

Avaliação genética de características oligogênicas em programas de melhoramento de plantas

Rodrigo Barros Rocha¹

André Rostand Ramalho²

José Roberto Vieira Júnior³

Abadio Hermes Vieira⁴

Resumo: A busca por métodos e estratégias de análise que permitam interpretar a informação genética produzida durante a recombinação é assunto atual e pertinente para o melhoramento de plantas. Características oligogênicas se caracterizam por sua herança governada por genes de maior efeito e por sua importância para as espécies vegetais cultivadas, com destaque para a resposta de resistência das plantas às doenças. A natureza discreta e a interação epistática destas características resultam em um padrão de herança que não deve ser interpretado pelos métodos tradicionais que pressupõe normalidade e herança governada por muitos genes de pequeno efeito. O objetivo deste trabalho é caracterizar as hipóteses genéticas de maior similaridade utilizadas para prever o padrão de herança de características oligogênicas visando subsidiar a condução e planejamento de experimentos. Os resultados indicam que embora a não rejeição de uma hipótese genética pelo teste de qui-quadrado possa ser obtida a partir de um número relativamente pequeno de indivíduos, a discriminação entre as hipóteses de segregação gênica deve ser feita a partir da análise de uma rede de cruzamentos planejados.

Palavras-chave: padrão de herança, teste de Bailey, interações epistáticas.

Abstract: The search for methods which allow a better interpretation of the genetic information produced during the recombination is still one of the major objectives of plant breeding. Oligogenic traits are distinguished by their heritage ruled by higher effect genes and by their importance for cultivated plants, with emphasis to the plant disease resistance heritage. The qualitative nature and epistatic interaction of these traits results in a heritage pattern that should not be interpreted thought traditional methods that presuppose normality and inheritance controlled by many genes of small effect. The objective of this work is to characterize the oligogenic genetic segregation patterns to the planning of plant breeding strategies. The results indicate that although the non rejection of a genetic hypothesis by the chi-square test can be obtained from a relatively small number of individuals, the discrimination among the oligogenic segregation patterns should be made from the analysis of a network of planned breeding strategy.

Key-words: heritage pattern, Bailey test, epistatic interactions.

¹Biólogo, D. Sc. em Genética e Melhoramento, Pesquisador da Embrapa Rondônia – BR 364, km 5,5, 78912-190, Porto Velho, Rondônia.

²Engenheiro Agrônomo, M. Sc. em Genética e Melhoramento, Pesquisador da Embrapa Rondônia – BR 364, km 5,5, 78912-190, Porto Velho,

³Engenheiro Agrônomo, D. Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Rondônia – BR 364, km 5,5, 78912-190, Porto Velho,

⁴Engenheiro Florestal, M. Sc. em Silvicultura e Manejo Florestal, Pesquisador da Embrapa Rondônia – BR 364, km 5,5, 78912-190, Porto Velho,

1 Introdução

O estudo da herança e da variação dos caracteres hereditários em plantas tem permitido a manipulação sistemática do processo de hereditariedade pela seleção dos indivíduos e famílias seguida pela recombinação preferencial dos genótipos portadores da maior frequência de alelos favoráveis ao cultivo agrícola (CRUZ et al. 2004).

Em geral, as características de maior relevância econômica para programas de melhoramento vegetal têm sua expressão governada por muitos genes de pequeno efeito (ZOBEL & JETT, 1995, FALCONER, 1987). Embora os princípios genéticos de segregação das características quantitativas sejam mendelianos, a identificação da segregação individual dos genes é complexa fazendo com que a média e a variância da distribuição dos valores métricos sejam essenciais para o estudo destas características. A interpretação genética destes caracteres pressupõe a herança governada por inúmeros genes de pequeno efeito e equivalentes para a expressão da característica ("Modelo Infinitesimal de Fisher") (CRUZ et al. 2004, LYNCH & WALSH, 1998).

Além da relevância econômica das características quantitativas, as características governadas por poucos genes têm mostrado sua importância econômica em muitos cultivos, com destaque para as características de resistência das plantas às doenças (ALZATE-MARIN et al. 2005). A natureza discreta da resposta destas características e a interação epistática dos genes resultam em um padrão de herança que não deveria ser analisado utilizando os métodos que pressupõem normalidade e herança governada por muitos genes de pequeno efeito (YU et al. 2000). Alguns exemplos de características importantes para o melhoramento vegetal e de provável herança oligogênica são: espessura de casca e acúmulo de óleos essenciais em eucalipto (ZOBEL & JETT, 1995), resistência ao *Ceratocystis* spp. em eucalipto (ALFENAS et al. 2004), resistência à mancha angular e à ferrugem e à antracnose no feijoeiro comum (SARTORATO & RAVA, 1994; VALE & ZAMBOLIM; 1997), resistência à ferrugem em soja (VIJAYALAKSHMI et al. 2005; JUNGHANS et al. 2003; WILCOX et al. 1996).

A caracterização do padrão da herança é um dos pontos mais importantes na manipulação dos componentes hereditários das características oligogênicas, uma vez que a determinação incorreta do padrão de herança pode gerar resultados equivocados nos ensaios de seleção (CRUZ et. al. 2004). O teste de hipóteses genéticas de segregação permite, com uma margem de erro, concluir a respeito do padrão predominante de herança (LIU, 1997). Neste contexto, define-se como hipótese genética o mecanismo de herança mais provável de uma característica baseado na avaliação dos dados disponíveis até o momento.

À disposição dos melhoristas existem várias configurações de cruzamentos controlados que podem ser utilizadas para não rejeitar uma hipótese genética. Os cruzamentos mais explorados nos programas de melhoramento vegetal são: cruzamentos controlados entre pais contrastantes, cruzamentos-teste, retrocruzamentos, autofecundações e também a análise de cruzamentos ao acaso. Maiores informações a respeito da importância e eficácia de cada uma destas estratégias podem ser obtidas em ROCHA et al., (2005); CRUZ et al. (2004); ROCHA et al., (2004); CRUZ et al. (2003); e LYNCH & WALSH (1998).

O objetivo deste trabalho é caracterizar as hipóteses genéticas de maior similaridade utilizadas para prever o padrão de herança de características oligogênicas visando subsidiar a condução e planejamento de experimentos.

2 Material e Métodos

2.1 Caracterização de um padrão de segregação.

A avaliação de um número limitado de indivíduos de mesma progênie permite inferir o padrão de herança das características e os genótipos dos genitores com determinado erro associado. O número de indivíduos necessários para concluir a

Respeito da herança de uma característica de distribuição discreta com determinado nível de confiança pode ser obtido através da expressão apresentada a seguir:

$$(i) \quad \alpha = (P(A_))^n$$

em que n é o número de descendentes da progênie e α é o erro que se comete ao desprezar a probabilidade de um indivíduo que produza n descendentes de fenótipo dominante $P(A_)$ seja heterozigoto (Aa). O complemento de α denominado de certeza é definido como:

$$(ii) \quad c = 1 - \alpha$$

em que c é a probabilidade de se concluir corretamente em relação à identidade do genótipo. Desta maneira, o número de indivíduos necessários para inferir a respeito dos genótipos paternos pode ser expresso como:

$$(iii) \quad n = \frac{\text{Log}(1 - \alpha)}{\text{Log}[P(A_)]}$$

2.2 Teste de segregação ambígua

O teste de χ^2 tem se mostrado bastante prático e eficiente para o teste de hipóteses de padrões de segregação, uma vez que considera os desvios ocorridos entre valores previstos e observados e o número de observações avaliado (SCHUSTER & CRUZ, 2004). Para a execução do teste são comparados dois valores o $\chi^2_{\text{calculado}}$ e o χ^2_{tabelado} , sendo o primeiro obtido a partir de dados experimentais, segundo a expressão apresentada a seguir:

(i)

$$\chi^2_{\text{calculado}} = \sum_i \left[\frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \right]$$

Em que O_i e E_i representam, respectivamente, os valores observados e esperados para a i -ésima classe fenotípica. O χ^2_{tabelado} é obtido a partir da informação

do número de graus de liberdade associado à hipótese genética testada e do nível de significância desejado. A decisão a respeito da não rejeição da hipótese genética de segregação é feita da seguinte maneira:

Se $\chi^2_{\text{calculado}} \geq \chi^2_{\text{tabelado}}$, rejeita-se H_0 .

Se $\chi^2_{\text{calculado}} < \chi^2_{\text{tabelado}}$, não se rejeita H_0 .

LIU (1997) apresenta metodologia desenvolvida por Bailey (1961) que permite a estimação do número de eventos necessários para a discriminação de duas hipóteses genéticas considerando a distribuição de χ^2 e um nível crítico associado. A obtenção do estimador considera dois padrões de segregação diferentes, definidos por x e y , e a frequência observada nas classes definidas por a e b , quantifica o número de indivíduos necessários para discriminar duas hipóteses genéticas de segregação:

$$n \geq \left[\frac{1 + \sqrt{(xy)}}{\sqrt{x} + \sqrt{y}} \right]^2 \chi^2_{\alpha,1}$$

x frequência observada da classe a

y frequência observada da classe b

2.3 Medidas de dissimilaridade entre os padrões de segregação

O inverso do número de indivíduos estimados pela estatística de Bailey foi utilizado com uma medida de dissimilaridade entre os padrões de segregação. Com base nesta matriz de dissimilaridade foi realizada uma análise de agrupamento por métodos hierárquicos utilizando como critério o método do UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Cruz et al., 2004).

3 Resultados e Discussão

Um dos pontos mais importantes no estudo das características de distribuição discreta é o teste de hipótese genética que permite com uma margem de erro

concluir a respeito do padrão predominante de segregação: se governado por um, dois ou mais genes e o tipo de interação predominante entre genes e alelos (SCHUSTER & CRUZ, 2004, LYNCH & WALSH, 1998, LIU, 1997). Padrões de segregação que possuem classes mais raras apresentam menores valores de c para progênies de mesmo tamanho (Figura 1). A dispersão dos valores de c mostra que a utilização de 30-50 indivíduos permite a caracterização dos principais padrões de segregação resultados da interação entre dois e três genes, com pequena margem de erro (Figura 1).

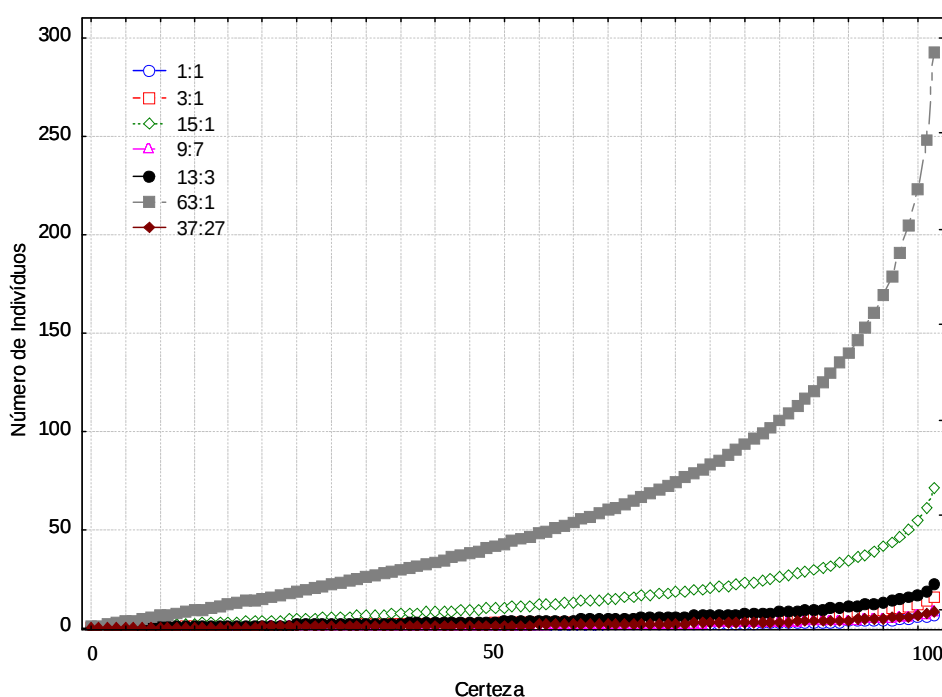


Figura 1 – Relação entre tamanho da progênie e a certeza da predição da identidade genotípica, considerando as probabilidades de ocorrência do genótipo heterozigoto para o gene marcador (P(Aa)), iguais, respectivamente, a 1:1, 3:4, 15:16, 9:16, 13:16, 63:64, 37:64

Se a não rejeição de de uma hipótese genética pelo teste do χ^2 necessita de um número relativamente pequeno de indivíduos, há de se considerar que a discriminação entre as hipóteses genéticas pode necessitar a avaliação de um número bem superior de indivíduos. Neste contexto, denomina-se segregação ambígua a impossibilidade de discriminação de duas ou mais hipóteses genéticas, e se caracteriza pela não rejeição simultânea de duas ou mais hipóteses de segregação gênica.

A probabilidade de ocorrência de segregação ambígua entre duas ou mais hipóteses genéticas distintas é inversamente proporcional ao número de indivíduos avaliados e à dissimilaridade dos padrões

Dois tipos de erros estão associados a um teste de hipótese. O erro tipo I que pode ser definido como a não rejeição da hipótese nula quando esta é verdadeira e o erro tipo II, que pode ser definido como a aceitação da hipótese nula quando esta é falsa (LIU, 1997). O erro tipo II é mais prejudicial para o melhoramento uma vez que favorece a seleção de indivíduos e famílias com menor frequência de genes favoráveis.

O teste de Bailey permite estimar o número mínimo de observações que deve ser avaliado para discriminar par a par cada uma das hipóteses genéticas com determinada probabilidade de erro. As distribuições de probabilidade são tão semelhantes quanto maior a similaridade dos padrões de segregação comparados. A avaliação dos dados deste teste permite observar que a separação categórica das hipóteses genéticas 9:7 de 27:37, por exemplo, necessita da análise de mais de 15.000 observações (Tabela 2).

Tabela 2: Número de indivíduos necessários para discriminação das hipóteses genéticas produzidas pela segregação de um, dois e três genes, com efeito, epistático.

	1p1	3p1	15p1	9p7	13p3a	63p1	27p37
1p1		54	12	974	32	7	619
3p1			50	95	666	22	112
15p1				15	99	235	17
9p7					49	9	15146
13p3a						35	55
63p1							9
27p37							

Visando facilitar a interpretação dos dados, foi construído um dendrograma utilizando o inverso do número de indivíduos estimados pela estatística de Bailey como uma medida de dissimilaridade.

Tal ferramenta facilita a visualização da relação entre as hipóteses e subsidia o planejamento de cruzamentos visando principalmente à separação das hipóteses governadas por diferentes números de genes (Figura 2).

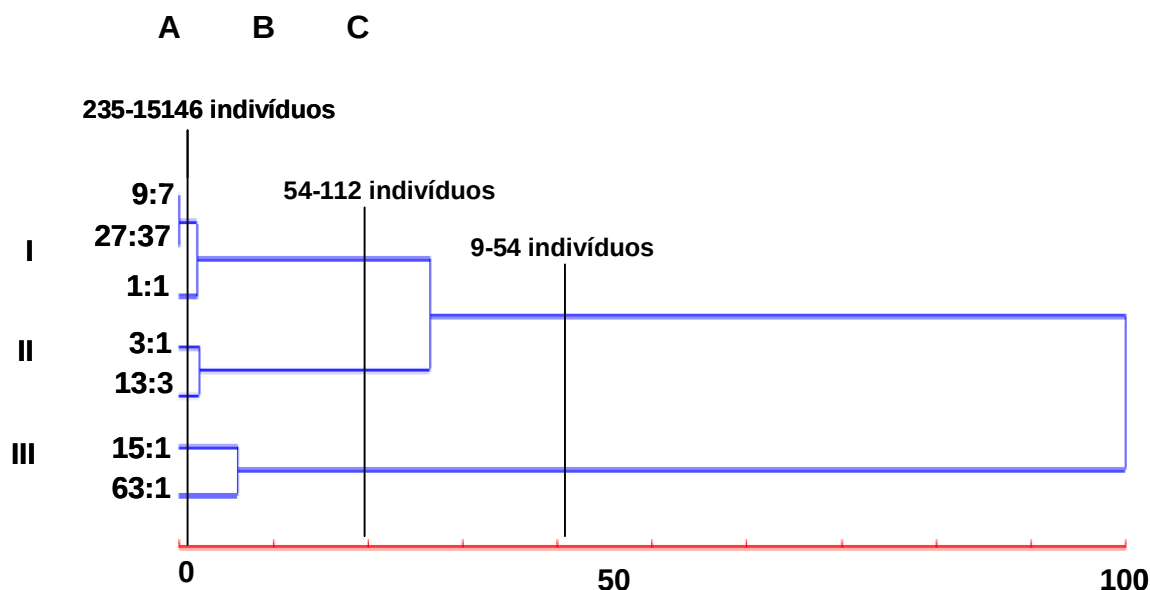


Figura 2 - Dendrograma construído pela técnica de UPGMA a partir de matriz de distância estimadas através do inverso do número de indivíduos necessários para separar duas hipóteses genéticas estimadas pelo teste de Bailey (1961) citado por LIU (2004).

Uma análise visual do dendrograma permite a discriminação dos pontos de fusão de grupos caracterizados pelas mais altas mudanças de nível como delimitadoras do número mínimo de indivíduos necessários para a discriminação das hipóteses genéticas. Neste contexto, as fusões entre os grupos I, II e III foram interpretadas considerando as linhas transversais traçadas nos pontos de maior mudança de nível, representados por A, B e C (Figura 2).

A linha C representa o ponto de maior mudança de nível que se caracteriza pela discriminação das hipóteses 15:1 e 63:1 das restantes. O número de indivíduos considerados nesta linha (9-54 indivíduos) não fornece subsídios para concluir, nem mesmo, em relação ao número de genes e mecanismo predominante da herança. Por outro lado, um aumento indiscriminado no tamanho das populações pode se mostrar frustrante, tendo em vista, que a separação de algumas hipóteses pode exigir a avaliação de populações de tamanho bem superior a 100 indivíduos. Além do par 9:7 e 27:37, as hipóteses 1:1 e 9:7, 1:1 e 27:37, 3:1 e 13:3, 3:1 e 27:37, 15:1 e 63:1 dependem da análise de mais de 100 indivíduos para ser discriminadas.

A simples utilização do critério da parcimônia para definição de uma hipótese genética, em que a opção pelo padrão de segregação mais simples reflete uma expectativa do pesquisador de maior probabilidade de acerto, pode ser traiçoeira, considerando, por exemplo, que uma hipótese genética tão simples quanto à

segregação de um único gene com proporção esperada de 1:1 necessita de mais de 500 observações para ser discriminada das hipóteses 9:7 (2 genes) e 27:37 (3 genes). Desconsiderando-se hipóteses genéticas mais semelhantes, observa-se que a utilização de 50-100 indivíduos em ensaios de segregação piloto permite separação das hipóteses menos similares.

O elevado número de indivíduos necessários para a discriminação entre algumas hipóteses pode ser considerado injustificável e de condução praticamente impossível na maioria das situações. Limitações de natureza prática contribuem para que o número de 50 indivíduos esteja próximo da capacidade de avaliação e que alternativas devem ser consideradas visando a um aumento na confiabilidade dos testes de segregação.

Desta forma, a análise simultânea de uma rede de cruzamentos planejados visando avaliar a segregação dos fatores responsáveis pela herança da característica em famílias aparentadas por meio da avaliação de genitores interconectados é uma opção para a determinação da hipótese genética mais adequada. O tempo e a mão de obra necessária para o desenvolvimento de uma rede de cruzamentos em espécies perenes faz este planejamento ainda mais importante.

Conclusões

Embora a não rejeição de uma hipótese genética pelo teste de qui-quadrado possa ser obtida a partir de um número relativamente pequeno de observações a discriminação dos padrões de herança deve ser feita a partir da análise simultânea de uma rede de cruzamentos planejados visando avaliar a segregação dos fatores responsáveis pela herança da característica em famílias aparentadas por meio da avaliação de genitores interconectados.

Referencias

ALFENAS A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA R.G., ASSIS T.F. **Clonagem e doenças do Eucalipto**. Viçosa, MG. Editora UFV, 2004. 442p.

ALZATE-MARIN A.L., CERVIGNI G.D.L., MOREIRA M.A., BARROS E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.4, p.333-342, 2005.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Trad. De Martinho de Almeida e Silva e José Carlos Silva. Viçosa, MG: UFV, 1987. 279p.

JUNGHANS D. T., ALFENAS A. C., BROMMONSHENKEL S. H., ODA S., MELLO E. J., GRATTAPAGLIA D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in Eucalyptus mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**. v.108, p.175-180, 2003.

LIU B.H., **Statistical Genomics: linkage mapping and QTL analysis**. Boca raton, Florida, USA: CRC Press, 1997, 610p.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland, USA: Sinauer Associates, Inc.Ed., 1998, 978p.

ROCHA, R. B.; MURO ABAD, J. I.; ARAÚJO, E. F.; CRUZ, C. D. Utilização do método Centróide para estudo de estabilidade e adaptabilidade ao ambiente. **Ciência Florestal**, v. 15, p. 255-266, 2005.

ROCHA, R.B., CRUZ, C.D., BARROS, W. S., FERREIRA, F.M., ARAÚJO, E.F. Comparisons of segregating populations for genetic mapping. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**., v.4, p.408 - 415, 2004.

SARTORATO, A.; RAVA C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília, Embrapa-SPI, Embrapa- CNPAF, 1994, 300p.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLI, L. (ED) **Controle de doenças de plantas – Grandes culturas**. v.2, Viçosa, MG, UFV, Depto. de Fitopatologia; Brasília, Ministério da Agricultura, 1997, 1065p.

VIJAYALAKSHMI S., YADAV K., KUSHWAHA C., SARODE S.B., SRIVASTAVA C.P., CHAND R., SINGH B.D. Identification of RAPD markers linked to the rust (*Uromyces fabae*) resistance gene in pea (*Pisum sativum*). **Euphytica**, v.144, p.265-274, 2005.

WILCOX P.L., AMERSON H.V., KUHLMAN E.G., LIU B., O'MALLEY D.M., SEDEROFF R.R. Detection of a major gene for resistance to fusiform rust disease in loblolly pine by genomic mapping. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, p.3859-3864, 1996.

YU K., PARK S. J., POYSA V. Marker assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. **Plant breeding**, v.199, p.411-415, 2000.

ZOBEL, B., JETT J. B. **Genetics of wood production**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 337p.