

Diversidade isoenzimática em *Myracrodruon urundeuva* em duas situações antrópicas no semi-árido

Isoenzymatic diversity in *Myracrodruon urundeuva* in two antropic situation in the semi-arid

Cristina Maria Batista de Lacerda
Paulo Yoshio Kageyama
Elza M. Ferraz

RESUMO: As populações de *Myracrodruon urundeuva* (Freire F. & M.F. Allemão - 1862) são originárias do semi-árido brasileiro e estão situadas na Estação Ecológica do Seridó (E.E.S.) - município de Serra Negra do Norte - RN e no Sítio Mata dos Alves (S.M.A.) - Imaculada - PB. A área da E.E.S. apresenta-se mais conservada, enquanto que no S.M.A. tem-se uma visão de perturbação antrópica bem acentuada. Folíolos de 30 indivíduos adultos por população foram analisados pela técnica de eletroforese de isoenzimas, em gel de penetrose de milho (13%). Verificou-se a presença de 8 locos com 10 alelos (E.E.S.) e 13 alelos (S.M.A.) nos indivíduos adultos, os quais representaram 7 sistemas enzimáticos: fosfoglucomutase (PGM), fosfoglucose isomerase (PGI), 6-fosfoglucomato desidrogenase (6PGDH), malato desidrogenase (MDH) glutamato-oxaloacetato trasaminase (GOT), leucina aminopeptidase (LAP), α -esterase (α -EST). As medidas de diversidade genética foram determinadas usando a frequência genotípica, diretamente inferidas pelas isoenzimas observadas nos géis. Em média, 12,5% (E.E.S.) e 25,0% (S.M.A.) dos locos foram polimórficos (critério de 0,95), o número efetivo de alelos por locos foi 1,3 e 1,6, respectivamente, a heterozigiosidade de 0,076, 0,121, com índice de fixação de -0,333 e -0,301 para as localidades da E.E.S. e do S.M.A., respectivamente. A taxa de cruzamento multilocos foi de 1,050 (E.E.S.) e 0,815 (S.M.A.), confirmando, portanto, a alogamia da espécie.

PALAVRAS-CHAVE: *Myracrodruon urundeuva*, Diversidade, Isoenzima, Heterozigiosidade, Eletroforese, Polimorfismo

ABSTRAT: The *Myracrodruon urundeuva* (Freire F. & M.F. Allemão) populations are originary of the semi-arid Brazilian, located in the Seridó Ecological Station (S.E.S.) - Serra Negra do Norte - RN and Mata dos Alves (S.M.A.) - Imaculada - PB. The area S.E.S. comes conserved, S.M.A. a vision of disturbance antropic is had well accentuated. Leaves of 30 adult individuals per populations were analysed by the isoenzymes electrophoretic technic, in maize penetrose (13%) gel. Were electrophoretically analysed 8 loci with 10 alleles (S.E.S.) and 13 alleles (S.M.A.) in the adults individuals. The represented seven enzyme systems: Phosphoglucomatase (PGM), Phosphoglucoisomerase (PGI), 6-Phosphoglucomatase dehydrogenase (6-PGDH), Malate dehydrogenase (MDH), Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), Leucine aminopeptidase (LAP) and α -Esterase (α -EST). Genetic diversity measures were determined using the genotype frequencies wich were inferred directly from the observed isozyme. On average, 12,5% (S.E.S.) and 25,0% (S.M.A.) of the loci were polymorphic (0,95 criterion). Effective number of alleles per locus was 1,3 and 1,6, respectively. Heterozygosity was 0,076 and 0,121 (S.E.S. and S.M.A., respectively) with fixation index of -0,333 (S.E.S.) and -0,301

(S.M.A.). The rate of mating was 1,050 and 0,815 (S.E.S. and S.M.A.), confirming, therefore, allogamia of the species.

KEYWORDS: *Myracrodruon urundeuva*, Genetic diversity, Isozyme, Heterozygosity, Electrophoresis, Polimorphism

INTRODUÇÃO

Estudos que comparam estrutura genética populacional de remanescentes florestais de diferentes tamanhos e graus de perturbação são fundamentais para o reconhecimento da perda genética real, fornecendo diretrizes para o uso racional dos recursos naturais.

O semi-árido brasileiro não é uma região homogênea, nem do ponto de vista botânico, nem climático, apresentando-se como uma vasta região heterogênea e com um patrimônio valiosíssimo quanto aos seus recursos naturais. Dentre os quais, as plantas xerófilas que representam, para as zonas áridas e semi-áridas, as únicas fontes vegetais produtoras de energia e asseguram as condições mínimas de sobrevivência da fauna silvestre e dos animais domésticos das zonas secas.

Com o desmatamento indiscriminado, o uso agrícola e mineral de forma errônea, as secas periódicas e o super pastejo dos animais domésticos (os maiores responsáveis pela aceleração no processo de degradação ambiental), a biodiversidade do semi-árido vem sofrendo perdas. Dentre as perdas, está a espécie *Myracrodruon urundeuva* que se encontra em franca erosão genética no nordeste brasileiro (Medeiros, 1996).

Myracrodruon urundeuva - (aroeira) pertence à família Anacardiaceae, é dióica, caracteri-

zada como secundária tardia, decídua, que inicia a derrubada das suas folhas nos meses de junho-julho. A queda total da folhagem e o início da floração vão do final de julho até setembro, respectivamente. Os primeiros frutos amadurecem no final de agosto e início de setembro, estendendo o período de frutificação até outubro (Pio Correa, 1926; Rizzini, 1971; Silva, 1978; FAO, 1986; Santin, 1989). A espécie é amplamente distribuída, ocorrendo desde a região Nordeste, avançando até a Argentina e o Paraguai. Ocorrendo, portanto, nas formações mais secas e abertas (Caatinga e Cerrado) até as muito úmidas e fechadas (Florestas tropicais) (Florsheim, 1992).

Dentre as técnicas de estudos existentes para se determinar as perdas da biodiversidade, encontra-se a eletroforese de isoenzimas. As isoenzimas têm sido usadas com êxito para a quantificação da diversidade genética, estimativa do sistema de cruzamento e taxa de endogamia em populações de espécies arbóreas tropicais (Hamrick e Loveless, 1986; O'Malley e Bawa, 1987).

O presente estudo visou quantificar a diversidade isoenzimática de *Myracrodruon urundeuva*, para detectar a existência de variações genéticas, associadas ao grau de perturbação de duas populações do semi-árido.

MATERIAL E MÉTODOS

População

As duas populações estudadas são originárias da região semi-árida do Brasil, situadas na Estação Ecológica do Seridó (E.E.S.) - Mu-

nício de Serra Negra do Norte - RN e no Sítio Mata dos Alves (S.M.A.) - Município de Imaculada - PB. A vegetação nas encostas de

morros da E.E.S. ainda se apresenta com áreas mais preservadas, com árvores de grande porte e uma maior diversidade de espécies, enquanto que a do S.M.A. encontra-se num grau de perturbação antrópica bem acentuada, apresentando-se em populações quase puras. As populações estão aproximadamente a 130 Km de distância uma da outra.

Amostragem

Foram utilizados tecidos foliares de 30 indivíduos adultos por população, os quais foram transportados e armazenados (Lacerda, 1997) no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA) - LCF/ESALQ/USP, em Piracicaba.

Eletoforese

As extrações das enzimas foram obtidas através da maceração foliar de indivíduos adultos, em aproximadamente 200 μ l de solução extratora composta por: fosfato de sódio bibásico (0,034M) - 0,6g; sacarose (0,2M) - 7,0g; polivinil pirrolidona-40 (2,56%) - 2,56g; DTT (3nM) - 0,05g; L-ácido ascórbico (5,7nM) - 0,1g; DIECA (5,8nM) 0,1g; bissulfite de sódio (2,6nM) - 0,05g; borato de sódio (2,5nM) 0,05g; polietilenoglicol 6.000 (1%) - 1,0g; água destilada -1000ml. Solução extração modificada de Alfnas et. al. (1991), pela ausência de 2-Mercaptoetanol. Antes da maceração das amostras, adicionaram-se aproximadamente 0,01g de areia lavada, 0,01g de Polyvinyl-pyrrolidone e Polyvinyl-pyrrolidone-360.

As análises eletroforéticas, transporte e acondicionamento do material (Ferraz et. al.,

1994) foram conduzidas em géis de penetrose de milho (13%), utilizando-se o sistema-tampão eletrodo: Citrato-morfolina (CM) de Clayton e Tretiak, 1972. Os sistemas isoenzimáticos utilizados foram: Fosfoglucomutase (PGM - EC 2.7.5.1); Fosfoglucoose isomerase (PGI - EC 5.3.1.9); 6-Phosphoglucomato desidrogenase (6PGDH - EC 1.1.1.44); Malato desidrogenase (MDH - EC 1.1.1.37); Glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT - EC 2.6.1.1); Leucina aminopeptidase (LAP - EC 3.4.4.11.1); α -Esterase (α -Est - EC 3.1.1.1) (Lacerda, 1997).

As isoenzimas que migraram mais rapidamente (anódica) no gel, foram designadas de loco 1, o próximo de loco 2 e assim sucessivamente. Dentro de cada loco, a banda de migração mais rápida foi denominada alelo 1 e as seguintes enumeradas como 2 e 3.

Análise dos dados

Através de freqüências alélicas, foram estimados os seguintes parâmetros:

(a) porcentagem de locos polimórficos [$P = (\text{n}^\circ \text{ de locos polimórficos}) / (\text{n}^\circ \text{ total de locos})$]; (b) número médio de alelos por loco [$A_p = (\text{n}^\circ \text{ total de alelos por locos polimórficos}) / (\text{n}^\circ \text{ locos polimórficos})$]; (c) heterozigosidade média observada ($\hat{H}_o = \sum P_i$) e heterozigosidade média esperada ($\hat{H}_e = \sum P_i^2$), em que: P_{ii} = freqüência dos genótipos homocigotos e p_i freqüência alélica estimada do iésimo alelo; (d) índice de fixação de Wright ou coeficiente de endogamia [$\hat{f} = 1 - (\hat{H}_o / \hat{H}_e)$], analisadas pelo programa de computador BIOSYS-1, desenvolvido por Swofford e Selander (1989) e (e) taxa de cruzamento multilocos (\hat{t}_m) obtidas a partir do programa MLT ("Multilocos") de Ritland (1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisaram-se 8 locos com 10 alelos totais na E.E.S. e 13 no S.M.A. em 4 sistemas

enzimáticos, para os indivíduos adultos (Tabela 1). Pgm-1, Pgi (1 e 2), Mdh (1, 2 e 3) na E.E.S.,

e Pgi (1 e 2), Mdh (2 e 3) no S.M.A. não mostraram variação alozímica; sendo assim, foram considerados locos monomórficos. Apenas na Est-1 da população do S.M.A., verificou-se a presença do alelo 3; comparativamente, os demais locos apresentaram os mesmos alelos nas duas populações.

A heterozigosidade esperada (H_e) por loco foi menor que a observada (H_o) por loco, refletindo dessa forma um excesso de heterozigotos, com índices de fixação negativos variando de -0,034 a -0,434. A população da E.E.S. apresentou um índice de fixação de -0,333 e a do S.M.A. de -0,301 (Tabela 1). Ambas populações apresentaram excesso de heterozigotos, sugerindo que possivelmente esteja ocorrendo efeitos de seleção em favor dos mesmos existentes na espécie.

A Tabela 1 mostra as frequências alélicas que permitiram estimar a heterozigosidade observada e esperada, bem como, o índice de fixação para populações de *M. urundeuva* no semi-árido brasileiro.

A Tabela 2 mostra a diversidade isoenzimática dentro e entre duas populações de *M. urundeuva* estudadas no semi-árido brasileiro, através dos principais parâmetros genéticos: porcentagem de locos polimórficos (P), número efetivo de alelos (A_p), heterozigosidade média observada e esperada (\hat{H}_o e \hat{H}_e) e taxa de cruzamento multilocos (i_m) e tamanho médio da amostra (N).

A heterozigosidade esperada (\hat{H}_e) foi relativamente menor que a observada (\hat{H}_o). As duas populações apresentaram uma heterozigosidade semelhante à encontrada por Hamrick e Godt (1990) de 0,109 para espécies tropicais, 0,124 para espécies de polinização por animais e 0,123 para espécies com dispersão pelo vento (características da espécie estudada). Moraes (1992), em estudo realizado

com *M. urundeuva* na Região de Bauru (SP) e Selvíria (MS), encontrou uma heterozigosidade média de 0,140 e 0,160, respectivamente. As populações do semi-árido (E.E.S. e S.M.A.) aqui estudadas, apresentaram valores próximos (0,076 e 0,121, respectivamente) aos encontrados por Moraes, 1992. Em ambos os trabalhos a diversidade genética foi de pequena magnitude, o que torna essas populações mais vulneráveis às condições adversas da natureza, devido a um menor potencial adaptativo.

A espécie apresentou baixo polimorfismo na E.E.S. e no S.M.A. (25,00% e 50,00% - Critério II). O baixo percentual de polimorfismo pode ser explicado pelo fato dos locos monomórficos e polimórficos terem sido amostrados ao acaso. Hamrick e Godt (1990), em estudo onde os locos monomórficos estavam presentes na estimativa da diversidade genética (amostragem ao acaso dos locos), encontraram para espécies vegetais, em média, 50,5% dos locos polimórficos e dentro de populações, em média, 34,2% de locos polimórficos.

Os sistemas de cruzamento nas plantas com reprodução sexuada variam de autogamia até a alogamia obrigatória. A taxa de cruzamento (\hat{t}) pode variar de planta para planta, de local para local e de ano para ano. O \hat{t} depende das características genéticas da planta, que possibilitam ou impedem a autofecundação (como a estrutura da flor, assincronia na floração, atividades de polinizadores, que variam no espaço e no tempo, e os sistemas de auto-incompatibilidade). As duas populações de *M. urundeuva* apresentaram altas taxas de cruzamento (1,050-E.E.S. e 0,815-S.M.A.). Como *M. urundeuva* é considerada uma espécie dióica, era esperada uma taxa de cruzamento de 100% nas populações. O percentual de aproximadamente 82% de cruzamentos na população do S.M.A. sugere perturbação na mesma (Tabela 2).

Tabela 1. Frequências alélicas, heterozigidade observada e esperada por loco (\hat{H}_o e \hat{H}_e) e índice de fixação por loco (\hat{f}) em duas populações, de *Myracrodruon urundeuva*, do Semi-Árido.

(Alleles frequencies, observed and expected heterozygosity per locus (\hat{H}_o e \hat{H}_e), fixation index (\hat{f}) in two populations in the *Myracrodruon urundeuva*, of the semi-arid.)

População	Estação Ecológica do Seridó							
	Loco	Alelo			\hat{H}_o	\hat{H}_e	\hat{f}	
	1	2	3					
Pgm-1	1,000	0,000	-	0,000	0,000			
Pgm-2	0,964	0,036	-	0,071	0,070	-0,037		
Pgi-1	1,000	0,000	-	0,000	0,000			
Pgi-2	1,000	0,000	-	0,000	0,000			
Mdh-1	1,000	0,000	-	0,000	0,000			
Mdh-2	1,000	0,000	-	0,000	0,000			
Mdh-3	1,000	0,000	-	0,000	0,000			
Est-1	0,733	0,267	-	0,533	0,398	-0,364		
Índice de fixação por população							-0,333	
População	Sítio Mata dos Alves							
	Loco	Alelo			\hat{H}_o	\hat{H}_e	\hat{f}	
	1	2	3					
Pgm-1	0,947	0,053	-	0,105	0,102	-0,056		
Pgm-2	0,957	0,043	-	0,087	0,085	-0,045		
Pgi-1	1,000	0,000	-	0,000	0,000			
Pgi-2	1,000	0,000	-	0,000	0,000			
Mdh-1	0,967	0,033		0,067	0,066	-0,034		
Mdh-2	1,000	0,000	-	0,000	0,000			
Mdh-3	1,000	0,000	-	0,000	0,000			
Est-1	0,604	0,375	0,021	0,708	0,504	-0,434		
Índice de fixação por população							-0,301	

Tabela 2. Estimativa dos parâmetros de diversidade isoenzimática em duas populações de *M. urundeuva*. (Estimate of the parameters of diversity isozyme in two populations of *M. urundeuva*)

População	(P)		(Ap)	\hat{H}_o	\hat{H}_e	$\left(\hat{t}_m\right)$	(N)
	Crit. I	Crit. II					
E.E.S.	12,50	25,00	1,3	0,076	0,057	1,050	27,6
			(0,2)	(0,066)	(0,048)	(0,08)	(1,0)
S.M.A.	25,00	50,00	1,6	0,121	0,093	0,815	25,8
			(0,3)	(0,085)	(0,047)	(0,04)	(2,7)

Os números entre parênteses correspondem aos desvios padrão

Critério I: quando a frequência do alelo mais comum for igual ou menor que 0,95;

Critério II: quando a frequência do alelo mais comum for igual ou menor que 0,99.

CONCLUSÃO

Baixos níveis de polimorfismo isoenzimático foram detectados nas populações estudadas.

A diversidade genética apresentada pelas populações de *Myracrodruon urundeuva* foi muito próxima aos valores médios das espécies arbóreas tropicais já estudadas.

A população que sofreu maior intervenção antrópica (S.M.A.) apresentou maior heterozigossidade, provavelmente devido à entrada de fluxo gênico oriundo de populações vizinhas.

M. urundeuva é uma espécie preferencialmente alógama, como confirmado pelos altos valores da taxa de cruzamento das duas populações. O valor da taxa de cruzamento de aproximadamente 82%, para a população do Sítio Mata dos Alves (S.M.A.), sugere a existência de variações genéticas associadas com o grau de perturbação.

AUTORES E AGRADECIMENTOS

CRISTINA MARIA BATISTA DE LACERDA é Engenheira Florestal, Mestre em Ciências Florestais pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) Caixa Postal 9 - 13400-970 - Piracicaba.

PAULO YOSHIO KAGEYAMA é Professor Titular do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) Caixa Postal 9 - 13400-970 - Piracicaba. - E-mail: kageyama@carpa.ciagri.usp.br

ELZA MARTINS FERRAZ é Técnica do Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas - Departamento de Ciências Florestais (LARGEA/LCF/ESALQ/USP) - Caixa Postal 9 - 13400-970 - Piracicaba. - E-mail: emferraz@carpa.ciagri.usp.br

Agradecimentos aos colegas do LARGEA pelo companheirismo e sugestões durante a realização desse trabalho. Ao Departamento de Ciências Florestais (ESALQ/USP), FAO e CAPES pelos recursos financeiros e pela concessão de bolsa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletoforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242p.
- FAO. **Databook on endangered tree and shrub species and provenances**. Rome, 1986. p.116-125.
- FERRAZ, E.M.; GANDARA, F.B.; LEPSPH-CUNHA, N.; REIS, M.S.; KAGEYAMA, P.Y. **Eletoforese de isoenzimas para espécies arbóreas: manual de laboratório**. Piracicaba: ESALQ / Departamento de Ciências Florestais / Laboratório de Biologia Reprodutiva e Genética de Espécies Arbóreas, 1994. 23p. (não publicado).
- FLORSHEIM, S.M.B. **Variações da estrutura anatômica e densidade básica da madeira de árvores de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão (Anacardiaceae)**. Piracicaba, 1992. 252p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S., ed. **Plant population genetic resources**. Sanderland: Sinauer, 1990. p.43-63
- HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. **Biotropica**, v.18, p.383-394, 1986.

- LACERDA, C.M.B. **Diversidade genética por isoenzimas em populações naturais de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Freire F. & M.F. Allemão) Anacardiaceae no semi-árido.** Piracicaba, 1997. 96p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- MEDEIROS, A.C.S. **Comportamento fisiológico, conservação de germoplasma a longo prazo e previsão de longevidade de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All. (Engl.)).** Jaboticabal: UNESP, 1996. 127p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista.
- MORAES, M.L.T. **Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão - Anacardiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Engler.** Piracicaba, 1992. 139p. Tese (Doutorado), - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- O'MALLEY, D.M.; BAWA, K.S. Mating system of a tropical rain forest tree species. **American journal of botany**, v.74, n.8, p.1143-1149, 1987.
- PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926. v.3, p.443-444.
- RITLAND, K. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. **The journal of heredity**, v.81, n.3, p.235-237, 1990.
- RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira.** São Paulo: Edgard Blücher / EDUSP, 1971. 294p.
- SANTIN, D.A. **Revisão taxonômica do gênero *Astronium* Jacq. e reavaliação do gênero *Myracrodruon* Fr. Allem. (Anacardiaceae).** Campinas: UNICAMP, 1989. 178p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Campinas.
- SILVA, L.B.X. Avaliação do comportamento inicial de diversas essências nativas e exóticas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE ECOLOGIA, 1, Curitiba, 1978. **Anais.**
- SWOFFORD, D.L.; SELANDER, R.B. **Biosys - 1: a computer program analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics.** Release 1, 7. Chicago: Illinois Natural History Survey, 1989.

