

ANÁLISE GENÉTICA DE FENÓTIPOS ISOENZIMÁTICOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.¹

Mario Luiz Teixeira de MORAES²
Selma Maria Bozzite MORAES²
Paulo Yoshio KAGEYAMA³
Alexandre Magno SEBBENN⁴

RESUMO

A herança e o desequilíbrio de ligação foram estudadas em seis locos polimórficos (*Got-1*, *Got-2*, *Lap-1*, *6pgdh-1*, *Pgi-2* e *Pgm-1*) de cinco sistemas isoenzimáticos (GOT, LAP, PGI, 6PGD e PGM) revelados em 55 progênies de polinização aberta de duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira) do Estado de São Paulo. A relação de ligação entre locos foi estudada pela medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows. A segregação para os locos foi geralmente homogênea entre árvores. No loco *Got-1* foi detectado desvio da razão de segregação esperada 1:1. Evidências de desequilíbrio de ligação foram observadas entre os locos: *Lap-1:Pgi-2*.

Palavras-chave: segregação; herança; desequilíbrio de ligação; isoenzimas; aroeira; espécies arbóreas tropicais.

1 INTRODUÇÃO

A análise de isoenzimas é uma ferramenta útil para caracterizar a estrutura de populações e acessar relações evolutivas em nível de espécies. A interpretação de medidas de variação, fluxo gênico, mutação e outros parâmetros genéticos requerem que modelos de herança e relação de ligação entre locos sejam determinados (Morgante *et al.*, 1993).

As espécies florestais mais pesquisadas, sob o aspecto genético, são as coníferas. Porém, mesmo para essas espécies a quantidade de informações sobre ligação gênica ainda é muito pequena.

ABSTRACT

Inheritance and linkage disequilibrium were studied in six polymorphic enzyme loci (*Got-1*, *Got-2*, *Lap-1*, *6pgdh-1*, *Pgi-2* and *Pgm-1*) from five isozymes systems (GOT, LAP, PGI, 6PGD and PGM) in 55 open-pollinated families of two *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira) populations of São Paulo State. Burrows composite measure of linkage disequilibrium was used to study linkage relationship between loci. Gene segregation of loci was generally homogeneous among trees. *Got-1* locus showed significant departure from the expected 1:1 segregation ratio. Linkage disequilibrium evidence was detected between a pair of loci: *Lap-1:Pgi-2*.

Key words: segregation; inheritance; linkage disequilibrium; isozymes; aroeira; tropical tree species.

Ressalta-se, no entanto, que as associações entre locos não são facilmente mantidas, tal como ocorre para a maioria das espécies em que predomina a fecundação cruzada. Também é raro, em espécies florestais, o desequilíbrio gamético entre pares de locos não ligados. Essa ausência freqüente de desequilíbrio de ligação, que ocorre nas espécies florestais, torna impossível que se encontre associações entre locos marcadores específicos e locos que controlam caracteres quantitativos. Desse modo, a seleção indireta por marcador genético bioquímico (isoenzimas) não deve ser eficiente. Tais colocações foram feitas por Torggler *et al.* (1995) em extensa revisão bibliográfica sobre o assunto.

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

(2) FEIS/UNESP, Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio-Economia, Av. Brasil Centro, 56, 15385-000, Ilha Solteira, SP, Brasil.

(3) ESALQ/USP, Departamento de Ciências Florestais, Av. Pádua Dias, 11, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

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

Myracrodruon urundeuva Fr. All. (aroeira) é uma espécie arbórea tropical dióica de ampla distribuição no Brasil, ocorrendo também na Argentina, Bolívia e Paraguai. Seu habitat é a floresta estacional semidecidual, a floresta estacional decidual, o cerrado, o cerradão, a caatinga, o chaco sul-mato-grossense e o pantanal mato-grossense. A espécie tem ampla utilidade. Sua madeira é utilizada para diversos fins como vigamento de pontes, postes, dormentes, moirões, etc. A planta é utilizada como ornamental, apícola, forrageira e para reflorestamentos ambientais (Carvalho, 1994).

O objetivo deste trabalho foi investigar a herança e o desequilíbrio de ligação entre seis locos polimórficos, revelados em cinco sistemas isoenzimáticos, de duas populações naturais de *M. urundeuva*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Sementes de polinização aberta foram coletadas em 25 a 30 árvores de duas populações naturais de *M. urundeuva*: Estação Ecológica do Instituto Florestal em Paulo de Faria – SP (Latitude 19°55'S, Longitude 49°31'W), e Selvíria – MS (Latitude 20°19'S, Longitude 49°31'W).

De cada árvore matriz foram analisados, via eletroforese de isoenzimas, tecidos foliares de 20 plântulas. O genótipo das árvores maternas foi estimado a partir da composição genotípica de suas progênes, usando o método de máxima verossimilhança de Brown & Allard (1970), implementado no programa MLTR de Ritland (1998).

2.2 Eletroforese de Isoenzimas

As enzimas foram extraídas dos tecidos foliares das plântulas, empregando-se aproximadamente 20 mg de tecido de limbo foliar, 10 mg de areia lavada, 7 mg de Polivinil Polipirrolidona e 200 µL da solução de extração número 1 (Alfenas, 1998). A eletroforese foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel de amido de milho (penetrose 30). Os extratos de cada amostra eram embebidos em pedaços de papel filtro (Whatman nº 3), tendo 1,0 cm de comprimento por 0,6 cm de largura, sendo colocados em seguida no gel. O tampão do eletrodo foi o ácido cítrico 0,04 M, sendo titulado com citrato morfolina [N-(3-amino-propil)-morfolina] até atingir pH 6,10, e o do gel o mesmo tampão, mas diluído na proporção de 1:20. As demais condições de corrida são semelhantes às descritas por Lacerda *et al.* (2001) para a aroeira. As isoenzimas reveladas encontram-se esquematizadas na TABELA 1.

TABELA 1 – Sistemas enzimáticos investigados para herança em *M. urundeuva*.

Sistemas enzimáticos (Abreviações) Número E.C.	Locos detectados	Número de alelos detectados
Aspartato aminotransferase (AAT) [= Glutamato oxaloacetato trasaminase (GOT)]. I.U.B. L-Aspartato: 2-oxoglutarato aminotransferase. E.C. 2.6.1.1	A	2
	B	2
Leucina aminopeptidase (LAP) E.C. 3.4.11.1	A	3
Fosfogluco isomerase (PGI) E.C. 5.3.1.9	A	1
	B	3
Fosfoglucomutase (PGM) E.C. 5.4.2.2	A	1
	B	2
6-Fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) E.C. 1.1.1.44	A	2

2.3 Análise de Segregação

No presente estudo não foram realizados cruzamentos controlados para a avaliação da herança isoenzimática de *M. urundeuva*. Assim, adotou-se o método descrito por Gillet & Hattemer (1989), que compara árvores maternas heterozigotas com a segregação de suas progênies de polinização aberta. As pressuposições do modelo de Gillet & Hattemer (1989) são que toda a progênie de uma árvore materna A_iA_i deve possuir o alelo A_i da árvore mãe. Em casos de uma árvore mãe heterozigota (ex. A_iA_j , $i \neq j$) tem-se as situações: a) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna, A_i ou A_j ; b) o número de progênies heterozigotas A_iA_j (N_{ij}) deve ser igual à soma das progênies homozigotas A_iA_i (N_{ii}) e A_jA_j (N_{jj}), $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$; e c) o número de progênies heterozigotas A_iA_k (N_{ik}) deve ser igual ao número de progênies heterozigotas A_jA_k (N_{jk}), $N_{ik} = N_{jk}$ ($k \neq i, j$). A análise genética foi realizada com 20 plântulas por progênie, coletadas de 55 árvores matrizes, seguindo a análise de segregação proposta por Mather (1963). Os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigotas foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1, usando um teste de qui-quadrado (χ^2) padrão (com correção de Yates), com um grau de liberdade. Em seguida, os fenótipos observados foram somados e um teste de qui-quadrado agrupado para a segregação 1:1 foi obtido ($\chi^2_{1:1 \text{ Agrupado}}$), com um grau de liberdade. A hipótese nula desse teste é a de igual proporção dos tipos de gametas na progênie produzida por diferentes árvores maternas de genótipo heterozigoto. Simultaneamente, todos os testes de qui-quadrado individuais foram somados, subtraindo-se em seguida desse total o valor de qui-quadrado agrupado, obtendo-se um teste de qui-quadrado de heterogeneidade ($\sum \chi^2_{\text{Heterogeneidade}}$) de segregação entre progênies. Este último teste de qui-quadrado teve $n-1$ grau de liberdade (Mather, 1963). Nesse estudo, designaram-se os locos 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 ligação foi analisado, utilizando-se a medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (Δ_{ij} , Weir, 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). As estimativas de desequilíbrio de ligação foram obtidas com auxílio do programa POPGENE versão 1.32 (Yeh & Yang, 1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Padrões das Isoenzimas

Todos os seis locos, revelados nos cinco sistemas isoenzimáticos, foram polimórficos e segregaram de dois a três alelos cada. Nesses também foram detectadas árvores matrizes heterozigotas em todos os locos, assim, foi possível a avaliação de sua herança e segregação. As descrições dos padrões de herança, segregação e desequilíbrio de ligação dos locos são apresentadas a seguir.

Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT)

O sistema GOT apresentou duas zonas de atividade (*Got-1* e *Got-2*) enzimática (FIGURA 1), segregando dois alelos em cada zona. A observação de fenótipos de indivíduos heterozigotos evidenciava a presença de três bandas nos géis, o que indica tratar-se de um loco controlado por uma enzima dimérica.

Leucina aminopeptidase (LAP)

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

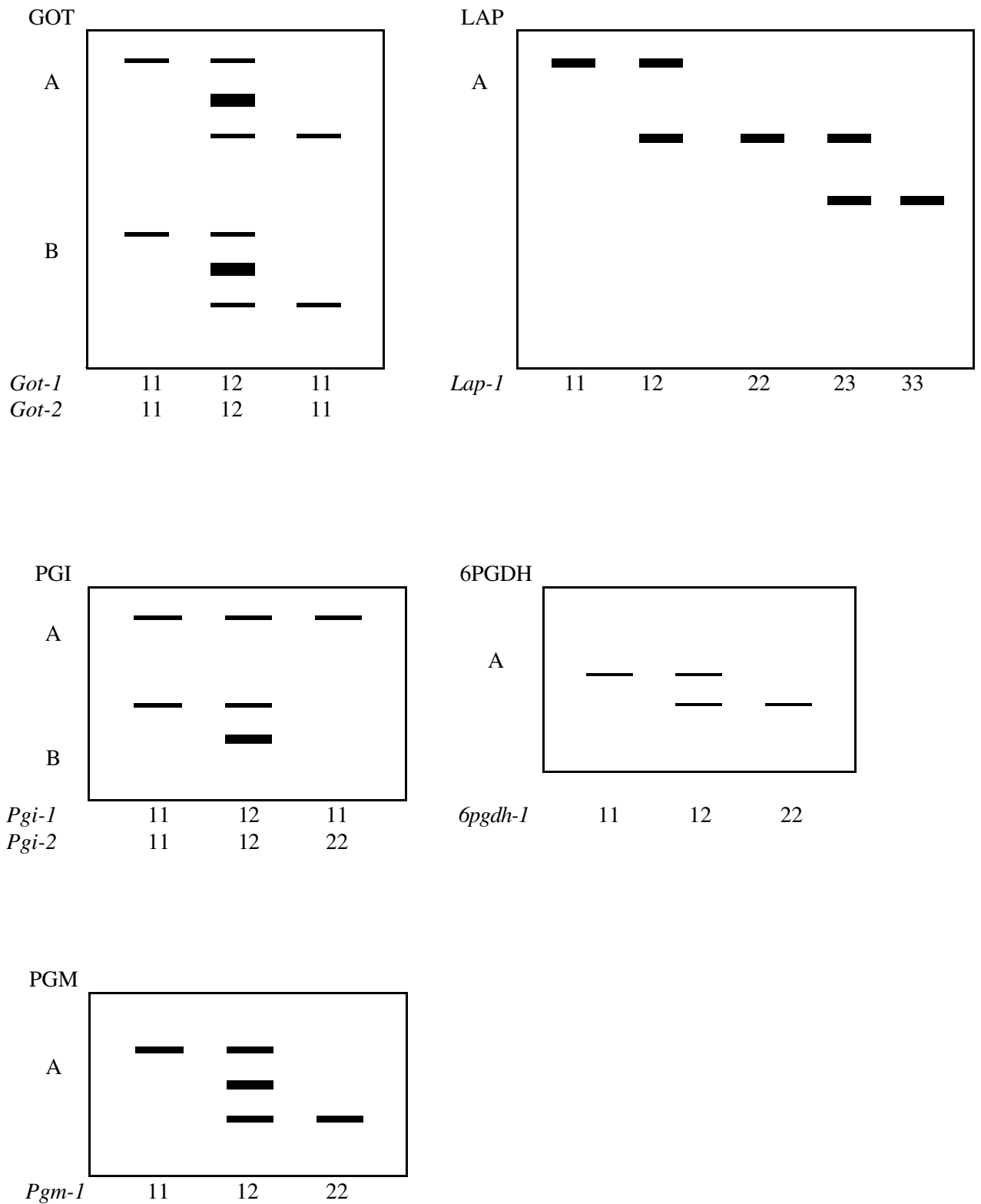


FIGURA 1 – Representação esquemática dos fenótipos observados nos zimogramas de *M. urundeuva* nos sistemas GOT, LAP, PGI, 6PGDH e PGM, juntamente com seus respectivos genótipos.

6-Fosfogluconato desidrogenase (6PGDH)

O sistema 6PGDH apresentou uma zona de atividade (FIGURA 1). Essa zona foi interpretada como um loco polimórfico (*6pgdh-1*), de expressão monomérica, segregando dois alelos cada. Um estudo em *Pinus massoniana* Lamb. (Huang *et al.*, 1994) também observou padrão fenotípico de indivíduos heterozigotos típico de enzimas monoméricas, embora muitos outros tenham observado este sistema como dimérico (El-Kassaby *et al.*, 1982; Müller-Starck & Liu, 1988; Perry & Knowles, 1989; Sousa *et al.*, 2002).

Fosfogluco isomerase (PGI)

O sistema PGI apresentou duas zonas de atividades. A zona de migração mais rápida (*Pgi-1*) era monomórfica e, por isso, foi excluída da análise genética. 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).

Fosfoglucomutase (PGM)

O sistema PGM apresentou duas zonas de atividade enzimática (FIGURA 1). A zona de migração mais anódica (*Pgm-1*) era polimórfica e segregou dois alelos. A observação de fenótipos de indivíduos heterozigotos indica que esse loco é controlado por uma enzima dimérica. A segunda zona, mais catódica (*Pgm-2*), não apresentou padrão de resolução nas condições de eletroforese utilizada que permitisse sua correta interpretação.

3.2 Padrões de Segregação

Foram detectados indícios significativos de heterogeneidade no padrão de segregação entre progênies de árvores heterozigotas de mesmo genótipo nos locos *Got-1*, *Lap-1*, *Pgi-2* e *Pgm-1* (TABELA 2). Contudo, quando progênies revelando desvios significativos foram excluídas das análises, nenhum desses locos revelou heterogeneidade de segregação.

O teste de qui-quadrado agrupado revelou desvio da razão de segregação esperada 1:1 para o loco *Got-1*, mesmo quando progênies de árvores heterozigotas, apresentando desvios significativos, foram excluídas da análise. Isso indica que esse loco pode não estar sob controle genético ou pode estar ocorrendo seleção, distorção meiótica, interações interalélicas, erros de interpretações dos zimogramas, ou simplesmente o fenômeno ocorreu por acaso (Adams & Joly, 1980; Cheliak & Pitel, 1985). Outra causa poderia ser a ligação dos marcadores a alelos deletérios, o que poderia levar a desvios de segregação pela eliminação de alelos ligados a alelos deletérios (Strauss & Conkle, 1986). Vários estudos realizados com espécies arbóreas relatam desvios da razão de segregação (Adams & Joly, 1980; Cheliak & Pitel, 1985; Perry & Knowles, 1989; Morgante *et al.*, 1993; Sousa *et al.*, 2002). No sistema GOT, desvios de segregação têm sido observados no loco *Got-2*, como em *Araucaria angustifolia* (Mart.) O.K. (Sousa *et al.*, 2002) e *Cedrus atlantica* Manetti (Fallour *et al.*, 2001).

3.3 Desequilíbrio Gamético

Foram detectados poucos indícios de desequilíbrio de ligação nas progênies de *M. urundeuva* (TABELA 3). Das 15 possíveis combinações entre pares de locos, só foram detectados indícios significativos de desequilíbrio gamético entre o par *Lap-1:Pgi-2* ($\hat{\Delta}_{ij} = 0,010$, $\chi^2 = 3,98$, $P = 0,046$). Nos demais pares de combinações entre locos não foram detectados indícios de ligação, e pode-se afirmar que os alelos de diferentes locos não estão associados e segregam independentemente. Em relação ao par de locos aparentemente ligado, *Lap-1:Pgi-2*, os resultados indicam que embora os alelos não segreguem independentemente, a ligação é fraca ($\hat{\Delta}_{ij} = 0,010$) e, por isso, a manutenção desses locos deve ter pouca influência na estimativa de parâmetros genéticos, sem a exclusão de algum desses. O desequilíbrio de ligação entre os locos *Lap-1:Pgi-2* não é reportado em nenhum outro estudo com espécies arbóreas.

TABELA 2 – Teste para hipótese de segregação regular (χ^2) de marcadores isoenzimáticos em *M. urundeuva*.

Loco	Genótipo materno	Caso ¹	Número de árvores (n)	$N_{ij} : N_{ii} + N_{jj}$	$N_{ik} : N_{jk}$	$\sum \chi^2_{Heterogeneidade}$ GL = n-1	$\chi^2_{1:1 Agrupado}$ GL = 1	Árvores com desvios de segregação
<i>Got-1</i>	A_1A_2	a)	11	36:153	–	29,89**	72,43**	7
		b)	4	24:41	–	4,14	4,45*	
<i>Got-2</i>	A_1A_2	a)	12	85:103	–	9,26	1,72	
		a)	27	238:260	–	79,80**	0,97	8
<i>Lap-1</i>	A_1A_2	b)	19	186:173	–	12,59	0,47	
		a) ²	2	21:19	0:0	2,50	0,10	
<i>6gpdh-1</i>	A_1A_2	a)	3	26:34	–	1,88	1,07	
		a) ²	5	26:30	15:14	15,96	0,32	1
<i>Pgi-2</i>	A_1A_2	a)	27	218:256	–	43,32*	3,05	5
		b)	22	187:203	–	17,48	0,66	
<i>Pgm-1</i>	A_1A_2	a)	16	136:169	–	38,90**	3,57	4
		b)	12	119:106	–	10,85	0,56	

(1) a) inclui todas as árvores heterozigotas em um dado loco; b) exclui as árvores com distorção de segregação em um dado loco.

(2) 2 x GL.

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

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

(*) $P < 0,05$.

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

TABELA 3 – Valores da medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows ($\hat{\Delta}_{ij}$), resultados do teste de qui-quadrado (χ^2) e probabilidade associada (P) para pares de locos isoenzimáticos em *M. urundeuva*.

Locos	$\hat{\Delta}_{ij}$	χ^2	P
<i>Got-1:Got-2</i>	0,000	0,09	0,770
<i>Got-1:Lap-1</i>	-0,008	1,96	0,161
<i>Got-1:Pgi-2</i>	0,002	0,20	0,654
<i>Got-1:6pgdh-1</i>	-0,000	0,00	0,969
<i>Got-1:Pgm-1</i>	0,003	0,34	0,562
<i>Got-2:Lap-1</i>	0,006	2,39	0,122
<i>Got-2:Pgi-2</i>	0,001	1,32	0,250
<i>Got-2:6pgdh-1</i>	0,004	0,02	0,881
<i>Got-2:Pgm-1</i>	0,004	0,58	0,447
<i>Lap-1:Pgi-2</i>	0,010	3,98*	0,046
<i>Lap-1:6pgdh-1</i>	-0,000	0,01	0,907
<i>Lap-1:Pgm-1</i>	-0,004	0,64	0,424
<i>Pgi-2:6pgdh-1</i>	-0,004	1,25	0,263
<i>Pgi-2:Pgm-1</i>	0,001	0,62	0,432
<i>6pgdh-1:Pgm-1</i>	0,001	0,14	0,708

(*) $P < 0,05$.

4 CONCLUSÕES

Em *M. urundeuva*, aparentemente, o loco isoenzimático *Got-1* não segrega na razão de segregação mendeliana 1:1.

Os pares de locos *Lap-1:Pgi-2* aparentemente não segregam de forma independente, estando possivelmente em equilíbrio gamético ou ligados.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo financiamento do projeto; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelas bolsas concedidas e aos técnicos: Ailton dos Reis, Alexandre Marques da Silva e Gelson Dias Fernandes, pela coleta do material de campo.

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.
- 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.
- 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.
- 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 Journal of Heredity**, Cary, v. 92, p. 260-266, 2001.
- GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, Oxford, v. 63, p. 135-141, 1989.
- 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.
- LACERDA, C. M. B. *et al.* Definição de protocolo enzimático para estudo da estrutura genética da aroeira. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 3, p. 311-315, 2001.
- MATHER, K. **The measurement of linkage in heredity**. New York: John Wiley & Sons, 1963. 149 p.
- 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.
- RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR**. Version 1.1. British Columbia: University of British Columbia. Disponível em: <<http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>>. Acesso em: 18 abr. 1998.
- 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. **Theoretical and Applied Genetics**, Asheville, v. 72, p. 483-493, 1986.
- TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGGLER, S. P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética - SBG, 1995. 186 p. (Série Monografias, 1).
- WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, Lawrence, v. 35, p. 235-354, 1979.
- YEH, F. C.; YANG, R. **POPGENE ver. 1.32: population genetics analysis**. Alberta: University of Alberta, 1999.