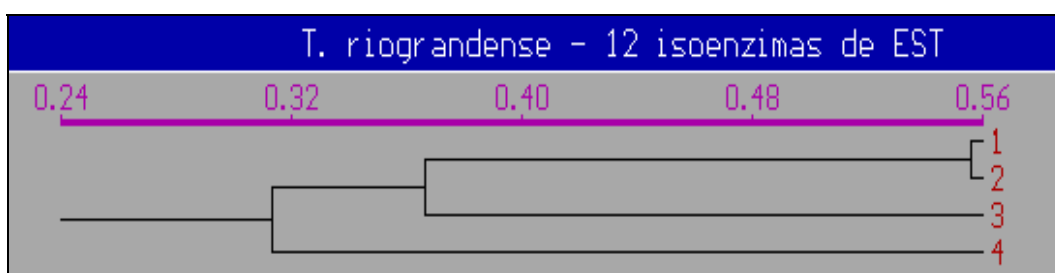
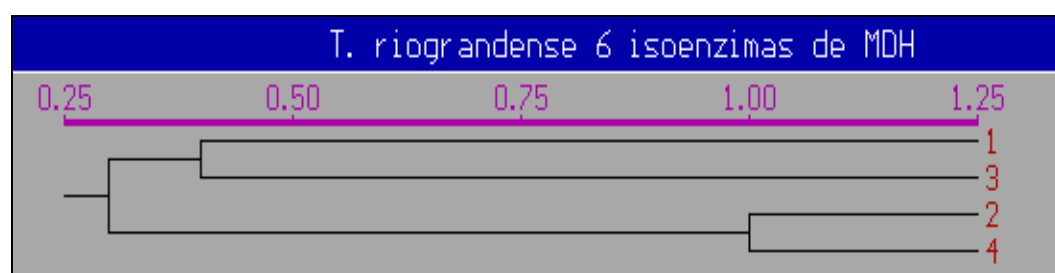
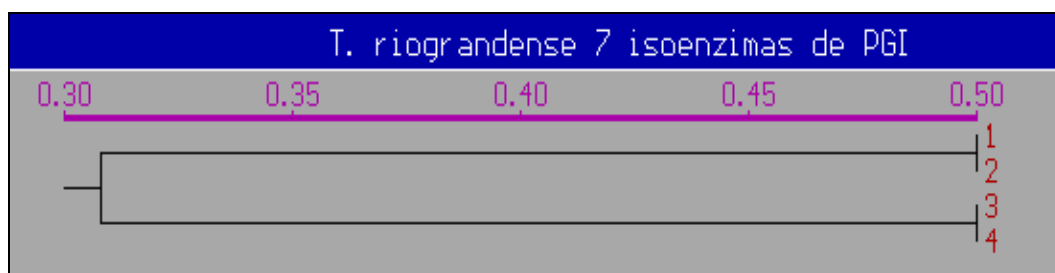
Ordenação para SOD	Acessos de <i>T. repens</i>	Nº de Indivíduos
1	BR1 88	10
2	El Lucero	10
3	Guaíba EEA	10
4	Guaíba S1	10
5	Haifa	10
6	Ladino	10
7	Lirepa	10
8	Nora	10
9	Pitau	10
10	Zapican	4

(Continuação do APÊNDICE 5)



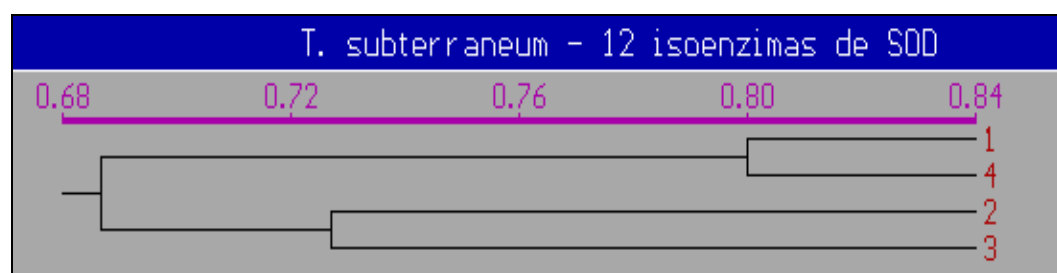
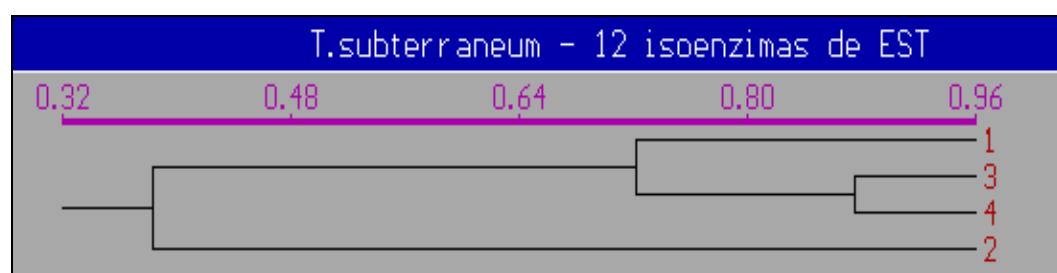
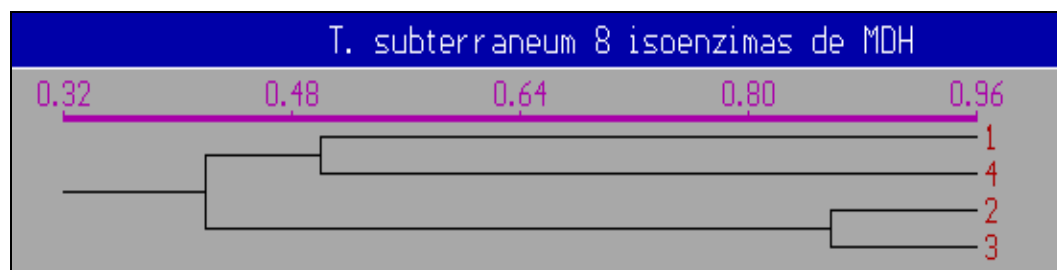
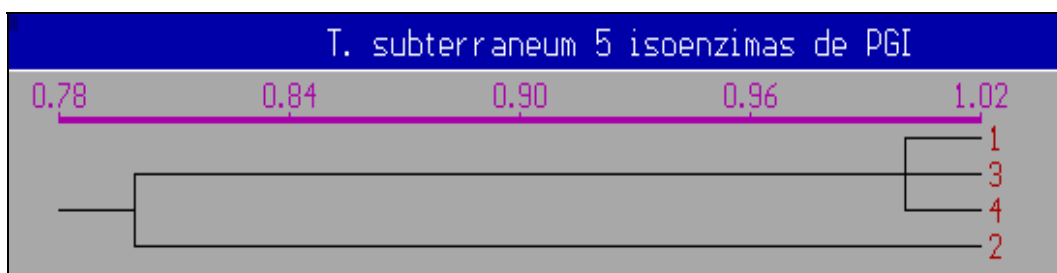
Ordenação	Acessos de <i>T. resupinatum</i>	Nº de Indivíduos
1	Schifino1994	9
2	La Yapa	10

(Continuação do APÊNDICE 5)



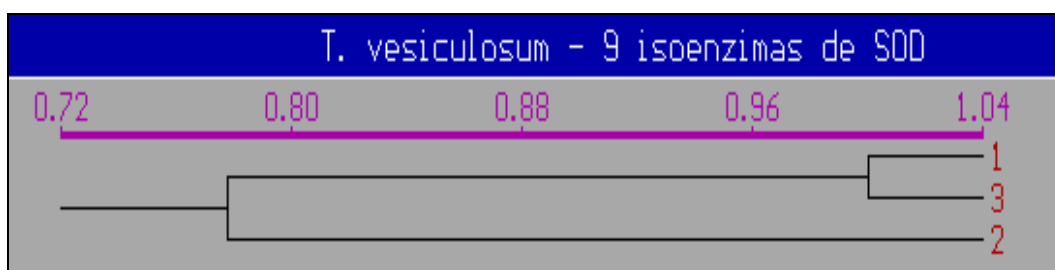
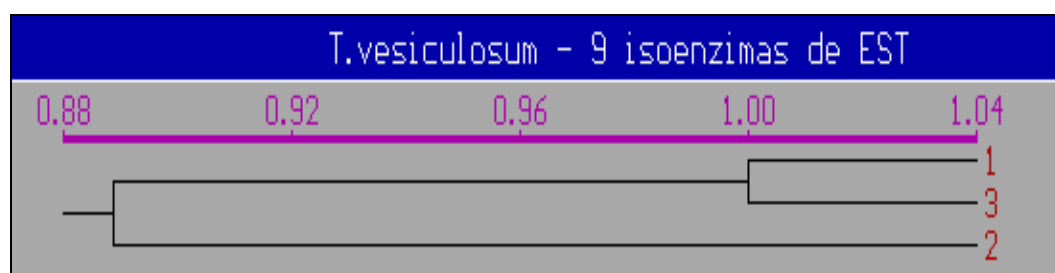
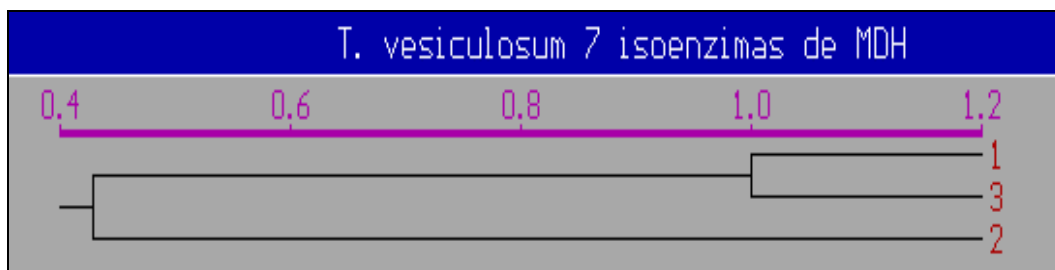
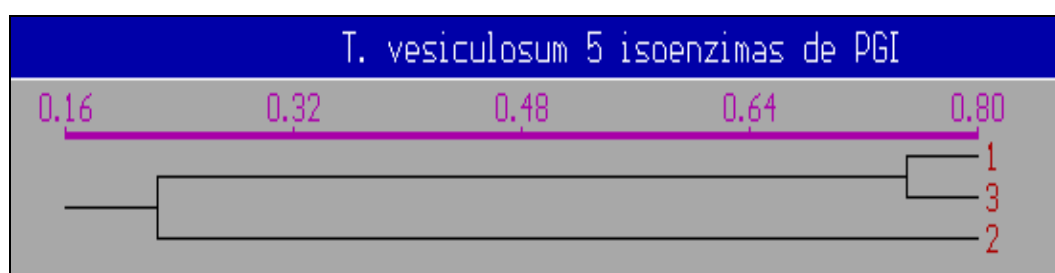
Ordenação	Acessos de <i>T. riograndense</i>	Nº de Indivíduos
1	Campos de Cima da Serra	11
2	Lages	10
3	Vacaria	9
4	São Joaquim	10

(Continuação do APÊNDICE 5)



Ordenação	Acessos <i>T. subterraneum</i>	Nº de Indivíduos
1	Larisa	10
2	Mount Barker	10
3	Seaton Park	5
4	Woogenellup	10

(Continuação do APÊNDICE 5)



Ordenação	Acessos de <i>T.vesiculosum</i>	Nº de Indivíduos
1	Santa Tecla	10
2	Weber 1995	10
3	Yuchi	10

(Continuação do APÊNDICE 5)

APÊNDICE 6 Matriz de Similaridade – Análise de agrupamentos das bandas enzimáticas de PGI

APÊNDICE 7 Matriz de Similaridade – Análise de agrupamentos das bandas enzimáticas de MDH

APÊNDICE 8 Matriz de Similaridade – Análise de agrupamentos das bandas enzimáticas de EST

APÊNDICE 9 Matriz de Similaridade – Análise de agrupamentos das bandas enzimáticas de SOD

APÊNDICE 10 Tabela com a lista de 39 bandas enzimáticas de EST incluídas na análise de agrupamentos global.

APÊNDICE 11 Tabela com a lista de 42 bandas enzimáticas de SOD incluídas na análise de agrupamentos global.

APÊNDICE 12 Matriz de similaridades da análise de agrupamentos global, que reuniu 120 bandas dos 4 sistema enzimáticos detectadas em 32 acessos de 8 espécies do gênero *Trifolium*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. O gênero <i>Trifolium</i> L.	4
2.1.1. Caracterização do gênero <i>Trifolium</i> L.	4
2.1.2. Importância forrageira	7
2.1.3. Caracterização das espécies estudadas.....	8
2.1.3.1. Seção <i>LOTOIDEAE</i> Crantz.	8
2.1.3.1.1. <i>Trifolium repens</i> L.....	8
2.1.3.1.2. <i>Trifolium riograndense</i> Burkart	11
2.1.3.1.3. <i>Trifolium polymorphum</i> Poir.....	13
2.1.3.2. Seção <i>MISTYLLUS</i> (C. Presl.) Godr.....	16
2.1.3.2.1. <i>Trifolium vesiculosum</i> Savi.....	16
2.1.3.3. Seção <i>VESICARIA</i> Crantz.	17
2.1.3.3.1. <i>Trifolium resupinatum</i> L.....	17
2.1.3.4. Seção <i>TRIFOLIUM</i>	19
2.1.3.4.1. <i>Trifolium pratense</i> L. (2n = 14, 28, 56)	19
2.1.3.4.2. <i>Trifolium incarnatum</i> L.....	21
2.1.3.5. Seção <i>TRICHOCEPHALUM</i> Koch.	24
2.1.3.5.1. <i>Trifolium subterraneum</i> L.	24
2.2. Eletroforese de isoenzimas vegetais.....	26
2.2.1. Eletroforese de zona: princípios e procedimentos.	27
2.2.2. Isoenzimas	30
2.2.3. Utilidades das isoenzimas.....	35
2.3. Sistemas enzimáticos estudados	36
2.3.1. Fosfoglicoisomerase (PGI; E. C. 5.3.1.9).....	38
2.3.2. Malato desidrogenase - NAD dependente (MDH-E.C.1.1.1.37).....	40
2.3.3. Esterases (EST – E. C. 3.1.1.1).....	44
2.3.4. Superóxido dismutase (SOD- E. C 1.15.1.1.).....	48
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.1. Material	53
3.2. Métodos	54
3.2.1. Estabelecimento e manutenção da coleção viva	54
3.2.1.1. Obtenção das sementes e germinação.....	54
3.2.1.2. Estabelecimento em casa de vegetação.....	55
3.2.1.3. Estabelecimento em canteiros	57
3.2.1.4. Manutenção da coleção viva	58
3.2.1.5. Coleta e armazenamento de sementes.....	59
3.2.2. Eletroforese de enzimas em géis de poliacrilamida	59
3.2.2.1. Pilotagem e escolha dos sistemas	60
3.2.2.2. Preparo dos géis	62
3.2.2.3. Preparo e aplicação das amostras	64
3.2.2.4. Migração	66
3.2.2.5. Coloração e revelação dos géis	67
3.2.2.6. Fixação e documentação dos géis	71

3.2.3. Medidas e cálculo das migrações relativas das bandas isoenzimáticas.....	71
3.2.4. Medidas de variabilidade genética e análises estatísticas	73
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1. Metodologia utilizada em laboratório.....	74
4.2. Análise das bandas e tratamento dos dados	77
Sistemas Enzimáticos	78
4.2.1. Fosfoglicoisomerase (PGI - E. C. 5.3.1.9).....	79
4.2.2. Malato desidrogenase NAP dependente (MDH – E. C. 1.1.1.37)	95
4.2.3. α e β Esterases (EST; E. C. 3.1.1.).....	108
4.2.4. Superóxido dismutase (SOD - E. C. 1.15.1.1).....	121
4.3. Análises inter-específicas para sistemas enzimáticos individualizados e reunindo os quatro sistemas.	134
4.3.1. Análise inter-específica ao nível de cada sistema enzimático.....	134
4.3.1.1. Análise inter-específica para PGI	134
4.3.1.2. Análise para MDH	136
4.3.1.3. Análise inter-específica para EST	138
4.3.1.4. Análise inter-específica para SOD	140
4.3.2. Análise inter-específica reunindo os quatro sistemas enzimáticos .	142
5. CONCLUSÕES	148
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
7. APÊNDICES	160

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Lista dos acessos estabelecidos em casa de vegetação e canteiros do DPFA - UFRGS e que foram incluídos na análise de isoenzimas de PGI, MDH, EST e SOD (1995-1997).	61
TABELA 2 – Variabilidade isoenzimática detectada em oito espécies de <i>Trifolium</i>	78
TABELA 3. Listagem das Frequências de ocorrência (f) de 16 isoenzimas de PGI, detectadas em 34 acessos do gênero <i>Trifolium</i> , incluídas nas análises intra e inter-específica e global, que reuniu os quatro sistemas enzimáticos....	84
TABELA 4. Listagem das frequências de ocorrência de 23 isoenzimas de MDH, detectadas em 36 acessos de <i>Trifolium</i> , incluídas nas análises intra e inter-específica de MDH e na análise global.	96
TABELA 5. Listagem das frequências de ocorrência (f) de 64 isoenzimas de EST, incluídas nas análises intra-específica deste sistema.	111
TABELA 6. Listagem das frequências de ocorrência (f) de 46 isoenzimas de SOD incluídas na análise intra-específica de oito espécies e 32 acessos do gênero <i>Trifolium</i>	125

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Detalhe de inflorescências de <i>Trifolium repens</i> , visitado por abelha (<i>Apis sp</i>) e de <i>Trifolium pratense</i> , nos canteiros demonstrativos do DPFA - UFRGS.	10
FIGURA 2a. Indivíduo de <i>Trifolium riograndense</i> na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	12
FIGURA 2b. Inflorescência de <i>Trifolium riograndense</i> na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	12
FIGURA 3a. Inflorescência de <i>Trifolium polymorphum</i> M1370 na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	15
FIGURA 3b. Aspecto de <i>Trifolium polymorphum</i> M1370 na casa de vegetação, DPFA-UFRGS, este material foi bienal.	15
FIGURA 4. Inflorescências de <i>Trifolium resupinatum</i> na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	18
FIGURA 5. Aspecto geral dos acessos de <i>Trifolium incarnatum</i> na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	22
FIGURA 6. Detalhe de inflorescências e folhas de um indivíduo de <i>Trifolium incarnatum</i> da cultivar AU Robin, na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	23
FIGURA 7a. Inflorescência de <i>Trifolium subterraneum</i> na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	25
FIGURA 7b. Aspecto de <i>T. subterraneum</i> na casa de vegetação, DPFA-UFRGS.	25
FIGURA 8. Aspecto geral de acessos de <i>Trifolium riograndense</i> (no centro) e de <i>Trifolium pratense</i> (nos cantos direito e esquerdo), na casa de vegetação do DPFA-UFRGS.	56
FIGURA 9a. Gel para avaliação de isoenzimas de PGI, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 6 e 17 do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino) as demais amostras são indivíduos da cv. Yuchi de <i>T. vesiculosum</i> , onde são observadas as bandas MR-0.28, MR-0.25 e MR-0.22.	80
FIGURA 9b. Gel para avaliação de isoenzimas de PGI, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 8, 17 e 24 do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino) as demais amostras são indivíduos do acesso Weber 1995 de <i>T. vesiculosum</i> , onde podem ser vistas as bandas MR-0.30 e MR-0.22.	80
FIGURA 10. Padrões de PGI para as oito espécies do gênero <i>Trifolium</i> analisadas.	81
FIGURA 11. Padrões de <i>Trifolium incarnatum</i> em PGI.	83
FIGURA 12. Padrões de <i>Trifolium polymorphum</i> em PGI.	86
FIGURA 13. Padrões de <i>Trifolium pratense</i> em PGI.	87
FIGURA 14. Padrões de <i>Trifolium repens</i> em PGI.	89
FIGURA 15. Padrões de <i>Trifolium resupinatum</i> em PGI.	91
FIGURA 16. Padrões de <i>Trifolium riograndense</i> em PGI.	92
FIGURA 17. Padrões de <i>Trifolium subterraneum</i> em PGI.	93
FIGURA 18. Padrões de <i>Trifolium vesiculosum</i> em PGI.	94
FIGURA 20a. Gel para avaliação de isoenzimas de MDH, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 8, 13 e 24 do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv.	

Ladino). As demais amostras são de <i>T. repens</i> cultivar Haifa (amostras 2 a 12) e Guaíba S1 (amostras 14 a 23).....	99
FIGURA 20b. Gel para avaliação de isoenzimas de MDH, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 7 e 13 do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino). As demais amostras são de <i>T. repens</i> cv. Zapican. Estas cvs. apresentaram o mesmo padrão de bandas para MDH, podendo ser observadas as bandas MR-0.34, MR-0.31, MR-0.27, MR-0.23, MR-0.14, MR-0.11 e MR-0.09.	99
FIGURA 21. Padrões de <i>Trifolium incarnatum</i> em MDH.....	100
FIGURA 22. Padrões de <i>Trifolium polymorphum</i> em MDH.....	100
FIGURA 23. Padrões de <i>Trifolium pratense</i> em MDH.....	101
FIGURA 24. Padrões de <i>Trifolium repens</i> em MDH.....	102
FIGURA 25. Padrões de <i>Trifolium resupinatum</i> em MDH.....	104
FIGURA 26. Padrões de <i>Trifolium riograndense</i> em MDH.....	105
FIGURA 27. Padrões de <i>Trifolium subterraneum</i> em MDH.....	106
FIGURA 28. Padrões de <i>Trifolium vesiculosum</i> em MDH.....	107
FIGURA 29. Padrões de EST para as oito espécies de <i>Trifolium</i> analisadas.....	109
FIGURA 30. Padrões de <i>Trifolium incarnatum</i> em EST.....	112
FIGURA 31. Gel para avaliação de isoenzimas de EST, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 8 e 17 do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino). O acesso Imigrantes Italianos de <i>Trifolium incarnatum</i> está representado nas amostras 2 a 12 e a cv. Woogenellup de <i>T. subterraneum</i> nas amostras 13 a 23.....	113
FIGURA 32. Padrões de <i>Trifolium polymorphum</i> em EST.....	114
FIGURA 33. Padrões de <i>Trifolium pratense</i> em EST.....	115
FIGURA 34. Padrões de <i>Trifolium repens</i> em EST.....	116
FIGURA 35. Padrões de <i>Trifolium resupinatum</i> em EST.....	117
FIGURA 36. Padrões de <i>Trifolium riograndense</i> em EST.....	118
FIGURA 37. Padrões de <i>Trifolium subterraneum</i> em EST.....	119
FIGURA 38. Padrões de <i>Trifolium vesiculosum</i> em EST.....	120
FIGURA 39. Gel para avaliação de isoenzimas de EST, da direita para a esquerda estão as amostras 1, 6, 17 e 24 do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino). As demais amostras representam dez indivíduos de <i>T. vesiculosum</i> cv. Yuchi, que foram amostrados em dois pontos consecutivos do gel.....	121
FIGURA 40a. Gel para avaliação de isoenzimas de SOD, da direita para a esquerda, as amostras 1, 7 e 13 são do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino). <i>T. riograndense</i> acesso Campos de Cima da Serra está representado nas amostras 2 a 12.....	122
FIGURA 40b. Gel para avaliação de isoenzimas de SOD, da direita para a esquerda as amostras 1, 8, 17 e 24 são do indivíduo controle (<i>T. repens</i> cv. Ladino). <i>T. vesiculosum</i> está representado pelas amostras 2 a 12 (cv. Yuchi) e amostras 13 a 23 (acesso Weber 1995). Cada acesso teve cinco indivíduos amostrados em dois pontos consecutivos do gel.....	122
FIGURA 41. Padrões de SOD para as oito espécies de <i>Trifolium</i> analisadas.....	124
FIGURA 42. Padrões de <i>Trifolium incarnatum</i> em SOD.....	126
FIGURA 43. Padrões de <i>Trifolium polymorphum</i> em SOD.....	127
FIGURA 44. Padrões de <i>Trifolium pratense</i> em SOD.....	128
FIGURA 45. Padrões de <i>Trifolium repens</i> em SOD.....	129

FIGURA 46. Padrões de <i>Trifolium resupinatum</i> em SOD	130
FIGURA 47. Padrões de <i>Trifolium riograndense</i> em SOD	131
FIGURA 48. Padrões de <i>Trifolium subterraneum</i> em SOD	132
FIGURA 49. Padrões de <i>Trifolium vesiculosum</i> em SOD	133
FIGURA 50. Resultado da análise da variabilidade, ao nível do sistema enzimático de PGI e reunindo 34 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.	135
FIGURA 51. Resultado da análise da variabilidade, ao nível do sistema enzimático de MDH e reunindo 36 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.	137
FIGURA 52. Resultado da análise da variabilidade, ao nível do sistema enzimático de EST e reunindo 36 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.	139
FIGURA 53. Resultado da análise da variabilidade, ao nível do sistema enzimático de SOD e reunindo 32 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.	141
FIGURA 54. Resultado da análise da variabilidade, reunindo os quatro sistemas enzimáticos (PGI, MDH, EST e SOD) e 34 acessos, pelo método de agrupamentos pela média. Para o cálculo da similaridade de Jaccard e construção do fenograma foi utilizado o NTSYS-PC.	144