

VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE POLIMORFISMOS ISOENZIMÁTICOS EM AVEIAS HEXAPLÓIDES¹

RODRIGO RODRIGUES MATIELLO², JOSÉ FERNANDES BARBOSA NETO³, MARIA JANE CRUZ DE MELO SERENO⁴, IVONE TADERKA e DIEGO GIRARDI PEGORARO⁵

RESUMO - A análise isoenzimática por eletroforese possui várias aplicações no melhoramento vegetal, principalmente na identificação de variabilidade genética – pois as isoenzimas são produtos diretos da expressão gênica –, e ajuda a entender a relação evolutiva entre as espécies, possibilitando a identificação de genótipos potenciais a serem utilizados nos programas de melhoramento. O presente trabalho teve por objetivo identificar a variabilidade genética através dos polimorfismos do sistema isoenzimático esterase e estimar a similaridade genética entre três grupos hexaplóides de aveia. Para a análise foram utilizados nove genótipos cultivados de aveia, três introduções silvestres de *Avena sterilis* L., e dezesseis introduções silvestres de *A. fatua* L. Ampla variabilidade genética de polimorfismos isoenzimáticos foi observada dentro e entre os grupos avaliados. A análise eletroforética revelou treze bandas diferenciais com migração anódica entre os genótipos testados. Apesar de existirem bandas isoesterásicas comuns entre eles, algumas delas parecem ser características de determinado grupo hexaplóide. Os resultados revelaram alta similaridade genética dos genótipos cultivados com o grupo silvestre de *A. fatua*, enquanto que o grupo de *A. sterilis* foi mais divergente, pelo fato de seu padrão eletroforético ser mais diferenciado que os demais grupos.

Termos para indexação: isoenzimas, similaridade genética, aveias hexaplóides, melhoramento vegetal.

GENETIC VARIABILITY THROUGH ISOZYMIC POLYMORPHISMS IN HEXAPLOID OATS

ABSTRACT - Analysis of isozymes have many applications in plant breeding specially in the study of genetic variability. Isozymes are direct product of genic expression and may help to understand the evolutionary relation between species, and allow to identify the potential genotypes for breeding programs. This work aimed to identify genetic variability through esterase polymorphism and to estimate genetic similarity among three hexaploid oat groups. Nine cultivated oat genotypes, three introductions of *A. sterilis* L., and 16 introductions of *A. fatua* L. were used. Wide polymorphisms of isozyme were observed within and between studied groups. The electrophoretic analysis showed 13 different bands with anodical migration between the genotypes. Although several bands were common for all genotypes, some of them were typical for a particular hexaploid group. These results indicate high genetic similarity between cultivated oat and *A. fatua* group. The *A. sterilis* group was more divergent, due to a more differentiated electrophoretic pattern.

Index terms: isozyme, genetic similarity, hexaploid oats, plant breeding.

¹ Aceito para publicação em 30 de outubro de 1997.

² Eng. Agr., M.Sc., Prof. Assistente, Dep. de Fitotecnia e Fitossanidade, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Praça Santos Andrade s/n, CEP 84010-330 Ponta Grossa, PR. Bolsista da FAPERGS. E-mail: rrmatiel@uepg.br

³ Eng. Agr., Ph.D., Dep. de Plantas de Lavoura, Fac. de Agronomia, UFRGS, Caixa Postal 776, CEP 95501-970 Porto Alegre, RS.

⁴ Bióloga, Dr.ª, Dep. de Plantas de Lavoura, Fac. de Agronomia, UFRGS.

⁵ Estudante da Fac. de Agronomia, UFRGS. Bolsista do CNPq.

INTRODUÇÃO

Nos últimos vinte e cinco anos inúmeras investigações têm sido feitas com o uso da técnica de eletroforese visando estimar e entender a estrutura da variabilidade genética em populações naturais, estudar o fluxo gênico entre as espécies, processos naturais de hibridação e estudos de filogenia (Ferreira & Grattapaglia, 1995). No melhoramento vegetal as isoenzimas têm sido utilizadas para a detecção de ligação gênica com caracteres mono e poligênicos, na identificação de variedades, e na seleção indireta com vistas a caracteres agronômicos (Tanksley & Orton, 1983).

A premissa básica adotada ao utilizar dados isoenzimáticos é que diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças nas seqüências de DNA, as quais codificam tais enzimas. O controle genético das isoenzimas ocorre através de vários genes, que podem ser alelos de um mesmo loco, ou estar situados em locos diferentes. A expressão das isoenzimas é codominante, isto é, em um indivíduo diplóide ambos os alelos de um loco são expressos e visualizados (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Aparentemente, o primeiro estudo da isoenzima esterase no gênero *Avena* foi realizado por Marshall & Allard (1969) em *A. barbata*. Estes autores relataram que a aloenzima esterase era condicionada por dois alelos codominantes, cada um com três locos independentes. Mais tarde, Simons et al. (1978) classificaram estes genes como E-1, E-2 e E-3. Também foi observado um grupo de ligação entre os alelos E-3 e P-1 (fosfatase) e com Px -1a e Px-1b (anodal peroxidase).

Em estudos genéticos com *A. fatua* L., Clegg & Allard (1973) identificaram seis locos da isoenzima esterase, com treze bandas anódicas, classificadas por eles como E-1 até E-6. Os autores também observaram que as aloenzimas associadas com os locos E-1, E-2, E-4 e E-5 eram condicionadas por dois alelos codominantes (proporção uma banda simples : duas bandas duplas : uma banda simples).

As espécies silvestres de aveia, consideradas como genitoras do grupo cultivado, são uma fonte potencial de variabilidade genética, e podem ser utilizadas em programas de melhoramento. Esta variabilidade genética dentro dos diferentes níveis de ploidia em aveia pode ser facilmente identificada pelo estudo de isoenzimas e proteínas pela técnica de perfil eletroforético (Tanksley & Jones, 1981).

O presente trabalho teve por objetivo identificar a variabilidade genética através dos polimorfismos do sistema isoenzimático esterase de genótipos cultivados e introduções silvestres de *A. sterilis* L. e *A. fatua*, bem como, estimar a similaridade genética entre os três grupos de aveia estudados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados genótipos cultivados de aveia (*Avena sativa* L.) desenvolvidos nos programas de melhoramento da Universidade de Passo Fundo e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, introduções silvestres de *Avena fatua* coletadas em 1993 na área de abrangência da Cooperativa Regional Triticola Serrana Ltda, Ijuí, RS, e introduções silvestres de *Avena sterilis* provenientes de Israel, cedidas pelas Universidades de Wisconsin e Texas e outra introdução da mesma raça, obtida na Estação Experimental de Pergamino, na Argentina (Tabela 1).

TABELA 1. Origem e genealogia de genótipos de aveias hexaplóides. Eldorado do sul, ufrgs, rs, 1994.

Genótipo	Origem	Genealogia
UPF-15	Brasil	COKER 82.33 // IL 3776 / OA 338
UPF-16	Brasil	CORONADO / X1799-2 / Sel. 11-PF // X 3530-40
UPF-17	Brasil	CORONADO / X1799-2 / Sel. 11-PF // X 3530-40
UFRGS-7	Brasil	X 1205 / FLA 1093
UFRGS-14	Brasil	805165 // COR ² / CTZ ³ / PENDEK / ME 1563
UFRGS-15	Brasil	COR ² / CTZ ³ / PENDEK / ME1563 // L16 / CR _{CPX} / C7512 // 74C8014
US-901717	Brasil	COR ² / CTZ ³ / PENDEK / ME1563 // 76-29 / 76-23 / 75-23 // CI 833
UFRGS-91905	Brasil	UFRGS-15 / UFRGS-881920
UFRGS-9120101	Brasil	Sel. UFRGS-18
I-320	Israel	Introdução <i>A. sterilis</i> L.
I-377	Israel	Introdução <i>A. sterilis</i> L.
I-ARG	Argentina	Introdução <i>A. sterilis</i> L.
I-93024	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93030	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93035	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93037	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93054	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93058	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93061	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93062	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93065	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93066	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93079	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93085	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93097	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93100	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93116	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.
I-93118	Brasil	Introdução <i>A. fatua</i> L.

A avaliação isoenzimática por eletroforese para o sistema esterase foi realizado no Laboratório de Microbiologia Fitopatológica do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS, em 1995. Foram avaliados nove genótipos de *A. sativa* (UPF-15, UPF-16, UPF-17, UFRGS-7, UFRGS-14, UFRGS-15, UFRGS-901717, UFRGS-91905 e UFRGS-9120101), três introduções silvestres de *A. sterilis* (I-320, I-377 e I-ARG) e dezesseis introduções silvestres de *A. fatua* (I-93024, I-93030, I-93035, I-93037, I-93054, I-93058, I-93061, I-93062, I-93065, I-93066, I-93079, I-93085, I-93097, I-93100, I-93116 e I-93118).

Para a análise de eletroforese, as sementes de todos os genótipos foram pré-germinadas em placas-de-Petri. Após uma semana em câmara de crescimento, as plântulas foram transferidas para vidros e armazenadas a -18°C em congelador. Foram utilizados géis de poliacrilamida de 1,0 mm de espessura, na concentração de 7%. Os tampões utilizados no preparo dos géis e nas cubas foram descritos por Scandalios (1969) no tocante ao sistema esterase.

A amostra de trabalho consistiu de 1,5 cm de coleóptilo, a qual foi macerada e homogeneizada em placa de acrílico com escavações de 7,0 mm de diâmetro e 4,5 mm de profundidade em 0,015 mL de tampão de gel. Para evitar a desnaturação das enzimas, a placa de acrílico foi mantida sobre uma caixa de plástico com gelo. Todos os géis inicialmente passaram por uma pré-migração, com o objetivo de orientar as moléculas do gel e facilitar a passagem posterior das isoenzimas.

Os genótipos foram dispostos completamente ao acaso nos géis, sendo que em cada gel sempre havia genótipos representantes de cada grupo de aveia. O número de repetições variou de cinco a dez pontos de aplicação por genótipo, num total de doze géis avaliados; cada gel possuía 24 pontos de aplicação.

A linha dos pontos de aplicação foi mantida a uma distância de 1,0 cm da ponte anódica. A distância entre a ponte anódica e catódica foi sempre de 12 cm, e a intensidade de campo empregada foi de 10 V/cm. A migração era interrompida quando a linha de frente (azul de bromofenol) atingia 8,0 cm do ponto de aplicação. A revelação dos géis para o sistema esterase seguiu o protocolo de Scandalios (1969).

A análise dos padrões eletroforéticos consistiu na classificação das bandas similares entre os genótipos, através da posição da banda no gel (migração relativa) e da sua intensidade de coloração, sendo as mesmas consideradas fracas, médias e fortes. Para o cálculo da migração relativa de cada banda, a linha de frente foi considerada como referência. Após a identificação das bandas, foi construída uma matriz, sendo que os genótipos estavam na linha, e as bandas, na coluna. Os escores atribuídos foram: presença da banda (1) e ausência da banda (0). Esta matriz foi submetida ao cálculo de Similaridade Genética (S_{ij}) entre os genótipos, de acordo com a fórmula proposta por Nei & Li (1979):

$$S_{ij} = \frac{X_{ni} \cdot X_{nj}}{N}$$

onde:

S_{ij} = similaridade genética entre o genótipo i e o genótipo j;

X_{ni} = escore para a banda "n" no genótipo i;

X_{nj} = escore para a banda "n" no genótipo j;

N = total de bandas avaliadas.

A partir da matriz de similaridade genética obtida entre os genótipos, esta foi submetida a uma análise de agrupamento pelo Método de Agrupamento pela Média (UPGMA) no programa NTSYS-PC (Rohlf, 1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações isoenzimáticas do sistema esterase dos 28 genótipos de aveia pertencentes aos grupos (cultivado, *A. sterilis* e *A. fatua*) estão representados esquematicamente por meio dos seus padrões eletroforéticos na Fig. 1. Além destas determinações, são apresentadas as medidas de similaridade genética de Nei & Li (1979), pela semelhança entre as bandas nos genótipos avaliados (Fig. 2).

A análise dos padrões eletroforéticos no sistema esterase revelou a presença de 13 bandas diferenciadas entre todos os genótipos avaliados. Neste estudo, todos os genótipos apresentaram bandas com migração anódica. A representação esquemática dos padrões eletroforéticos evidenciaram uma ampla variabilidade genética por meio dos polimorfismos do sistema esterase dentro dos grupos, bem como entre eles (Fig. 1). Estes polimorfismos podem ser o resultado da utilização do tecido vegetal (coleóptilo) num estágio juvenil, o qual normalmente apresenta um grande número de locos isoenzimáticos sendo expressos, o que permitiu a visualização de maior número de bandas isoesterásicas. Eichler (1995), estudando a variação de polimorfismo isoenzimático no sistema esterase em somaclones de aveia, observou um menor número de bandas

isoesterásicas, provavelmente devido à utilização do tecido vegetal em estágio mais avançado de desenvolvimento, o que levou a uma redução no número de bandas, explicado pela regulação temporal dos locos isoenzimáticos. Também este polimorfismo encontrado entre e dentro dos grupos de aveia pode estar relacionado com a condição hexaplóide dos genótipos, onde os genes ou alelos de mesma função estão localizados nos diferentes genomas.

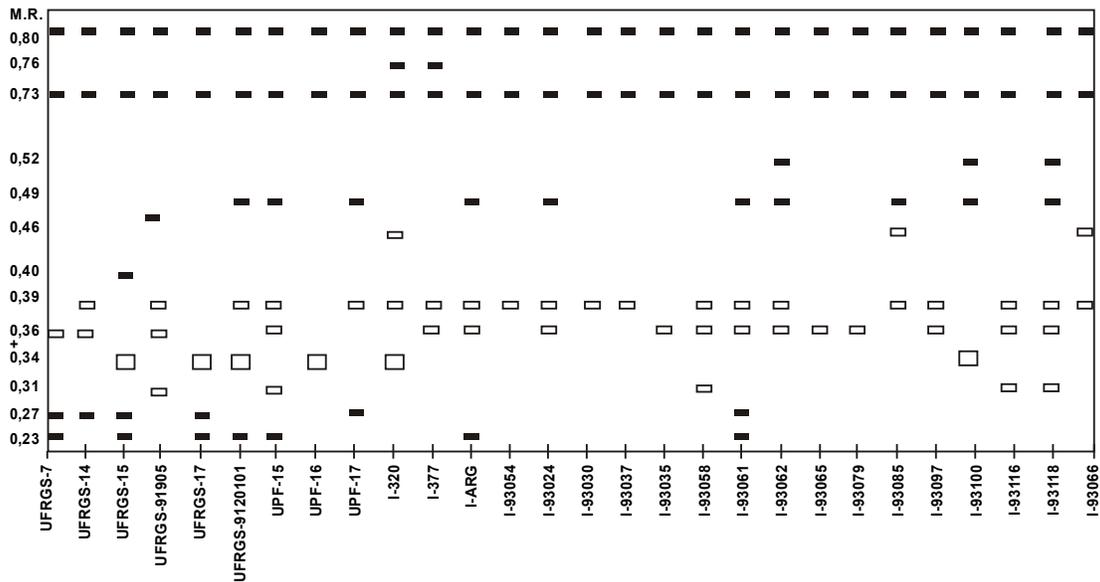


FIG. 1. Padrões isoenzimáticos do sistema esterase para coleótilos de genótipos cultivados de aveia e introduções silvestres de *a. sterilis* l. e *a. fatua* l. ufrgs, rs. 1996.

As bandas isoesterásicas de MR 0,36, 0,39 (intensidade média), 0,73 e 0,80 (intensidade fraca) foram comuns entre os genótipos avaliados, o que ressalta certa homologia entre as raças, justificada pela ancestralidade comum de *A. fatua*, *A. sterilis* e *A. sativa* (Fig. 1). Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Tavares (1991), onde as bandas de MR 1,0 (banda de referência), 0,62 e 0,44 foram comuns aos genótipos cultivados e às introduções silvestres de *A. sterilis*.

A variabilidade observada no grupo cultivado no sistema esterase pode ser o resultado da seleção artificial de caracteres de importância agrônômica, imposta sobre os genótipos, possivelmente devido a uma associação entre locos isoenzimáticos e caracteres agrônômicos. Este comportamento pode ser visualizado nas cultivares UPF-16 e UPF-17, que revelaram padrão isoenzimático diferenciado, apesar de serem oriundas do mesmo cruzamento inicial (Fig. 1). Em tomate, Rick & Fobes (1974) encontraram forte associação entre um loco de fosfatase ácida com um gene de resistência a nematóide; em milho, Frey et al. (1986) encontraram associações significantes entre marcadores isoenzimáticos e rendimento de grãos.

Apesar da elevada similaridade entre as raças, algumas bandas isoesterásicas foram típicas para determinado grupo, a saber: a banda de MR 0,40 (intensidade média), somente visualizada na cultivar UFRGS-15 do grupo cultivado; a banda de MR 0,52 (intensidade fraca), comum a três introduções silvestres de *A. fatua*; e a banda de MR 0,76 (intensidade fraca), presente em duas introduções de *A. sterilis* (Fig. 1).

A análise de agrupamento obtida a partir da similaridade genética de Nei & Li (1979) revelou a formação de quatro grupos principais (Fig. 2): o primeiro foi composto de três genótipos cultivados, onde as cultivares UFRGS-15 e US-901717 apresentaram a maior similaridade genética deste grupo com 90% de bandas em comum; o segundo foi composto por dois genótipos cultivados e uma introdução silvestre de *A. fatua*; a maioria dos genótipos estudados estão agrupados no terceiro grupo, principalmente as introduções silvestres de *A. fatua*, cuja análise de similaridade revelou que a linhagem UFRGS-91905 e as introduções I-93058 e I-93116 apresentaram o mesmo padrão eletroforético, e são muito similares entre si. Da mesma forma, três introduções de *A. fatua* L. revelaram 100% de similaridade (I-93035; I-93065 e I-93079). Entretanto, a

introdução silvestre de *A. sterilis* L. (I-ARG) apresentou elevada similaridade genética com o genótipo cultivado UPF-15 (Fig. 2); o quarto grupo foi composto predominantemente por introduções silvestres de *A. fatua* e *A. sterilis*, sendo que a introdução I-320 apresentou 70% de similaridade com este grupo. Neste agrupamento, a cultivar UPF-17 apresentou similaridade de 75% com as demais introduções de *A. fatua*, ao passo que as introduções I-93054; I-93030 e I-93037 revelaram o mesmo padrão eletroforético (Fig. 2).

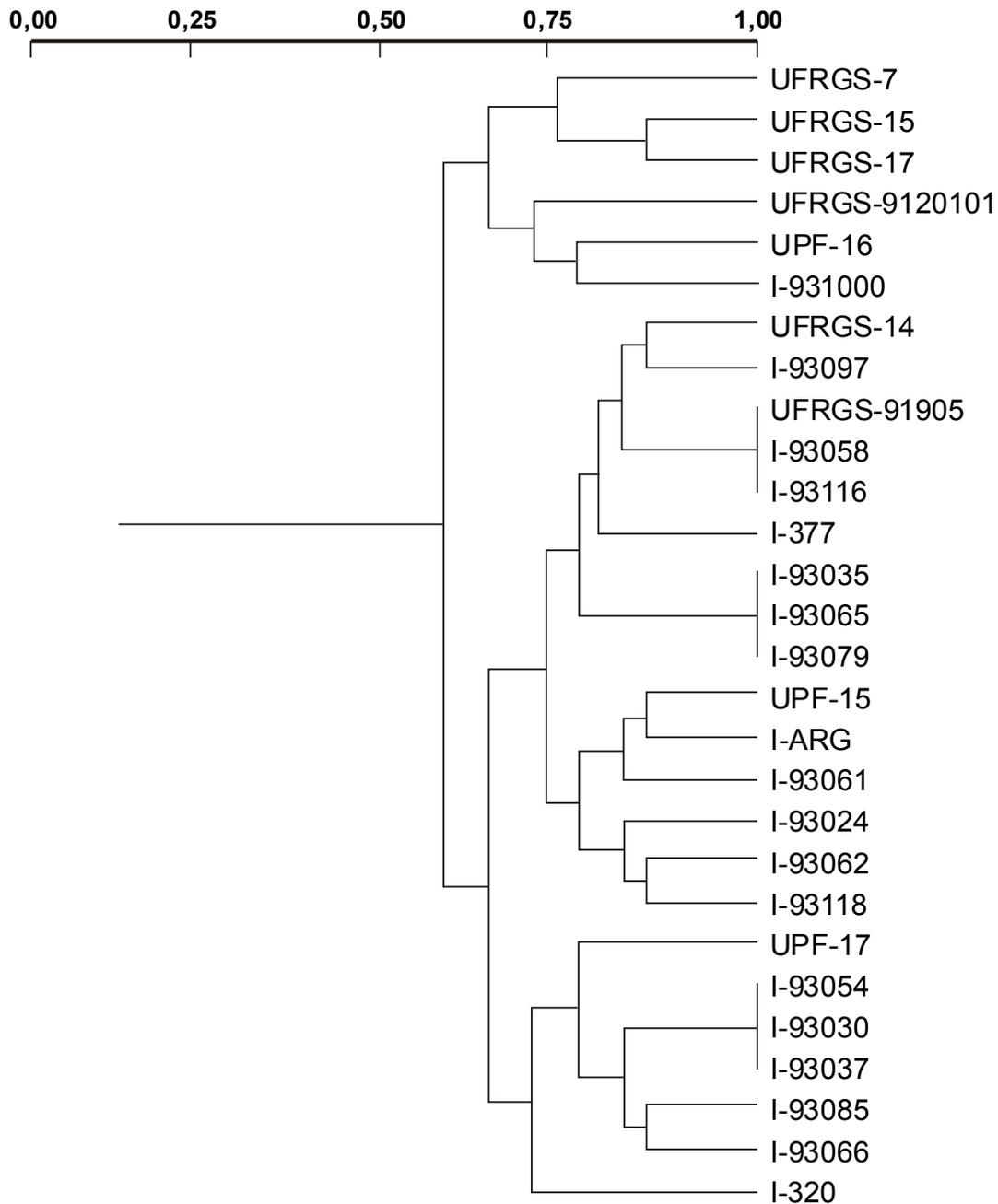


FIG. 2. Análise de agrupamento pelo método de agrupamento pela média (upgma) relativa a genótipos cultivados e introduções silvestres de *a. Fatua* l. E *a. Sterilis* l., Através do sistema isoenzimático esterase, agrupadas de acordo com a similaridade de nei & li (1979). Ufrgs, rs. 1996.

A análise de similaridade genética entre os genótipos do grupo cultivado e introduções de *A. fatua* e *A. sterilis* revelou ampla variabilidade genética através do polimorfismo do sistema isoenzimático esterase, e as introduções de *A. fatua* apresentaram maior homologia de bandas com o grupo cultivado, em comparação com as introduções de *A. sterilis*, que, de modo geral, evidenciaram padrões eletroforéticos mais divergentes, exceto a introdução I-ARG, que apresentou 93% de bandas em comum com a cultivar UPF-15. Num estudo de variação isoenzimática em vinte e três sistemas de isoenzimas em genótipos de *A. sterilis*, provenientes de vários países, Phillips et al. (1993) encontraram amplo polimorfismo isoenzimático, sendo que a utilização de genótipos silvestres a partir da análise de agrupamento garantiria a manutenção da diversidade genética.

Estes resultados podem ser úteis para planejar os cruzamentos entre os grupos com a finalidade de incrementar a diversidade genética no grupo cultivado.

CONCLUSÕES

1. A análise isoenzimática revela ampla variabilidade genética através dos polimorfismos do sistema esterase para os grupos hexaplóides de aveia estudados.

2. As introduções silvestres de *A. fatua* L. apresentam maior similaridade genética com o grupo cultivado, se comparado com o grupo de *A. sterilis* L., o qual demonstra padrões eletroforéticos mais divergentes.

REFERÊNCIAS

- CLEGG, M.T.; ALLARD, R.W. The genetics of electrophoretic variants in *Avena*. II. The esterase E1, E2, E4, E5, E6 and anodal peroxidase APX4 loci in *A. fatua*. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v.64, p.3-6, 1973.
- EICHLER, L. **Caracterização agrônômica, citogenética e isoenzimática de somaclones de aveia**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 91p. Dissertação de Mestrado.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1995. 220p.
- FREY, O.M.; STUBER, C.W.; GOODMAN, M.M. Yield manipulation from selection on allozyme genotypes in a composite of elite corn lines. **Crop Science**, Madison, v.26, p.917-921, 1986.
- MARSHALL, H.G.; ALLARD, R.W. The genetics of electrophoretic variants in *Avena*. I. The esterase E4, E9, E10, phosphatase P5, and anodal peroxidase APX5 loci in *A. barbata*. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v.60, p.17-19, 1969.
- NEI, M.; LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v.76, p.5256-5273, 1979.
- PHILLIPS, T.D.; MURPHY, J.P.; GOODMAN, M.M. Isozyme variation in germplasm accessions of the wild oat *Avena sterilis* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.86, p.54-64, 1993.
- RICK, C.M.; FOBES, J.F. Association of an allozyme with nematode resistance. **Reporter Tomato Genetic**, v.25, p.25-27, 1974.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Exeter Software, 1992. 236p.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v.3, p.37-79, 1969.
- SIMONS, M.D.; MARTENS, J.W.; MCKENZIE, I.; NISHIYAMA, I.; SADANAGA, K.; SEBESTA, J.; THOMAS, H. **Oats: A standardized system of nomenclature for genes and chromosomes and catalog of genes governing characters in oats**. Washington, DC: USDA-SEA, 1978. 450p. (Agriculture Handbook, 509).
- TANKSLEY, S.D.; JONES, R.A. Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing the genetic purity of F1 hybrids of tomato. **HortScience**, Alexandria, v.16, p.179-181, 1981.
- TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding: Part B**. Amsterdam: Elsevier, 1983. 472p.
- TAVARES, M.J.C.M.S. **Variabilidade genética em *Avena sativa* L., *Avena sterilis* L. e em seus híbridos: avaliações agrônômicas, morfológicas, citogenéticas e eletroforéticas**. Porto Alegre: UFRGS, 1991. 141p. Tese de Doutorado.