



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

**CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA DE CLONES
DE AZEVINHO (*Ilex aquifolium* L.)**

ENG^a DE PRODUÇÃO FLORESTAL

Relatório do Trabalho de Fim de Curso

Heliodoro Maurício Nuno



CASTELO BRANCO

1997

ÍNDICE

Resumo	iv
Abstract	v
Abreviaturas	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Quadros	ix
A. INTRODUÇÃO	2
I - O azevinho	2
1 - Considerações gerais acerca da espécie	2
1.1 - Caracterização botânica	2
1.2 - Área de distribuição, valor ecológico e económico	3
II - As isoenzimas na caracterização de material vegetal	6
1 - Considerações gerais	6
2 - Características das isoenzimas	8
3 - Interpretação genética dos zimogramas	9
4 - Marcadores genéticos e estudo de características de interesse florestal	12
5 - As isoenzimas na identificação varietal	14
5.1 - Estabilidade ambiental	15
5.2 - Variação intervarietal	15
5.3 - Variação intravarietal	16
6 - Factores laboratoriais afectantes dos resultados	17
7 - Isoenzimas no género <i>Ilex</i>	17
III - Electroforese	18
1 - Electroforese de zona contínua (CZE)	19
2 - Electroforese de zona em tampão descontínuo (MZE)	20
3 - Focagem isoelectrica (IEF)	21
IV - Objectivos do trabalho	22

B. MATERIAL E MÉTODOS	24
I - Materiais	24
1 - Material biológico	24
2 - Equipamento	24
3 - Reagentes	24
II - Métodos	25
1- Extração das isoenzimas	25
2 - Electroforese de zona em tampão descontínuo	26
2.1 - Electroforese em sistema horizontal	26
2.2 - Electroforese em sistema vertical (sistema convencional)	28
2.2.1- Preparação do gel de poliacrilamida	28
2.2.2- Preparação das amostras proteicas	28
2.2.3- Deposição das amostras e migração electroforética	29
3 - Focagem isoelectrica	29
4 - Detecção das isoenzimas	30
5 - Fixação e preservação dos géis	31
C. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
I - Determinação e optimização das condições experimentais	34
1 - Electroforese em sistema horizontal	36
1.1 - Álcool desidrogenase, chiquimato desidrogenase, fosfatase ácida, glutamato desidrogenase e malato desidrogenase	36
1.2 - Peroxidase	36
1.3 - Esterase	37
2 - Electroforese em sistema vertical (sistema convencional)	37
2.1 - Peroxidase	37
2.2 - Esterase	38
2.3 - Álcool desidrogenase, chiquimato desidrogenase, fosfatase ácida, glicerol-3-fosfato desidrogenase, glucose-6-fosfato desidrogenase, glutamato desidrogenase e malato desidrogenase	39
2.4 - Nitrato de prata	39

II - Detecção de polimorfismos isoenzimáticos	39
1 - Electroforese em sistema horizontal	41
1.1 - Esterase	41
1.1.1 - Folha	41
1.2 - Peroxidase	44
1.2.1 - Folha	44
1.2.2 - Caule	46
2 - Electroforese em sistema vertical (sistema convencional)	48
2.1 - Esterase	48
2.1.1 - Folha	48
2.1.2 - Caule	49
2.2 - Peroxidase	52
2.2.1 - Folha	52
2.2.2 - Caule	53
III - Detecção de polimorfismos com coloração com nitrato de prata	56
D. CONCLUSÕES	59
E. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
F. ANEXOS	

RESUMO

Com este trabalho pretendeu-se encontrar polimorfismos, por electroforese de isoenzimas, que permitam identificar 24 clones e 2 cultivares de azevinho (*Ilex aquifolium* L.), nomeadamente as cultivares “Ferox aurea” e “Aureo marginata”. Os zimogramas foram obtidos por dois tipos de electroforese, a electroforese de zona em tampão descontínuo, na qual se utilizou a electroforese em sistema horizontal e a electroforese em sistema vertical (sistema convencional), em gel de poliacrilamida e a focagem isoelectrica. Utilizaram-se extractos de tecidos de caules (tecidos exteriores ao cambio vascular), retirados por incisão anelar e folhas com alguns meses de idade.

As análises foram realizadas para os sistemas enzimáticos: álcool desidrogenase (ADH), chiquimato desidrogenase (SKD), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH), glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutamato desidrogenase (GDH), malato desidrogenase (MDH) e peroxidase (PRX). Apenas se conseguiram obter resultados satisfatórios com os sistemas enzimáticos da esterase (EST) e da peroxidase (PRX), a partir dos quais foi possível distinguir e identificar todos os clones e cultivares estudados.

Com a coloração com o nitrato de prata (detecção de polimorfismos através da proteína total) foi possível distinguir e identificar a cultivar “Ferox aurea” relativamente à cultivar “Aureo marginata” e aos clones 8, 9, 10, 12, 26 e 27, que apresentam o mesmo padrão de bandas.

Verificou-se que o padrão isoenzimático varia com o estado de desenvolvimento do material recolhido, e também de acordo com o período do ano.

Dos sistemas enzimáticos estudados a peroxidase foi aquela que apresentou maiores vantagens, já que permite obter maior discriminação entre os clones e cultivares.