

HERANÇA E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM LOCOS ISOENZIMÁTICOS DE *Eschweilera ovata**

Eduardo GUSSON**
Alexandre Magno SEBBENN***

RESUMO

A herança e o desequilíbrio de ligação entre 11 locos polimórficos de oito sistemas isoenzimáticos foram estudados em progênies de polinização aberta de duas populações de *Eschweilera ovata* (Bambess.) Miers (biriba) do Estado da Bahia. A análise da segregação de progênies de árvores heterozigotas revelou simples herança mendeliana para onze locos (*Acp-1*, *Dia-1*, *Dia-2*, *Dia-3*, *G6pdh-1*, *Mdh-1*, *Nadh-1*, *Nadh-2*, *Pgi-1*, *Pgi-2* e *6pgdh-1*). A segregação desses locos foi geralmente homogênea entre árvores, embora algumas tenham apresentado desvios significativos da segregação esperada 1:1. Desvios significativos do equilíbrio gamético foram detectados entre três pares de locos: *6pgdh-1:Pgi-2*, *Dia-1:Dia-2* e *Dia-2:Dia-3*.

Palavras-chave: segregação; desequilíbrio de ligação; isoenzimas; biriba; espécies arbóreas tropicais.

1 INTRODUÇÃO

Em décadas recentes, variantes eletroforéticas de isoenzimas têm-se tornado marcadores genéticos muito populares em pesquisas de genética florestal (Wang & Lin, 1998; Lewandowski, 2000; Marchelli & Gallo, 2000). Isoenzimas têm sido utilizadas para o mapeamento genômico, quantificação da diversidade e diferenciação genética de populações, análise do sistema de reprodução, estudos de introgressão e relação filogenética entre espécies (Lewandowski, 2000). Contudo, para estes fins, marcadores bioquímicos devem primeiro ter sua herança genética confirmada para utilização como marcadores genéticos (Pastorino & Gallo, 1998; Wang & Lin, 1998; Marchelli & Gallo, 2000). Estudos de herança mendeliana em isoenzimas têm sido conduzidos para inúmeras espécies arbóreas, especialmente em coníferas (Papageorgiou *et al.*, 1993;

ABSTRACT

Inheritance and gametic disequilibrium were studied between 11 polymorphic loci of the eight isozymes systems from open-pollinated families of two *Eschweilera ovata* (Bambess.) Miers (biriba) populations from Bahia State. Segregation analysis of families from heterozygote trees revealed simple mendelian inheritance for eleven loci (*Acp-1*, *Dia-1*, *Dia-2*, *Dia-3*, *G6pdh-1*, *Mdh-1*, *Nadh-1*, *Nadh-2*, *Pgi-1*, *Pgi-2* and *6pgdh-1*). Gene segregation at these loci was generally homogeneous among trees. However, there were significant deviations from the expected segregations ratio 1:1 at some individual trees. Significant gametic disequilibrium was observed for three pairs of loci: *6pgdh-1:Pgi-2*, *Dia-1:Dia-2* and *Dia-2:Dia-3*.

Key words: segregation; linkage disequilibrium; isozymes; biriba; tropical tree species.

Pastorino & Gallo, 1998; Lewandowski, 2000). Espécies arbóreas tropicais têm sido objeto de menor número de estudos, embora o interesse por estas espécies, na análise do sistema de reprodução e estrutura genética, tenha aumentado na última década.

Aqui é reportado o estudo da herança e desequilíbrio de ligação entre locos isoenzimáticos de *E. ovata* (Lecythidaceae) ou biriba, uma espécie arbórea tropical de valor econômico que habita, exclusivamente, as florestas pluvial Atlântica e Amazônica brasileira. O objetivo é investigar se os marcadores bioquímicos revelados têm herança mendeliana simples e se existe desequilíbrio de ligação entre alelos de 11 locos isoenzimáticos revelados em *E. ovata*, para fins de utilização em estudos do sistema de reprodução, diversidade e estrutura genética. Como não foram realizados cruzamentos controlados, a análise genética é baseada na segregação de progênies de polinização aberta de árvores maternas heterozigotas.

(*) Aceito para a publicação em outubro de 2004.

(**) ESALQ/USP, Departamento de Ciências Florestais, Av. Pádua Dias, 15, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

(***) Instituto Florestal, Caixa Postal 1322, 01059-970, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: amsebbenn@bol.com.br

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Sementes de polinização aberta foram coletadas em 40 árvores de duas populações de *E. ovata* na região de Salvador, Estado da Bahia. Essas sementes foram posteriormente germinadas em incubadora, sob controle de luz e temperatura. Essas condições consistiram de fotoperíodo de oito horas em temperatura alternando de 25 a 30°C. As isoenzimas foram reveladas em tecidos foliares de plântulas com 20 a 25 dias de idade.

2.2 Eletroforese de Isoenzimas

A eletroforese horizontal em gel de amido foi usada para separar as enzimas ACP, DIA, G6PDH, IDH, MDH, PGI, 6PGDH, NADHDH e SKDH (TABELA 1).

As enzimas foram extraídas empregando-se, aproximadamente, 20 mg de tecido de limbo foliar, 10 mg de areia lavada, 7 mg de Polivinil Pirrolidona (PVP 40), 7 mg de Polivinil Pirrolidona (PVP-60) e 200 microlitros da solução de extração número 1 de Alfenas (1998), alterada pela ausência de Mercaptoetanol. Utilizou-se a eletroforese horizontal conduzida em meio suporte de gel de 2/3 de amido de milho (penetrose 30) a 13%, combinado com 1/3 de amido de batata (Sigma). As “corridas” foram realizadas em geladeira com temperatura de 5°C.

A zona especificando bandas de maior taxa de migração foi designada como 1, a próxima 2 e assim, sucessivamente. Dentro de cada zona, a banda de migração mais rápida foi designada como 1, a próxima como 2 e assim sucessivamente.

TABELA 1 – Sistemas enzimáticos investigados para herança em *E. ovata*.

Sistemas enzimáticos (Abreviações) Número E.C.	Locos detectados	Número de alelos detectados
Fosfatase ácida (ACP) 3.1.3.2	1	2
Diaforase (DIA) 1.8.1.4	1	3
	2	3
	3	3
Glucose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH) 1.1.1.49	1	2
Isocitrato desidrogenase (IDH) 1.1.1.42	1	1
Malato desidrogenase (MDH) 1.1.1.37	1	3
	2	2
NADH-desidrogenase (NADH) 1.6.99.3	1	2
	2	3
Fosfogluose isomerase (PGI) 5.3.1.9	1	3
	2	4
6-Fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) 1.1.1.44	1	3
Xiquimato desidrogenase (SKDH) 1.1.1.25	1	2

2.3 Análise de Segregação

Neste trabalho não foram realizados cruzamentos controlados para o estudo da herança isoenzimática de *E. ovata*, adotando-se o método descrito por Gillet & Hattemer (1989) que compara árvores maternas heterozigotas com suas progênies de polinização aberta. As pressuposições do modelo de Gillet & Hattemer (1989) são que toda a progênie de uma árvore materna A_iA_i deve

possuir o alelo A_i da árvore mãe. Em caso de uma árvore mãe heterozigota (ex. A_iA_j , $i \neq j$) procedeu-se da seguinte maneira: a) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna, A_i , A_j ; b) o número de progênies heterozigotas A_iA_j (N_{ij}) deve ser igual a soma das progênies homozigotas A_iA_i (N_{ii}) e A_jA_j (N_{jj}), $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$, e c) o número de progênies heterozigotas A_iA_k (N_{ik}) deve ser igual ao número de progênies heterozigotas A_jA_k (N_{jk}), $N_{ik} = N_{jk}$ ($k \neq i, j$).

A análise genética foi realizada com 40 progênies, cada uma com dez plantas de polinização aberta. Os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigotas foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1, usando um teste G (Sokal & Rohlf, 1981) com um grau de liberdade. Posteriormente, todos os testes individuais foram somados e um teste G total foi obtido ($\sum G_{Hipótese1:1}$), com n graus de liberdade, sendo n o número de progênies usadas no teste. Simultaneamente, os fenótipos observados foram somados e um teste de G agrupado para a segregação 1:1 foi obtido ($G_{1:1Agrupado}$), com um grau de liberdade. A hipótese nula desse teste é a de igual proporção dos tipos de gametas na progênie produzida por diferentes árvores maternas de genótipo heterozigoto. Em seguida, testou-se a hipótese de heterogeneidade de segregação entre progênies, usando-se um teste G de heterogeneidade ($\sum G_{Heterogeneidade}$), obtido pela subtração do teste G agrupado ($G_{1:1Agrupado}$), do teste G total ($\sum G_{Hipótese1:1}$). Esses testes são aditivos de forma que $\sum G_{Hipótese1:1} = \sum G_{Heterogeneidade} + G_{1:1Agrupado}$, com n , $n-1$ e 1 grau de liberdade, respectivamente (Sousa *et al.*, 2002).

2.4 Análise de Desequilíbrio de Ligação

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado com base na medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (Δ_{ij} , Weir, 1979) e no coeficiente de correlação, r_{ij} , calculado de Δ_{ij} (Weir, 1979), devido à possibilidade dos cruzamentos não terem ocorrido de forma aleatória e, conseqüentemente, existir endogamia nas progênies. Essa medida é aquela apropriada para situações onde a união de gametas não ocorreu de forma aleatória e a identificação dos genótipos é incompleta (Weir & Cockerham, 1979). O teste de desequilíbrio foi realizado usando o programa POPGENE versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). A hipótese $H_0: \Delta_{ij} = 0$ foi avaliada com o teste de qui-quadrado (χ^2) proposto por Weir (1979).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Herança e Padrão das Isoenzimas

Oito das 28 enzimas testadas em *E. ovata* puderam ser resolvidas suficientemente para o estudo da herança. A enzima Isocitrato desidrogenase (IDH) apresentou uma simples zona invariável, interpretada como um loco (*Idh-1*) monomórfico. A herança e os padrões de segregação das demais isoenzimas reveladas em *E. ovata* são descritos a seguir.

a) Fosfatase ácida (ACP)

O sistema ACP apresentou duas zonas de atividades. A zona de migração mais rápida (*Acp-2*) apresentou baixa qualidade de resolução e, por isso, foi descartada da análise genética. A zona de migração mais lenta, denominada *Acp-1*, foi interpretada como uma enzima de expressão monomérica, visto que a observação de genótipos heterozigotos nos zimogramas revelava duas bandas (FIGURA 1).

b) Diaforase (DIA)

O sistema DIA apresentou três zonas de atividade (*Dia-1*, *Dia-2* e *Dia-3*) (FIGURA 1). Essas zonas foram interpretadas como locos polimórficos de expressões monoméricas, segregando três alelos em cada loco (FIGURA 1). Três zonas de atividade também foram observadas nessa enzima em *Liriodendron tulipifera* L. (Parks *et al.*, 1990).

c) Glucose 6 Fosfato Desidrogenase (G6PDH)

Uma simples zona de atividade (*G6pdh-1*) foi observada na enzima G6PDH. Esse loco foi interpretado como polimórfico, segregando dois alelos (FIGURA 1). Um simples loco controlando essa enzima também foi relatado em *Pinus thunbergii* Parl (Shiraishi, 1988), *Pinus leucodermis* Ant. (Morgante *et al.*, 1993) e *Pinus massoniana* Lamb (Huang *et al.*, 1994). Observando os zimogramas nos géis de indivíduos heterozigotos, verificou-se que o fenótipo isoenzimático apresentava duas bandas, típico de enzimas monoméricas.

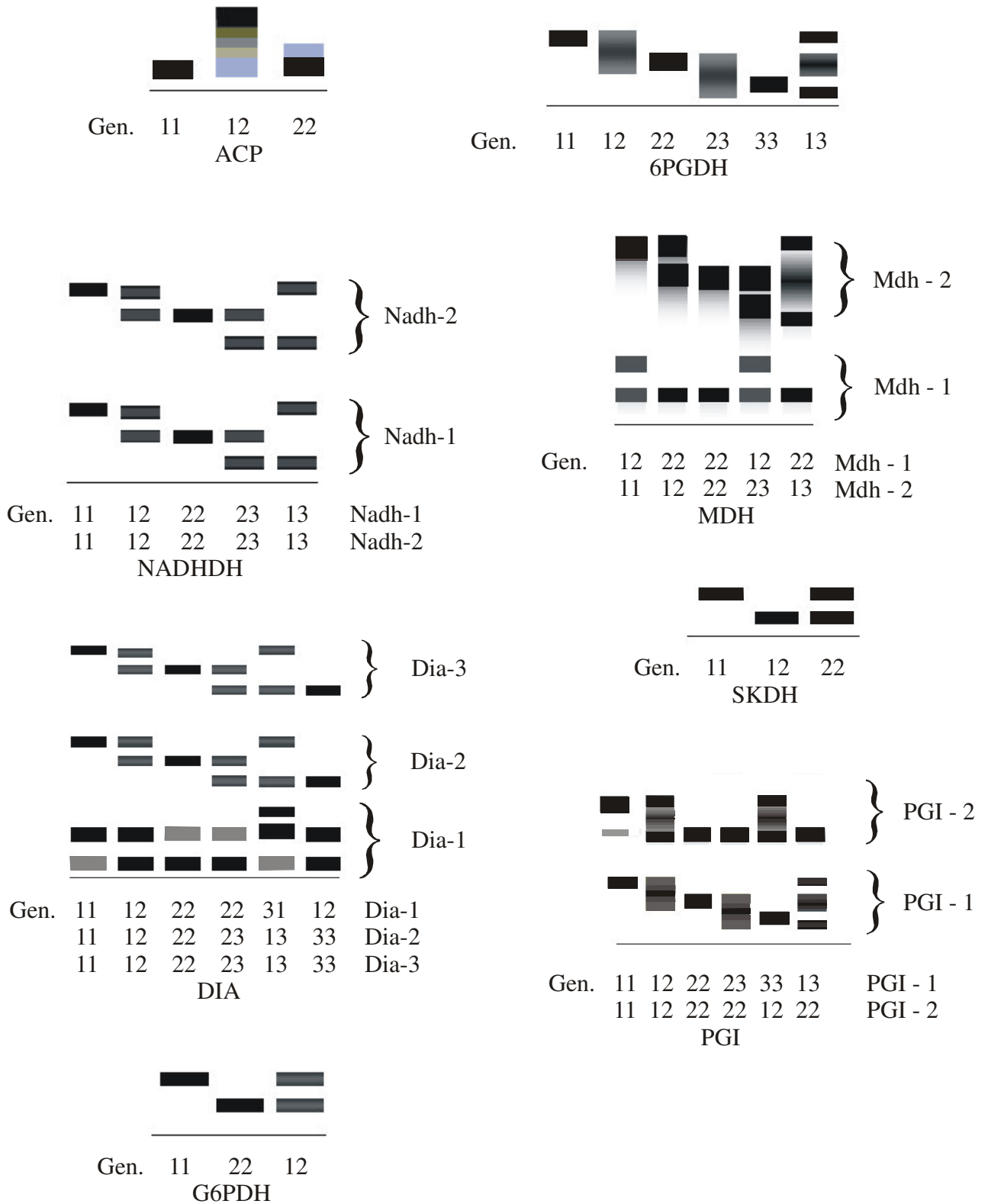


FIGURA 1 – Representação esquemática da interpretação de bandas dos sistemas enzimáticos analisados para *E. ovata*.

d) *Malato Desidrogenase* (MDH)

Duas zonas de atividade foram observadas no sistema MDH, sendo ambas polimórficas e interpretadas como locos (*Mdh-1* e *Mdh-2*), compostos por enzimas de expressão monomérica, segregando dois alelos na zona de migração mais lenta (*Mdh-1*) e três alelos na zona mais rápida (FIGURA 1). Duas zonas de atividade na enzima MDH também foi reportado em *Cunninghamia lanceolata* Hook. (Geburek & Wang, 1990), embora em *Thuja occidentalis* L. (Perry & Knowles, 1989), *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. (Chaisurisri & El-Kassaby, 1993) e *Acer pseudoplatanus* L. (Konnert *et al.*, 2001) tenham sido observadas três zonas de atividade.

e) *NADH-desidrogenase* (NADHDH)

Foram observadas duas zonas de atividade na enzima NADHDH (*Nadh-1* e *Nadh-2*), sendo ambas passíveis de interpretação (FIGURA 1). Em ambos os locos foram detectados a segregação de três alelos. O fenótipo de indivíduos heterozigotos apontou essa enzima como sendo monomérica.

f) *Fosfogluose Isomerase* (PGI)

Duas zonas de atividades foram observadas na enzima PGI (FIGURA 1). Em ambas as zonas, o fenótipo de indivíduos heterozigotos apresentou três bandas, o que é típico de enzimas diméricas. A zona de migração mais rápida (anódica), denominada *Pgi-1*, revelou a segregação de três alelos, e a zona mais lenta (*Pgi-2*) revelou a segregação de quatro alelos. A grande maioria dos estudos tem detectado duas zonas de atividade nessa enzima (Lewandowski *et al.*, 1992; Papageorgiou *et al.*, 1993; Wang & Lin, 1998; Lewandowski, 2000).

g) *Xiquimato Desidrogenase* (SKDH)

O sistema SKDH apresentou apenas uma zona de atividade (*Skdh-1*) nos géis. Essa zona foi interpretada como um loco polimórfico, composto por uma enzima de expressão monomérica, com genótipo heterozigoto apresentando duas bandas e segregando dois alelos (FIGURA 1). Expressão monomérica no sistema SKDH também foi observada em *A. angustifolia* (Sousa *et al.*, 2002). Dois locos no sistema SKDH têm sido detectados em diversos outros estudos da herança isoenzimática em espécies arbóreas (Geburek & Wang, 1990; Potenko, 2001; Sousa *et al.*, 2002), embora existam relatos de apenas uma zona de atividade (Liu & Furnier, 1993).

h) *Fosfogluconato Desidrogenase* (6-PGDH)

Uma simples zona (*6pgh-1*) foi detectada na enzima 6PGDH. A observação de fenótipos de indivíduos heterozigotos indica que essa enzima tem expressão dimérica e segrega três alelos (FIGURA 1). Um simples loco no sistema 6PGDH também foi relatado em *P. taeda* (Adams & Joly, 1980), embora em muitos estudos dois locos tenham sido reportados nessa enzima (Cheliak & Pitel, 1985; Potenko, 2001; Sousa *et al.*, 2002).

3.2 Segregação

O loco *Idh-1* era monomórfico e o *Mdh-2* não apresentou nenhum genótipo materno heterozigoto, assim não foi possível estudar seus padrões de segregação. A análise genética de progênies de árvores heterozigotas de três (*Dia-2*, *Mdh-1* e *Nadh-2*) dos 11 locos polimórficos restantes e passíveis de análise não rejeitou a hipótese de segregação 1:1 (TABELA 2). Nos locos *Acp-3*, *Dia-1*, *Dia-3*, *G6pdh-1* e *Nadh-1* foram detectados desvios de segregação em pelo menos um dos três testes G , mas ausência de desvios quando progênies, mostrando desvios, foram excluídas das análises. O mesmo ocorreu em progênies de árvores heterozigotas do tipo A_2A_3 do loco *Pgi-1* e de árvores A_1A_3 no loco *Pgi-2*, sendo encontrados desvios significativos em dois dos três testes G , mas ausência de desvios quando as árvores, mostrando desvios significativos, foram excluídas da análise. O loco *6pghd-1* apresentou desvios significativos no teste agrupado ($G_{1:1Agrupado}$), em progênies de árvores heterozigotas do tipo A_1A_2 e no teste total de segregação ($\sum G_{Hipótese 1:1}$) e teste agrupado ($G_{1:1Agrupado}$), em progênies de árvores heterozigotas do tipo A_1A_3 , mas ausência de desvios quando as árvores, mostrando desvios significativos, foram excluídas da análise. Assim, não se rejeita a hipótese de segregação 1:1 para esse loco.

Em suma, não existem indícios para rejeitar a hipótese esperada da segregação 1:1 em nenhum dos locos aqui estudados em *E. ovata*, e todos podem ser utilizados em estudos genéticos populacionais, sistema de reprodução e análise de paternidade com a espécie.

TABELA 2 – Testes G para hipótese de segregação regular de marcadores isoenzimáticos em *E. ovata*.

Loco	Genótipo materno	Caso	Número de árvores (n)	$N_{ij} : N_{ii} + N_{jj}$	$N_{ik} : N_{jk}$	$\sum G_{Hipótese I}$ GL = n	$\sum G_{Heterogeneidade}$ GL = n-1	$G_{I, Agrupado}$ GL = 1	Árvores com desvios de segregação
<i>Acp-3</i>	A_1A_2	a	22	89:122	–	38,11**	32,92	5,18*	6
		b	16	73:74	–	11,36	11,26	0,10	
<i>Dia-1</i>	A_1A_2	a	23	139:86	–	46,95**	34,35*	12,60**	4
		b	19	110:75	–	13,3	10,90	3,22	
<i>Dia-2</i>	A_1A_2	a	9	37:43	–	14,10	12,91	1,19	1
	A_2A_3	a†	10	40:40	3:3	12,95	12,95	0,00	1
<i>Dia-3</i>	A_1A_2	a	4	8:26	–	19,74**	9,71*	10,03**	2
		b	2	7:10	–	2,20	1,67	0,53	
	A_2A_3	a	10	37:44	–	13,08	12,47	0,61	1
		b	9	36:37	–	2,96	2,20	0,76	
<i>Gópdh-1</i>	A_1A_2	a	22	83:125	–	44,22**	35,68**	8,54**	7
		b	20	81:108	–	18,99	18,37	0,62	
<i>Mdh-1</i>	A_1A_2	a	2	7:5	–	0,45	0,12	0,33	
	A_2A_3	a†	12	65:53	1:0	12,94	11,71	1,22	
<i>Nadh-1</i>	A_1A_2	a	8	18:37	–	29,39**	21,45**	7,82*	1
		b	7	17:29	–	6,19	4,93	1,26	
<i>Nadh-2</i>	A_1A_2	a	18	79:88	–	24,51	24,28	0,23	
<i>Pgi-1</i>	A_1A_2	a	4	18:21	–	0,51	0,28	0,23	
	A_2A_3	a†	21	80:100	11:13	44,92*	44,76*	0,17	4
		b†	17	70:78	10:7	37,34	36,95	0,39	
<i>Pgi-2</i>	A_1A_2	a	17	86:73	–	18,62	17,55	1,06	
	A_1A_3	a†	5	27:5	12:0	26,99**	10,35*	16,64**	3
		b†	2	12:5	7:0	7,58	3,42	4,16	
<i>6pghd-1</i>	A_1A_2	a	14	40:76	–	23,23	11,87	11,36**	4
		b	13	39:68	–	11,85	9,45	2,40	
	A_1A_3	a†	12	38:43	24:12	48,96**	46,85**	4,08	1
		b†	11	38:39	23:7	26,33	25,65	5,01	
	A_2A_3	a†	5	12:25	4:5	16,98	12,30	0,11	1

N_{ij} e $N_{ii} + N_{jj}$ são os números observados dos genótipos heterozigotos e homozigotos, respectivamente.

N_{ik} e N_{jk} são os números observados de genótipos heterozigotos do tipo ik e jk , respectivamente.

a) Inclui todas as árvores heterozigotas em um dado loco.

b) Exclui as árvores com distorção de segregação em um dado loco.

(*) $P < 0,050$.

(**) $P < 0,010$.

† = 2 x GL.

3.3 Desequilíbrio de Ligação

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado usando apenas os onze locos polimórficos, com base na medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows. Foram detectados fracos indícios de desequilíbrio de ligação nos locos avaliados em *E. ovata*. São apresentados na TABELA 3 apenas os resultados para os locos com desvios significativos, visando economizar espaço. Dos 55 pares possíveis de combinação de locos, apenas três pares (*6pgdh-1:Pgi-2*; *Dia-1:Dia-2* e *Dia-2:Dia-3*) apresentaram desvios significativos a 95% de probabilidade da hipótese de segregação independente ou equilíbrio de ligação. Isso representa 5,4% dos pares de locos possíveis de comparação. Nos demais pares de locos não foram detectados indícios de desequilíbrio de ligação, e é possível afirmar que os alelos de diferentes locos não estão associados e segregam independentemente.

Em relação aos locos com desequilíbrio de ligação, ressalta-se que, embora os desvios são significativos, as ligações são aparentemente fracas, como pode ser observado pelos baixos valores de $\hat{\Delta}_{ij}$ (TABELA 3). A exclusão de um dos locos dos pares *6pgdh-1:Pgi-2*; *Dia-1:Dia-2* e *Dia-2:Dia-3*, quebra qualquer associação alélica entre esses, de forma que possam ser usados em subseqüentes análises do sistema de reprodução, diversidade e estrutura genética de populações de *E. ovata*.

O desequilíbrio de ligação entre os pares de locos aqui detectados não foi reportado até o presente, em nenhum outro estudo com espécies arbóreas. Como a utilização de locos em desequilíbrio de ligação no estudo do sistema de reprodução e estrutura genética produz estimativas não independentes de parâmetros genéticos, um loco de cada par ligado deverá preferencialmente ser excluído das futuras análises.

TABELA 3 – Valores da medida composta de Burrows para o desequilíbrio de ligação ($\hat{\Delta}_{ij}$), resultados do teste de qui-quadrado (χ^2) e probabilidade associada (P) para pares de locos isoenzimáticos que apresentaram desvios significativos da hipótese de desequilíbrio de ligação em *E. ovata*.

Locos	$\hat{\Delta}_{ij}$	χ^2	P
<i>6pgdh-1:Pgi-2</i>	-0,029	4,61*	0,032
<i>Dia-1:Dia-2</i>	-0,042	5,39*	0,020
<i>Dia-2:Dia-3</i>	0,028	3,92*	0,048

(*) $P < 0,05$.

4 CONCLUSÕES

Não foram detectados desvios significativos de segregação nos onze locos analisados, podendo-se aceitar que se encontram sob controle genético e segregam de acordo com a razão 1:1.

Foram detectados desvios significativos da hipótese de equilíbrio de ligação entre os pares de locos *6pgdh-1:Pgi-2*; *Dia-1:Dia-2* e *Dia-2:Dia-3*. Um loco de cada par deve, preferencialmente, ser excluído das análises genéticas que requerem locos em equilíbrio de ligação.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa parcial de mestrado ao primeiro autor; à Fundação de Amparo

à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo financiamento da pesquisa; à Assistente Técnica de Pesquisa Científica e Tecnológica Yara Cristina Marcondes e ao Técnico de Apoio à Pesquisa Carlos Eduardo Spósito, pela revisão gramatical e correção do presente artigo, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. T.; JOLY, R. J. Genetics of allozymes variants in Loblolly Pine. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 71, p. 33-40, 1980.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicação em plantas e microorganismos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 1998. 574 p.

- CHASURISRI, K.; EL-KASSABY, Y. A. Genetic control of isoenzymes in Sitka Spruce. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 84, p. 206-211, 1993.
- CHELIAK, W. M.; PITEL, J. A. Inheritance and linkage of allozymes in *Larix laricina*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 34, p. 142-148, 1985.
- GEBUREK, T.; WANG, Q. Inheritance of isozyme variants and their linkage relationships in Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* Hook.). **Euphytica**, Dordrecht, v. 49, p. 193-201, 1990.
- GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, Oxford, v. 63, p. 135-141, 1989.
- HUANG, Q. Q. *et al.* Genetic control of isozyme variation in Masson Pine, *Pinus massoniana* Lamb. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, p. 285-292, 1994.
- KONNERT, M.; RUETZ, W.; FROMM, M. Genetic variation in *Acer pseudoplatanus* L. I. Inheritance of isozymes variants. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 8, p. 25-37, 2001.
- LEWANDOWSKI, A. Inheritance and linkage of some allozymes in *Pinus armandii* Franch. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 49, p. 79-82, 2000.
- _____; BURCZYK, J.; MEJNARTOWICZ, L. Inheritance and linkage of some allozymes in *Taxus baccata* L. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 41, p. 342-347, 1992.
- LIU, Z.; FURNIER, G. R. Inheritance and linkage of allozymes and restriction fragment length polymorphisms in Trembling Aspen. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 84, p. 419-424, 1993.
- MARCHELLI, P.; GALLO, L. A. Genetic analysis of isozymes variants in open-pollinated families of southern beech (*Nothofagus nervosa* (Phill.) Dim. et Mil. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 49, p. 90-98, 2000.
- MORGANTE, M.; VENDRAMIN, G. G.; GIANNINI, R. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Pinus leucodermis* Ant. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 42, p. 231-236, 1993.
- PAPAGEORGIOU, A. C. *et al.* Genetic analysis of isoenzyme variation in Mediterranean Cypress (*Cupressus sempervire* L.). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 42, p. 109-111, 1993.
- PARKS, C. R. *et al.* Genetic control of isozyme variation in the genus *Liriodendron* L. (Magnoliaceae). **Journal of Heredity**, Cary, v. 81, p. 317-323, 1990.
- PASTORINO, M. J.; GALLO, L. A. Inheritance of isozyme variants in *Astrocedrus chileis* (D. Do) Florin et Boutelje. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 47, p. 15-20, 1998.
- PERRY, D. J.; KNOWLES, P. Inheritance and linkage relationships of allozymes of eastern white cedar (*Thuja occidentalis*) in northwestern Ontario. **Genome**, Ottawa, v. 32, p. 245-250, 1989.
- POTENKO, V. Inheritance of allozymes and genetic variation in natural population of Japanese Yew in Petrov Island, Russia. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 8, p. 307-313, 2001.
- SHIRAISHI, S. Inheritance of isozymes variation in Japanese Black Pine, *Pinus thunbergii* Parl. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 37, p. 93-100, 1988.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**: the principles and practice of statistics in biological research. New York: Copyright Ltd., 1981. 859 p.
- SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; ROBION, I. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 51, p. 191-196, 2002.
- WANG, C. T.; LIN, T. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme, and estimation of outcrossing rate in a seed orchard of *Cunninghamia konishii* Hay. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 47, p. 33-37, 1998.
- WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, Lawrence, v. 35, p. 235-254, 1979.
- _____; COCKERHAM, C. C. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating population. **Heredity**, Lund, v. 43, p. 105-111, 1979.
- YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE version 1.32**: Microsoft Window-based freeware for population genetics analysis. Edmonton: University of Alberta, 1999. Disponível em: <<http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm>>. Acesso em: 30 mar. 2004.