

HERANÇA E LIGAÇÃO EM LOCOS DE ISOENZIMAS EM *Genipa americana* L.*

Alexandre Magno SEBBENN**

RESUMO

A herança e a ligação foram estudadas em quatro locos polimórficos (*6pgdh-1*, *Pgi-2*, *Mdh-1* e *Mdh-2*) de três sistemas isoenzimáticos de *Genipa americana*, analisados por eletroforese horizontal em gel de amido, usando tecidos coletados de quinze progênies de polinização aberta, procedentes de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo. Esses locos segregaram de dois a três alelos. A segregação nesses locos foi homogênea entre árvores. Contudo, existem desvios significativos da segregação esperada 1:1 para algumas árvores em alguns locos. Desvios significativos da razão de segregação esperada 1:1 foram detectados nos locos *Mdh-2* e *6pgdh-1*. Não foram detectadas evidências de ligação entre nenhum dos pares de locos avaliados em *G. americana* e esses podem ser utilizados sem restrição para estudos do sistema de reprodução, diversidade e estrutura genética de populações da espécie.

Palavras-chave: segregação; jenipapo; espécies arbóreas tropicais.

1 INTRODUÇÃO

A técnica de eletroforese de isoenzimas tem sido amplamente aplicada em estudos de melhoramento (Adams & Joly, 1980) e conservação genética florestal. A técnica tem grande poder para estudos de introgressão, sistema de reprodução, diversidade e estrutura genética, mapeamento genômico e análise da relação filogenética entre espécies (Lewandowski, 2000). Algumas dessas aplicações requerem que o modo de herança e a relação de equilíbrio de ligação entre as isoenzimas sejam conhecidos (Gillet & Hattemer, 1989; Lewandowski *et al.*, 1992; Thorsén *et al.*, 1997). Entretanto, para que os marcadores bioquímicos sejam utilizados como marcadores genéticos é necessário que sua herança genética mendeliana seja confirmada (Muona *et al.*, 1987;

ABSTRACT

Inheritance and linkage for four polymorphic loci (*6pgdh-1*, *Pgi-2*, *Mdh-1* and *Mdh-2*) from three enzyme systems in *Genipa americana* were analyzed by horizontal starch gel electrophoresis using tissues collected from fifty open-pollinated families in Moji-Guaçu, São Paulo State. These allozyme loci have segregated from two to four alleles per polymorphic locus. Gene segregation on those loci was homogeneous among trees. However, there were significant deviations from the expected segregation ratios on some loci and some individual trees. In addition, *Mdh-2* and *6pgdh-1* loci have shown significant deviations from the 1:1 expected segregation ratio. Linkage disequilibrium evidences were not detected between any two pairs of loci from *G. americana* and those can be used with no restriction to study the mating system, genetic diversity, and genetic structure on the species.

Key words: segregation; jenipapo; tropical tree species.

Thorsén *et al.*, 1997; Wang & Lin, 1998). Tais estudos têm sido especialmente conduzidos em coníferas (Papageorgious *et al.*, 1993; Lewandowski, 2000). Contudo, infelizmente, poucas espécies arbóreas folhosas têm sido submetidas a essas análises.

O objetivo deste trabalho foi investigar a herança e o desequilíbrio de ligação em quatro locos isoenzimáticos polimórficos revelados em uma população de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) procedente de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo. *G. americana* é uma espécie arbórea tropical dióica, polinizada por insetos e de distribuição ampla, que vai do México (20°N) ao Estado de São Paulo (20°S). Sua madeira é de grande utilidade na carpintaria, construção civil, indústria de móveis, etc., e os frutos são comestíveis e medicinais, entre outras utilidades da espécie (Carvalho, 1994).

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

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Os estudos da herança e ligação foram realizados a partir da coleta de sementes de polinização aberta e tecidos foliares de quinze árvores de *G. americana* de uma população natural localizada em floresta mesófila semidecídua de planalto, na Estação Ecológica de Moji-Guaçu, do Instituto Florestal de São Paulo.

2.2 Eletroforese de Isoenzimas

As enzimas foram extraídas de tecidos foliares de quinze árvores adultas e vinte plântulas de cada progênie, 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. A eletroforese de isoenzimas foi a horizontal, conduzida em meio suporte de gel de amido de milho (penetrose 30) a 13%.

As “corridas” foram realizadas em geladeira, com temperatura de 5°C. Nos primeiros 30 minutos de “corrida”, mantinha-se a corrente elétrica constante a 35mA, sendo, posteriormente, elevada a 40mA até o final do processo. A voltagem nos eletrodos foi de 120 a 180 volts, e no gel, de seis a oito volts nos primeiros 30 minutos, e 140 a 210 volts e oito a dez volts, nos eletrodos e no gel, respectivamente, no restante do tempo de “corrida”. As amostras embebidas em papel-de-filtro eram retiradas dos géis após 30 minutos de migração, sendo que o tempo médio do processo de “corrida” era de aproximadamente 8 horas e 30 minutos. Nesse ponto, o marcador azul de bromofenol atingia de 7 cm a 8 cm de migração. Terminada a “corrida”, o gel era cortado em seis fatias, com espessura em torno de 1,0 mm, sendo que a primeira e a última fatia eram descartadas. As quatro faces restantes eram submetidas à coloração em enzimas específicas. Os sistemas isoenzimáticos PGM, PGI e 6PGDH foram revelados sempre utilizando fatias mais nobres (as duas primeiras). A lista das isoenzimas investigadas encontra-se na TABELA 1.

TABELA 1 – Sistemas enzimáticos investigados para herança em *G. americana*.

Sistemas enzimáticos (Abreviações) Número E.C.	Locos detectados	Número de alelos detectados/loco
Fosfoglucomutase (PGM) E.C. 5.4.2.2	1	1
6-Fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) E.C. 1.1.1.44	1	3
Fosfogluose isomerase (PGI) E.C. 5.3.1.9	1	1
	2	2
Malato desidrogenase (MDH) E.C. 1.1.1.37	1	2
	2	2
	3	1
Peroxidase (PER) E.C. 1.11.1.7	1	1

2.3 Análise de Segregação

Não foram realizados cruzamentos controlados para o estudo da herança isoenzimática em *G. americana*. Adotou-se o método descrito por Gillet & Hattemer (1989) que compara o genótipo de árvore materna com a segregação de suas progênies de polinização aberta. As seguintes condições devem ser satisfeitas: a) toda progênie de uma árvore materna A_iA_i deve possuir o alelo A_i da árvore mãe, e

b) em casos de uma árvore mãe heterozigota (ex. A_iA_j , $i \neq j$): i) cada indivíduo de uma progênie deve possuir um dos alelos da árvore materna, A_i ou A_j ; ii) 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 iii) o número de progênies heterozigotas A_iA_k (N_{ik}) deve ser igual ao número de progênies heterozigotas A_jA_k (N_{jk}), $N_{ik} = N_{jk}$, com $k \neq i, j$.

A análise genética foi realizada da seguinte forma: os fenótipos observados em cada progênie das árvores maternas heterozigotas foram comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1. A hipótese foi aceita ou descartada com base em um teste G padrão. Posteriormente, todos os testes G foram somados e um teste G total para a segregação 1:1 foi obtido ($\sum G_{Hipótes1:1}$). Simultaneamente, os fenótipos observados, de progênies de árvores heterozigotas do mesmo genótipo materno, foram somados e um teste G agrupado foi obtido ($G_{1:1Agrupado}$). A hipótese nula desse teste é a de igual proporção dos tipos de gametas na progênie produzida por diferentes árvores maternas de mesmo genótipo heterozigoto. A seguir, testou-se a hipótese de homogeneidade 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 ($\sum G_{Hipótes1:1}$). Esses testes são aditivos de forma que $\sum G_{Hipótes1:1} = \sum G_{Heterogeneidade} + G_{1:1Agrupado}$, com n , $n-1$ e 1 grau de liberdade, respectivamente (Souza *et al.*, 2002). Se o teste de heterogeneidade era significativo, progênies de árvores heterozigotas, que apresentaram desvio da segregação 1:1, foram excluídas do conjunto de dados e as análises foram repetidas. No presente estudo, os locos e os alelos foram identificados por números, em ordem decrescente de migração do anodo para o catodo.

2.4 Análise de Desequilíbrio de Ligação

Como existem indícios de endogamia na população de *G. americana* aqui estudada (Sebbenn *et al.*, 1998), o teste de desequilíbrio de ligação foi realizado com base na medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (Δ_{ij} , Weir, 1979), usando o programa POPGENE versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). A medida de desequilíbrio de ligação de Burrows é apropriada para situações onde a união de gametas não ocorreu de forma aleatória e a identificação dos genótipos é incompleta

(Weir, 1979; Weir & Cockerham, 1979). A hipótese $H_0 : \Delta_{ij} = 0$ foi testada com o teste de qui-quadrado (χ^2) proposto por Weir (1979).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Padrões Isoenzimáticos

Os sistemas PGM e PRX expressaram somente uma simples banda monomórfica nos géis, sugerindo a existência de apenas um loco com um alelo fixado, assim não foi possível determinar seus padrões de herança e desequilíbrio de ligação. A seguir são descritos os padrões de herança, segregação e desequilíbrio de ligação das isoenzimas polimórficas (PGI, MDH e 6PGDH) detectadas em *G. americana*.

Fosfoglucoase Isomerase (PGI)

O sistema PGI apresentou duas zonas de atividades (FIGURA 1). A zona de migração mais rápida apresentou uma só banda em todos géis, nas condições de laboratório usadas, e foi interpretada como um loco monomórfico (*Pgi-1*) com um alelo fixado. A segunda zona de atividade (*Pgi-2*) apresentou polimorfismo, segregando dois alelos. A observação do fenótipo de indivíduos heterozigotos indicou tratar-se de uma enzima dimérica. No sistema PGI, duas zonas de atividade têm sido observadas em diversos estudos com espécies arbóreas (King & Dancik, 1983; Lewandowski *et al.*, 1992; Wang & Lin, 1998; Lewandowski, 2000; Pastorino & Gallo, 2001; Hussendörfer *et al.*, 1995).

Malato Desidrogenase (MDH)

O sistema MDH apresentou três zonas de atividades. As duas zonas de migração mais rápidas (*Mdh-1* e *Mdh-2*) eram polimórficas e segregavam dois alelos. A zona mais lenta era monomórfica (*Mdh-3*). O fenótipo de árvores heterozigotas apresentava três bandas, sugerindo que a enzima era dimérica (FIGURA 1).

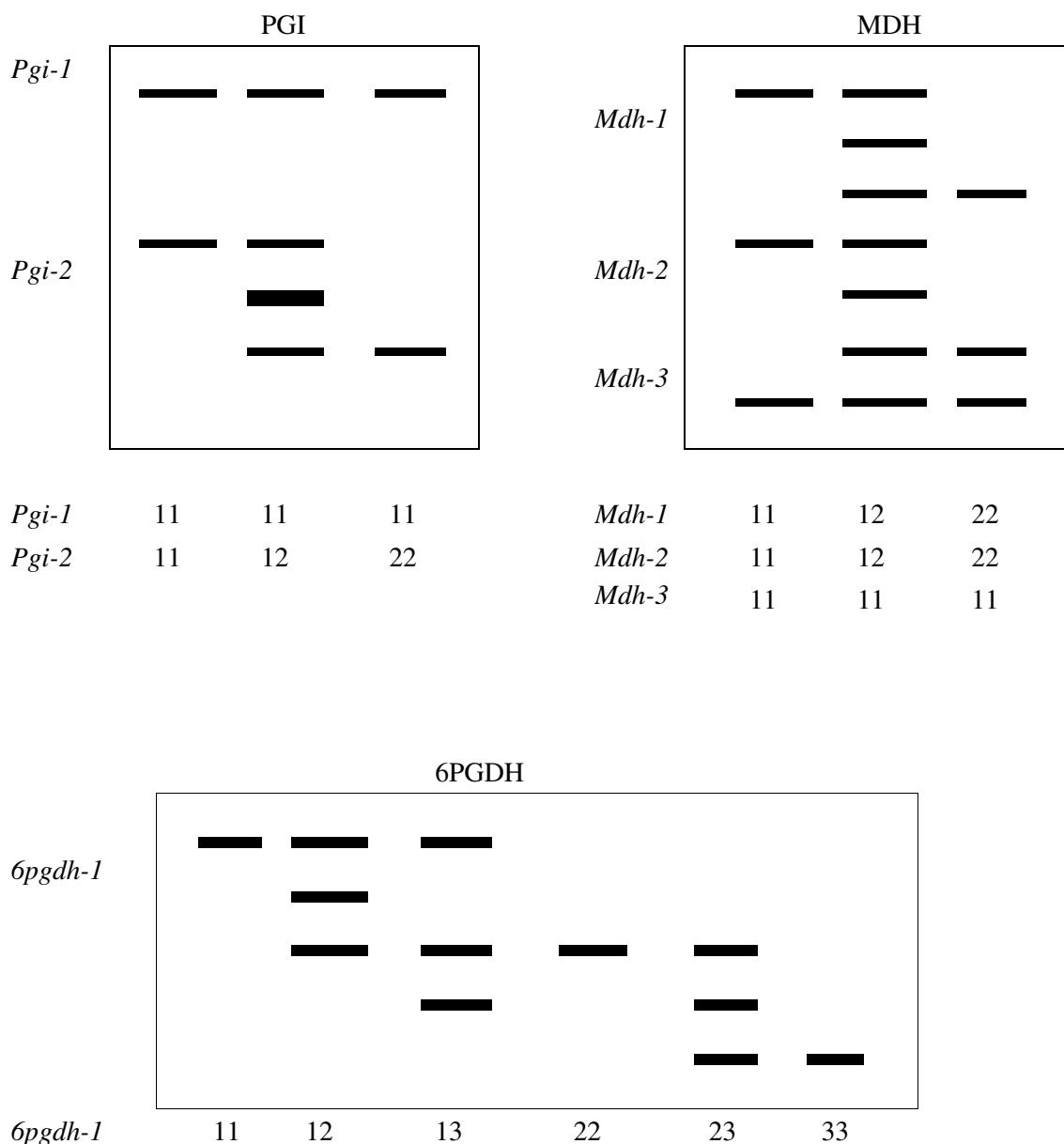


FIGURA 1 – Representação esquemática dos fenótipos observados nos zimogramas de *G. americana* nos sistemas PGI, MDH e 6PGDH, juntamente com seus respectivos genótipos.

Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH)

O sistema 6PGDH apresentou apenas uma zona de atividade, denominada loco *6Pgdh-1* e interpretado como um loco monomérico, segregando três alelos (FIGURA 1). Um loco no sistema 6PGDH também foi observado em *P. taeda* (Adams & Joly, 1980), embora outros estudos tenham detectado duas zonas de atividade nessa enzima (Konnert *et al.*, 2001;

Sousa *et al.*, 2002; Zhelev *et al.*, 2002). Em *Pinus massoniana* Lamb., Huang *et al.* (1994) observaram padrão fenotípico de indivíduos heterozigotos típicos de enzima monomérica. Porém, em espécies como *Cunninghamia lanceolata* Hook. (Müller-Starck & Liu, 1988), *Thuja occidentalis* L. (Perry & Knowles, 1989) e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (Sousa *et al.*, 2002), o heterozigoto tem apresentado fenótipo de enzima dimérica.

3.2 Padrões de Segregação

Não foram detectados indícios de heterogeneidade de segregação entre progênies de árvores heterozigotas de mesmo genótipo materno para os locos avaliados. O teste G de heterogeneidade ($\sum G_{Heterogeneidade}$) não detectou diferenças significativas para os locos *Pgi-2*, *Mdh-2* e *6pgdh-1*, indicando que a segregação é homogênea em progênies de diferentes árvores de mesmo genótipo materno (TABELA 3). O loco *Pgi-2* apresentou desvio significativo da hipótese de segregação 1:1, no teste G total ($\sum G_{Hipótese1:1}$) e agrupado ($G_{1:1Agrupado}$), mas ajuste quando a progênie da única árvore apresentando desvios significativos de segregação foi excluída da análise (TABELA 3).

A análise da progênie da única árvore heterozigota detectada no loco *Mdh-1* não revelou desvios da segregação esperada 1:1. Contudo, é desejável que esse loco tenha sua herança estudada com base em um número maior de progênies de árvores heterozigóticas ou com base em um número grande de descendentes (150 indivíduos) da referida árvore, para obter-se uma conclusão mais consistente. Nos locos *Mdh-2* e *6pgdh-1*, foram detectados desvios significativos da razão esperada de segregação 1:1

nos testes G total ($\sum G_{Hipótese1:1}$) e agrupado ($G_{1:1Agrupado}$), devido ao excesso de homozigotos, como pode ser observado pela relação $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$ (TABELA 3). No entanto, quando progênies de árvores heterozigóticas, apresentando desvios significativos da razão de segregação 1:1 (TABELA 2), foram excluídas da análise, o loco *6pgdh-1* ajustou-se à hipótese de segregação 1:1, no teste G total, mas rejeitou a hipótese no teste agrupado. Assim, admite-se a possibilidade de que ambos os locos *Mdh-2* e *6pgdh-1* apresentam desvios da razão de segregação mendeliana 1:1. Desvios de segregação têm sido observados em diversos estudos da herança isoenzimática de espécies arbóreas (Adams & Joly, 1980; Cheliak & Pitel, 1985; Konnert *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2002). As causas podem ser várias, como as isoenzimas estarem sob controle de mais de um loco, seleção, distorções meióticas, interações interalélicas e deriva genética (Adams & Joly, 1980; Cheliak & Pitel, 1985). Outra causa pode ser a presença de alelos nulos (Gillet & Hattemer, 1989). Os desvios observados podem incluir uma ou mais dessas causas, mas é difícil determinar qual é a causa real. Conclusões mais consistentes podem ser obtidas usando maior número de árvores heterozigotas ou maiores tamanhos de progênies (50 indivíduos por progênies).

TABELA 2 – Árvores de *G. americana* mostrando desvios significativos no teste G para a razão de segregação meiótica 1:1, nos locos isoenzimáticos *Pgi-2*, *Mdh-2* e *6pgdh-1*.

Genótipo materno		N_{ij}	$N_{ii} + N_{jj}$	G $GL = 1$	Genótipo materno		N_{ij}	$N_{ii} + N_{jj}$	G $GL = 1$
Num.	Tipo				Num.	Tipo			
<i>Pgi-2</i>					<i>6pgdh-1</i>				
3	A_1A_2	3	16	8,89*	3	A_1A_2	5	14	4,26*
<i>Mdh-2</i>					9	A_1A_2	2	17	11,84**
3	A_1A_2	2	18	12,80**	10	A_1A_2	3	14	7,12**
14	A_1A_2	5	15	5,00*	14	A_1A_2	1	12	9,31**
26	A_1A_2	2	17	11,84**	19	A_1A_2	2	9	4,45*
					26	A_1A_2	4	14	5,56*

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

(*) $P < 0,050$.

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

TABELA 3 – Teste G para hipótese de segregação regular de marcadores isoenzimáticos em *G. americana*.

Loco	Genótipo materno	Número de árvores (n)	$N_{ij} : N_{ii} + N_{jj}$	$\sum G_{Hipótese:1:1}$ GL = n	$\sum G_{Heterogeneidade}$ GL = n- 1	$G_{1:1Agrupado}$ GL = 1	Árvores com desvio de segregação	
<i>Pgi-2</i>	A_1A_2	a	13	109:149	24,10*	17,88	6,23*	1
		b	12	106:133	14,34	11,28	3,05	
<i>Mdh-1</i>	A_1A_2	a	1	8:12	–	–	0,81	
<i>Mdh-2</i>	A_1A_2	a	4	9:50	33,51**	2,11	31,39**	3
<i>6pdh-1</i>	A_1A_2	a	9	31:110	54,04**	4,46	51,40**	6
		b	3	14:30	6,66	0,70	5,95*	

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

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

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

(*) $P < 0,050$.

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

3.3 Desequilíbrio de Ligação

Não foram detectados indícios de desequilíbrio de ligação para nenhum dos pares de locos avaliados em *G. americana* (TABELA 4). As estimativas da medida composta de desequilíbrio de ligação ($\hat{\Delta}_{ij}$) foi próxima a zero e os valores do teste de qui-quadrado não foram significativos para nenhuma das seis possíveis combinações entre pares de locos. Portanto, esses locos devem estar em equilíbrio de ligação

e os alelos de diferentes locos segregam de forma independente. Em espécies de polinização cruzada, o desequilíbrio de ligação é menos provável de ocorrer do que em espécies de autofecundação devido à fecundação cruzada exercer um papel análogo ao da recombinação, resultando em ligações menos efetivas (Hastings, 1990). Os resultados obtidos pelo teste de equilíbrio gamético indicam que os locos revelados podem ser usados em estudos do sistema de reprodução, análise de paternidade, diversidade e estrutura genética de *G. americana*, sem restrições.

TABELA 4 – Valores da medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows ($\hat{\Delta}_{ij}$), resultados do teste de qui-quadrado (χ^2) e probabilidade associada (P) para pares de locos isoenzimáticos em *G. americana*.

Locos	$\hat{\Delta}_{ij}$	χ^2	P
<i>6pgdh-1:Pgi-2</i>	0,004	0,04	0,838
<i>6pgdh-1:Mdh-1</i>	-0,007	1,75	0,185
<i>6pgdh-1:Mdh-2</i>	0,001	0,33	0,565
<i>Pgi-2:Mdh-1</i>	0,003	0,31	0,576
<i>Pgi-2:Mdh-2</i>	-0,004	0,38	0,539
<i>Mdh-1:Mdh-2</i>	0,000	0,01	0,933

4 CONCLUSÕES

Os locos *Mdh-2* e *6pgdh-1* não segregaram perfeitamente de acordo com a razão esperada 1:1 em *G. americana*.

Os locos *Pgi-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2* e *6pgdh-1* não estão ligados entre si e podem ser usados conjuntamente em análises genéticas que requeiram locos em equilíbrio de ligação, como estudos do sistema de reprodução e análise de paternidade.

5 AGRADECIMENTO

O autor agradece à Assistente de Pesquisa Científica e Tecnológica Yara Cristina Marcondes pela revisão gramatical do artigo.

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 microorganismo. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 574 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira. Colombo: EMBRAPA/CNPQ; Brasília, DF: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 640 p.

CHELIAK, W. M.; PITEL, J. A. Inheritance and linkage of allozymes in *Larix laricina*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 34, p. 142-148, 1985.

GILLET, E.; HATTEMER, H. H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, Oxford, v. 63, p. 135-141, 1989.

HASTINGS, A. The interaction between selection and linkage in plant populations. In: BROWN, A. H. D. *et al.* (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetics resources**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 33-41.

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.

HUSSENDÖRFER, E.; KONNERT, M.; BERGMANN, F. Inheritance and linkage of isozymes variants of Silver Fir (*Abies alba* Mill.). **Forest Genetics**, Zvolen, v. 2, p. 29-40, 1995.

KING, J. N.; DANCİK, B. P. Inheritance and linkage of isozymes in white spruce (*Picea glauca*). **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 25, p. 430-436, 1983.

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.; BURCZYK, J.; MEJNARTOWICZ, L. Inheritance and linkage of some allozymes in *Taxus baccata* L. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 41, p. 342-347, 1992.

LEWANDOWSKI, A. Inheritance and linkage of some allozymes in *Pinus armandii* Franch. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 49, p. 79-82, 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.

MÜLLER-STARCK, G.; LIU, Y.Q. Genetics of *Cunninghamia lanceolata* Hook. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 37, p. 236-243, 1988.

MUONA, O.; YAZDANI, R.; LINDQVIST, G. Analysis of linkage in *Picea abies*. **Hereditas**, Lund, v. 106, p. 31-36, 1987.

PAPAGEORGIOUS, A. C. *et al.* Genetic analysis of isoenzyme variation in Mediterranean Cypress (*Cupressus sempervirens* L.). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 42, p. 109-111, 1993.

PASTORINO, M. J.; GALLO, L. A. Inheritance of isozyme variants in *Astrocedrus chilensis* (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.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 53, p. 15-30, 1998.

SOUSA, V. A.; HATTEMER, H. H.; ROBINSON, I. P. Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 51, p. 191-196, 2002.

THORSÉN, J. *et al.* Inheritance and linkage of isozyme loci in the Basket Willow (*Salix viminalis* L.). **The Journal of Heredity**, Cary, v. 88, p. 144-150, 1997.

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. 235-354, 1979.

_____.; COCKERHAM, C. C. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. **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.

ZHELEV, P.; GÖMÖRY, D.; PAULE, L. Inheritance and linkage of allozymes in a Balkan endemic, *Pinus peuce* Griseb. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 93, p. 60-62, 2002.