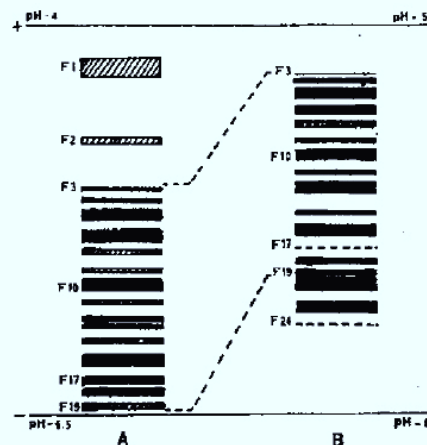


Caracterização isoenzimática de material vegetal

Carlos Manuel Gaspar dos Reis (*)



1. Introdução

As metodologias normalmente utilizadas para distinguir e caracterizar o material vegetal baseiam-se, fundamentalmente, nas diferenças fenotípicas observadas nas variedades e nas cultivares estudadas. Apesar deste tipo de avaliação fenotípica ser muito importante, é difícil fazer a interpretação dos dados ao nível genético já que a maioria das características estudadas são de natureza poligénica, além da sua expressão ser marcadamente mediada por interações com o ambiente.

Pode-se tentar realizar a distinção de genótipos pela comparação dos seus cromatogramas quando se separam moléculas como flavonóides e antocianinas. Contudo, na cromatografia, à semelhança do que acontece nos descritores morfológicos, é difícil estabelecer uma relação directa entre fenótipo e genótipo pois a maioria desses compostos resulta de complexos processos metabólicos.

De entre os métodos bioquímicos, a electroforese de isoenzimas constitui um instrumento analítico de grande eficácia e precisão, constituindo estas óptimos "marcadores moleculares" em estudos de identificação e caracterização de genótipos. As diferenças existentes entre os genes que codificam para os polipéptidos traduzem-se, na electroforese, por variações na mobilidade das enzimas, permitindo o estudo destas o estabelecimento de uma directa relação entre fenótipo e genótipo.

2. Características das isoenzimas

As isoenzimas são diferentes formas moleculares de uma enzima, presentes no mesmo indivíduo, que compartilham um substrato comum e catalisam a mesma reacção, mas que diferem na mobilidade electroforética (Markert e Moller, 1959).

As isoenzimas especificadas por alelos do mesmo locus foram designadas por aloenzimas (Prakash *et al.*, 1969, citados por Wendel e Weeden, 1990), reservando-se o termo isoenzima para designar as formas que se devem à expressão de genes estruturais de diferentes loci. Contudo, o termo isoenzimas é utilizado normalmente em sentido lato, englobando tanto as aloenzimas como as isoenzimas no sentido restrito do termo.

A ocorrência das isoenzimas poderá ser explicada, em termos genéticos, como o produto de mutações a nível do DNA que se irão reflectir na composição e na sequência dos aminoácidos das cadeias polipeptídicas.

As mutações podem acarretar diferenças significativas nas cargas iónicas das cadeias polipeptídicas e, ainda, nas suas dimensões e formas. Quando as cadeias polipeptídicas são submetidas a uma diferença de potencial num gel semiporoso de amido ou poliácrilamida, verificar-se-ão distintas velocidades de migração, não só pelo efeito eléctrico como também pela crivagem molecular

imposta pela estrutura do gel. Estes efeitos irão produzir, idealmente, a separação das isoenzimas presentes na amostra em zonas discretas de actividade enzimática (bandas) ao longo do gel, cuja natureza matricial irá manter a posição da molécula proteica após o final da electroforese. A subsequente imersão do gel numa solução que contém um substrato específico para a enzima que se pretende estudar e um corante que precipita ao nível do produto da reacção, permitirá revelar *in situ* as diferentes bandas da mesma enzima. O padrão de bandas observadas no gel para cada amostra é designado de **zimograma**.

Assim, uma vez que a sequência de aminoácidos de uma proteína é primariamente determinada pela sequência de nucleótidos de um gene estrutural, a análise da estrutura de uma proteína por electroforese é, numa primeira aproximação, uma análise do respectivo gene codificante (Gottlieb, 1977).

Basicamente, são três os mecanismos de produção das isoenzimas (Weeden, 1983; Castro, 1989):

- i) mutação num dado *locus* com a formação de diferentes alelos;
- ii) duplicação génica num cromossoma homólogo ou num não-homólogo. Este fenómeno poderá resultar de diferentes processos, como o entrecruzamento desigual entre cromossomas homólogos, a ocorrência de translocações recíprocas entre cromossomas não homólogos ou, mais simplesmente, por poliploidização. Subsequente divergência do gene original pela ocorrência de mutações no(s) gene(s) duplicado(s) poderão conduzir a novas formas da mesma enzima, codificadas por diferentes *loci*;
- iii) ocorrência de modificações das proteínas após a tradução, nomeadamente por clivagem da cadeia polipeptídica, ligação a outras moléculas, como coenzimas, grupos fosfato, etc., e agregação de cadeias polipeptídicas em unidades multiméricas.

Poder-se-á tentar explicar a ocorrência de múltiplas formas moleculares de uma enzima num organismo pelo facto de, a mesma reacção química ocorrer em diferentes compartimentos subcelulares, com diferentes condições de pH e de concentração de metabolitos, sendo necessário, por isso, diferentes isoenzimas para uma catálise eficiente (Gottlieb, 1982).

Alguns sistemas enzimáticos, como as esterases, aminopeptidases e peroxidases, apresentam frequentemente, no mesmo compartimento subcelular, três ou mais isoenzimas, pelo que uma outra hipótese avançada para explicar a abundância de isoenzimas observável é a variação na especificidade do substrato. Contudo, nem sempre se consegue demonstrar a existência de uma divergência funcional entre diferentes isoenzimas, pelo que não se sabe muito bem se estas desempenham realmente um papel importante na fisiologia celular, ou se não serão mais do que proteínas redundantes (Weeden e Wendel, 1990).

Quando comparadas com os restantes "marcadores moleculares", as isoenzimas apresentam algumas propriedades que as tornam extremamente interessantes, das quais salientamos:

- i) as aloenzimas são tipicamente codificadas por alelos de expressão codominante e são herdadas de acordo com as proporções mendelianas, o que permite a distinção fácil entre genótipos homocigóticos e heterocigóticos¹;
- ii) as isoenzimas não apresentam interacções de natureza epistática e pleiotrópica e não são influenciadas, salvo raras excepções, por factores ambientais;
- iii) é possível estudar um elevado número de *loci* utilizando pequenas quantidades de material biológico.

Como qualquer método analítico a electroforese de isoenzimas apresenta algumas limitações. Com efeito, para além de permitirem cobrir apenas uma pequena fracção do genoma dos indivíduos estudados, as isoenzimas podem não manifestar toda a variabilidade genética existente nos genes estruturais que as codificam. Em primeiro lugar, a electroforese de isoenzimas não permite detectar todas as diferenças existentes ao nível genético, devido à redundância do código genético e ao facto de nem todas as substituições de aminoácidos alterarem a mobilidade electroforética. Segundo, os genes eucariotas possuem sequências de DNA que não são traduzidas. Por último, este método não permite identificar qual a origem genética de enzimas com diferentes mobilidades electroforéticas que poderão ser consequentes de substituições, adições ou deleções de aminoácidos (Crick, 1979; Simpson e Withers, 1986; May, 1992).

3. Interpretação genética dos zimogramas

O número de bandas de um zimograma depende do número de genes codificantes, dos seus estados alélicos (homocigótico ou heterocigótico), da estrutura quaternária da enzima e da sua compartimentação subcelular. Um outro factor a ter em conta é o grau de ploidia, que poderá reflectir-se não só no acréscimo do número de bandas, como também na variação da sua espessura e intensidade de coloração (Castro, 1989).

A metodologia utilizada no estudo da hereditariedade das isoenzimas é, em tudo semelhante à seguida para os caracteres mendelianos monogénicos, embora, relativamente a diversos marcadores morfológicos, as isoenzimas apresentem a vantagem de estarem sob o controlo de alelos codominantes.

As proteínas identificadas por electroforese podem ser formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas, designando-se por monoméricas se constituídas apenas por uma cadeia polipeptídica, diméricas se formadas por duas subunidades, cada uma consistindo numa cadeia polipeptídica simples, tetraméricas se formadas por quatro subunidades, etc.

No caso mais simples, uma enzima monomérica codificada por um *locus* (isto é, monogénica) com dois alelos poderá originar o aparecimento de indivíduos com três fenótipos distintos (Fig. 1): bandas simples nos dois tipos de homocigóticos e duas bandas no

heterozigótico, ambas resultantes da presença de dois diferentes produtos proteicos codificados pelos dois alelos.

Nas enzimas multiméricas os produtos génicos dos *loci* combinam-se ao acaso para produzir a forma enzimática activa. Assim, para uma enzima dimérica, codificada por um *locus* com dois alelos, o fenótipo isoenzimático do heterozigótico apresentará três bandas (Fig. 1).

As bandas formadas por subunidades polipeptídicas diferentes, são designadas bandas heteroméricas. No caso das enzimas monoméricas não se forma naturalmente uma banda heteromérica. Nas enzimas diméricas, codificadas por um *locus*, o heterozigótico irá produzir uma banda heteromérica (AB) e nas tetraméricas o heterozigótico irá produzir três bandas heteroméricas: AAAB, AABB e ABBB (Fig. 1).

Da associação casual das subunidades em formas multiméricas resultam diferentes tipos de moléculas que formam distintas bandas com diferente intensidade de coloração e/ou largura. Do desenvolvimento da expressão binomial $(A+B)^n$, onde A e B representam os polipéptidos especificados pelos alelos *a* e *b*, e *n* o número de polipéptidos da enzima activa, é possível calcular o número de bandas expectável, as proporções isoenzimáticas relativas e a constituição em subunidades de cada banda. Assim, no caso de uma enzima tetramérica codificada por um *locus*, com os alelos *a* e *b* em iguais proporções, teremos:

$$(A+B)^4 = A^4 + 4A^3B + 6A^2B^2 + 4AB^3 + B^4$$

que traduz um perfil de cinco bandas nas proporções relativas de 1:4:6:4:1 (Fig. 1).

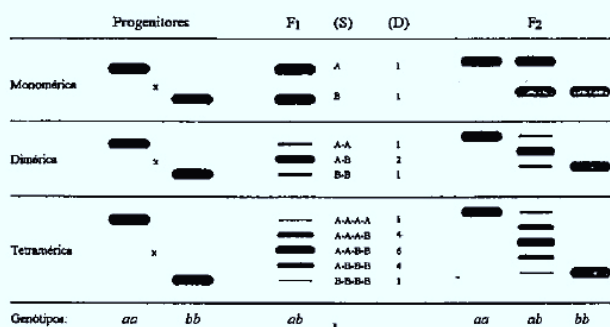


Figura 1 - Diagramas de zimogramas de enzimas monoméricas, diméricas e tetraméricas controladas por um *locus* dialélico. O alelo *a* especifica a subunidade polipeptídica A e o alelo *b* especifica a subunidade polipeptídica B (S), constituição em subunidades de cada isoenzima; (D), quantidade relativa em cada banda (adaptado de Wendel e Weeden, 1990).

Nos casos em que as enzimas são codificadas por mais de um gene (isto é, policistrónicas) e estando localizadas no mesmo compartimento subcelular, se os polipéptidos especificados pelos alelos se associam de forma casual em produtos multiméricos, será possível o aparecimento de heteromultímeros de natureza intragénica.

O número de bandas (*n*) expectável num sistema multigénico depende do número de subunidades diferentes (*S*) e do número de subunidades que constituem a enzima (*Q*), podendo ser determinado através da fórmula (Shannon, 1968):

$$n = \frac{(S+Q-1)!}{(Q!)(S-1)!}$$

Assim, por exemplo, no caso de uma enzima dimérica codificada por dois *loci* heterozigóticos, da associação casual das subunidades, resultará um fenótipo composto por dez bandas.

Para além da complexidade originada pela existência de vários genes codificantes, frequentemente, torna-se difícil a interpretação dos zimogramas pela ocorrência de determinado tipo de fenómenos de origem genética e não genética (Weeden e Wendel, 1990):

- ausência de codominância;
- as bandas heterodímeras podem migrar para posições que não são intermédias das bandas homodímeras, ou mesmo, em casos excepcionais, podem migrar para uma zona exterior aos limites definidos por estas;
- ocorrência de "alelos nulos", que são variantes sem actividade enzimática²;
- ocorrência de modificações das proteínas após a tradução, originando o aparecimento de bandas adicionais;
- introdução de artefactos durante a preparação das amostras ou durante a electroforese;
- ocorrência de bandas duplas ou conjuntos de bandas ("bandas sombra" ou "bandas fantasma"), cujo comportamento genético depende, no entanto, de um único alelo.

4. Áreas de estudo

Apesar das limitações anteriormente referidas a electroforese de isoenzimas tem sido um instrumento analítico utilizado e muito útil em várias áreas de estudo, nomeadamente:

4.1. Identificação varietal

É possível detectar dois tipos de variação quando se comparam os zimogramas de diferentes indivíduos:

1) Variação intervarietal:

Os estudos de variação intervarietal baseiam-se na detecção de diferenças qualitativas e quantitativas entre zimogramas de diferentes variedades ou cultivares da mesma espécie.

Considera-se que existe variação qualitativa quando uma determinada banda isoenzimática, caracterizada pela sua taxa de migração, está presente no zimograma de uma cultivar ou variedade mas ausente no zimograma

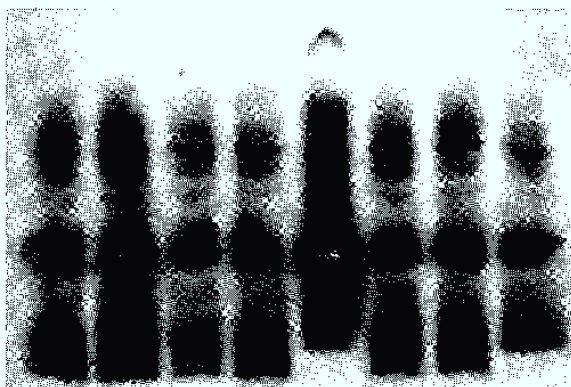


Figura 2 - Zimogramas de fosfatase ácida da folha de diferentes cultivares de *Vigna unguiculata* obtidos por focagem isoelétrica. Observam-se três zimogramas diferentes: as populações 1, 2, 3, 4, 6 e 7 possuem zimogramas idênticos, pertencendo os outros dois tipos às populações 5 e 8 (Reis, 1994).

de uma outra variedade ou cultivar. As bandas deste tipo são designadas **polimórficas**, e o seu número determina o valor de um sistema isoenzimático na identificação varietal (Fig.2).

Verifica-se variação quantitativa quando uma determinada banda presente nos zimogramas de duas cultivares ou variedades diferentes (banda monomórfica) difere pela intensidade de coloração (Fig. 3). A variação quantitativa, ao contrário da variação qualitativa, não proporciona diferenças evidentes, pelo que a sua utilização na identificação varietal tem menor interesse. Além disso, a expressão das diferenças quantitativas é normalmente afectada por variações ambientais e ontogénicas, o que dificulta a sua interpretação.

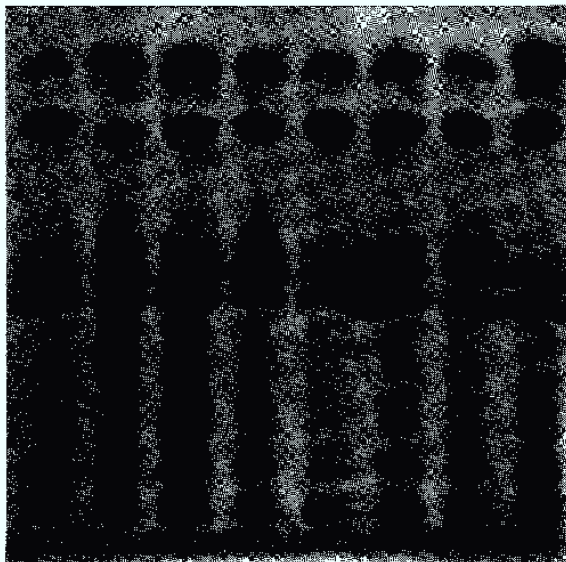


Figura 3 - Zimogramas de fosfatase ácida de cotilédones de diferentes cultivares de *Vigna unguiculata* obtidos por focagem isoelétrica. Observa-se apenas variação quantitativa (Reis, 1994).

II) Variação intravarietal:

Considera-se que existe variação intravarietal quando se observam distintos zimogramas entre indivíduos da mesma cultivar ou da mesma variedade.

Nas cultivares das espécies propagadas por via vegetativa, o fenótipo isoenzimático deverá ser extremamente uniforme e estável, pelo que não será de esperar variação intravarietal, pois tanto os genótipos homocigóticos como os heterocigóticos são estabilizados ou "congelados" por esse processo de multiplicação. Os indivíduos dessas cultivares possuem o mesmo genótipo, pelo que a sua análise não requer uma amostragem muito exaustiva.

Nas espécies autogâmicas, reproduzidas por via seminal, as cultivares, na sua maioria, são formadas por mais de um genótipo, mesmo que a selecção tenha sido conduzida com o objectivo de obter um fenótipo morfológica e fisiologicamente uniforme, pelo que é expectável alguma variabilidade intravarietal para alguns sistemas enzimáticos, embora para outros possa existir grande uniformidade.

Nas espécies alogâmicas, estando as populações em polinização livre, a heterocigosidade e a variabilidade intravarietal são elevadas. Neste caso, não interessa seleccionar pela uniformidade isoenzimática em um ou mais *loci*, devido aos efeitos adversos que esta selecção poderá ter no desempenho agronómico. Uma alternativa possível, para distinguir variedades e cultivares, é a comparação das frequências alélicas isoenzimáticas (Hayward e Medam, 1977; Nielson, 1980; Ostergaard e Nielsen, 1981; Bailey, 1983), o que pressupõe não só o conhecimento do controlo génico das isoenzimas como também o estudo de um grande número (>100) de indivíduos (Simpson e Withers, 1986). Contudo, a comparação de variedades com base nas frequências alélicas não satisfaz totalmente as exigências impostas pelos organismos legais de certificação.

Nalgumas espécies alogâmicas é possível e economicamente viável a produção de híbridos, com a exploração do vigor híbrido ou *heterosis*, resultando estes do cruzamento controlado entre linhas puras. Os padrões isoenzimáticos das linhas puras ou dos híbridos resultantes do seu cruzamento deverão ser bastante uniformes permitindo portanto aferir a pureza de lotes comerciais de semente, sendo possível detectar a contaminação por pólen estranho na geração referente à produção da semente híbrida ou, nas gerações antecedentes, referentes à produção das linhas puras.

4.2. Estudos de sistemática e evolução

Para além da identificação varietal a electroforese de isoenzimas permite investigar e clarificar outros problemas no âmbito da sistemática.

A contribuição mais importante da electroforese de isoenzimas nos estudos de sistemática vegetal relaciona-se com a possibilidade de permitir quantificar as semelhanças e diferenças genéticas existentes entre populações e *taxa*. Este tipo de estudo poder-se-á realizar pela comparação directa dos zimogramas

ou, de forma mais correcta, através do cálculo de parâmetros estatísticos (percentagem de *loci* polimórficos, número médio de alelos por *locus*, número médio de *loci* polimórficos por indivíduo, etc.), após a compreensão do controlo genético das isoenzimas.

Contudo, deve salientar-se que a divergência isoenzimática não está normalmente associada com a especiação, podendo ocorrer divergência nos *loci* isoenzimáticos não acompanhada por processos de especiação e, reciprocamente, pode verificar-se especiação sem uma concomitante divergência nos *loci* isoenzimáticos (Gottlieb, 1984). Também as diferenças de natureza morfológica que permitem reconhecer diferentes *taxa* dentro de uma espécie ocorrem frequentemente sem uma correspondente divergência isoenzimática, fenómeno bastante notório quando se comparam as espécies domesticadas com os respectivos progenitores selvagens, pelo que se considera que a selecção, para características relacionadas com a domesticação, embora possa ser responsável por rápidas alterações fenotípicas, estas não são normalmente acompanhadas por mutações nos *loci* que especificam para as enzimas (Crawford, 1990).

Embora este aspecto constitua factor limitante no que se refere à utilização da electroforese de isoenzimas em taxonomia, existem diversos trabalhos que exemplificam a sua importância na resolução de alguns problemas taxonómicos difíceis. Assim, por exemplo, Jefferies e Gottlieb (1982) estudaram duas espécies diplóides de *Salicornia* que sob o ponto de vista morfológico são quase indistinguíveis, mas que ocupam *habitats* ligeiramente diferentes (embora por vezes se encontrem juntas na natureza). Os referidos autores não detectaram variação alozimática entre os indivíduos de cada espécie nem indícios de hibridação, contudo, verificaram a existência de diferenças isoenzimáticas entre as duas espécies, suficientes para a sua consideração como *taxa* distintos.

Em organismos diplóides os dados obtidos com a electroforese de isoenzimas podem ser utilizados no estudo da importância da hibridação na formação de novas espécies. Uma vez que os alelos de um *locus* produzem diferentes aloenzimas, sendo a sua expressão codominante, é possível verificar se uma planta híbrida expressa ou não as aloenzimas características dos progenitores. No entanto, a utilização desta metodologia pressupõe que:

- i) as espécies tidas como progenitoras ainda existam;
- ii) os alelos das espécies progenitoras para as isoenzimas em estudo sejam diferentes exibindo, preferencialmente, diferenças de natureza qualitativa;
- iii) não tenha ocorrido a divergência genética nem das espécies progenitoras nem do presumível híbrido.

A hipótese de origem híbrida de uma espécie será rejeitada caso o presumível híbrido não apresente ambos os alelos específicos das espécies que são tidas como progenitoras ou, no caso em que apresente alelos que não se encontram nas espécies parentais (Crawford, 1990).

As isoenzimas constituem, também, uma ferramenta muito importante nos estudos sobre a origem dos poliplóides, permitindo realizar o enquadramento genético de uma determinada espécie como alopólíploide ou autopolíploide.

4.3. Marcadores genéticos e estudo de características de interesse agronómico

As isoenzimas são marcadores ideais para a construção de mapas genéticos dos cromossomas das espécies vegetais e algumas estão positivamente correlacionadas com determinados genótipos com valor agronómico devido à existência de ligação génica. Para algumas espécies, nomeadamente o milho (Goodman *et al.*, 1980; Goodman e Stuber, 1983; Wendel *et al.*, 1986), o tomateiro (Tanskley e Rick, 1980; Tanskley, 1983) e o trigo (Hart, 1983), estão documentados mapas extensivos de marcadores isoenzimáticos.

Os marcadores isoenzimáticos podem ser utilizados para detectar os genes desejados nas populações em segregação, com base no facto de o *locus* isoenzimático marcador identificar ou "marcar" um segmento cromossómico e permitir, o seu acompanhamento através das várias manipulações genéticas desenvolvidas no âmbito de programas de melhoramento. Segmentos cromossómicos homólogos, que possuem alelos alternativos no *locus* marcador podem ser identificados em diferentes indivíduos (ou linhas) e comparados pelos seus efeitos na expressão das características a seleccionar.

Assine, Leia e Divulgue

Agroforum

A sua Revista de Divulgação Agrária

O Desenvolvimento Rural só é possível se **Formação, Investigação, Técnicos e Agricultores** estiverem em permanente contacto

Assim, por exemplo, no tomateiro a utilização como marcador de uma aloenzima de fosfatase ácida (*Aps-1*) que está ligada a um gene para a resistência aos nemátodos (Rick e Fobes, 1974; Rick e Tanksley, 1983; citados por Simpson e Withers, 1986), permitiu avanços significativos nos trabalhos de melhoramento neste âmbito. Também Weeden e Marx (1984) demonstraram que na espécie *Pisum sativum* o gene que especifica uma forma da enzima fosfoglucomutase (*Pgm-p*) pode ser utilizado como marcador para o gene recessivo *mo*, o qual confere resistência ao vírus do mosaico amarelo do feijão.

Referências bibliográficas

- Bailey, D. C. (1983) Isozymic variation and plant breeders' rights. In: Tanksley, S. D.; Orton, T. J. (Eds) Isozymes in Plant Genetics and Breeding (pp 425-440). Elsevier, Amsterdam.
- Castro, L. F. T. (1989) Isoenzimas do *Pinus pinaster* Ait. numa Perspectiva de Aplicação ao Melhoramento Genético da Espécie. Tese de Doutoramento. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Crawford, D. J. (1990) Enzyme electrophoresis and plant systematics. In: Soltis, D. E.; Soltis, P. S. (Eds) Isozymes in Plant Biology (pp 146-164). Chapman and Hall, London.
- Crick, F. (1979) Split genes and RNA splicing. *Science*, 204:264-271.
- Goodman, M. M.; Stuber, C. W.; Newton, K.; Weissinger, H. H. (1980) Linkage relationships of 19 isozyme loci in maize. *Genetics*, 96:697-710.
- Goodman, M. M.; Stuber, C. W. (1983) Maize. In: Tanksley, S. D.; Orton, T. J. (Eds) Isozymes in Plant Genetics and Breeding (pp 1-33). Elsevier, Amsterdam.
- Gottlieb, L. D. (1977) Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gdn.*, 64:161-180.
- Gottlieb, L. D. (1982) Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science*, 216:373-380.
- Gottlieb, L. D. (1984) Electrophoretic analysis of the phylogeny of the selfing populations of *Clarkia xantiana*. *Pl. Syst. Evol.*, 147:91-102.
- Hart, G. E. (1983) Hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). In: Tanksley, S. D.; Orton, T. J. (Eds) Isozymes in Plant Genetics and Breeding (pp 35-56). Elsevier, Amsterdam.
- Hayward, J. L.; McAdam, N. J. (1977) Isoenzyme polymorphism as a measure of distinctiveness and stability in cultivars of *Lolium perenne*. *Z. Pflzücht.*, 79:59-68.
- Jefferies, R. L.; Gottlieb, L. B. (1982) Genetic differentiation of the microspecies *Salicornia europea* L. (*sensu stricto*) and *S. ramosissima* J. Woods. *New Phytol.*, 92:123-129.
- Markert, C. L.; Moller, F. (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, autogene and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 45:753-763.
- May, B. (1992). Starch gel electrophoresis of allozymes. In: Hoelzel, A. R. (Ed.) Molecular Genetic Analysis of Populations, a Practical Approach (pp 1-27). Oxford University Press, New York.
- Nielson, G. (1980) Identification of all genotypes in tetraploid ryegrass (*Lolium* spp.) segregating for four alleles in a PGI-enzyme locus. *Hereditas*, 92:49-52.
- Ostergaard, H.; Nielsen, G. (1981) Cultivar identification by means of isozymes. I. Genotypic survey of the PGI-2 locus in tetraploid ryegrass. *Z. Pflzücht.*, 87:121-132.
- Reis, C. M. G. (1994) Caracterização Isoenzimática de Populações de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- Shannon, L. M. (1968) Plant isoenzymes. *Ann. Rev. Pl. Physiol.*, 19:187-210.
- Simpson, M. J. A.; Withers, L. A. (1986) Characterization of plant genetic resources using isozyme electrophoresis: a guide to the literature. IBPGR, Rome.
- Tanksley, S. D.; Rick, C. M. (1980) Isozyme linkage map of tomato: applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 57:161-170.
- Tanksley, S. D. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1:3-8
- Tanksley, S. D.; Orton, T. J. (1983) Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Elsevier, Amsterdam.
- Weeden, N. F. (1983) Evolution of plant isozymes. In: Tanksley, S. D.; Orton, T. J. (Eds) Isozymes in Plant Genetics and Breeding (pp 177-208). Elsevier, Amsterdam.
- Weeden, N. F.; Marx, G. A. (1984) Chromosomal location of twelve isozyme loci in *Pisum sativum*. *J. Hered.*, 75:365-370.
- Wendel, J. F.; Stuber, C. W.; Edwards, M. D.; Goodman, M. M. (1986) Duplicated chromosomal segments in maize (*Zea mays* L.): further evidence from hexokinase isozymes. *Theor. Appl. Genet.*, 72:178-185.
- Wendel, J. F.; Weeden, N. F. (1990). Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis, D. E.; Soltis, P. S. (Eds) Isozymes in Plant Biology (pp 5-45). Chapman and Hall, London.

¹ No caso dos marcadores morfológicos, em que existe uma interação do tipo dominante/recessivo, a distinção dos diferentes genótipos só é possível pela realização de cruzamentos-teste e observação das descendências.

² O termo "alelos nulos" refere-se aos alelos para os quais não se verifica a produção de um produto proteico activo. Tal pode dever-se a várias causas, nomeadamente: ausência da cópia génica, ausência de transcrição, ausência de tradução ou inactividade do produto proteico (May, 1992).

*Eng. Agrícola, Professor Adjunto da ESACB

Declaro que pretendo ser assinante da Revista **Agroforum** por 1 ano (2 números)

A partir do nº _____

Para o efeito envio:

Cheque nº _____ s/banco _____

Nome: _____ Nº de Cont.: _____

Morada _____

Assinatura: _____

Continente e Ilhas - 750\$00