

HERANÇA GENÉTICA E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM NOVE LOCOS ISOENZIMÁTICOS DE *Eremanthus erythropappus**

Sybelle BARREIRA**
Alexandre Magno SEBBENN***
Paulo Yoshio KAGEYAMA**

RESUMO

A herança e o equilíbrio genotípico foram estudados em sete sistemas isoenzimáticos (ACP, EST, 6PGDH, PGM, PGI, DIA e G6PDH), codificando sete locos em *Eremanthus erythropappus*. A análise foi baseada na segregação de progênies de polinização aberta de árvores maternas heterozigotas e o desequilíbrio foi estudado com base na medida de desequilíbrio genotípico de Burrows. O loco *G6pdh* não pôde ter sua herança estudada porque não foram detectadas árvores maternas heterozigóticas para este loco. As outras seis enzimas eram polimórficas e foram encontradas árvores maternas heterozigóticas. A herança mendeliana de seis locos (*Acp*, *Est*, *6pgdh*, *Pgi*, *Pgm* e *Dia*) foi confirmada pelo ajuste das frequências gaméticas maternas observadas às esperadas pelo modelo de segregação 1:1. O desequilíbrio de ligação foi examinado para 21 pares de combinações de locos. Um único par de locos parece estar em desequilíbrio de ligação, *Dia/G6pdh*.

Palavras-chave: segregação; candeia; espécies arbóreas tropicais; desequilíbrio genotípico de Burrows.

1 INTRODUÇÃO

Eremanthus erythropappus (DC.) Macleish (candeia) é uma espécie arbórea neotropical de grande importância econômica e que está sendo o centro de atenção em diversas partes do Estado de Minas Gerais, por seu valor econômico para pequenos e médios agricultores. Sua área de ocorrência é típica de locais montanhosos, pedregosos com solos ruins. A espécie, pertencente ao grupo ecológico das pioneiras ou secundárias iniciais,

ABSTRACT

The inheritance and linkage disequilibrium were studied in seven enzyme systems (ACP, EST, 6PGDH, PGM, PGI, DIA e G6PDH), codifying for seven loci in *Eremanthus erythropappus*. The segregation analysis was based on the segregation of open-pollinated offsprings from heterozygous mother-trees and the linkage disequilibrium was studied using Burrows genotypic disequilibrium measure. The inheritance of *G6pdh* locus was not studied because no heterozygous mother-tree was detected. Another six enzymes were polymorphic and heterozygous mother-tree could be found. Mendelian inheritance was confirmed for all six loci by the fitting of the observed maternal gametic frequencies to those expected from the 1:1 segregation ratio model. Linkage disequilibrium was examined for as many as 21 pairs of allozyme loci. A single pair of loci appears to be in gametic disequilibrium, *Dia/G6pdh*.

Key words: segregation; candeia; tropical tree species; Burrows genotypic disequilibrium.

é considerada precursora na invasão de campos (Carvalho, 1994). Seu crescimento é rápido em campos abertos, formando povoamentos quase puros. Em certas áreas a densidade de plantas por hectare chega a 400 indivíduos. A madeira de *E. erythropappus* é dura, resistente e apresenta odor de ácidos valerianos e um óleo essencial cujo princípio ativo é o α -bisabolol, que exhibe propriedades antiinflamatórias, antibacterianas, antimicóticas, dermatológicas e espasmódicas (Teixeira *et al.*, 1996).

(*) Aceito para a publicação em novembro de 2005.

(**) 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: alexandresebbenn@yahoo.com.br

E. erythropappus está sob regime de manejo no Estado de Minas Gerais. Contudo, praticamente nada se conhece sobre os níveis de diversidade genética, distribuição espacial dos genótipos e sistema de reprodução da espécie. Tais informações são fundamentais para delinear estratégias para a conservação, melhoramento genético e manejo florestal sustentado da espécie e podem ser eficientemente obtidas com base em dados de marcadores bioquímicos, como isoenzimas. Contudo, estimativas de parâmetros do sistema de reprodução e de diversidade genética dependem de modelos que pressupõem herança mendeliana e ausência de ligação entre os locos. Assim, para que as isoenzimas possam ser utilizadas como marcadores genéticos, é necessário o prévio estudo da herança e desequilíbrio de ligação entre locos (Furnier *et al.*, 1986; Gillet & Hattemer, 1989; Lewandowski *et al.*, 1992; Liu & Furnier, 1993; Pastorino & Gallo, 1998; Lewandowski, 2000). Tais estudos podem ser facilmente conduzidos com base em estruturas de progênies oriundas de genótipos maternos heterozigotos.

O objetivo deste trabalho foi investigar a herança e o desequilíbrio de ligação em locos isoenzimáticos detectados em *E. erythropappus*. O estudo foi realizado comparando-se a segregação de progênies de polinização aberta de genótipos maternos heterozigóticos com o esperado pela hipótese de segregação mendeliana 1:1.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem das Progênies

A população estudada encontra-se em um fragmento florestal localizada no município de Baependi, MG. Nessa região, *E. erythropappus* apresenta populações com mais de 300 árvores adultas reprodutivas por hectare.

Para o estudo foram coletadas sementes de polinização aberta em dois eventos reprodutivos envolvendo duas situações diferentes de interferência humana: um evento reprodutivo antes e um após a exploração. Antes da exploração foram coletadas sementes em 27 árvores e após em 24 árvores. A intensidade de exploração foi de 75%, restando aproximadamente 50 árvores adultas reprodutivas selecionadas para a melhor forma do fuste, aleatoriamente distribuídas pela área.

As sementes foram coletadas de árvores aleatoriamente escolhidas na população antes e após a exploração, distante entre si em pelo menos 100 m, para evitar coletar sementes em árvores aparentadas. De cada árvore foram genotipados, via eletroforese de isoenzimas, 15 descendentes. Como o estudo da segregação é baseado apenas na segregação gamética de árvores maternas heterozigóticas para os locos e o pólen não influencia essa segregação, não se espera que a exploração afete o estudo.

Foram amostrados, também, tecidos foliares em 230 árvores adultas. As sementes e as folhas foram transportadas para o Laboratório de Genética e Reprodução de Espécies Arbóreas - LARGEA, no Departamento de Ciências Florestais ESALQ/USP, em caixas de isopor com gelo, procedimento utilizado para evitar modificações bioquímicas (degradação das enzimas).

O genótipo das árvores maternas foi determinado da composição genotípica de suas progênies, utilizando-se o método de máxima verossimilhança de Brown & Allard (1970), implementado no programa MLTR de Ritland (2004).

2.2 Protocolo de Isoenzimas

O protocolo para os sistemas enzimáticos de *E. erythropappus* foi desenvolvido com base em Alfenas *et al.* (1991), com adaptações para a referida espécie. Para a análise de eletroforese de isoenzimas foram utilizadas amostras foliares dos indivíduos adultos e de plântulas. As amostras dos tecidos foliares das árvores adultas puderam ficar armazenadas por, no máximo, três dias e após este período começavam a oxidar.

Os testes para o desenvolvimento do protocolo envolveram dois tampões de extração (Alfenas, 1998; Soltis & Soltis, 1989) comparados para vários sistemas enzimáticos (TABELA 1). Após as análises de eletroforese, constatou-se que o tampão de Alfenas *et al.* (1991) apresentava melhor padrão de revelação, sendo, portanto, adotado como o tampão a ser utilizado em todas as extrações. A composição da solução pode ser observada na TABELA 2.

BARREIRA, S.; SEBBENN, A . M.; KAGEYAMA, P. Y. Herança genética e desequilíbrio de ligação em nove locos isoenzimáticos de *Eremanthus erythropappus*.

TABELA 1 – Composição da solução utilizada na extração de enzimas de *E. erythropappus*. (Fonte: Alfenas *et al.*, 1991).

Reagente	Quantidade
Fosfato de sódio dibásico	0,6 g
Sacarose	7 g
Polivinil pirrolidona PVP-40	2,56 g
L-ácido ascórbico	100 mg
Dietilditiocarbamato DIECA	100 mg
Bissulfito de sódio	50 mg
Borato de sódio	50 mg
Polietilenoglicol-6000	1 g
Mercaptoetanol	1-2 ml
Água destilada (q.s.p.)	100 ml

TABELA 2 – Enzimas testadas e seus respectivos códigos, para determinação do protocolo para *E. erythropappus*. (Fonte: Alfenas, 1998).

Enzima	Código
Esterase	α -EST – EC 3.1.1.1
Malato desidrogenase	MDH – EC 1.1.1.37
β -glucosidade	β -GLU – EC 3.2.1.21
Fumarase	FUM – EC 4.2.1.2
Galactose desidrogenase	GLDH – EC 1.1.1.48
6-fosfogluconato desidrogenase	6PGDH – EC 1.1.1.44
Leucina aminopeptidase	LAP – EC 3.4.11.1
Menadinona redutase	MR – EC 1.6.99.3
Fosfatase ácida	ACP – EC 3.1.3.2
Glutamato desidrogenase	GDH – EC 1.4.1.3
Isocitrato desidrogenase	IDH – EC 1.1.1.42
Fosfogluose isomerase	PGI – EC 5.3.1.9
Lactato desidrogenase	LDH – EC 1.1.1.27
Glucose-6-fosfato desidrogenase	G6PDH – EC 1.1.1.44
Álcool desidrogenase	ADH – EC 1.1.1.1
Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase	NADHDH – EC 1.6.99.3
Glutamato-oxaloacetato transaminase	GOT – EC 2.6.1.1
Diaforase	DIA – EC 1.6.4.3
Peroxidase	PO – EC 1.11.1.7
Fosfoglucomutase	PGM – EC 2.7.5.1
Xiquimato desidrogenase	SKDH – EC 1.1.1.25
Sorbitol desidrogenase	SDH – EC 1.1.1.14
Fosfatase alcalina	ALP – EC 3.3.3.1
Superóxido dismutase	SOD – EC 1.15.1.1
Glicerato 2 desidrogenase	G2DH – EC 1.1.1.29
Manitol desidrogenase	MADH – EC 1.1.1.67
Peroxidase método II	POII- EC – 1.11.1.7

Após a determinação do protocolo, todas as amostras de árvores adultas foram extraídas, embebidas em pedacinhos de papel (papel whatman n. 3), os quais foram colocados em microtubos e armazenados em freezer (-80°C).

Foram testados 27 sistemas de coloração, descritos na TABELA 2, para quatro sistemas de tampão de gel-eletrodo (Citrato de Morfolina, Histidina, Lítio/Borato e Tris Citrato) em gel horizontal de amido de milho (penetrose) e amido de batata a 13% de amido. Em cada gel foram colocadas 20 amostras e três pedacinhos de papel com azul de bromofenol para marcar distância de migração.

Dos tampões de gel-eletrodo testados, o Citrato de Morfolina pH 7,1/6,1 foi o que apresentou

melhor resolução das bandas para 13 sistemas enzimáticos, quando o material utilizado foi obtido dos indivíduos adultos (α -EST, ACP, PGI, 6PGDH, PGM, SKDH, G6PDH, LAP, DIA, GOT, NADHDH, MR, MDH), pois apresentaram ótima atividade e resolução das bandas passíveis de interpretação. Também, para o material obtido das plântulas, o tampão gel-eletrodo de Citrato Morfolina pH 7,1/6,1 foi o que apresentou melhor resolução das bandas. No entanto, os sistemas isoenzimáticos não mantiveram o padrão durante as corridas, restando sete com ótima atividade e resolução das bandas (ACP, α -EST, 6PGDH, PGM, PGI, G6PDH e DIA) (FIGURA 1).

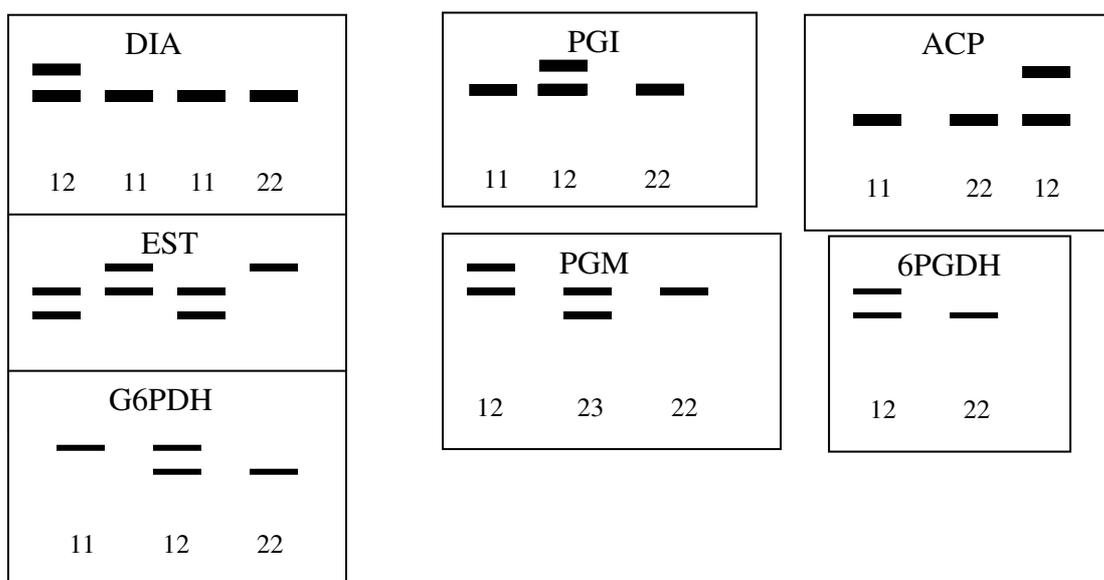


FIGURA 1 – Representação esquemática da interpretação de bandas dos sistemas enzimáticos analisados em progênies de *E. erythropappus*.

2.3 Análise de Segregação

O estudo da herança das isoenzimas foi baseado no método desenvolvido por Gillet & Hattemer (1989), que compara o genótipo de árvores maternas heterozigóticas com a segregação de suas progênies de polinização aberta.

O modelo analisa apenas a segregação gamética materna e é baseado nas seguintes pressuposições: *i*) segregação meiótica regular durante a produção de megásporos; *ii*) fertilização aleatória das oosferas por cada um dos tipos de pólen (haplóides), e *iii*) ausência de viabilidade seletiva diferencial nas progênies antes da investigação por marcadores genéticos.

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 heterozigóticas (ex. A_iA_j , $i \neq j$): b.1) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna, A_i ou A_j ; b.2) espera-se que o número de progênies heterozigóticas A_iA_j (n_{ij}) seja igual à soma das progênies homozigóticas A_iA_i (n_{ii}) e A_jA_j (n_{jj}), $n_{ij} = n_{ii} + n_{jj}$; b.3) espera-se que o número de progênies heterozigóticas A_iA_k (n_{ik}) seja igual ao número de progênies heterozigóticas A_jA_k (n_{jk}), $n_{ik} = n_{jk}$, com $k \neq i, j$. Inicialmente, os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigóticas foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1, usando o teste G , com um grau de liberdade. Em seguida, progênies de árvores de mesmo genótipo materno foram agrupadas e uma estatística G foi calculada para testar a hipótese de segregação agrupada 1:1 ($G_{1:1_Agrupado}$). Dessas árvores agrupadas, foi feito o somatório das estatísticas G individuais, obtendo-se a estatística G total ($G_{Total_1:1}$) e testando-se a hipótese de segregação 1:1 para o conjunto das progênies. Depois, os fenótipos observados de progênies de árvores heterozigóticas, 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 nas progênies, produzida por diferentes árvores maternas de mesmo genótipo heterozigótico. Quando não houve rejeição da hipótese de homogeneidade dos arranjos, validou-se o teste G agrupado de aderência à proporção esperada de 1:1. Esses testes são aditivos, de forma que $G_{Total_1:1} = G_{Homogeneidade} + G_{1:1_Agrupado}$, com distribuição de qui-quadrado e n , $n-1$ e 1 graus de liberdade, respectivamente. Quando os testes de homogeneidade resultaram estatisticamente significativos, as progênies que apresentaram desvios em relação à 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.

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado com base na medida composta de desequilíbrio genotípico de Burrows (Δ_{ij}) (Weir, 1979), usando o programa GDA (Lewis & Zaykin, 2002). A medida de desequilíbrio genotípico de Burrows é apropriada para situações em que 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).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Herança Genética e Desequilíbrio de Ligação

Um das pressuposições básicas do modelo de reprodução mista é a herança mendeliana codominante dos locos e a independência na segregação de alelos de diferentes locos (equilíbrio de ligação). Assim, a seguir são apresentados os padrões de revelação dos locos isoenzimáticos e os resultados dos testes de segregação e desequilíbrio de ligação entre os nove locos revelados nas progênies de *E. erythropappus*.

3.2 Padrões dos Locos Isoenzimáticos Polimórficos

Fosfatase ácida (ACP): foi possível observar a presença de mais de uma zona de atividade nesse sistema, mas apenas uma foi passível de interpretação. A zona de atividade interpretável foi determinada como uma enzima de expressão monomérica, visto que a observação dos fenótipos de árvores heterozigóticas, nos zimogramas, revelava duas bandas (FIGURA 1). Em *Trema micrantha* foram detectadas três zonas de atividade na enzima ACP, sendo todas monoméricas e segregando até três alelos (Ribas & Sebbenn, 2004a). Em *Cecropia pachystachya* também foram observadas três zonas de atividade nessa enzima, mas apenas a zona de atividade do meio apresentou polimorfismo (Ribas & Sebbenn, 2004b). Três zonas de atividade na enzima ACP também foram observadas em *Caesalpinia echinata* (Giudice-Neto *et al.*, 2004).

Alfa-Esterase (α -EST): o sistema α -EST apresentou uma zona de atividade passível de interpretação. Essa zona foi interpretada como um loco polimórfico segregando três alelos. O fenótipo de árvores heterozigotas apresentava duas bandas, indicando tratar-se de uma enzima monomérica (FIGURA 1). O mesmo padrão monomérico nessa enzima é relatado em *Caesalpinia echinata* (Giudice-Neto *et al.*, 2004), *Esenbeckia leiocarpa* (Seoane & Sebbenn, 2004), *Tabebuia cassinoides* (Sebbenn & Seoane, 2004) e *Trema micrantha* (Ribas & Sebbenn, 2004a).

Fosfogluconato Desidrogenase (6-PGDH): uma zona de atividade foi detectada na enzima 6PGDH. A observação de fenótipos de indivíduos heterozigóticos indicou que esta enzima tem expressão monomérica e segrega dois alelos. Um loco no sistema 6PGDH também foi relatado em *Pinus taeda* (Adams & Joly, 1980), *Genipa americana* (Sebbenn, 2004), *Myracrodruon urundeuva* (Moraes *et al.*, 2004), *Eschweilera ovata* (Gusson & Sebbenn, 2004), embora em muitos estudos dois locos tenham sido reportados nessa enzima (Cheliak & Pitel, 1985; Potenko, 2001; Sousa *et al.*, 2002; Giudice-Neto *et al.*, 2004; Sebbenn & Seoane, 2004).

Fosfoglucoose Isomerase (PGI): o sistema PGI apresentou duas zonas de atividade. A zona de migração mais rápida não pôde ser interpretada devido à baixa qualidade de revelação. A zona de atividade mais lenta foi interpretada como um loco polimórfico, controlado por uma enzima de expressão dimérica (genótipos heterozigotos apresentavam três bandas), segregando dois alelos (FIGURA 1). Em todas as espécies arbóreas são relatadas duas regiões de atividade nesta enzima e, em geral, a expressão é dimérica (Pastorino & Gallo, 2001; Sousa *et al.*, 2002; Seoane & Sebbenn, 2004; Sebbenn, 2004; Giudice-Neto *et al.*, 2004).

Fosfoglucomutase (PGM): o sistema PGM apresentou uma zona de atividade. Este loco foi interpretado como polimórfico segregando três alelos em estrutura monomérica (FIGURA 1). Na espécie neotropical *Esenbeckia leiocarpa*, Seoane & Sebbenn (2004) não observaram variação, interpretando o loco como monomórfico. Em *Tabebuia cassinoides* (Sebbenn & Seoane, 2004) e *Cecropia pachystachya* (Ribas & Sebbenn, 2004b) foram observadas duas zonas de atividade nessa enzima,

sendo ambas polimórficas e de expressão dimérica, ou seja, os fenótipos de indivíduos heterozigóticos apresentavam três bandas. Em *Myracrodruon urundeuva* foi observada uma zona de atividade, de expressão dimérica (Moraes *et al.*, 2004).

Diaforase (DIA): o sistema DIA apresentou uma zona de atividade. Esta zona foi interpretada como um loco polimórfico de expressão monomérica, segregando dois alelos (FIGURA 1). A enzima DIA é relatada em *Trema micrantha* como possuindo duas zonas de atividade, na zona de migração mais lenta foram observados três alelos (Ribas & Sebbenn, 2004a). Em *Eschweilera ovata* são relatadas três zonas de atividade nessa enzima, cada uma segregando três alelos (Gusson & Sebbenn, 2004). Em *Caesalpinia echinata* é relatada uma zona de atividade nessa enzima, onde é observada a segregação de três alelos (Giudice-Neto *et al.*, 2004). Todos os trabalhos citados se referem a esta enzima como sendo monomérica, ou seja, o fenótipo de indivíduos heterozigotos apresenta duas bandas nos géis.

Glucose 6 Fosfato Desidrogenase (G6PDH): Uma simples zona de atividade foi observada na enzima G6PDH. Esse loco foi interpretado como polimórfico, segregando dois alelos. Observando os zimogramas nos géis de indivíduos heterozigóticos, verificou-se que o fenótipo isoenzimático apresentava duas bandas, típico de enzimas monoméricas. Um simples loco controlando essa enzima também foi relatado em *Pinus thunbergii* (Shiraishi, 1988), *Pinus leucodermis* (Morgante *et al.*, 1993), *Pinus massoniana* (Huang *et al.*, 1994), *Eschweilera ovata* (Gusson & Sebbenn, 2004) e *Trema micrantha* (Ribas & Sebbenn, 2004a).

3.3 Segregação

Não foi possível submeter o loco *G6pdh* à análise de segregação porque não foram detectadas árvores maternas heterozigóticas.

Em geral, foram detectados poucos desvios de segregação nos locos isoenzimáticos estudados em *E. erythropappus* (TABELA 3). Em progênies de árvores heterozigóticas dos locos *Acp* e *Dia* não foram detectados desvios da razão de segregação esperada 1:1 em nenhum dos testes *G* aplicados, indicando que essas zonas de atividade enzimática estão sob controle de locos codominantes.

TABELA 3 – Testes *G* para hipótese de segregação codominante em locos isoenzimáticos de uma população de *E. erythropappus*.

Loco	Genótipo Materno	Caso	<i>m</i>	$n_{ij} : (n_{ii} + n_{jj})$	$n_{ik} : n_{jk}$	$G_{Total_1:1}$ GL = <i>n</i>	$G_{Homogeneidade}$ GL = <i>n</i> -1	$G_{1:1_Agrupado}$ GL = 1	Número de árvores com desvio
<i>Acp</i>	A_1A_2	a	24	117:128	–	24,8	24,3	0,49	1
<i>Est</i>	A_1A_2	a	16	73:67	–	19,01	18,75	0,25	2
		a	4	12:22	12:4	28,52**	21,35**	7,17*	2
	A_2A_3	b	2	3:8	3:2	3,56	1,00	2,56	
		a	3	3:5	3:3	11,7	4,53	7,24*	1
<i>6Pgdh</i>	A_1A_2	b	2	3:4	3:2	4,84	2,34	2,50	
		a	30	204:132	–	63,14**	47,59*	15,55**	9
<i>Pgm</i>	A_1A_2	b	21	128:102	–	16,7	13,76	2,95	
		a	6	22:44	–	12,4	5	7,48**	
<i>Pgi</i>	A_1A_2	a	13	81:66	–	56,97**	55,44**	1,53	5
		b	8	39:41	–	8,17	8,12	0,05	
<i>Dia</i>	A_1A_2	a	20	95:75	–	29,5	27,18	2,36	

(*) $P < 0,05$.(**) $P < 0,01$.

No sistema *Est*, progênies de 16 árvores heterozigotas A_1A_2 também não apresentaram desvios da hipótese de segregação 1:1, embora duas progênies individualmente tenham apresentado desvios da razão de segregação esperada 1:1. Por outro lado, foram detectados desvios da razão de segregação 1:1 nos três testes *G* em progênies de árvores heterozigóticas do tipo A_1A_3 . A causa dos desvios foi o excesso de homozigóticas do tipo A_3A_3 (dados não mostrados) e de heterozigotos do tipo A_1A_2 (TABELA 3). A análise individual de segregação das progênies mostrou que duas apresentavam desvios da hipótese de segregação 1:1. Quando essas foram excluídas da análise, os três testes se ajustam à hipótese de segregação mendeliana codominante 1:1. Segundo Sousa *et al.* (2002), distorções de segregação podem ser causadas por vantagem seletiva do alelo mais freqüente no loco. Em suma, como foram detectados desvios de segregação em progênies de apenas algumas poucas árvores A_1A_3

e grande número de progênies de árvores heterozigóticas A_1A_2 ajustaram-se à hipótese de segregação 1:1, conclui-se que esse loco está sob controle genético de um loco codominante.

A análise genética de 30 progênies de árvores heterozigóticas A_1A_2 , para o loco *6pgdh*, rejeitou a hipótese de segregação 1:1 nos três testes *G*. Das 30 árvores analisadas nesse loco, nove apresentavam desvios de segregação no teste *G* individual e de acordo com os resultados apresentados na TABELA 3 os desvios foram causados pelo excesso de heterozigotos (204 heterozigotos:132 homozigotos). Porém, quando as progênies de árvores heterozigóticas, apresentando desvios de segregação, foram excluídas das análises, todos os testes se ajustaram à hipótese de segregação regular 1:1, e como a grande maioria das árvores se ajustou à hipótese de segregação 1:1, não se rejeita a hipótese de que o loco *6pgdh* esteja sob controle genético de um loco codominante.

O excesso observado de heterozigotos poderia ter sido causado por seleção a favor de heterozigotos entre o momento da fertilização e a análise dos fenótipos. Como isoenzimas são geralmente neutras, ou seja, não sofrem seleção, a seleção detectada poderia ser explicada por ligação entre o loco avaliado e um loco não neutro. Seleção para heterozigotos tem sido constantemente reportada em locos isoenzimáticos de espécies arbóreas. Desvios de segregação no loco *6pgdh* também são relatados por Sousa *et al.* (2002) em *Araucaria angustifolia*.

O loco *Pgm* apresentou desvios de segregação no teste $G_{1:1, Agrupado}$ devido ao excesso de homozigotos (22 heterozigotos:44 homozigotos), embora nenhum dos testes individuais tenha apresentado desvio de segregação. Isso sugere que está ocorrendo desvio da razão de segregação codominante 1:1 nesse loco. Portanto, se rejeita a hipótese de segregação 1:1 no loco *Pgm*. 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). As causas dos desvios de segregação observados no loco *Pgm* podem ser diversas, como: as isoenzimas podem estar sob controle de mais de um loco, seleção, distorções meióticas, interações interalélicas, ligação com locos, possuir alelos deletérios, erro amostral e erros de interpretação dos zimogramas nos géis (Cheliak & Pitel, 1985; Strauss & Conkle, 1986).

O loco *Pgi* apresentou desvios de segregação nos testes da hipótese de segregação total 1:1 ($G_{Total_1:1}$) e de homogeneidade de segregação ($G_{Homogeneidade}$). A causa dos desvios foi o excesso de heterozigotos. Contudo, quando cinco progênies apresentando desvios de segregação individual foram excluídas das análises, todos os testes se ajustaram à hipótese de segregação codominante 1:1. A causa dos desvios na segregação individual de progênies de árvores heterozigotas pode estar associada ao pequeno tamanho amostral, 15 plantas por progênies e a presença de seleção favorecendo alelos, visto que ocorreu heterogeneidade de segregação entre árvores e um excesso de heterozigotos. Segundo Pastorino & Gallo (2001), o ideal para estudos de segregação é o uso de grandes progênies > 50, isto evitaria problemas de deriva amostral nos testes. No entanto, não se rejeita a hipótese de segregação no loco *Pgi*.

3.4 Desequilíbrio de Ligação

O teste de desequilíbrio de ligação foi conduzido usando a medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (TABELA 4). Dos 21 pares possíveis de combinações entre locos foram detectados indícios significativos de desequilíbrio de ligação entre os pares *Acp/Pgi*, *Est/Acp*, *G6pdh/6pgdh*, *Dia/Pgi* e *Dia/G6pdh* nas árvores adultas, *Acp/G6pdh* e *G6pdh/6pgdh* nas progênies antes do manejo e entre os locos *Acp/6pgdh*, *Est/Acp*, *G6pdh/Pgi* e *Dia/G6pdh* nas progênies pós-manejo. Contudo, como se trata da mesma população, mas gerações diferentes (adultos e duas gerações de descendentes), e as ligações não foram constantes entre as gerações, o desequilíbrio observado, aparentemente não é físico, mas gamético. Apenas o desequilíbrio observado entre os locos *Est/Acp*, *G6pdh/6pgdh* e *Dia/G6pdh* se repetiu em mais de uma geração. Desses, o desequilíbrio observado entre os pares de locos *Est/Acp* e *G6pdh/6pgdh* ocorreu na geração adulta e em apenas uma das gerações de progênies (antes ou após a exploração), sugerindo também se tratar de desequilíbrio gamético e não desequilíbrio de ligação. Nos outros dois locos, não foi possível avaliar as três gerações. O valor do coeficiente de desequilíbrio de Burrows (Δ_{ij}) foi de, no máximo, -0,085, indicando associação entre os alelos em repulsão. A medida de desequilíbrio de Burrows varia de -0,25 a 0,25 (Weir, 1979). Valor zero indica equilíbrio de ligação, valores tendendo a -0,25 indicam desequilíbrio de ligação e alelos de diferentes locos ligados em repulsão e valores tendendo a 0,25 indicam desequilíbrio de ligação e alelos de diferentes locos em acoplamento. Assim, pode-se afirmar que o desequilíbrio atingiu 34% do valor mínimo negativo (-0,25) e um dos locos. Em suma, esses resultados sugerem que os alelos dos *Dia/G6pdh* 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 nessa população do sistema de reprodução, análise de paternidade e estrutura genética populacional. Nos demais pares de locos não foram detectados indícios de desequilíbrio de ligação e é possível afirmar que os alelos de diferentes locos segregam independentemente.

BARREIRA, S.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Herança genética e desequilíbrio de ligação em nove locos isoenzimáticos de *Eremanthus erythropappus*.

TABELA 4 – Valores estimados para a medida composta de Burrows para o desequilíbrio gamético ($\hat{\Delta}_{ij}$), resultados do teste de qui-quadrado (χ^2) para pares de locos isoenzimáticos que apresentaram desvios significativos da hipótese de desequilíbrio de ligação em *E. erythropappus*.

Pares de locos	Adultos		Progênie antes		Progênie após	
	$\hat{\Delta}_{ij}$	χ^2	$\hat{\Delta}_{ij}$	χ^2	$\hat{\Delta}_{ij}$	χ^2
<i>Acp/Pgi</i>	-0,045	4,38*	0,006	0,32	-0,001	0,01
<i>Acp/Pgm</i>	0,023	0,89	–	–	–	–
<i>Acp/6pgdh</i>	0,005	0,09	0,004	0,49	-0,02	3,95*
<i>Acp/G6pdh</i>	0,012	0,57	0,030	5,03*	0,00	0,00
<i>Acp/Dia</i>	0,004	0,04	–	–	-0,001	0,00
<i>Est/Pgi</i>	-0,005	0,06	0,014	1,69	0,010	0,24
<i>Est/Pgm</i>	0,006	0,06	–	–	–	–
<i>Est/6pgdh</i>	0,012	0,49	0,013	3,43	0,00	0,07
<i>Est/G6pdh</i>	0,003	0,02	0,026	3,39	-0,010	0,16
<i>Est/Dia</i>	-0,035	2,74	–	–	–	–
<i>Est/Acp</i>	0,066	8,77*	0,025	2,02	0,030	4,26*
<i>6pgdh/Pgi</i>	-0,010	0,49	-0,003	0,15	0,006	0,22
<i>6pgdh/Pgm</i>	0,009	0,34	–	–	–	–
<i>G6pdh/Pgi</i>	-0,018	1,05	–	–	-0,026	4,87*
<i>G6pdh/Pgm</i>	0,011	0,31	–	–	–	–
<i>G6pdh/6pgdh</i>	0,027	5,14*	-0,014	5,83*	-0,001	0,22
<i>Dia/Pgi</i>	0,063	10,65**	–	–	-0,002	0,02
<i>Dia/Pgm</i>	-0,017	0,61	–	–	–	–
<i>Dia/6Pgdh</i>	0,001	0,00	–	–	0,002	0,02
<i>Dia/G6pdh</i>	-0,085	17,45**	–	–	0,031	6,21*
<i>Pgm/Pgi</i>	-0,012	0,38	–	–	–	–

(*) $P < 0,05$.

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

4 CONCLUSÕES

1. O estudo da herança e segregação em locos isoenzimáticos de *E. erythropappus* indica que os locos, em geral, segregam de acordo com as leis mendelianas.
2. O par de locos *Dia/G6pdh* apresentou indício de desequilíbrio de ligação, portanto, os alelos destes locos não segregam de forma independente e um dos locos deve ser excluído nessa população para análises genéticas que requeiram locos em equilíbrio de ligação, como estudos do sistema de reprodução e análises de paternidade.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos e estagiários do Laboratório de Reprodução e Genética - LARGEA do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ, a dois revisores anônimos pelas importantes sugestões feitas no prévio manuscrito e a Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo - FAPESP pelo financiamento do projeto. Alexandre Magno Sebbenn e Paulo Yoshio Kageyama também agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, W. T.; JOLY, R. J. Linkage relationships among twelve allozyme loci in loblolly pine. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 71, p. 199-202, 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.
- _____. **et al. Eletroforese de proteínas em fungos e essências florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 1991. 242 p.
- BROWN, A. H. D.; ALLARD, R. W. Estimation of mating system in open-pollinated maize populations using isozyme 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.
- FURNIER, G. R. **et al.** Inheritance and linkage of allozymes in seed tissues of whitebark 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.
- GIUDICE-NETO, J. del; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Herança e ligação em locos isoenzimáticos de *Caesalpinia echinata* L. (pau-brasil). **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 101-110, 2004.
- GUSSON, E.; SEBBENN, A. M. Herança e equilíbrio gamético 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.
- KONNERT, M.; RUETZ, W.; FROMM, M. Genetic variation in *Acer pseudoplatanus* L. I. Inheritance of isozyme 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.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **GDA - Genetic Data Analysis: version 1.1 for Windows 95/NT**. Disponível em: <<http://www.lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>>. Acesso em: 29 nov. 2002.
- 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.
- MORAES, M. L. T. **et al.** Análise de fenótipos isoenzimáticos e desequilíbrio de ligação em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 83-90, 2004.
- MORGANTE, M.; VENDRAMIN, G. G.; GIANNINI, R. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Pinus leucodermis*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 42, p. 231-237, 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.
- POTENKO, V. Inheritance of allozymes and genetic variation in natural population of Japanese Yew in Petrov Island, Russia. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 8, p. 307-313, 2001.
- RIBAS, L. A.; SEBBENN, A. M. Herança e desequilíbrio de ligação em locos isoenzimáticos de *Trema micrantha*. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 73-81, 2004a.
- _____. Herança e desequilíbrio gamético em sete locos de isoenzimas de *Cecropia pachystachya*. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 111-119, 2004b.

BARREIRA, S.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Herança genética e desequilíbrio de ligação em nove locos isoenzimáticos de *Eremanthus erythropappus*.

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**, Oxford, v. 88, p. 221-228, 2004.

SEBBENN, A. M. Herança e ligação em locos de isoenzimas em *Genipa americana* L. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 65-72, 2004.

_____.; SEOANE, C. E. S. Herança e ligação em isoenzimas de equilíbrio de ligação em locos isoenzimáticos de *Tabebuia cassinoides*. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 137-145, 2004.

SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M. Herança genética e desequilíbrio de ligação em isoenzimas de *Esenbeckia leiocarpa*. **Rev. Inst. Flor**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 57-63, 2004.

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

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. **Isozyme in plant biology**. Portland: Dioscorides Press, 1989. 268 p. (Advances in plant science, 4).

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.

TEIXEIRA, M. C. B. *et al.* Influência da luz na Germinação de sementes de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bit). In: XVIII-ERBOT., 1996, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 1996. p. 23-24.

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.