

Estimativa da taxa de cruzamento em *Bromus auleticus*¹

Gilberto Luiz Dalagnol²

Resumo – O conhecimento do modo de reprodução das espécies vegetais é fundamental na exploração e no manejo de populações naturais, nos programas de melhoramento genético e regeneração de acessos em bancos de germoplasmas. *Bromus auleticus* Trinius é uma gramínea hiberna, perene, nativa da América do Sul, com alto potencial forrageiro e adaptativo a condições adversas de clima e solo. O objetivo do trabalho foi caracterizar o sistema reprodutivo da espécie e estimar a taxa de cruzamento entre acessos existentes na Epagri/Estação Experimental de Lages. Quatro progênies oriundas de cruzamentos naturais foram caracterizadas utilizando-se dez locos isoenzimáticos (PGI, SKDH, IDH, PRX1, PRX2, PRX3, MDH1, MDH3, 6PGDH, £-EST). Foram estimadas as taxas de cruzamento uniloco e multilocos, usando as frequências alélicas das progênies com análise do programa MLT (Ritland, 1990). As estimativas uniloco variaram de 0,001 a 1,648, com média de 0,571, e a multilocos foi de 1,096, o que caracteriza que o modo de reprodução predominante é a alogamia.

Termos para indexação: alozimas, uniloco, multilocos, autogamia, alogamia.

Estimates of crossing frequency in *Bromus auleticus*

Abstract – It is important to know the plant reproduction mode for the exploration and management of the natural plant population, as well as for breeding program and germoplasm regeneration of accessions. *Bromus auleticus* Trinius is a perennial winter grass, native of South America which shows high potential for forage and has good adaptation to soil and climate adversities. The objective of this work was to characterize the reproductive system of the species and to estimate its crossing frequency among the accesses existing at Epagri/ Experiment Station of Lages. Four progenies originated from natural crosses were characterized by ten allozymic loci (PGI, SKDH, IDH, PRX1, PRX2, PRX3, MDH1, MDH3, 6PGD and EST). Crossing frequency of unilocus and multilocus were estimated using the allelic frequencies and the MLT program (Ritland, 1990). The unilocus estimation varied from 0,001 to 1,648 and had a mean frequency of 0,571. The multilocus had a frequency of 1,096. Based on these results, the reproduction mode is predominantly allogamic.

Index terms: allozymes, unilocus, multilocus, autogamy, allogamy.

Introdução

O sistema de cruzamento de uma espécie vegetal é o parâmetro principal a ser considerado na análise da organização genética das populações, pois os padrões pelos quais os gametas são transportados de geração para geração exercem um controle primário sobre a distribuição das frequências genotípicas e afetam o potencial de recombinação, moderando ou acelerando a taxa de produção de novas combinações e a perda de algumas existentes (Allard, 1971).

Nas populações alógamas, as plantas tendem a ser altamente heterozigotas e, quase sem exceção, a endogamia forçada resulta em redução do vigor e outros efeitos adversos (Allard, 1971). A intensidade na troca de alelos entre os indivíduos variará na medida do grau de alogamia e fatores adicionais, como a existência de agamospermia, endogamia, cruzamentos preferenciais ou cruzamentos não-aleatórios, implicam desvios da panmixia, de forma a restringir as combinações possíveis. A caracterização do sistema reprodutivo e

estimativas da taxa de cruzamento são fundamentais para uma adequada avaliação deste componente.

Plantas de espécies de fecundação cruzada normalmente carregam diferentes alelos em diversos locos e suas progênies tendem a ampla segregação, produzindo indivíduos heterozigotos e mantendo a variabilidade genética.

Conhecer o sistema reprodutivo e, em especial, a taxa de cruzamento (t) é fundamental para o estudo da dinâmica das populações naturais ou artificiais, pois oferece subsídios

Aceito para publicação em 6/6/2005.

¹Extraído da dissertação de mestrado do autor.

²Eng. agr., M.Sc., Epagri/Estação Experimental de Lages, C.P. 181, 88502-970 Lages, SC, fone: (49) 3224-4400, e-mail: gldalagnol@epagri.rct-sc.br.

para optar por um sistema de manejo que permita a exploração, com manutenção desta dinâmica. Assim, o sistema de cruzamento caracteriza a maneira pela qual os gametas são tomados para produzir os descendentes de uma população (O'Malley & Bawa, 1987).

O modelo de multilocos permite a obtenção de estimativas mais adequadas da taxa de cruzamento, considerando as combinações genotípicas envolvendo todos os locos. O modelo multilocos de Ritland & Jain (1981) fundamenta-se em que as progênies de um genótipo materno representam um conjunto de genótipos derivados de óvulos, que se cruzam numa probabilidade "t", com um conjunto de pólenes com frequências alélicas "p" e se autofecundam numa probabilidade (1-t).

A utilização do método implica o fornecimento dos genótipos maternos e das progênies, pois, conforme Ritland & Jain (1981), pressupõe a inexistência de mutação, seleção após fertilização, ligação entre locos analisados, cruzamentos preferenciais e variação nas frequências alélicas do conjunto de pólenes.

A comparação entre as médias das estimativas de locos simples (\hat{t}_s) e a estimativa multilocos (\hat{t}_m) fornece subsídios para avaliar a ocorrência de cruzamentos entre aparentados, possibilitando caracterizar a ocorrência de endogamia (Ritland & Jain, 1981; Ritland & El-Kassaby, 1985). A variância da estimativa de "t" reduz com o aumento do número de indivíduos por progênie (mais que dez indivíduos, conforme Ritland & El-Kassaby, 1985).

A taxa de cruzamento é uma determinação pontual, podendo variar de um ciclo para outro em função das condições climáticas ocorrentes, as quais facilitam ou dificultam a polinização, principalmente com a não-coincidência do período de disponibilidade de pólen e óvulo viáveis.

Bromus auleticus é uma gramínea perene, nativa da Amé-

rica do Sul, de crescimento hi-bernal e alta resistência ao frio. Adapta-se a diversos tipos de solos, desde que sejam bem drenados. Apresenta enraizamento profundo e vigoroso, grande capacidade de rebrote, tolerância a altas temperaturas e intensidade de luz (Millot, 2000).

Em nível experimental, foram obtidos 4.621kg/ha de matéria seca em dez cortes (março a dezembro, com intervalo de 30 dias), similares aos obtidos por Bemhaja (2000), de 4.800kg/ha, e por Rivas (2000), entre 5.000 e 9.000kg/ha, embora testando cultivares diferentes, e valores médios de 22% para proteína bruta, 71,7% para digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica e 66,7% para nutrientes digestíveis totais, resultados estes comparáveis a outras espécies perenes do Planalto Serrano Catarinense, conforme análises feitas por Freitas et al. (1994).

O objetivo deste trabalho foi estimar a taxa de cruzamento entre quatro acessos de *Bromus auleticus* Trinius existentes na Epagri/Estação Experimental de Lages, SC.

Material e métodos

Trabalhou-se com quatro genótipos de *Bromus auleticus*, num policruzamento em blocos casualizados, com duas repetições de 18 plantas. As sementes colhidas neste ciclo foram semeadas para obtenção das progênies, das quais coletou-se tecido vegetal para extração de enzimas e eletroforese utilizando alozimas.

A análise laboratorial foi executada no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA/UFSC no ano de 2000.

Utilizando os dados de frequências alélicas das progênies, estimados através da eletroforese, e posteriormente o programa MLT (Ritland, 1990), estimaram-se as taxas de cruzamento uniloco e multilocos detectando a frequência com que ocorre a troca de alelos dentro de cada loco e entre os locos,

considerados como um único grupo.

O processo de obtenção das estimativas traz implícito um equilíbrio de endogamia (Ritland & Jain, 1981; Ritland & El-Kassaby, 1985), equivalente ao equilíbrio de Wright, com "f" em função de "t", num processo matricial: $P = (1-t) S + t T$, sendo:

P = matriz de probabilidades de genótipos multilocos nas progênies;

S = matriz de probabilidades nas progênies por autofecundação;

T = matriz de probabilidades nas progênies por cruzamento.

A matriz de genótipos multilocos das progênies estudadas foi obtida conforme Ritland & Jain (1981). Inicialmente é estabelecida P e, posteriormente, esta matriz é maximizada através de uma função logarítmica de máxima verossimilhança, em que P é função de "t" e "p". Com a maximização da matriz T, o processo permite a obtenção da frequência de alelos em óvulos e pólen.

A estimativa da taxa de cruzamento tem sido obtida a partir da relação $t = (1-f)/(1+f)$, dada por Wright (1921), sendo "f" a estimativa de endogamia existente no nível de indivíduo. Esta estimativa pode ser obtida a partir do índice de fixação, estimado loco a loco, obtendo-se uma média da taxa de cruzamento aparente (Vencovsky, 1992), como em Marcon (1988), Moraes (1992) e Paiva et al. (1994b). A estimativa das taxas de cruzamento uniloco e multilocos (Tabela 1) e as estimativas das frequências alélicas de pólen e óvulo (Tabela 2), obtidas segundo Ritland & Jain (1981), e das progênies, pelo programa MLT (Ritland, 1990), possibilitaram avaliar a heterogeneidade destas através do teste χ^2 .

Resultados e discussão

As estimativas uniloco variaram de 0,001 a 1,648, sendo que a taxa média foi de 0,571. A estimativa multilocos obtida foi de 1,096 (Tabela 1).

Tabela 1. Taxas de cruzamento para locos individuais e multilocos estimadas para quatro progênies de *Bromus auleticus* Trinius e aderência ao modelo uniloco e multilocos. UFSC – Florianópolis, SC, 2000

Loco	Taxa uniloco	Nº alelos	GL	c2	P > F
PGI	1,648	2	1	8,856	>0,01<0,05 ^(*)
SKDH	0,955	3	9	10,189	>0,05 (ns)
IDH	0,426	2	1	0,452	>0,05 (ns)
PRX1	0,033	2	1	0,297	>0,05 (ns)
PRX2	0,759	2	1	21,811	<0,01 ^(**)
PRX5	0,001	2	1	0,000	>0,05 (ns)
MDH1	0,890	2	1	0,847	>0,05 (ns)
MDH3	0,001	2	1	(-) ⁽¹⁾	(/) ⁽³⁾
6PGD	0,025	2	1	(-)	(/)
EST	0,975	3	9	(x) ⁽²⁾	(x)
Média	0,571	22	3	6,064	>0,05 (ns)
Média (+) ⁽⁴⁾	0,452	20	3	6,064	>0,05 (ns)
Est. multilocos	1,096	22	15	42,454	<0,01^(**)

Notas: Para o cálculo da média foram descartados os valores de χ^2 com GL = 0.

⁽¹⁾(-) GL = 0.

⁽²⁾(x) GL elevado – modelo recomenda descartar, visando diminuir erro de estimativa.

⁽³⁾(/) referente a valor de $\chi^2 = 0$.

⁽⁴⁾(+) estimativa desconsiderando valores maiores que 1.

^(*)e ^(**) significância estatística a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente. ns = diferença não significativa.

Comparando-se as taxas uniloco e multilocos é possível caracterizar cruzamentos entre aparentados e/ou autofecundação, de acordo com Ritland & El-Kassaby (1985); Santos (1994) e Gandara (1996). Entretanto, esta comparação pode ter sido prejudicada pelos valores dos erros associados às estimativas uniloco, cuja taxa variou de 0,001 (loco MDH3) a 1,648 (loco PGI), sendo que este último caracteriza a inadequação do modelo multilocos para as devidas estimativas. Os valores obtidos para taxas de cruzamento sugerem a ocorrência de cruzamentos entre indivíduos aparentados, caracterizando cruzamentos não-aleatórios ou preferenciais, podendo também ser associados à assincronia fenológica ocorrente entre as plantas.

Oliveira et al. (2000), estudando um grupo de dez plantas isoladas de 48 acessos de *Bromus auleticus*, não constataram produção de sementes, indicando que a espécie é alógama e provavelmente autoincompatível, uma vez que as flores são hermafroditas e não há separação temporal entre o amadurecimento do grão de pólen e do estigma. Progênies com um número elevado de heterozigotos na população natural Kiyú, no Uruguai, levaram Rivas (1996) a concluir que esta espécie é alógama ou de pareamento misto.

O teste de aderência ao modelo multilocos revelou significância estatística, demonstrando sua inadequação para a referida estimativa. No entanto, Ritland & El-Kassaby (1985) citaram que estes desvios não chegam a

prejudicar a obtenção das estimativas, mas podem estar associados à ocorrência de outros fatores como os cruzamentos preferenciais, não-aleatórios, biparentais.

Outro fator que deve ser considerado quando se deseja estimar a taxa de cruzamento é a heterogeneidade entre as frequências alélicas de pólen e óvulos. A aplicação do teste de contingência ($\chi^2 = 358,82$, GL = 19, P < 00,1) demonstrou que as frequências de pólen e óvulos são significativamente diferentes, podendo-se admitir uma possível associação da heterogeneidade com os desvios constatados (Tabela 2).

O índice F_{ST} (Wright, 1965) (Tabela 2) mostra a divergência genética média das progênies dentro de cada loco, inclusive com valores acentuados (MDH1 e NADH1), cujo valor médio dos locos tomados em conjunto foi de 0,118 (11,8%), significando que foi mantida a variabilidade genética.

Com alta taxa de cruzamento e alta heterozigosidade, as gerações posteriores poderão apresentar novas combinações, mantendo ou aumentando a variabilidade genética, elevando o potencial adaptativo a ambientes diversos, e com tendência a manter a dinâmica populacional com baixos níveis de endogamia.

Conclusões

A alta taxa de cruzamento estimada caracteriza *Bromus auleticus* Trinius como uma espécie de reprodução predominantemente alógama.

Para *Bromus auleticus* é recomendável a formação de variedades sintéticas, a fim de se manterem altos índices de diversidade genética.

Especial atenção deve ser dada aos trabalhos de melhoramento genético e regeneração de acessos de *Bromus* sp. para evitar a ocorrência de fluxo gênico entre as populações, que compromete a fidelidade genotípica. ▶

Tabela 2. Frequências alélicas de pólen e óvulo e variância para dez locos alozímicos de *Bromus auleticus* Trinius. UFSC – Florianópolis, SC, 2000

Loco	Alelo	Frequência			Índice F_{ST} médio/loco
		Pólen	Óvulo	Média	
PGI1	1	0,360	0,500	0,430	0,040
PGI1	2	0,640	0,500	0,570	0,040
SKDH	1	0,800	0,600	0,700	0,095
SKDH	2	0,200	0,300	0,250	0,026
SKDH	3	0,001	0,100	0,050	0,102
IDH1	1	0,953	0,800	0,876	0,108
IDH1	2	0,047	0,200	0,123	0,108
PRX1	1	0,730	0,500	0,615	0,112
PRX1	2	0,270	0,500	0,385	0,112
PRX2	1	0,750	0,500	0,625	0,133
PRX2	2	0,250	0,500	0,375	0,133
PRX3	1	0,987	0,900	0,943	0,071
PRX3	2	0,013	0,100	0,565	0,071
PRX4	1	0,999	1,000	0,999	0,001
PRX4	2	0,001	0	0,0005	0,000
PRX5	1	0,976	1,000	0,988	0,024
PRX5	2	0,024	0	0,012	0,024
NADH1	1	0,999	0,800	0,899	0,219
NADH1	2	0,001	0,200	0,100	0,219
MDH1	1	0,347	0,800	0,573	0,419
MDH1	2	0,653	0,200	0,426	0,419
Índice F_{ST} médio					0,118

Agradecimentos

À Epagri e à UFSC pelo suporte financeiro.

Literatura citada

- ALLARD, R.W. *Princípios de melhoramento genético de plantas*. Rio de Janeiro: Usaid; São Paulo: Edgar Blucher, 1971. 381p.
- BEMHAJA, M. Gramínea Perenne Invernal para Suelos Arenosos: *Bromus auleticus* cv. INIA Taboba In: REUNIÃO TEMÁTICA INTERNACIONAL SOBRE O GÊNERO *BROMUS*, 2000, Bagé, RS. *Anais...* Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2000. p.29.
- FREITAS, E.A.G.; DUFLOTH, J.H.; GREINER, L.C. *Tabela de composição químico-bromatológica e energética dos alimentos para animais ruminantes em*

Santa Catarina. Florianópolis: Epagri, 1994. 333p. (Epagri. Documentos, 155).

- GANDARA, F.B. *Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de Cedrea fissilis* Vell. (Meliaceae) 1996. 69f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, SP.
- MARCON, G. *Estrutura genética de populações de Stylosantes humilis H.B.K. (Leguminosae) de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco*. 1988. 178p. Tese (Doutorado) – Esalq/USP, Piracicaba, SP.
- MILLOT, J.C. *Bromus auleticus*: Una nueva especie domesticada. In: REUNIÃO TEMÁTICA INTERNACIONAL SOBRE O GÊNERO *BROMUS*, 2000, Bagé, RS. *Anais...* Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2000. p.7-11.
- 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). 1992. 139f. Tese (Doutorado) – Esalq/USP, Piracicaba-SP.

- OLIVEIRA, J.C.P.; SILVEIRA, L.R.M.; MORAES, C.O.C.; SARMENTO, M.B.; XAVIER, H.C. Determinação do modo de reprodução de *Bromus auleticus*. In: REUNIÃO TEMÁTICA INTERNACIONAL SOBRE O GÊNERO *BROMUS*, 2000, Bagé, RS. *Anais...* Bagé: Embrapa Pecuária Sul 2000. p.31.
- O'MALLEY D.M.; BAWA, K.S. Mating system of a tropical rain forest tree species. *Amer. Journal of Botany*, v.78, n.8, p.1.143-1.149, 1991.
- PAIVA, J.R.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOSKY, R. Genetic of rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Wild. Ex Adr de Juss.) Müll. Arg.) 2 Mating system. *Silvae Genetica*, v.43, n.5/6, p.373-376, 1994.
- RITLAND, K.; EL-KASSABY, Y.A. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas-fir as show by an efficient multilocus model. *Theoretical Applied Genetics*, v.71, p.374-384, 1985.
- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity*, v.47, n.1, p.35-52, 1981.
- RITLAND, K. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. *The Journal Heredity*, v.81, n.3, p.235-237, 1990.
- RIVAS, M. *Estudio del sistema reproductivo y estructura poblacional de (Bromus auleticus) Trinius (ex-Nees) mediante isoenzimas*. 1996. 110f. Dissertação (Mestrado) Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.
- RIVAS, M. Los cultivares "Potrillo" y "Zarco" de *Bromus auleticus*. In: REUNIÃO TEMÁTICA INTERNACIONAL SOBRE O GÊNERO *BROMUS*, 2000, Bagé, RS. *Anais...* Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2000. p.28.
- SANTOS, E.G. *Ecologia da polinização, fluxo de pólen e taxa de cruzamento em (Bauhinia forficata) Link. (Caesalpinniaceae)*. 1994. 114f. Dissertação (Mestrado) – Esalq/USP, Piracicaba, SP.
- VENCOSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE GENÉTICA, 10., 1992, Rio de Janeiro, RJ. *Anais...* Rio de Janeiro, 1992, p.53-60.
- WRIGHT, S. Systems of mating. *Genetics*, v.6, p.111-78, 1921.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, v.19, p.395-420, 1965.