

ESTUDO DA VARIABILIDADE ISOENZIMÁTICA EM *EUCALYPTUS UROPHYLLA* DAS ILHAS FLORES

The isoenzymatic variation in Eucalyptus urophylla of Flores Island

Maisa Pimentel Martins-Corder ; Edson Seizo Mori
Paulo Yoshio Kageyama ; Catalina Romero Lopes

RESUMO: A população de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake do presente estudo, originária da Ilha Flores, foi selecionada em uma população base geneticamente variável, para florescimento precoce. Plântulas de 17 progênies entre 2 e 5 meses de idade foram analisadas pela técnica de eletroforese, em gel de penetrose de milho (13%). Verificaram-se a presença de 9 (possíveis) locos e 29 alelos, os quais representaram 5 sistemas enzimáticos: α -Esterase (α -EST), Xiquimato desidrogenase (SKDH), Malato desidrogenase (MDH), Isocitrato desidrogenase (IDH) e Leucina aminopeptidase (LAP). As medidas da variabilidade genética foram determinadas usando a frequência genotípica que foram diretamente inferidas pelas isoenzimas observadas nos géis. Na média, 77,8% dos locos foram polimórficos (critério de 0,95), o número efetivo de alelos por locos foi 3,20, a heterozigosidade foi de 0,31 e a taxa de cruzamento foi 64%. Conseqüentemente, o sistema reprodutivo da população é intermediário, sendo preferencialmente por alogamia. Embora a população de *E. urophylla* já tenha sido submetida a um ciclo de seleção, constatou-se uma ampla base genética através dos altos níveis de polimorfismo e heterozigosidade observados.

PALAVRAS-CHAVE: *Eucalyptus urophylla*, Eletroforese, Isoenzima, Variabilidade, Polimorfismo, Heterozigosidade.

ABSTRACT: The population of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake of the present study is originary from Flores Island. It was previously selected in a genetically variable base population for premature flowering. Seedlings of 17 arrays progenie between age of two and five months were electrophoretically analysed at 9 possible loci and 29 alleles. They represented five enzyme systems: α -Esterase (α -EST), Shikimate dehydrogenase (SKDH), Malate dehydrogenase (MDH), Isocitrate dehydrogenase (IDH), and Leucine aminopeptidase (LAP), in cornstarch gel (penetrose) at 13%. Genetic variability measures were determined using the genotype frequencies which were inferred directly from the observed isozyme. On average, 77,8% of the loci were polymorphic (0,95 criterion). Effective number of alleles per polymorphic locus was 3,20. Mean heterozygosity was 0,31. Mean rate of mating was 64%. Thus, the breeding system of the population is intermediary, being preferentialy allogamous. Although submitted to a selection cycle, this population



represents a large base for further genetic improvements, due to the high levels of observed polymorphism and heterozygosity.

KEYWORDS: *Eucalyptus urophylla*, Electrophoresis, Isozyme, Variation, Polimorphism, Heterozygosity.

INTRODUÇÃO

A técnica de eletroforese de isoenzimas é uma ferramenta valiosa para o melhoramento genético e conservação de espécies florestais.

Basicamente, as isoenzimas são utilizadas para: (a) estudar a diversidade genética de populações distintas ou espécies e (b) como marcadores moleculares no “senso strictu”.

Alta variabilidade nos marcadores foi descrita para várias espécies de *Eucalyptus*: *E. urophylla* (Martins-Corder, 1994); *E. grandis* (Martins-Corder, 1994; Mori, 1993); *E. cloeziana* (Passador, 1994); *E. pulverulenta* (Peters et al., 1990); *E. citriodora* (Yeh et al., 1983); *E. obliqua* (Brown et al., 1975) e diversas outras descritas por Brown & Moran (1981).

No Brasil, estudos a respeito do nível de diversidade isoenzimática em populações de *Eucalyptus* spp são ainda incipientes. Pesquisas dessa natureza podem definir importantes estratégias a serem adotadas em programas de melhoramento genético.

Deste modo, o presente estudo visou quantificar a variabilidade isoenzimática de *E. urophylla*, procedente de Ilhas Flores (Indonésia), que foi submetida, anteriormente, a uma seleção visando florescimento precoce.

MATERIAL E MÉTODOS

População

O presente estudo foi conduzido com 17 famílias de meios-irmãos de *E. urophylla* S.T. Blake, denominadas P01, P02, P08, P13, P14, P15, P25, P26, P27, P31, P32, P33, P37, P38, P53,

P56 e P74, selecionadas em população base para melhoramento, localizada na Estação Experimental de Anhembi (SP) da ESALQ/USP. As árvores que floresceram mais cedo, por volta de 10 meses foram selecionadas para comporem um teste de progênie de primeira geração.

Amostragem

As 17 famílias de meios-irmãos foram analisadas entre as idades de 2 e 5 meses, no viveiro do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP.

As plântulas foram produzidas sob 50% de sombra, com adubação semanal e irrigação diária.

Analisou-se, em média, 18 indivíduos para cada família de meios irmãos.

Eletroforese

Os extratos foliares foram obtidos através da maceração de uma folha juvenil em 200 µl de solução extratora composta por: Fostato de sódio bibásico (0,034M) - 0,6g.; Sacarose (0,2M) - 7,0g.; PVP-40 (2,56%) - 2,56g.; DTT (3mM) - 50mg.; L-Ácido ascórbico (5,7 mM) - 100,0mg.; DIECA (5,8 mM) - 100,0mg.; Bissulfito de sódio (2,6 mM) - 50,0mg.; Borato de sódio (2,5mM) - 50,0mg.; 2-Mercaptoetanol (0,2%) - 0,2ml; Polietilenoglicol 6000 (1%) - 1,0 g.; água destilada - 100,0ml. A solução foi elaborada por Namkoong (s/d) e citada por Alfenas et al. (1991). Conforme sugestão dos autores, adiciona-se um traço de PVPP antes da maceração das amostras.



Os procedimentos adotados nas análises eletroforéticas, e descritos por Conkle *et al.* (1982), foram conduzidos em camada suporte de amido de milho (penetrose) a 13%.

Utilizaram-se os seguintes sistemas-tampão gel/eletrodo:

(a) Citrato-morfolina (CM: pH 6,1: *tampão do eletrodo*: 0,04M ácido cítrico, ajustado com N-(3-aminopropil) morfolina; *tampão do gel*: diluição de 1:20 do tampão do eletrodo; *condições de corrida*: 25 mA, 220 V; (Clayton & Tretiak, 1972), para revelação de Malato desidrogenase (MDH - EC 1.1.1.37); Isocitrato desidrogenase (IDH - EC 1.1.1.42); Leucina aminopeptidase (LAP - EC 3.4.11.1) e, (b) Tris-citrato (TC: Ph 7,5: *tampão do eletrodo*: - 0,223M tris (hidroximetil)amino-metano e 0,086M ácido cítrico, ajustado com tris; *tampão do gel*: diluição de 3,5% do tampão do eletrodo; *condições de corrida*: 20 mA, 130 V; (Soltis *et al.*, 1983), para α -Esterase (α -EST - EC 3.1.1.1) e Xiquimato desidrogenase (SKDH - EC 1.1.1.25).

A revelação das isoenzimas, a fixação e a secagem dos géis seguiram metodologia proposta por Alfenas *et al.* (1991).

Para cada sistema enzimático, as isoenzimas que migraram mais rapidamente (anódica) no gel, designou-se de loco 1, o próximo de loco 2 e assim por diante. Dentro de cada loco, a banda de migração mais rápida foi denominada alelo 1 e cada banda sucessiva foi enumerada 2, 3, 4, etc.

Análise de Dados

A partir dos zimogramas calcularam-se as frequências alélicas em cada loco, empregando-se as estimativas de:

- heterozigosidade por loco ($h_1 = 1 - \sum x^2$) e heterozigosidade média [$H = (1/r) \sum h_1$];
- índice de fixação [$F = 1 - (H_o/H_e)$];
- taxa efetiva de cruzamento [$t = (1-F)/(1+F)$]. Outros cálculos foram efetuados para

estimar: (a) porcentagem de locos polimórficos [$P = (n^\circ \text{ de locos polimórficos}) / (n^\circ \text{ total de locos})$]; (b) número médio de alelos por loco [$Ap = (n^\circ \text{ total de alelos por locos polimórficos}) / (n^\circ \text{ de locos polimórficos})$].

Essas análises foram fornecidas pelo programa de computador BIOSYS - 1, desenvolvido por Swofford & Selander (1989).

RESULTADOS

Analisaram-se 9 zonas de atividade (locos) e 29 variantes alozímicas em 5 sistemas enzimáticos. As frequências alélicas e demais parâmetros genéticos estão apresentados na Tabela 1. Apenas Mdh-1 não mostrou variação alozímica, sendo assim, considerado um loco monomórfico. Alelos raros estiveram presentes em 78% dos locos analisados. Observou-se que, em α -Est-1, Skdh e Lap-2, a frequência do alelo mais comum não correspondeu ao alelo 1. Isto ocorreu no sentido de facilitar os estudos comparativos com a outra população de *E. urophylla* de Timor, analisada anteriormente por Martins-Corder (1994). Nesse caso, verificou-se que houve alteração no perfil isoenzimático, conforme ilustrado na Figura 1, em relação à presença do alelo 4 da α -Est-2, apenas na população de *E. urophylla* das Ilhas Flores. Comparativamente, os demais (possíveis) locos apresentaram os mesmos alelos nas duas populações.

No geral, verificou-se que a heterozigosidade esperada (H_e) por loco foi maior que a heterozigosidade observada (H_o) por loco, em 89% dos locos analisados. Isto refletiu em um excesso de homozigotos, com índices de fixação positivos que variaram de 0,126 a 0,582. Apenas α -Est-3 apresentou um ligeiro excesso de heterozigotos ($F = -0,053$).

A amplitude de variação da amostra foi de 249 a 300 indivíduos. Isto se deu em virtude da dificuldade na interpretação dos perfis de bandas de determinados indivíduos, não sendo estes então, incluídos nas análises estatísticas.



Tabela 1:

Freqüências alélicas, heterozigiosidade observada por loco (Ho), heterozigiosidade esperada por loco (He), índice de fixação (F) e taxa de cruzamento (t), em 9 locos isoenzimáticos de *Eucalyptus urophylla*, das Ilhas Flores.

Alleles frequencies, observed heterozygosity per locus (Ho), expected heterozygosity per locus (He), fixation index (F) and outcrossing rate (t), in 9 isozyme loci of Eucalyptus urophylla, from Flores Island.

Loco	Alelo					Ho	He	F	t
	1	2	3	4	5				
α -Est-1	0,278	0,035	0,174	0,513		98	181,009	0,458	0,372
α -Est-2	0,782	0,012	0,089	0,117		100	110,406	0,093	0,830
α -Est-3	0,594	0,364	0,042			137	130,369	0,053	1,112
Skdh	0,283	0,486	0,030	0,185	0,016	116	163,040	0,287	0,554
Lap-1	0,494	0,027	0,113	0,366		95	156,702	0,393	0,436
Lap-2	0,349	0,448	0,203			136	158,751	0,142	0,751
Mdh-1	1,000								
Mdh-2	0,954	0,046				20	22,936	0,126	0,776
Idh	0,896	0,098	0,006			20	47,900	0,582	0,264
Média								0,254	0,640

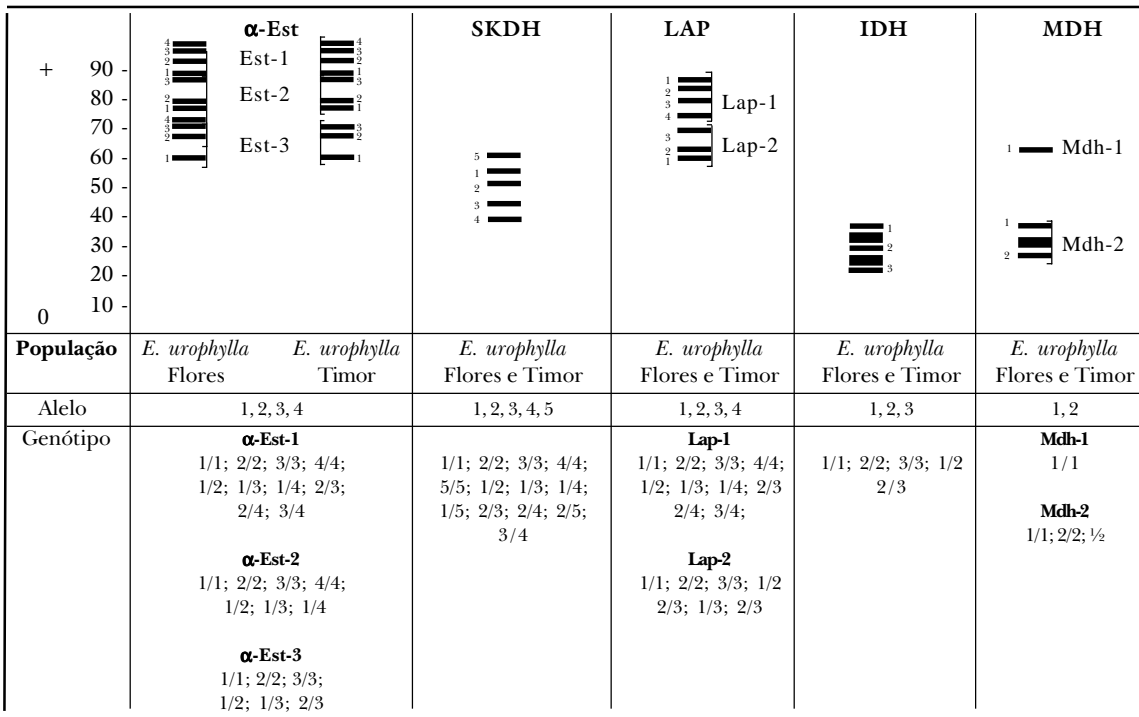


Figura 1:

Diagrama da variação isoenzimática de *E. urophylla* das Ilhas Flores e Timor. Os genótipos das isoenzimas de *E. urophylla* de Timor estão representados abaixo do diagrama. As isoenzimas α -Est, Skdh e Lap são monoméricas. As Idh e Mdh são diméricas.

Diagram of the isozyme variation of Eucalyptus urophylla from Flores and Timor Islands. The genotype of the isozymes of E. urophylla from Timor are represented below the diagram. The α -Est, Skdh and Lap enzymes are monomeric. The Idh and Mdh are dimeric.



Tabela 2:

Estimativas do número médio de alelos por locos (Ap), porcentagem de locos polimórficos (P), heteroziguidade média (H) e tamanho médio da amostra (N), em diferentes populações de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*.

Estimates of average number of alleles per locus (Ap), percentage of polymorphic loci (P), average heterozygosity (H) and average size of the sample (N), in different populations of Eucalyptus urophylla and E. grandis.

População	Referência	Grau de Melhoro-mento	No médio de alelos/loco (Ap)	% locos polimórficos (P) Crit. I Crit. II		Heteroziguidade média (H)	Tamanho médio amostra (N)
<i>E. urophylla</i> (Ilha Flores)	Presente estudo	P.S.M.	3,20 (0,4)	77,8	88,9	0,305 (0,069)	265,2 (6,0)
<i>E. urophylla</i> (Dilli-Timor)	MARTINS-CORDER, 1994	A.P.S.	3,00 (0,3)	81,8	90,9	0,283 (0,067)	231,4 (14,4)
<i>E. grandis</i> (Coff's Harbour)	MARTINS-CORDER, 1994	A.P.S.	2,50 (0,3)	54,5	72,7	0,166 (0,055)	266,7 (1,7)
<i>E. grandis</i> (Coff's Harbour)	MORI 1993	P.S.C.	3,30 (0,5)	87,5	87,5	0,364 (0,092)	35,0 (0,0)

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.

P.S.M.- Pomar de sementes por mudas; A.P.S.-Área de produção de sementes; P.S.C.- Pomar de sementes clonal.

A tabela 2 mostrou a estimativa da variabilidade isoenzimática dentro da população de *E. urophylla* das Ilhas Flores, através dos principais parâmetros: número efetivo de alelos por loco, porcentagem de locos polimórficos e heteroziguidade média.

Para fins comparativos, na tabela 2 incluíram-se os resultados obtidos, por Martins-Corder(1994) e Mori (1993), em *E. urophylla* de Timor, e *E. grandis* de Coff's Harbour, respectivamente. Estas populações foram analisadas em condições laboratoriais similares e têm em comum, a maioria dos sistemas enzimáticos testados. Desse modo, as análises comparativas são mais seguras.

A população de *E. urophylla* das Ilhas Flores figurou entre as espécies com valores mais elevados em termos de medidas de diversidade.

A taxa efetiva média de cruzamentos (t) de *E. urophylla* das Ilhas Flores foi de 64%.

Verificaram-se, no entanto, que a-Est-1 e Idh foram os que mais contribuíram no sentido de reduzir o valor médio de t.

DISCUSSÃO

O sistema de cruzamento de *E. urophylla* é intermediário, podendo ocorrer em um mesmo fruto sementes oriundas de autofertilização e/ou fertilização cruzada. No entanto, são inúmeras as anormalidades provocadas pela autofertilização, que vão desde o crescimento anormal do tubo polínico no estigma da própria flor, até a mortalidade (ou crescimento retardado) de plantas (Zobel & Talbert, 1984), em diferentes etapas de desenvolvimento.

A presença de vários alelos raros (por exemplo, alelo 2 em α -Est-1; alelo 2 em α -Est-2; alelo 3 em α -est-3; alelo 5 em Skdh) pode ser devida às mutações que eventualmente tenham ocorrido



na população, ou, à introdução desses no conjunto gênico da população através de hibridações com populações vizinhas de *Eucalyptus*, por migração. Mori (1993) observou significativas taxas de migração de alelos com baixa frequência, em uma população de *E. grandis*.

A espécie *E. urophylla* mostra, em seu habitat natural, uma das maiores variações entre todas as espécies de *Eucalyptus spp.* que é devido a sua ampla distribuição geográfica (Eldridge et al., 1993). Inclusive, comentaram os autores, a variação contínua (clinal) nas características morfológicas tem dificultado a separação taxonômica de formas distintas em novas espécies ou variedades.

Altos níveis de polimorfismo isoenzimático foram detectados na população em estudo. Isto

revelou que existe uma ampla base genética na população que pode ser devida à amostragem adequada do material, que é genuinamente variável e/ou à seleção para a característica precocidade de florescimento, não está conduzindo a perdas na variabilidade alozímica. As características de crescimento, que são freqüentemente visadas na seleção, e as isoenzimas estão estreitamente relacionadas com os sistemas adaptativos (Mitton, 1989). Deste modo, a seleção para crescimento pode levar a uma maior uniformidade em nível isoenzimático. A manutenção da variabilidade genética é fundamental para o sucesso dos programas de melhoramento (Zobel & Talbert, 1984). Populações com ampla variabilidade são menos vulneráveis às condições adversas devido ao seu maior potencial adaptativo.

AUTORES E AGRADECIMENTOS

MAISA PIMENTEL MARTINS-CORDER: Professora Doutora Visitante da Universidade Federal de Santa Maria, RS (UFSM);

EDSON SEIZO MORI: Professor Doutor do Departamento de Agricultura e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), Botucatu, SP.

PAULO YOSHIO KAGEYAMA: Professor Adjunto do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) - Piracicaba, SP.

CATALINA ROMERO LOPES: Professora Departamento de Genética do Instituto de Biociências (IB/UNESP) - Botucatu, SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa: UFV, 1991. 242 p.
- BROWN, A. D. H.; MORAN, G. F. Isozymes and the genetic resources of forest trees. In: SYMPOSIUM ON ISOZYME OF NORTH AMERICAN FOREST TREES AND FOREST INSECTS, 1981. *Proceedings*. Berkeley: Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, 1981. p.1-10.
- BROWN, A. D. H.; MATHESON, A.C.; ELDRIDGE, K.G. Estimation of the mating system of *Eucalyptus obliqua* L'Herit using allozyme polymorphism. *Australian Journal of Botany*, v. 23, p. 931-49, 1975.
- CLAYTON, J.; TRETIAK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel eletrophoresis. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, Ottawa, v. 29, p.1169-72, 1972.
- CONKLE, M. T.; HODGESSKISS, P. D.; NUNKALLY, L. B.; HUNTER, S. C. *Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual*. Berkeley: Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, 1982. 64 p.



- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; VAN WYK, G. *Eucalypt Domestication and Breeding*. New York: Oxford University Press, 1993. 288 p.
- MARTINS-CORDER, M. P. *Caracterização isoenzimática de híbridos de Eucalyptus spp.* Botucatu, 1994. 113 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista.
- MITTON, J. B. Physiological and demographic variation. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S., ed. *Isozyme in plant biology*. Portland, 1989, v. 4, p. 127-145.
- MORI, E. S. *Variabilidade genética isoenzimática em uma população de Eucalyptus grandis Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção*. Piracicaba, 1993. 119 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- PASSADOR, G. C. *Resistência à ferrugem e análise de isoenzimas em procedências de Eucalyptus cloeziana*. Viçosa, 1994. 69 p. Dissertação (M.S.) – Universidade Federal de Viçosa.
- PETERS, G. B.; LONIE, J. S.; MORAN, G. F. The breeding System genetic diversity and pollen sterility in *Eucalyptus pulverulenta*, a rare species with small disjunct populations. *Australian Journal of Botany*, v. 38, p. 559-70, 1990.
- SOLTIS, D. E.; HAUFLE, C. H.; DARROW, D. C.; GASTONY, G. J. Starch gel electrophoresis of a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *American Fern Journal*, v. 73, p. 9-26, 1983.
- SWOFFORD, D. L.; SELANDER, R. B. *Biosys-1*: A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics, Release 1.7. Illinois, 1989. 43 p.
- YEH, F. C.; BRUNE, A.; CHELIAK, W. M.; CHIPMAN, D. C. Mating system of *Eucalyptus citriodora* in a seed stand. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*, v. 13, p. 1051-5, 1983.
- ZOBEL, B.; TALBERT, J. *Applied Forest Tree Improvement*. New York: John Willey, 1985. 505 p.

