

HERANÇA GENÉTICA E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM LOCOS DE ISOENZIMAS EM *Esenbeckia leiocarpa**

Carlos Eduardo Sícole SEOANE**
Alexandre Magno SEBBENN***

RESUMO

Oito sistemas enzimáticos (EST, IDH, PGM, PGI, MDH, PER, 6PGDH e SKDH) codificando nove locos foram investigados em *Esenbeckia leiocarpa*. Quatro sistemas isoenzimáticos foram monomórficos (IDH, PGM, 6PGDH e SKDH) e quatro polimórficos (EST, PGI, MDH e PER). A herança mendeliana foi confirmada para quatro locos, pelo teste de ajuste dos padrões de segregação observados em relação à razão de segregação esperada 1:1, em progênies de árvores heterozigotas. O desequilíbrio de ligação foi examinado para dez pares de locos. Apenas um simples par de locos parece estar em desequilíbrio de ligação, *Est-1:Prx-1*.

Palavras-chave: segregação; guarantã; espécies arbóreas tropicais.

ABSTRACT

Eight enzymes systems (EST, IDH, PGM, PGI, MDH, PER, 6PGDH and SKDH) coding for nine loci were investigate in *Esenbeckia leiocarpa*. Four allozyme systems were monomorphic (IDH, PGM, 6PGDH and SKDH) and four polymorphic (EST, PGI, MDH and PER). Mendelian inheritance was confirmed for four loci by testing the fit of band-pattern to 1:1 expected segregation ratio in progeny from heterozygous trees. Linkage disequilibrium was examined for ten pair of allozymes loci. A simple pair of loci appears to be in linkage disequilibrium, *Est-1:Prx-1*.

Key words: segregation; guarantã; tropical tree species.

1 INTRODUÇÃO

Esenbeckia leiocarpa Engl. (guarantã) é uma espécie arbórea climática de ocorrência agregada e característica de floresta latifoliada primária. A espécie não tolera, quando jovem, insolação direta, razão pela qual não é encontrada em formações secundárias. Sua dispersão é restrita e descontínua, ocorrendo em frequência elevada somente em poucas áreas, na forma de reboleiras, que podem se estender por centenas de metros. Sua madeira é muito resistente e usada em obras externas como postes, dormentes, etc., e na construção civil para os mais diversos fins (Lorenzi, 1992).

O conhecimento do sistema de reprodução, estrutura e diversidade genética é de fundamental importância para o delineamento de estratégias para a conservação e o melhoramento genético de espécies arbóreas.

Tais informações podem ser eficientemente elucidadas com base em dados de marcadores bioquímicos. Contudo, para que essa classe de marcadores possa ser utilizada como marcadores genéticos é necessário, *a priori*, o conhecimento dos padrões de herança e associação entre alelos de diferentes locos (Furnier *et al.*, 1986; Gillet & Hattemer, 1989; Lewandowski *et al.*, 1992; Liu & Furnier, 1993; Pastorino & Gallo, 1998; Lewandowski, 2000).

O objetivo deste trabalho foi investigar a herança e o desequilíbrio de ligação em locos isoenzimáticos detectados em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. O estudo foi realizado comparando a segregação de progênies de polinização aberta de genótipos maternos de árvores heterozigotas.

(*) Aceito para a publicação em maio de 2004.

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

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem das Progênies

Sementes de polinização aberta foram coletadas em 20 árvores de duas populações naturais localizadas em dois fragmentos de *E. leiocarpa* do Estado de São Paulo: Estações Ecológicas de Caetetus (Latitude 22°22'S, Longitude 49°40'W) e Ibicatú (Latitude 22°47'S, Longitude 47°50'W). De cada árvore foram genotipadas, via eletroforese de isoenzimas, 20 sementes. O genótipo das árvores maternas foi determinado da composição genotípica de suas progênies, usando o método de máxima verossimilhança de Brown & Allard (1970), implementado no programa MLTR de Ritland (2002).

2.2 Eletroforese em Gel de Amido

As enzimas foram extraídas de tecidos foliares de plântulas empregando-se, aproximadamente, 20 mg de tecido de limbo foliar, 10 mg de areia lavada, 7 mg de Polivinil Pirrolidona (PVP 40), 7 mg de Polivinil Pirrolidona (PVP-60) e 200 microlitros da solução de extração número 1 de Alfenas (1998), alterada pela ausência de Mercaptoetanol. A eletroforese foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel de 2/3 de amido de milho (penetrose 30) a 13%, combinado com 1/3 de amido de batata (Sigma). As "corridas" foram realizadas em geladeira, com temperatura de 5°C. O tampão de cuba e do gel utilizado foi o Citrato Morfolina (CM pH 6,1 – Clayton & Treiak, 1972). A lista das isoenzimas investigadas encontra-se na TABELA 1.

TABELA 1 – Sistemas enzimáticos estudados em *E. leiocarpa*.

Sistemas enzimáticos (Abreviações) Número E.C.	Locos detectados	Número de alelos detectados/loco
Fosfoglucomutase (PGM) E.C. 5.4.2.2	A	1
Fosfoglucoase isomerase (PGI) E.C. 5.3.1.9	B	2
Isocitrato desidrogenase (IDH) E.C. 1.1.1.42	A	1
Malato desidrogenase (MDH) E.C. 1.1.1.37	A C D	2 3 3
α -Esterase (α -EST) E.C. 3.1.1.1	A	4
6-Fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) E.C. 1.1.1.44	A	2
Peroxidase (PER) E.C. 1.11.1.7	A	4
Xiquimato desidrogenase (SKDH) E.C. 1.1.1.25	A	1

2.3 Análise de Segregação

O estudo da herança isoenzimática em *E. leiocarpa* foi realizado com base no método descrito por Gillet & Hattemer (1989) que compara o genótipo de árvore materna com a segregação de suas progênies 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, e b) em casos de uma árvore mãe heterozigota (ex. A_iA_j , $i \neq j$):

i) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna, A_i ou A_j ; ii) o número de progênies heterozigotas A_iA_j (N_{ij}) deve ser igual a soma das progênies homozigotas A_iA_i (N_{ii}) A_jA_j (N_{jj}), $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$, e iii) o número de progênies heterozigotas A_iA_k (N_{ik}) deve ser igual ao número de progênies heterozigotas A_jA_k (N_{jk}), $N_{ik} = N_{jk}$, com $k \neq i, j$. A análise genética foi realizada com 20 plantas de cada uma das 20 progênies de polinização aberta.

Os fenótipos observados em cada progênie das árvores maternas heterozigotas foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1. As hipóteses foram aceitas ou descartadas com base no teste G padrão. Os fenótipos observados em progênies das árvores heterozigotas do mesmo genótipo materno, sem desvios no teste de segregação individual, foram somados e um teste G agrupado foi obtido ($G_{1:1Agrupado}$). A hipótese nula deste teste é a de igual proporção dos tipos de gametas em progênie produzida por diferentes árvores maternas de mesmo genótipo heterozigoto. Em seguida, testou-se a hipótese de homogeneidade de segregação entre progênies, usando-se um teste G de heterogeneidade ($\sum G_{Heterogeneidade}$), obtido pela subtração do teste de G agrupado ($G_{1:1Agrupado}$) da soma dos testes G individuais por progênies.

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado com base na medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (Δ_{ij} , Weir, 1979), usando o programa POPGENE versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). A medida de desequilíbrio de ligação de Burrows é apropriada para situações onde a união de gametas não ocorreu de forma aleatória e a identificação dos genótipos é incompleta (Weir & Cockerham, 1979). A hipótese $H_0: \Delta_{ij} = 0$ foi testada com o teste de qui-quadrado (χ^2) descrito em Weir (1979). Os locos foram designados com letras e números e os alelos com números, em ordem decrescente de migração do anodo para o catodo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Locos Isoenzimáticos Monomórficos

Nas condições de eletroforese utilizadas no presente estudo os sistemas isoenzimáticos IDH, PGM, SKDH e 6PGDH revelaram apenas uma zona de atividade aparentemente monomórfica. Em diversos outros estudos dos padrões de herança e segregação de isoenzimas em espécies arbóreas têm sido observados mais de uma zona de atividade enzimática e polimorfismo nesses sistemas.

3.2 Padrões dos Locos Isoenzimáticos Polimórficos

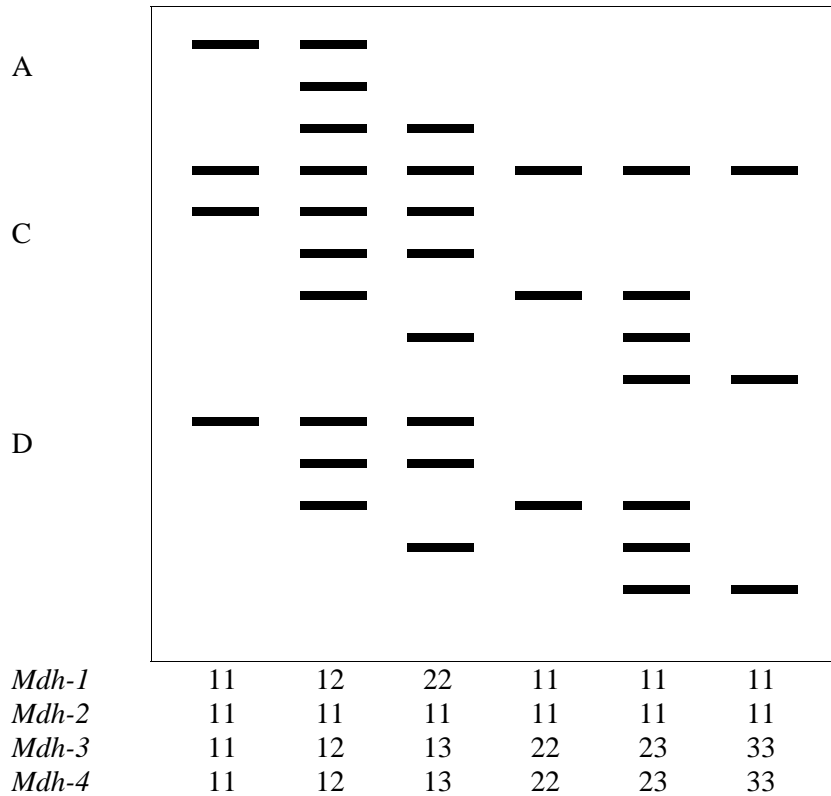
Alfa-Esterase (α -EST): o sistema α -EST apresentou uma simples zona de atividade denominada *Est-1* (FIGURA 1). A atividade enzimática nessa zona foi interpretada como um loco polimórfico segregando até quatro alelos. A observação do fenótipo de indivíduos heterozigotos indicou que essa enzima era monomérica.

Malato Desidrogenase (MDH): o sistema MDH apresentou quatro zonas de atividades. As zonas A (*Mdh-1*), C (*Mdh-3*) e D (*Mdh-4*) foram interpretadas como locos polimórficos, compostos por enzimas de expressão dimérica, segregando até três alelos por loco (FIGURA 1). A zona B (*Mdh-2*) apresentou-se como um loco monomórfico com um alelo fixado. Quatro zonas de atividade na enzima MDH também foram reportadas em *Pinus massoniana* Lamb. (Huang *et al.*, 1994) e *Pinus peuca* Griseb (Zhelev *et al.*, 2002).

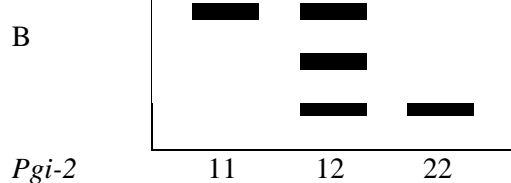
Fosfogluose Isomerase (PGI): o sistema PGI apresentou duas zonas de atividades. A zona de migração mais rápida, denominada loco *Pgi-1*, apresentou baixa qualidade de resolução e, por isso, foi descartada da análise genética. A zona de migração mais lenta (*Pgi-2*) foi interpretada como um loco polimórfico, controlado por uma enzima de expressão dimérica, segregando dois alelos (FIGURA 1). Praticamente a totalidade dos estudos com a enzima PGI, em espécies arbóreas, têm detectado duas zonas de atividade (Huang *et al.*, 1994; Wang & Lin, 1998; Lewandowski, 2000; Marchelli & Gallo, 2000; Pastorino & Gallo, 1998; Souza *et al.*, 2002).

Peroxidase (PER): o sistema PER apresentou apenas uma simples zona de atividade, interpretada como um loco polimórfico (*Per-1*) de expressão monomérica, segregando quatro alelos (FIGURA 1). Nesse sistema, em *Pinus thunbergii* Parl. (Shiraishi, 1988) e *Fagus sylvatica* L. (Müller-Starck & Starke, 1993) foram detectadas duas zonas de atividade nessa enzima, e em *Populus tremuloides* (Michx.), *Pinus nigra* L., *Pinus maximowiczii* Henry e *Pinus canadensis* Moench (Rajora & Dancik, 1992), até três zonas.

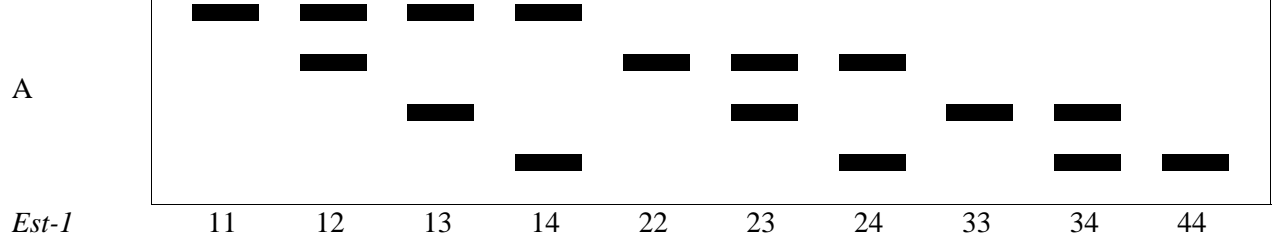
MDH



PGI



EST



PRX

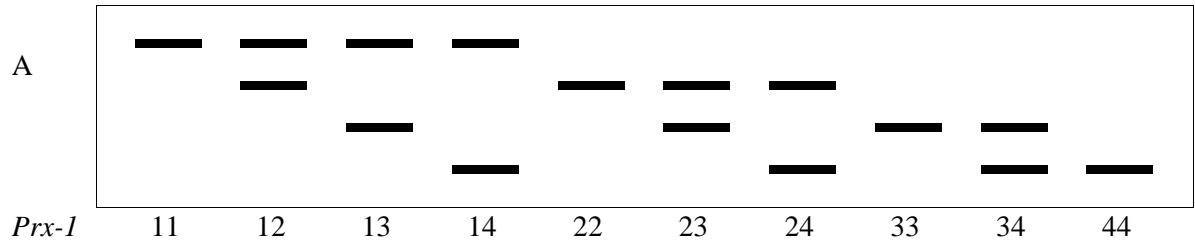


FIGURA 1 – Representação esquemática dos fenótipos observados nos zimogramas de *E. leiocarpa* nos sistemas EST, PGI, MDH e PER, juntamente com seus respectivos genótipos.

3.3 Padrões de Segregação e Desequilíbrio de Ligação

Não foram detectados fortes indícios de desvios de segregação nos locos isoenzimáticos estudados em *E. leiocarpa* (TABELA 2). Nos locos *Est-1* e *Mdh-3* não foram detectados desvios da razão de segregação esperada 1:1. A análise genética de progênes de árvores heterozigotas A_1A_2 , para o loco *Pgi-2*, rejeitou a hipótese de segregação 1:1 no teste G agrupado ($G_{Agrupado1:1}$), embora o teste de heterogeneidade ($\sum G_{Heterogeneidade}$) indicou que a segregação foi homogênea entre as árvores. Assim, aparentemente os alelos do loco *Pgi-2* não estão segregando de acordo com a razão esperada 1:1.

Por outro lado, o loco *Mdh-4* rejeitou a hipótese de segregação no teste G de heterogeneidade ($\sum G_{Heterogeneidade}$), mas não no teste agrupado, portanto não se rejeita a hipótese de segregação mendeliana esperada 1:1, embora exista variação no padrão de segregação entre progênes. No loco *Per-1*, três progênes de árvores heterozigotas A_1A_2 rejeitaram a hipótese de segregação 1:1 no teste agrupado ($G_{Agrupado1:1}$). Contudo, sete progênes de árvores heterozigóticas do tipo A_2A_3 , não rejeitaram a hipótese de segregação 1:1, para ambos os testes de qui-quadrado. Assim, não se rejeita a hipótese de segregação 1:1 no loco *Per-1*.

TABELA 2 – Teste para hipótese de segregação regular (teste G) de marcadores isoenzimáticos em *E. leiocarpa*.

Loco	Genótipo materno	Número de árvores (n)	$N_{ij} : N_{ii} + N_{jj}$	$N_{ik} : N_{jk}$	$\sum G_{Heterogeneidade}$ $GL = n - 1$	$G_{Agrupado1:1}$ $GL = 1$	Árvores com desvio de segregação
<i>Est-1</i>	A_1A_3	7	19:23	19:14	13,03£ ₁	1,14£ ₂	2
	A_2A_3	8	51:49	7:9	20,24£ ₁	0,29£ ₂	1
<i>Mdh-3</i>	A_1A_2	6	50:54	–	1,47	0,15	
<i>Mdh-4</i>	A_1A_3	2	0:37	0:3	47,13**£ ₁	4,16£ ₂	2
<i>Pgi-2</i>	A_1A_2	9	50:75	–	5,54	5,03*	2
<i>Per-1</i>	A_1A_2	5	6:22	–	0,19	9,72**	3
	A_2A_3	7	35:54	7:12	6,65£ ₁	5,42£ ₂	1

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 dos genótipos heterozigotos do tipo ik e jk , respectivamente; £₁, e £₂ têm 2(n-1) e 2 graus de liberdade, respectivamente;

(*) $P < 0,050$.

(**) $P < 0,010$.

Resumindo, com base nos resultados dos testes de qui-quadrado foram detectados desvios da razão de segregação 1:1 apenas no loco *Pgi-2*. Desvios de segregação têm sido detectados em vários locos isoenzimáticos de espécies arbóreas (Cheliak & Pitel, 1985; Shiraishi, 1988; Konnert *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2002). Diversas podem ser as causas dos desvios de segregação observados no loco *Pgi-2*, como as isoenzimas podem estar sob controle de mais de um loco, seleção, distorções meióticas, interações interalélicas, ligação com locos, possuindo alelos deletérios, erro amostral, erros de interpretação dos zimogramas nos géis (Cheliak & Pitel, 1985; Strauss & Conkle, 1986) e presença de alelos nulos (Gillet & Hatemer, 1989).

Dos dez possíveis pares de combinações entre locos, só foram detectados indícios significativos de desequilíbrio de ligação entre um par de locos: *Est-1:Per-1*. A medida composta de Burrows de desequilíbrio de ligação ($\hat{\Delta}_{ij}$) foi baixa, 0,053, embora tenha sido significativa ($\chi^2 = 9,53$, $P = 0,002$). Isso indica que os alelos desses locos estão associados e não segregam independentemente, de forma que um dos locos deve ser removido de análises que requeiram locos em equilíbrio gamético, como estudos do sistema de reprodução, análise de paternidade e estrutura genética populacional. Nos outros pares de locos não foram observados indícios de desequilíbrio de ligação.

4 CONCLUSÕES

O loco *Pgi-2* não segregou perfeitamente de acordo com as leis mendelianas. Os locos *Est-1:Per-1* não segregam de forma independente e é necessária a exclusão de um desses para análises genéticas que requeiram locos em equilíbrio gamético.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento do projeto, e à Assistente Técnica de Pesquisa Científica e Tecnológica Yara Cristina Marcondes, pela revisão gramatical do artigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicação em plantas e microorganismo. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 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.

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

CLAYTON, J.; TRETIK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v. 29, p. 1169-1172, 1972.

FURNIER, G. R. *et al.* Inheritance and linkage of allozymes in seed tissues of whitwark pine. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, 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.

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.

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.

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.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 302 p.

MARCHELLI, P.; GALLO, L. A. Genetic analysis of isozymes variants in open-pollinated families of southern beech (*Nothofagus nervosa* (Phill.) Dim. et Mil. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 49, p. 90-98, 2000.

MÜLLER-STARCK, G.; STARKE, R. Inheritance of isoenzymes in European Beech (*Fagus sylvatica* L.). **The Journal of Heredity**, Cary, v. 84, p. 291-296, 1993.

PASTORINO, M. J.; GALLO, L. A. Inheritance of isozyme variants in *Astrocedrus chilensis* (D. Do) Florin et Boutelje. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 47, p. 15-20, 1998.

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using *n* independent loci. **Heredity**, Oxford, v. 88, p. 221-228, 2002.

RAJORA, O. P.; DANCİK, B. P. Allozyme variation and inheritance in leaves of *Populus deltoides*, *P. nigra*, *P. maximowiczii* and *P. x canadensis* in comparison to those in root tips. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 41, p. 289-292, 1992.

SHIRAIISHI, S. Inheritance of isozymes variation in Japanese Black Pine, *Pinus thunbergii* Parl. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 37, p. 93-100, 1988.

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.

SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M. Herança genética e desequilíbrio de ligação em locos de isoenzimas em *Esenbeckia leiocarpa*.

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.

WANG, C. T.; LIN, T. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme, and estimation of outcrossing rate in a seed orchard of *Cunninghamia konishii* Hay. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 47, p. 33-37, 1998.

WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, Lawrence, v. 35, p. 235-354, 1979.

_____.; 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.

ZHELEV, P.; GÖMÖRY, D.; PAULE, L. Inheritance and linkage of allozymes in a Balkan endemic, *Pinus peuce* Griseb. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 93, p. 60-62, 2002.