

HERANÇA E LIGAÇÃO EM LOCOS ISOENZIMÁTICOS DE *Caesalpinia echinata* L. (PAU-BRASIL)¹

João Del GIUDICE-NETO²
Alexandre Magno SEBBENN³
Paulo Yoshio KAGEYAMA⁴

RESUMO

Este artigo apresenta o estudo da variação isoenzimática em *Caesalpinia echinata* L. (pau-brasil). Onze sistemas enzimáticos (ACP, DIA, EST, G6PDH, GOT, LAP, MDH, PGI, PRX, SKDH e 6PGDH) codificando dezoito locos (*Acp-1*, *Est-3*, *Dia-1*, *G6pdh-1*, *Got-1*, *Lap-1*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgi-1*, *Pgi-2*, *Prx-1*, *Prx-2*, *Prx-3*, *Prx-4*, *Skdh-1*, *6pgdh-1* e *6pgdh-2*) foram investigados. Entre esses locos, *Pgi-1* e *Got-1* foram detectados como monomórficos. Três locos (*Mdh-2*, *G6pdh-1* e *6pgdh-1*) não tiveram sua herança analisada devido à ausência de progênes de árvores heterozigotas na amostra. A herança mendeliana simples foi confirmada para dez locos (*Acp-1*, *Dia-1*, *Est-3*, *Lap-1*, *Mdh-1*, *Mdh-3*, *Prx-1*, *Prx-3*, *Skdh-1* e *6pgdh-2*). Três locos (*Pgi-2*, *Prx-2* e *Prx-4*) apresentaram desvios altamente significativos ($P < 0,01$) para a hipótese de segregação regular 1:1. As relações de desequilíbrios de ligações foram avaliadas em 120 pares de locos isoenzimáticos. Seis pares de locos apresentaram ligação: *Mdh-3:Dia-1*, *Mdh-3:Prx-3*, *6pgdh-1:Pgi-2*, *6pgdh-1:Prx-1*, *6pgdh-2:Prx-3* e *Pgi-2:Prx-4*.

Palavras-chave: segregação; *Caesalpinia echinata*; espécies arbóreas tropicais.

1 INTRODUÇÃO

Caesalpinia echinata Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae) é uma espécie arbórea endêmica brasileira típica da floresta ombrófila densa. Sua ocorrência natural vai do Estado do Rio Grande do Norte (05°45'S) ao Rio de Janeiro (23°S) (Carvalho, 1994). *C. echinata* foi a primeira espécie arbórea brasileira a ser explorada comercialmente em larga escala. Sua exploração teve grande importância econômica para o país no início da colonização,

ABSTRACT

This article presents a study of isozyme variation in *Caesalpinia echinata* L. (brazilwood). Eleven isozyme systems (ACP, DIA, EST, G6PDH, GOT, LAP, MDH, PGI, PRX, SKDH and 6PGDH) codifying eighteen loci (*Acp-1*, *Est-3*, *Dia-1*, *G6pdh-1*, *Got-1*, *Lap-1*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgi-1*, *Pgi-2*, *Prx-1*, *Prx-2*, *Prx-3*, *Prx-4*, *Skdh-1*, *6pgdh-1* and *6pgdh-2*) were investigated. Among these loci, *Pgi-1* and *Got-1* were monomorphic. Three loci (*Mdh-2*, *G6pdh-1* and *6pgdh-1*) were not evaluated for inheritance due the lack of families from heterozygous mother trees in the sampling. Mendelian inheritance was confirmed for ten allozyme loci (*Acp-1*, *Dia-1*, *Est-3*, *Lap-1*, *Mdh-1*, *Mdh-3*, *Prx-1*, *Prx-3*, *Skdh-1*, and *6pgdh-2*). Three loci (*Pgi-2*, *Prx-2* and *Prx-4*) showed significant deviations ($P < 0.01$) from expected segregation 1:1 hypothesis. Linkage relationships were examined for 120 pairs of allozyme loci. Six pairs of loci showed linked: *Mdh-3:Dia-1*, *Mdh-3:Prx-3*, *6pgdh-1:Pgi-2*, *6pgdh-1:Prx-1*, *6pgdh-2:Prx-3* and *Pgi-2:Prx-4*.

Key words: segregation; *Caesalpinia echinata*; tropical tree species.

especialmente pela presença de corantes em sua madeira, que eram usados para a fabricação de tintura para roupas. No entanto, sua intensiva e desordenada exploração, iniciada logo após a ocupação da costa brasileira pelos colonizadores portugueses, reduziu sua distribuição a pequenos remanescentes na atualidade (Mello-Filho, 1991/1992; Cardoso *et al.*, 1998), levando a espécie para a lista das arbóreas em alto risco de extinção (Brasil, 1992). Hoje, há apenas pequenas populações remanescentes isoladas e, portanto, medidas para a sua conservação devem ser adotadas imediatamente.

(1) Aceito para a publicação em setembro de 2004.

(2) Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01061-970, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: jdjudic@ig.com.br

(3) Instituto Florestal, Caixa Postal 1322, 01059-970, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: amsebbenn@bol.com.br

(4) ESALQ/USP, Departamento de Ciências Florestais, Av. Pádua Dias, 15, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

A conservação genética de uma espécie requer o conhecimento de seu sistema de reprodução, variabilidade e estrutura genética. Tais estudos podem ser eficientemente realizados com base em dados de marcadores bioquímicos, como isoenzimas. Entretanto, para que marcadores isoenzimáticos possam ser utilizados como marcadores genéticos é necessário conhecer *a priori* a sua herança (Furnier *et al.*, 1986; Gillet & Hattemer, 1989; Lewandowski, 2000). Outra informação genética importante no estudo do sistema de reprodução é o conhecimento da relação de segregação entre locos. A avaliação do sistema de reprodução por marcadores genéticos requer a suposição de equilíbrio de ligação (Ritland & Jain, 1981).

O objetivo deste trabalho foi investigar a herança e o desequilíbrio de ligação em locos isoenzimáticos detectados em *C. echinata*. Foram usadas estruturas de progênies de polinização aberta, agrupadas por árvore materna heterozigota para o estudo da herança genética das isoenzimas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

O estudo foi realizado no arboreto experimental de pau-brasil (22°15'02,4"S e 47°09'28,9"W; altitude média 650 m) implantado na Reserva Biológica e Estação Experimental do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (22°14,8' - 15,6'S e 47°8,8' - 11,6'W, altitude média de 640 m), no município de Mogi Guaçu. A área total do arboreto é de 3.000 m², aproximadamente, tendo sido implantado em dezembro de 1980, a partir de mudas originadas de sementes provenientes da Estação Ecológica de Tapacurá, Estado de Pernambuco, dentro da zona de ocorrência natural da espécie (Aguiar, 1992). Contudo, não existem informações sobre o número de árvores matrizes que deu origem às sementes utilizadas no plantio do arboreto. Inicialmente, sua implantação visava testar o efeito de diferentes espaçamentos sobre os parâmetros dendrométricos da espécie. Mas, devido ao quadro alarmante de erosão genética em que a espécie se encontra, esse arboreto passou

a ser visto como uma importante fonte potencial de material para a recombinação e uso da sua variabilidade genética. Atualmente, o arboreto tem 262 árvores com altura média de doze metros e diâmetro à altura do peito (DAP) em torno de 17 cm.

Para a análise genética de *C. echinata*, em 1999 foram coletadas sementes de polinização aberta em 27 árvores do arboreto. As sementes foram germinadas em substrato contendo uma mistura igual de terra vegetal, vermiculita e acícula de pinus peneirada. Tubetes, com capacidade de 100 cm³, foram utilizados como recipientes. As mudas foram mantidas nesse tipo de recipiente durante toda a fase de estudo, recebendo, entretanto, adubação mineral de manutenção, a cada sete dias aproximadamente. Alternava-se a aplicação de nitrogênio (2 mg de N/muda) e potássio (3 mg de K₂O/muda).

2.2 Eletroforese

Em janeiro de 2002 foram coletadas folhas de 31 árvores adultas e de 10 plântulas (progênies) de 27 dessas árvores. Nos adultos procurou-se coletar folhas jovens. Nas plântulas coletaram-se folhas do terceiro par ou superior. O período de coletas foi na parte da manhã, em dias chuvosos ou na ausência de sol, proporcionados pela época do ano. As amostras, depois de identificadas e acondicionadas em sacos de papel *Kraft*, foram armazenadas em geladeira a 5°C por aproximadamente 24 horas, sendo então transportadas ao laboratório, onde foram submetidas às técnicas de eletroforese de isoenzimas, segundo as recomendações descritas em Soltis & Soltis (1989), Kephart (1990) e Alfenas (1998). Dezoito locos puderam ser interpretados em onze sistemas enzimáticos previamente selecionados (TABELA 1). O sistema SKDH (E.C. 1.1.1.25) demonstrou atividade apenas nas progênies. Esse loco foi utilizado para análises de estrutura entre as progênies, não sendo utilizado, entretanto, para as análises de diversidade e estrutura entre adultos e progênies. Para esse loco, os genótipos das árvores maternas foram determinados por meio da composição genotípica das progênies, usando o método de máxima verossimilhança de Brown & Allard (1970), implementado no programa MLTR de Ritland (2004).

TABELA 1 – Sistemas enzimáticos estudados em *C. echinata*.

Enzimas (Sigla) Número E.C.	Locos detectados	Número de alelos detectados
Fosfatase ácida (ACP) E.C. 3.1.3.2	A	2
Diaforase (DIA) E.C. 1.8.1.4	A	3
α -Esterase (α -EST) E.C. 3.1.1.1	A	2
Fosfoglucose isomerase (PGI) E.C. 5.3.1.9	A	1
	B	2
Glucose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH) E.C. 1.1.1.49	A	2
Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) E.C. 2.6.1.1	A	1
Leucina aminopeptidase (LAP) E.C. 3.4.11.1	A	2
Malato desidrogenase (MDH) E.C. 1.1.1.37	A	2
	B	2
	C	3
Peroxidase (PRX) E.C. 1.11.1.7	A	3
	B	3
	C	3
	D	2
Xiquimato desidrogenase (SKDH) E.C. 1.1.1.25	A	2
6-Fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) E.C. 1.1.1.44	A	3
	B	3

E.C. = Enzyme Commission.

2.3 Análise de Segregação

Para o estudo da herança isoenzimática em *C. echinata* adotou-se o método descrito por Gillet & Hattemer (1989), que compara o genótipo de árvore materna com a segregação de suas progênes de polinização aberta. As seguintes condições devem ser satisfeitas: a) toda progênie de uma árvore materna A_iA_i deve possuir o alelo A_i da árvore mãe; b) Em casos de uma árvore mãe heterozigota (ex. A_iA_j , $i \neq j$): b.1) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna, A_i , A_j ; b.2) o número de progênes heterozigotas A_iA_j (N_{ij}) deve ser igual à soma das progênes homozigotas A_iA_i (N_{ii}) e A_jA_j (N_{jj}), $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$; b. 3) o número de progênes heterozigotas A_iA_k (N_{ik}) deve ser igual ao número de progênes heterozigotas A_jA_k (N_{jk}), $N_{ik} = N_{jk}$, com $k \neq i, j$. Inicialmente, os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigotas foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1. A somatória desses testes individuais possibilita avaliar a hipótese de segregação 1:1 por meio de um teste G (Weir, 1996).

Depois, os fenótipos observados de progênes de árvores heterozigotas de mesmo genótipo materno foram submetidos a um teste de homogeneidade ($G_{Homogeneidade}$), no qual a hipótese nula é a de igual proporção dos tipos de gametas na progênie produzida por diferentes árvores maternas de mesmo genótipo heterozigoto. No caso da não rejeição da hipótese de homogeneidade dos arranjos, um teste de aderência à proporção esperada de 1:1 foi realizado agrupando-se todos os arranjos individuais ($G_{1:1Agrupado}$). Segundo Weir (1996), estes testes são aditivos, de forma que $\sum G_{1:1} = \sum G_{Homogeneidade} + \sum G_{1:1Agrupado}$, com distribuição de qui-quadrado e n , $n-1$ e 1 graus de liberdade, respectivamente. Se os testes de homogeneidade resultassem estatisticamente significativos, e considerando ainda o pequeno tamanho amostral de cada progênie (média de 10 plantas por progênie), as progênes que apresentaram desvios de segregação 1:1 foram descartadas e novos testes foram executados. Os locos foram designados com letras e números, e os alelos com números, em ordem decrescente de migração do ânodo para o cátodo.

2.4 Desequilíbrio de Ligação

O teste de equilíbrio de ligação foi analisado usando a medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (Δ_{ij}) (Weir, 1979). Essa medida é apropriada para situações em que existem indícios de que a união de gametas não ocorreu de forma aleatória e a identificação dos genótipos é incompleta (Weir & Cockerham, 1979). A hipótese nula de equilíbrio de ligação ($\Delta_{ij} = 0$) foi testada com o teste de qui-quadrado (χ^2) descrito em Weir (1979). Essas estimativas foram obtidas com auxílio do programa POPGENE versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Padrões das Isoenzimas

Dos onze sistemas isoenzimáticos avaliados, um era monomórfico (*Got-1*). Os demais apresentaram zonas de atividade enzimática com variações. A seguir é apresentada a descrição dos sistemas.

Fosfatase ácida (ACP)

O sistema ACP apresentou três zonas de atividade enzimática. A zona de migração mais rápida (catódica), denominada loco *Acp-1* apresentou duas variantes, indicando a segregação de dois alelos (FIGURA 1). As duas outras zonas (*Acp-2* e *Acp-3*) não apresentaram padrão de resolução que permitisse a interpretação genética. A avaliação de fenótipos de árvores heterozigotas revelou que esse loco é controlado por enzimas de expressão monomérica. Três zonas de atividades enzimáticas no sistema ACP também foram reportadas em *Cedrus atlantica* Manetti (Fallour *et al.*, 2001) e *Cecropia pachystachya* Trec. (Ribas *et al.*, 2004).

Diaforase (DIA)

O sistema enzimático DIA apresentou uma zona (*Dia-1*) de atividade nos géis (FIGURA 1), nas condições utilizadas em laboratório. A zona *Dia-1* foi interpretada como um loco polimórfico segregando três alelos. A observação dos fenótipos de árvores heterozigotas indicou que essa enzima é de expressão monomérica.

α -Esterase (EST)

O sistema EST apresentou três zonas de atividade enzimática. Contudo, apenas a zona de menor velocidade de migração apresentou-se plausível de interpretação (*Est-3*). Essa zona foi interpretada como um loco polimórfico, de expressão monomérica, segregando dois alelos (FIGURA 1).

Glucose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH)

O sistema G6PDH apresentou uma zona de atividade (FIGURA 1). Essa zona foi interpretada como um loco (*G6pdh-1*) polimórfico, monomérico, segregando dois alelos. Um simples loco controlando essa enzima também tem sido relatado em outros estudos realizados com espécies arbóreas (Morgante *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1994; Gusson *et al.*, 2004).

Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT)

O sistema GOT apresentou somente uma zona de atividade enzimática (*Got-1*), aparentemente invariável (FIGURA 1) e interpretada como um loco monomórfico, com um alelo fixado.

Leucina aminopeptidase (LAP)

A enzima LAP apresentou uma zona de atividade, interpretada como um loco polimórfico (*Lap-1*) segregando dois alelos (FIGURA 1). A observação de fenótipos de indivíduos heterozigotos indica que esse loco é monomérico.

Malato Desidrogenase (MDH)

A enzima MDH apresentou três zonas de atividade, todas polimórficas e interpretáveis. O padrão observado em indivíduos heterozigotos sugere que esses locos são diméricos (FIGURA 1). As duas zonas de migração mais rápida (*Mdh-1*, *Mdh-2*) segregaram dois alelos cada, e a zona de migração mais lenta (*Mdh-3*) segregou três alelos. Três zonas de atividade nesse sistema isoenzimático também foram observadas em outras espécies arbóreas (Ying & Morgenstern, 1990; Huang *et al.*, 1994; Konnert *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2002).

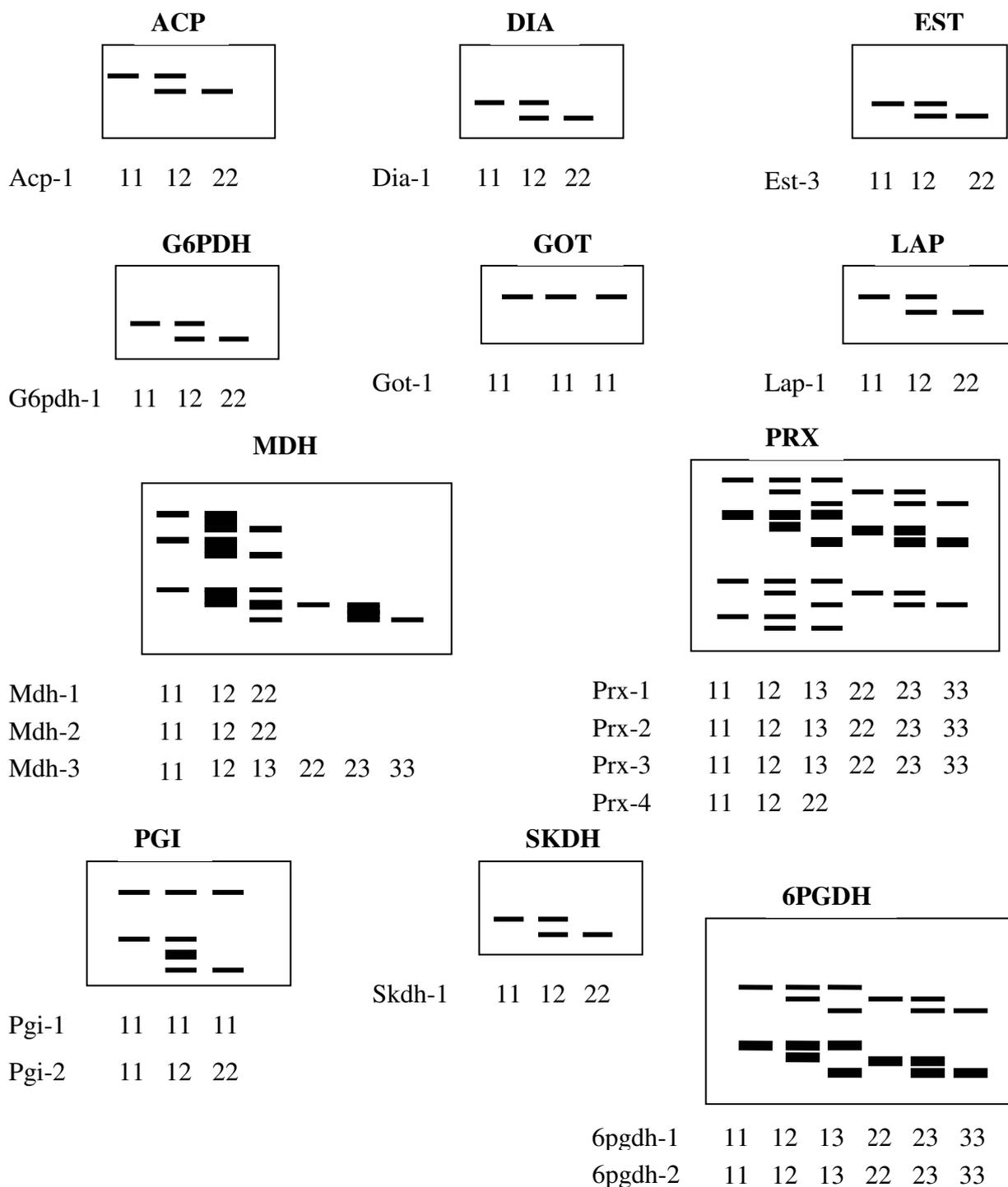


FIGURA 1 – Representação esquemática dos fenótipos observados nos zimogramas de *C. echinata* em onze sistemas enzimáticos.

Fosfoglucoase Isomerase (PGI)

O sistema PGI apresentou duas zonas de atividade. A zona de migração mais rápida, denominada *Pgi-1* era monomórfica nos géis. A zona mais lenta (*Pgi-2*) era polimórfica e foi interpretada como um loco controlado por enzimas de expressão dimérica, segregando dois alelos (FIGURA 1). Duas zonas de atividade nessa enzima também foram detectadas em *Taxus baccata* L. (Lewandowski *et al.*, 1992), *Couratari guianensis* e *Couratari multiflora* (Lepsch-Cunha, 1996) e *Abies alba* Mill. (Hussendörfer *et al.*, 1995).

Peroxidase (PRX)

O sistema PRX apresentou quatro zonas de atividade (*Prx-1*, *Prx-2*, *Prx-3* e *Prx-4*), todas polimórficas (FIGURA 1). O fenótipo de árvores heterozigotas indica que esses locos são controlados por enzimas de expressão monomérica. Nos locos *Prx-1*, *Prx-2* e *Prx-3* foram observadas as segregações de três alelos e no loco *Prx-4* a segregação de dois alelos.

Xiquimato Desidrogenase (SKDH)

O sistema SKDH apresentou uma zona de atividades (*Skdh-1*) nas condições de eletroforese usadas (FIGURA 1). Essa zona foi interpretada como um loco polimórfico, composto por uma enzima de expressão monomérica, segregando dois alelos. Expressão monomérica no sistema SKDH também foi observada em *Populus tremuloides* (Michx.) (Liu & Fournier, 1993).

6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH)

O sistema 6PGDH apresentou duas zonas de atividade (FIGURA 1), interpretadas como locos polimórficos (*6pgdh-1*, *6pgdh-2*), de expressão monomérica, segregando três alelos cada. Outros estudos em espécies arbóreas relatam duas zonas de atividade na enzima 6PGDH (Ying & Morgenstern, 1990; Konnert *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2002). Huang *et al.* (1994) estudando *Pinus massoniana* Lamb. observaram no sistema 6PGDH, tal como no presente trabalho, padrão fenotípico de indivíduos heterozigotos típico de enzimas monoméricas, embora em *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* (Mirb.) Franco (El-Kassaby *et al.*, 1982), *Cunninghamia lanceolata* Hook.

(Müller-Starck & Liu, 1988), *Thuja occidentalis* L. (Perry & Knowles, 1989) e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (Sousa *et al.*, 2002) esse sistema tem apresentado fenótipo de enzima dimérica.

3.2 Padrões de Segregação

Do conjunto de 18 locos, 2 eram monomórficos (*Pgi-1* e *Got-1*) e 16 polimórficos. Destes últimos, em 3 (*Mdh-2*, *G6pdh-1* e *6pgdh-1*) não foram detectadas progênes descendentes de árvores heterozigotas na amostra e, portanto, não foi possível estudar os padrões de segregação. Nos demais, foram detectadas progênes de uma a dezesseis árvores heterozigotas, de forma que foi possível estudar os padrões de segregação agrupando-as para cada loco individualmente (TABELA 2).

A análise de segregação de progênes de árvores heterozigotas de *C. echinata* detectou indícios de desvios da razão esperada 1:1 em todos os 13 locos possíveis de análise, exceção ao loco *Est-3*, das progênes oriundas dos maternais A_1A_2 e A_2A_3 do loco *Prx-1* e A_1A_2 do loco *6pgdh-2* (TABELA 2). Portanto, nos doze locos restantes, ao menos um tipo de progênie apresentou desvio da segregação esperada 1:1. Entretanto, quando são excluídas as progênes não homogêneas ou que apresentaram desvios significativos, a maioria dos locos analisados (dez) não rejeita a hipótese de segregação regular de 1:1. Percebe-se pela TABELA 2 que, de fato, poucas progênes se desviam da segregação mendeliana e quando estas são retiradas da análise, a relação 1:1 é satisfeita. A exclusão de progênes variou de 20% para o loco *Dia-1* a 50% para os locos *Mdh-1* e *Prx-3*, contudo, o pequeno número de maternais heterozigotas nestes locos justifica uma exclusão maior, ao passo que locos que tiveram um número maior de árvores mães heterozigotas, poucas progênes foram excluídas, reforçando que estes locos não rejeitam a hipótese de segregação regular 1:1. Assim, por essas análises, os locos *Acp-1*, *Dia-1*, *Est-3*, *Lap-1*, *Mdh-1*, *Mdh-3*, *Prx-1*, *Prx-3*, *Skdh-1* e *6pgdh-2* não apresentam qualquer indício de desvios de segregação e podem ser usados em futuras análises genéticas populacionais.

TABELA 2 – Teste para hipótese de segregação regular (valor G) em marcadores isoenzimáticos de *C. echinata*.

Loco	Genótipo materno	Situação	n	$N_{ij} : N_{ii} + N_{jj}$	$N_{ik} : N_{jk}$	ΣG	ΣG	ΣG	
						1:1 GL = n	Homogeneidade GL = n-1	1:1 Agrupado GL = 1	
<i>Acp-1</i>	A_1A_2	a	10	33:51	–	28,43**	24,54**	3,89*	
		b	7	22:35		9,74	6,75	2,99	
<i>Dia-1</i>	A_2A_3	a	15	77:45	0:0	45,53* ^{G1}	37,04 ^{G2}	8,49* ^{G3}	
		b	12	54:44	0:0	18,54 ^{G1}	17,52 ^{G2}	1,02 ^{G3}	
<i>Est-3</i>	A_1A_2	a	2	6:9	–	0,79	0,19	0,60	
<i>Lap-1</i>	A_1A_2	a	8	10:42	–	34,15*	12,98	21,17**	
		b	5	9:19		7,38	3,73	3,65	
<i>Mdh-1</i>	A_1A_2	a	4	9:23	–	22,53**	16,19**	6,34*	
		b	2	9:8		1,73	1,67	0,06	
<i>Mdh-3</i>	A_2A_3	a	16	74:40	3:9	63,86** ^{G1}	50,43* ^{G2}	13,43** ^{G3}	
		b	12	41:39	3:9	23,01 ^{G1}	19,82 ^{G2}	3,19 ^{G3}	
<i>Pgi-2</i>	A_1A_2	a	15	95:35	–	97,23**	68,46**	28,77**	
		b	8	53:19		29,61**	12,89*	16,71**	
<i>Prx-1</i>	A_1A_2	a	7	6:19	1:6	24,39* ^{G1}	13,32 ^{G2}	11,07** ^{G3}	
		b	4	6:8	0:3	6,37 ^{G1}	1,92 ^{G2}	4,45 ^{G3}	
	A_1A_3	a	2	2:7	0:1	5,49 ^{G1}	1,16 ^{G2}	4,33 ^{G3}	
	A_2A_3	a	3	3:15	0:0	9,93 ^{G1}	1,20 ^{G2}	8,73* ^{G3}	
		b	2	2:8	0:0	4,87 ^{G1}	1,01 ^{G2}	3,85 ^{G3}	
<i>Prx-2</i>	A_1A_3	a	8	45:2	8:8	75,32** ^{G1}	26,70* ^{G2}	48,62** ^{G3}	
		b	2	7:1	8:2	19,21** ^{G1}	10,29** ^{G2}	8,92* ^{G3}	
	A_2A_3	a	15	17:10	5:75	98,40** ^{G1}	23,07 ^{G2}	75,33** ^{G3}	
		b	4	6:5	4:14	9,20 ^{G1}	3,22 ^{G2}	5,98 ^{G3}	
<i>Prx-3</i>	A_1A_2	a	3	9:3	10:7	17,28** ^{G1}	13,61** ^{G2}	3,67 ^{G3}	
		b	2	6:3	3:7	3,42 ^{G1}	0,76 ^{G2}	2,66 ^{G3}	
	A_1A_3	a	8	15:21	8:16	51,03** ^{G1}	47,31** ^{G2}	3,72 ^{G3}	
		b	4	10:9	3:5	9,11 ^{G1}	8,55 ^{G2}	0,56 ^{G3}	
<i>Prx-4</i>	A_1A_2	a	8	17:33	–	30,37**	25,16**	5,21*	
		b	3	6:12		2,52	0,48	2,04	
<i>Skdh-1</i>	A_1A_2	a	4	4:26	–	22,27**	4,24	18,03**	
		b	2	3:9		3,59	0,45	3,14	
<i>6pgdh-2</i>	A_1A_2	a	1	7:3	0:0	1,65 ^{G1}	0,00 ^{G2}	1,65 ^{G3}	
		A_2A_3	a	9	29:47	0:0	32,81** ^{G1}	28,51* ^{G2}	4,30 ^{G3}
			b	6	19:31	0:0	9,55 ^{G1}	6,64 ^{G2}	2,91 ^{G3}

N_{ij} e $N_{ii} + N_{jj}$ são os números observados de genótipos heterozigotos e homozigotos, respectivamente.

N_{ik} e N_{jk} são os números observados de genótipos heterozigotos do tipo ik e jk , respectivamente.

n = número de árvores maternas.

a) Inclui todas as árvores heterozigotas em um dado loco.

b) Exclui as árvores com distorção de segregação em um dado loco.

(*) $P < 0,05$.

(**) $P < 0,01$.

G1 = 2n graus de liberdade; G2 = 2n-2 graus de liberdade e G3 = 2 graus de liberdade.

Os locos *Pgi-2* e *Prx-2* apresentaram desvios altamente significativos ($P < 0,01$) tanto para a hipótese de segregação agrupada 1:1 ($G_{1:1Agrupado}$) quanto para a total ($G_{1:1}$) de progênies de árvores heterozigotas. Os desvios nesses locos seguiram significativos, mesmo com a exclusão das progênies não homogêneas. O excesso de plântulas heterozigotas, filhas de árvores heterozigotas, é a causa principal desses desvios. Já o loco *Prx-4* também apresenta desvios altamente significativos ($P < 0,01$) para as hipóteses de segregação regular e de homogeneidade dos arranjos gaméticos. Ao se fazer a exclusão das progênies significativas, uma relação de satisfação dessas hipóteses é obtida, entretanto, dado que mais da metade (62,5%) das progênies tem de ser excluída para que se obtenha uma segregação regular, não é razoável supor que esse loco tenha, para a espécie em estudo, o modo de herança esperado. Ao contrário dos locos *Pgi-2* e *Prx-2*, o loco *Prx-4* apresenta um excesso de homozigotos. Segundo Gillet & Hattemer (1989), isso pode estar sugerindo a presença de um alelo nulo nesse loco. Esses autores propõem um teste, segundo o qual progênies oriundas do maternal A_iA_0 ($i \neq 0$) teriam uma expectativa fenotípica de $N_{00} \leq N_{i-}$ e $N_{k-} = N_{ik}$ ($k \neq 0, i$). Realizou-se este teste para o loco *Prx-4*, tanto para o maternal A_1A_0 quanto para o maternal A_2A_0 e, nas duas situações, a hipótese de existência de um alelo nulo atuando nesse loco foi rejeitada ($N_{00} = 0$, $N_{1-} = 35$, $N_{2-} = 0$ e $N_{12} = 25$ para as progênies cujos maternais são do tipo A_1A_0 e $N_{00} = 0$, $N_{2-} = 14$, $N_{1-} = 0$ e $N_{12} = 27$ para as progênies de maternais A_2A_0). Conclui-se que esses locos não têm um modo hereditário regular.

Vários estudos realizados com locos isoenzimáticos em espécies arbóreas têm detectado desvios de segregação. Por exemplo, Furnier *et al.* (1986) observaram desvios da razão de segregação esperada 1:1 nos locos *Fle-1*, *Pgi-4* e *Mdh-4* em *Pinus albicaulis* Engelman. Perry & Knowles (1989) relatam desvios de segregação no loco *Mdh-1* em *Thuja occidentalis* L. Em *Larix laricina* (Du Roi) K. Koch., Cheliak & Pitel (1985)

descrevem desvios de segregação nos locos *G6pdh* e *Pgi-2* e Ying & Morgenstern (1990) no loco *Acp-1*. Em *A. angustifolia*, Sousa *et al.* (2002) detectaram desvios de segregação no loco *Got-b*. Desvios de segregação em locos isoenzimáticos também são descritos em outros trabalhos (Adams & Joly, 1980; Morgante *et al.*, 1993). A causa tem sido atribuída ao fato das isoenzimas poderem estar sob controle de mais de um loco, não estarem sob controle genético, seleção, distorções meióticas, interações interalélicas, acaso (Adams & Joly, 1980; Cheliak & Pitel, 1985) e ligação dos marcadores a alelos deletérios (Strauss & Conkle, 1986).

3.3 Desequilíbrio de Ligação

Foram observados indícios de desequilíbrio de ligação em locos de *C. echinata* (TABELA 3). Considerando as 120 combinações possíveis, entre os 16 locos polimórficos, foram detectados valores significativos de desequilíbrio de ligação entre seis pares envolvendo nove locos: *Mdh-3:Dia-1*, *Mdh-3:Prx-3*, *6pgdh-1:Pgi-2*, *6pgdh-1:Prx-1*, *6pgdh-2:Prx-3* e *Pgi-2:Prx-4*. O maior valor de desequilíbrio de ligação significativo foi observado entre os locos *Mdh-3:Prx-3* ($\hat{\Delta}_{ij} = 0,028$, $\chi^2 = 4,86$, $P = 0,027$), embora este valor ainda seja extremamente baixo. O loco *Pgi-2* não apresentou segregação mendeliana simples e, por isso, será descartado, quebrando-se, assim, dois grupos de ligação observados (*6pgdh-1:Pgi-2* e *Pgi-2:Prx-4*). Adicionalmente, sugere-se a exclusão dos locos *Prx-1*, envolvido em um grupo de ligação (*6pgdh-1:Prx-1*), e *Prx-3* envolvido em dois grupos de ligação (*Mdh-3:Prx-3* e *6pgdh-2:Prx-3*). Nos demais pares de locos não foram detectados quaisquer indícios de desequilíbrio de ligação e podem ser usados em subseqüentes estudos que requeiram o equilíbrio gamético, como análises do sistema de reprodução, cálculos de parentescos, testes de paternidade e quantificação da diversidade e estrutura genética de *C. echinata*.

TABELA 3 – Valores da medida composta de desequilíbrio gamético de Burrows ($\hat{\Delta}_{ij}$), resultados do teste de qui-quadrado (χ^2) e probabilidade associada (P) para pares de locos isoenzimáticos que apresentaram desvios significativos da hipótese de desequilíbrio gamético em populações de *C. echinata*.

Locos	$\hat{\Delta}_{ij}$	χ^2	P
<i>Mdh-3:Dia-1</i>	0,001	6,25*	0,012
<i>Mdh-3:Prx-3</i>	0,028	4,86*	0,027
<i>6pgdh-1:Pgi-2</i>	0,005	4,20*	0,040
<i>6pgdh-1:Prx-1</i>	-0,004	4,48*	0,034
<i>6pgdh-2:Prx-3</i>	0,027	5,34*	0,021
<i>Pgi-2:Prx-4</i>	0,026	4,33*	0,037

(*) $P < 0,05$.

4 CONCLUSÕES

A herança mendeliana simples foi confirmada para dez locos (*Acp-1*, *Dia-1*, *Est-3*, *Lap-1*, *Mdh-1*, *Mdh-3*, *Prx-1*, *Prx-3*, *Skdh-1* e *6pgdh-2*) avaliados em *C. echinata*. Três locos (*Pgi-2*, *Prx-2* e *Prx-4*) apresentaram desvios altamente significativos para a hipótese de segregação regular 1:1.

Os pares de locos *Mdh-3:Dia-1*, *Mdh-3:Prx-3*, *6pgdh-1:Pgi-2*, *6pgdh-1:Prx-1*, *6pgdh-2:Prx-3* e *Pgi-2:Prx-4* encontram-se ligados ou em equilíbrio gamético, assim, um loco de cada par deve ser excluído para estudos genéticos que requeiram segregação independente entre locos.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo financiamento do Projeto (Processo 2000/06422-4).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. T.; JOLY, R. J. Genetics of allozymes variants in Loblolly Pine. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 71, p. 33-40, 1980.

AGUIAR, F. F. A. Comportamento ecológico de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), cultivado em arboreto experimental. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 16, n. 3, p. 255-261, 1992.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicação em plantas e microorganismos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 1998. 574 p.

BRASIL. Portaria IBAMA nº 06-N, de 15 de janeiro de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, v. 130, n. 16, 23 jan. 1992. Seção I.

BROWN, A. H. D.; ALLARD, R. W. Estimation of mating system in open-pollinated maize populations using isozymes polymorphisms. **Genetics**, Washington, D.C., v. 66, p. 133-145, 1970.

CARDOSO, M. A. *et al.* High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinoideae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 601-608, 1998.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. 640 p.

CHELIAK, W. M.; PITEL, J. A. Inheritance and linkage of allozymes in *Larix laricina*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 34, p. 142-148, 1985.

EL-KASSABY, Y.A.; YEH, F.C.; SZIKLAI, O. Inheritance of allozyme variants in Coastal Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 24, p. 325-335, 1982.

FALLOUR, D.; FADY, B.; LEFÈVRE, F. Evidence of variation in segregation patterns within a Cedrus population. **The J. of Heredity**, Cary, v. 92, p. 260-266, 2001.

FURNIER, G. R. *et al.* Inheritance and linkage of allozymes in seed tissues of whitebark pine. **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 28, p. 601-604, 1986.

GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, Oxford, v. 63, p. 135-141, 1989.

- GUSSON, E.; SEBBENN, A. S. Herança e desequilíbrio de ligação em locos isoenzimáticos de *Eschweilera ovata*. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 129-136, 2004.
- HUANG, Q. Q. *et al.* Genetic control of isozyme variation in Masson Pine, *Pinus massoniana* Lamb. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, p. 285-292, 1994.
- HUSSENDÖRFER, E.; KONNERT, M.; BERGMANN, F. Inheritance and linkage of isozymes variants of Silver Fir (*Abies alba* Mill.). **Forest Genetics**, Zvolen, v. 2, p. 29-40, 1995.
- KEPHART, S. R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 77, n. 5, p. 693-712, 1990.
- KONNERT, M.; RUETZ, W.; FROMM, M. Genetic variation in *Acer pseudoplatanus* L. I. Inheritance of isozymes variants. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 8, p. 25-37, 2001.
- LEPSCH-CUNHA, N. **Estrutura genética e fenologia de espécies raras de *Couratari* spp. (Lecythidaceae) na Amazônia Central.** 1996. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- LEWANDOWSKI, A. Inheritance and linkage of some allozymes in *Pinus armandii* Franch. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 49, p. 79-82, 2000.
- _____.; BURCZYK, J.; MEJNARTOWICZ, L. Inheritance and linkage of some allozymes in *Taxus baccata* L. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 41, p. 342-347, 1992.
- LIU, Z.; FURNIER, G. R. Inheritance and linkage of allozymes and restriction fragment length polymorphisms in Trembling Aspen. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 84, p. 419-424, 1993.
- MELLO-FILHO, L. E. A Floresta Atlântica. In: MONTEIRO, S; KAZ, L. (Coord.). **Floresta Atlântica: textos científicos.** Rio de Janeiro: Alumbramento, 1991/1992. p. 17-21.
- MORGANTE, M.; VENDRAMIN, G. G.; GIANNINI, R. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Pinus leucodermis* Ant. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 42, p. 231-236, 1993.
- MÜLLER-STARCK, G.; LIU, Y. Q. Genetics of *Cunninghamia lanceolata* Hook. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 37, p. 236-243, 1988.
- PERRY, D. J.; KNOWLES, P. Inheritance and linkage relationships of allozymes of eastern white cedar (*Thuja occidentalis*) in northwestern Ontario. **Genome**, Ottawa, v. 32, p. 245-250, 1989.
- RIBAS, L. A., SEBBENN, A. S. Herança e desequilíbrio de ligação em sete locos isoenzimáticos de *Cecropia pachystachya*. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 111-119, 2004.
- RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR:** Version 2.4. Toronto: University of Toronto, 2002. Disponível em: <<http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs>>. Acesso em: 30 mar. 2004.
- _____.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, Oxford, v. 47, p. 35-52, 1981.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. **Isozymes in plant biology.** Portland: Dioscorides Press, 1989. 268 p.
- SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; ROBINSON, I. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 51, p. 191-196, 2002.
- STRAUSS, S. H.; CONKLE, M. T. Segregation, linkage and diversity of allozymes in knobcone pine. **Theor. Appl. Genet.**, Berlin, v. 72, p. 483-493, 1986.
- WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, Lawrence, v. 35, p. 235-354, 1979.
- _____. **Genetic data analysis II: method for discrete population genetic data.** Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445 p.
- _____.; COCKERHAM, C. C. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. **Heredity**, Lund, v. 43, p. 105-111, 1979.
- YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE version 1.32:** Microsoft Window-based freeware for population genetics analysis. Edmonton: University of Alberta, 1999. Disponível em: <<http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm>>. Acesso em: 30 mar. 2004.
- YING, L.; MORGENSTERN, E.K. Inheritance and linkage relationships of some isozymes of *Larix laricina* in New Brunswick, Canada. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 39, p. 245-251, 1990.