

HERANÇA E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM LOCOS ISOENZIMÁTICOS DE

Peltophorum dubium

Edson Seizo Mori¹, Alexandre Magno Sebbenn², José Fernando de Sousa Lima³, Raymond Paul Guries⁴

RESUMO

Estudos foram realizados sobre a herança e o desequilíbrio de ligação em locos isoenzimáticos de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., vulgarmente conhecida como canafístula ou angico-amarelo, uma espécie arbórea de ampla distribuição nas florestas tropicais e subtropicais da América do Sul. Pouco se conhece sobre a diversidade genética e sistema de reprodução da espécie, aspectos estes fundamentais para a conservação genética, bem como para o seu melhoramento genético. A herança e a ligação de seis isoenzimas codificando nove locos são reportadas em *P. dubium* usando progênies de polinização aberta de árvores maternas heterozigotas. Em geral, a razão de segregação conformou com a esperada em caracteres sob controle de herança mendeliana. Desvio da razão de segregação 1:1 foi observado apenas para o loco *Pgm-2*. A ligação entre pares de locos foi inferida usando a medida composta de desequilíbrio de ligação de Borrows. Desvios de desequilíbrio de ligação foram observados entre sete pares de locos (α -*Est-2:Ugpp-2*, α -*Est-3:\alpha*-*Est-4*, α -*Est-3:Ugpp-2*, *6pgdh-2:Aco-1*, *6pgdh-2:Pgm-1*, *Aco-1:Pgm-1* e *Pgm-1:Pgm-2*), dois dos quais estavam ligados (α -*Est-3:\alpha*-*Est-4*, *6pgdh-2:Pgm-1*). A herança mendeliana simples foi confirmada para a maioria dos locos avaliados. Contudo, alguns pares desses locos parecem não estar segregando de forma independente, de forma que alguns devem ser excluídos de análises genéticas que requeram a pressuposição de equilíbrio de ligação.

Palavras-chave: Canafístula, espécies arbóreas tropicais, segregação.

¹Engenheiro Florestal, Dsc., Professor Titular do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Unesp/FCA, Campus Lageado, Botucatu (SP), Brasil. esmori@fca.unesp.br

²Engenheiro Florestal, Dsc., Pesquisador do Instituto Florestal de São Paulo, Estação Experimental de Tupi, Piracicaba (SP), Brasil. alexandresebbenn@yahoo.com.br

³Biólogo, Dsc., Professor do Curso de Engenharia Agrônômica, Universidade Estadual do Tocantins, Palmas (TO), Brasil. jfslima2@gmail.com

⁴Forestry, Phd, Professor Titular do Department of Forest and Wildlife Ecology, University of Wisconsin, Madison, (EUA), United States of America. rpguries@wisc.edu

INHERITANCE AND LINKAGE DESEQUILIBRIUM IN ISOZYME LOCI OF *Peltophorum dubium*

ABSTRACT

Studies were conducted on the inheritance and linkage disequilibrium in isozyme loci detected in *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., commonly known as canafístula or mimosa-yellow, an arboreal species widely distributed in tropical and subtropical forests of South America. Little is known about the genetic diversity and reproduction system of the kind which are essential aspects for genetic conservation, as well as for genetical enhancement. Inheritance and linkage of six allozymes, encoded by nine variable enzyme loci, are reported in *P. dubium* (Spreng.) Taub. using open-pollinated progenies from heterozygous mother trees. In general, segregation ratios conformed to those expected for traits under single Mendelian control. Deviation from 1:1 segregation ratio was observed at *Pgm-2* locus. Linkage between pairs of loci was studied using the Burrows composite measure of linkage disequilibrium. Linkage disequilibrium was observed between seven pairs of loci (α -*Est-2:Ugpp-2*, α -*Est-3:\alpha*-*Est-4*, α -*Est-3:Ugpp-2*, *6pgdh-2:Aco-1*, *6pgdh-2:Pgm-1*, *Aco-1:Pgm-1*, and *Pgm-1:Pgm-2*), two of them were highly linked (α -*Est-3:\alpha*-*Est-4* and *6pgdh-2:Pgm-1*). The simple mendelian inheritance was confirmed for most of the evaluated loci in *P. dubium*. However, some pairs of these loci do not appear to be segregating independently, so that some may be deleted genetic analysis requiring presupposition binding equilibrium.

Key words: Canafístula, tropical tree species, segregation.

INTRODUÇÃO

A conservação genética é espécie-específica devido à estrutura genética de cada espécie ser o resultado de um longo e próprio histórico evolutivo. Por isso, é necessária a avaliação da estrutura genética de cada organismo que se pretenda a efetiva conservação. Essa estrutura de uma espécie é, em parte, determinada pelo seu sistema de reprodução, considerando que este é o fator que determina como os genótipos de uma população são recombinados para formar a população descendente (Allard, 1971). O uso de marcadores genéticos como isoenzimas tem sido uma valiosa ferramenta na avaliação do sistema de reprodução, diversidade e estrutura genética. Contudo, para que marcadores isoenzimáticos possam ser utilizados como marcadores genéticos é necessário o estudo *a priori* de sua herança na população (Furnier *et al.*, 1986; Gillet e Hattemer, 1989; Lewandowski, 2000; Borém e Caixeta, 2006; Mori *et al.*, 2013), bem como de sua associação entre locos. Muitas variações observadas em marcadores genéticos podem não ter herança mendeliana ou podem estar ligadas com variações observadas em outros locos, de forma que médias ou estimativas de certos parâmetros genéticos não possam ser feitas devido a vícios introduzidos nas estimativas.

Peltophorum dubium (Spreng.) Taub., conhecida como canafístula ou angico-amarelo, é uma espécie arbórea de ampla distribuição nas florestas tropicais e subtropicais da América do Sul, muito usada para fins ornamentais, medicinais, obtenção de madeira serrada e roliça, energia (carvão) e para reflorestamentos

ambientais (Carvalho, 1994). Apesar de sua grande utilidade, a espécie está na lista das espécies arbóreas em risco de extinção (FAO, 1996; Mori *et al.*, 2013), apresentando populações pequenas e isoladas com significativa redução na diversidade genética (Sebbenn *et al.*, 2011; Feres *et al.*, 2012).

Pouco se conhece sobre a diversidade genética e o sistema de reprodução de *Peltophorum dubium*, aspectos estes fundamentais para a conservação, bem como para o melhoramento genético da espécie (Mori *et al.*, 2013). Esses mesmos autores afirmam que não existe nenhum estudo genético sobre o seu sistema de reprodução e nada se sabe sobre a taxa de cruzamento, cruzamentos correlacionados, coancestria e tamanho efetivo dentro de progênies de polinização aberta em populações de *P. dubium*. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar a herança e o desequilíbrio de ligação de locos isoenzimáticos da espécie *Peltophorum dubium* para fins de conservação, utilizando estruturas de progênies de polinização aberta, agrupadas por árvore materna heterozigota.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Sementes oriundas de polinização aberta foram coletadas de duas populações naturais de *Peltophorum dubium* nas Regiões de Assis e Presidente Prudente (Parque Estadual do Morro do Diabo), estado de São Paulo. As populações de Assis e Presidente Prudente estão localizadas, respectivamente, nas coordenadas 22°35'S e 50°25'W e 22°31'S e 52°10'W, em altitudes que variam entre 520 m a 580 m. Na população de

Assis, foram coletadas sementes em sete a 11 árvores em oito subpopulações. Na população de Presidente Prudente, foram coletadas sementes entre cinco a onze árvores em cinco subpopulações. O total de progênies avaliadas foi de 105. De cada árvore, foram analisadas, por eletroforese de isoenzimas, apenas cinco sementes. O genótipo das árvores maternas foi determinado a partir da composição genotípica de suas progênies amostradas, por meio do método de máxima verossimilhança de Brown e Allard (1970), implementado no programa MLTR de Ritland (1997).

Extração das enzimas e eletroforese

Preliminarmente, foram testados 18 sistemas isoenzimáticos, os quais estão descritos na tabela 1 (ACP, ACO, ADH, AAT, UGPP, 6PG, MDH, PGM, PGI, SKDH, GDH, IDH, ME, α EST, β EST, G2D, LAP e CAT). Desses, foram escolhidos os seis sistemas que apresentaram zonas de variação nos géis com padrão que permitisse a interpretação dos zimogramas (Tabela 1). As isoenzimas foram extraídas de plântulas recém germinadas com água deionizada. A maceração foi realizada a temperatura aproximada de 5°C para evitar a desnaturação das isoenzimas. Foram testados diversos tecidos de plantas com os melhores resultados em plântulas inteiras com três dias de idade.

Foi utilizada a eletroforese horizontal em gel de amido a 12%, a qual foi realizada em câmara fria a temperatura entre 1°C a 5°C. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi modificado a partir das metodologias de Clayton e Tretiak (1972), Soltis *et al.* (1983), Cheliak e

Pitel (1984) e Yamada e Guries (1989). Os protocolos utilizados para a revelação das isoenzimas foram baseados em Yamada e Guries (1989), Stuber *et al.* (1988), Soltis *et al.* (1983) e são mostrados na tabela 2.

Tabela 1: Sistemas enzimáticos em *Peltophorum dubium*.

Sistemas enzimáticos (Abreviações) Número E.C.	Locos detectados	Número de alelos detectados
α -Esterase (α EST) EC 3.1.1.1	A	2
	B	3
	C	2
Isocitrato desidrogenase (IDH) EC 1.1.1.42	A	3
6-Fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) EC 1.1.1.44	A	-
	B	3
Uridina-5'- difosfoglucose pirofosforilase (UGPP) EC 2.7.7.9.	A	-
	B	3
Acomitase (ACO) E.C. 4.2.1.3	A	2
	A	3
Fosfoglucomutase (PGM) EC 5.4.2.2	A	3
	B	3

Análise de segregação

Neste estudo, não foram feitos cruzamentos controlados para avaliar a herança em locos isoenzimáticos de *Peltophorum dubium* e, por isso, adotou-se o método desenvolvido por Gillet e Hattemer (1989). Esse método compara o genótipo da árvore materna com a segregação de suas progênies de polinização aberta e as seguintes condições devem ser satisfeitas: a) Toda progênie de uma árvore materna homocigota A_iA_i (ou A_jA_j , ou A_kA_k) deve possuir o alelo A_i (ou A_j , ou A_k) da árvore mãe; b) Em casos de uma árvore mãe

Tabela 2: Composição dos sistemas tampão gel/eletrodo testados para eletroforese.

Sistema	Tampão do Gel	Tampão do Eletrodo	Condições da Corrida
RW	Tris (0,03M).....36,33g Ác. Cítrico (0,0038M).....9,60g Água (q.s.q.).....1l pH.....8,5	Hidróxido de lítio (0,06M).....2,52g Ác. Bórico (0,3M).....1,86g Água.....1l pH.....8,6	
AC	Ác. Cítrico (0,04M).....8,40g Titular com N-(3-aminopropil) morfolina até o pH desejado. Água (q.s.q.).....1l pH.....7,1 Diluir a 1:20 para uso.	Ác. Cítrico (0,04M).....8,40g Titular com N-(3-minopropil) morfolina até o pH desejado. Água (q.s.q.).....1l pH.....6,1	9 W/5h ou 6,6 V/3 cm de gel/3h ou 9 mA/cm de gel/5h
TC	Diluição para 3,5% do tampão do eletrodo	Tris (0,223M).....27,01g Ác. Cítrico(0,086M)..16,52g Água (q.s.q.)1l pH7,5	20 V/cm de gel/5 h

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 . ($i \neq j$); o número de progênies heterozigotas A_iA_j (N_{ij}) é esperado por ser igual a soma das progênies homozigotas A_iA_i (N_{ii}) e A_jA_j (N_{jj}), $N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$; iii) o número de progênies heterozigotas A_iA_k (N_{ik}) é esperado ser igual ao número de progênies heterozigotas A_jA_k (N_{jk}), $N_{ik} = N_{jk}$, com $k \neq i, j$.

Os fenótipos observados em cada progênie de árvores maternas heterozigotas foram, inicialmente, comparados com o esperado pela hipótese de segregação 1:1. Devido ao pequeno tamanho amostral de cada progênie (cinco plantas por progênie), o teste de segregação foi feito agrupando-se progênies filhas de árvores heterozigotas de mesmo genótipo materno, usando um teste de qui-quadrado ($X^2_{1:1Agrupado}$), padrão, com um grau de liberdade. Os locos foram designados com letras e números e os alelos com

números, em ordem decrescente de migração do ânodo para o catodo.

Desequilíbrio de ligação

O teste de equilíbrio de ligação foi analisado usando a medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows, Δ_{ij} (Weir, 1979). Essa medida é apropriada para situações onde existem indícios de que a união de gametas não ocorreu de forma aleatória e a identificação dos genótipos é incompleta (Weir e Cockerham, 1979). A hipótese nula de equilíbrio de ligação ($\Delta_{ij} = 0$) foi testada por meio do teste de qui-quadrado (X^2) descrito em Weir (1979). Essas estimativas foram obtidas com auxílio do programa Popgene versão 1.32 (Yeh et al., 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Padrões das isoenzimas

Todos os seis sistemas isoenzimáticos analisados em *Peltophorum dubium* apresentaram, pelo menos, uma zona com variação. A descrição

dos padrões de segregação de cada zona nesses sistemas é dada a seguir.

Alfa-Esterase (α EST).

O sistema α EST apresentou quatro zonas de atividades enzimáticas (Figura 1). A zona de migração mais rápida (α Est-1) apresentou-se invariável e, assim, foi descartada da análise genética. As outras três apresentaram variação típica de enzimas monoméricas com indivíduos heterozigotos apresentando duas bandas. As zonas dois (α Est-2) e três (α Est-4) segregaram dois alelos cada e a zona quatro (α Est-4) segregou três alelos.

Isocitrato Desidrogenase (IDH)

O sistema IDH apresentou apenas uma zona de atividade (*Idh-1*) (Figura 1). Esta zona foi interpretada como um loco de expressão dimérica, segregando três alelos. Uma zona de atividade na enzima IDH também foi descrita em *Pinus taeda* L. (Adams e Joly, 1980), *Pseudotsuga menziesii* var *menziesii* (Mirb.) Franco (El-Kassaby et al., 1982), *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière (Fallour et al., 2001), *Cecropia pachystachya* Trécul (Ribas et al., 2004) e, mais recentemente, *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. (Mori et al., 2013). Porém, nesse último trabalho, os autores apresentaram resultados da análise de sistema de reprodução e parâmetros de endogamia e coancestria de quatro populações de *P. dubium* avaliada em sete locos isoenzimáticos.

Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH)

O sistema 6PGDH apresentou duas zonas de atividades (Figura 1). A zona de migração mais rápida (*6pgdh-1*) mostrou-se invariável e, por isso,

foi descartada da análise. A segunda zona (*6pgdh-2*) apresentou variação e foi interpretada como um loco polimórfico segregando três alelos. A observação de fenótipos de indivíduos heterozigotos indica que este loco é controlado por uma enzima de expressão dimérica. Duas zonas de atividade na enzima 6PGDH também têm sido observadas em outras espécies arbóreas (Ying e Morgenstern, 1990; Konnet et al., 2001; Sousa et al., 2002; Zhelev et al., 2002).

Uridina-5'-difosfoglucose pirofosforilase (UGPP)

O sistema UGPP apresentou duas zonas de atividades enzimáticas (Figura 1). A primeira zona (*Ugpp-1*) não apresentou variação e foi descartada. A segunda zona, *Ugpp-2*, apresentou polimorfismo e foi interpretada como um loco monomérico segregando três alelos. Esta enzima tem sido muito pouco estudada em tecidos de espécies arbóreas.

Aconitase (ACO)

O sistema ACO apresentou uma simples zona de atividade (*Aco-1*), interpretada como locos polimórficos, controlado por uma enzima de expressão monomérica segregando três alelos (Figura 1). Em *Pseudotsuga menziesii* var *menziesii*, El-Kassaby et al. (1982) relataram duas zonas de atividades nessa enzima, sendo uma polimórfica e segregando dois alelos.

Fosfoglucomutase (PGM)

O sistema PGM apresentou três zonas de atividades enzimáticas (Figura 1). As duas zonas de migração mais anódica (*Pgm-1* e *Pgm-2*) foram polimórficas e segregaram três e dois alelos cada.

Tabela 3: Teste para hipótese de segregação regular (χ^2) em marcadores isoenzimáticos de *Peltophorum dubium*.

Loco	Genótipo materno	Caso	Número de árvores (n)	$N_{ij} = N_{ii} + N_{jj}$	$N_{ik} : N_{jk}$ $N_{ik} = N_{jk}$	χ^2 1:1 Agrupado $GL=1$
<i>αEst-2</i>	A_1A_2	a)	5	9:14	---	1,09ns
<i>αEst-3</i>	A_2A_3	a)	48	79:161	0:0	28,08** ^G
		b)	35	74:101	0:0	4,17ns ^G
<i>αEst-4</i>	A_1A_2	a)	36	89:91	---	0,02ns
<i>Idh-1</i>	A_1A_2	a)	22	38:51	---	1,90ns
	A_2A_3	a)	3	7:8	0:0	0,07ns ^G
<i>βpgdh-2</i>	A_1A_2	a)	22	97:83	---	1,09ns
	A_1A_3	a)	3	7:5	2:0	2,33ns ^G
<i>Aco-1</i>	A_1A_2	a)	11	33:20	---	3,19ns
<i>Ugpp-2</i>	A_2A_3	a)	21	50:53	0:0	0,09ns ^G
<i>Pgm-1</i>	A_2A_3	a)	31	76:81	1:1	0,16ns ^G
<i>Pgm-2</i>	A_1A_2	a)	33	119:47	---	31,23**
		b)	27	89:46	---	13,70**

N_{ij} e $N_{ii}+N_{jj}$, são os números observados de 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. **: $P < 0,010$; ns = não significativo. G: $GL=2$.

A terceira zona, denominada de *Pgm-3*, não mostrou variação e, por isso, foi descartada da análise.

Padrões de Segregação

Os resultados evidenciaram desvios da segregação em dois (*α Est-2* e *Pgm-2*) dos nove locos avaliados em *Peltophorum dubium* (Tabela 3). O loco *α Est-2* apresentou maior desvio da razão esperada de segregação 1:1 para progênies agrupadas de 48 árvores heterozigotas do tipo A_2A_3 . Contudo, quando progênies de oito árvores que apresentaram desvio da segregação esperada individual 1:1 foram excluídas da análise, o teste de qui-quadrado agrupado não rejeitou a hipótese de segregação mendeliana simples. Por outro lado, o loco *Pgm-2* rejeitou a hipótese de segregação esperada 1:1, tanto na análise que incluía progênies de árvores heterozigotas mostrando desvios individuais de segregação, como na

análise que excluía essas. Assim, rejeita-se a hipótese de que o loco *Pgm-2* esteja seguindo os padrões mendelianos.

Os demais locos não apresentaram qualquer indício de desvios de segregação mendeliana e podem ser utilizados, aparentemente, sem restrição, em subseqüentes estudos genéticos populacionais. Desvios de segregação em locos isoenzimáticos de espécies arbóreas são reportados em diversos estudos (Adams e Joly, 1980; Cheliak e Pitel, 1985; Perry e Knowles, 1989; Ying e Morgenstern, 1990; Morgante et al., 1993; Sousa et al., 2002; Botrel et al., 2006; Martins et al., 2007; Mori et al., 2013). As causas de desvios de segregação podem ser diversas, como erros na interpretação dos géis, isoenzimas sob o controle de mais de um loco ou, não estar sob controle genético, seleção, distorções meióticas, interações interalélicas, acaso (Adams e

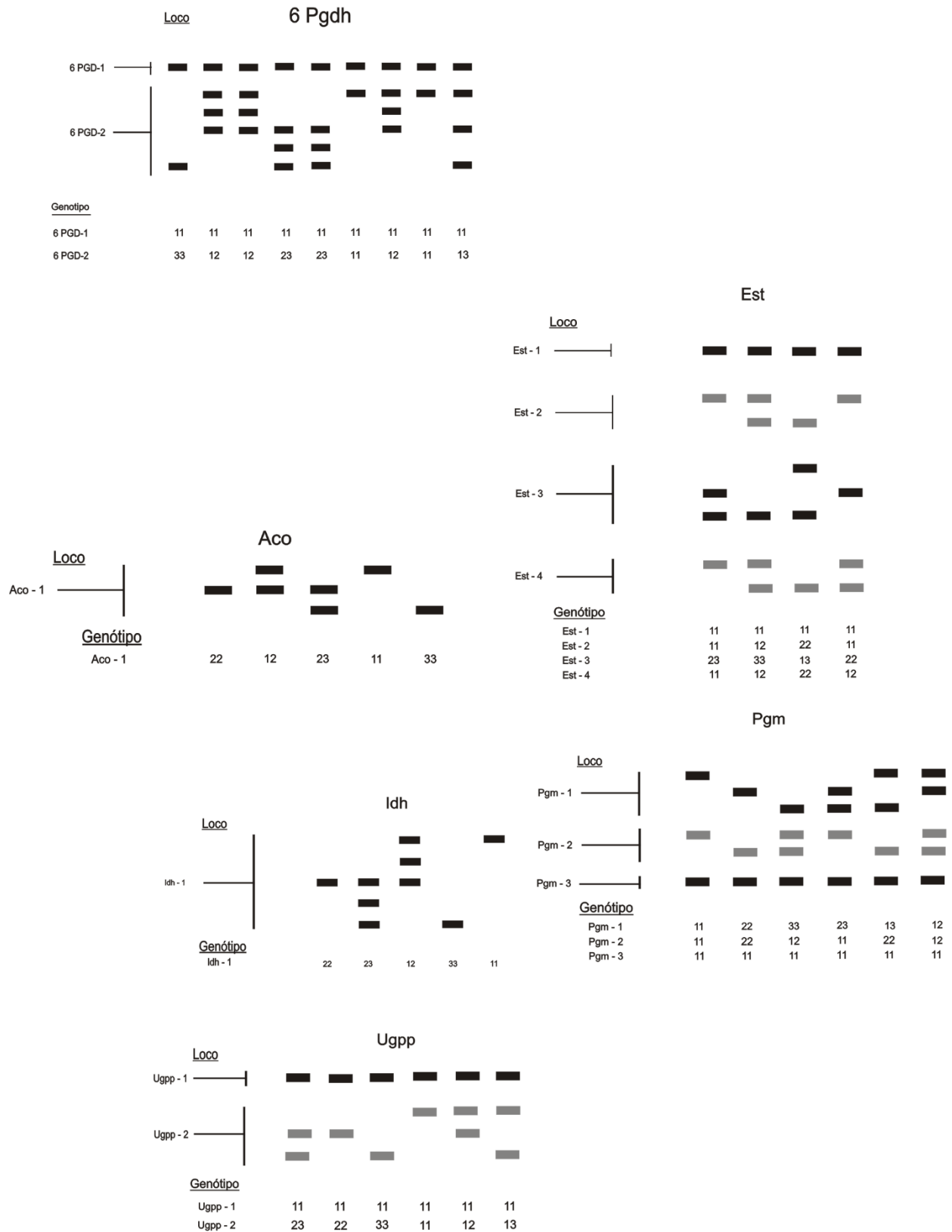


Figura 1: Representação esquemática dos fenótipos observados nos zimogramas de *Peltophorum dubium* nos sistemas α EST, IDH, 6PGDH, UGPP, ACO e PGM, juntamente com seus respectivos genótipos.

Joly, 1980; Cheliak e Pitel, 1985; Botrel et al., 2006) e ligação dos marcadores a alelos deletérios (Strauss e Conkle, 1986; Borém e Caixeta, 2006).

Desequilíbrio de ligação

Foram detectados indícios de desequilíbrio de ligação em locos de *Peltophorum dubium* (Tabela 4). Dos 36 pares de combinações de dois locos formados dos nove locos polimórficos analisados, sete pares apresentaram valores significativos de desequilíbrio de ligação: $\alpha Est-2:Ugpp-2$, $\alpha Est-2:\alpha Est-4$, $\alpha Est-3:Ugpp-2$, $6pgdh-2:Aco-1$, $6pgdh-2:Pgm-1$, $Aco-1:Pgm-1$, $Pgm-1:Pgm-2$. O maior valor de desequilíbrio detectado ocorreu entre os locos $\alpha Est-2$ e $\alpha Est-4$ ($\Delta_{ij} = 0,118$, $\chi^2 = 71,08$, $P \leq 0,0001$). As demais associações detectadas mostraram-se pouco robustas e, por isso, optou-se pela exclusão de dois locos do conjunto, $Est-4$ e $Pgm-2$. A exclusão do loco $Est-4$ quebrou a mais forte ligação detectada e a exclusão do loco $Pgm-2$ eliminou o único loco com forte desvio de segregação.

Tabela 4: Valores da medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (Δ_{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 equilíbrio de ligação em *Peltophurum dubium*.

Locos	Δ_{ij}	χ^2	P
$\alpha Est-2:Ugpp-2$	-0,014	4,68*	0,030
$\alpha Est-3:\alpha Est-4$	0,118	71,08**	0,000
$\alpha Est-3:Ugpp-2$	-0,037	5,43*	0,020
$6pgdh-2:Aco-1$	0,005	6,07*	0,014
$6pgdh-2:Pgm-1$	0,022	8,98**	0,003
$Aco-1:Pgm-1$	0,023	4,10*	0,043
$Pgm-1:Pgm-2$	0,024	5,38*	0,020

*: $P < 0,050$.

Os locos remanescentes podem ser usados em subsequentes estudos que requeiram ajuste a

suposição de equilíbrio de ligação, como análises do sistema de reprodução, cálculos de parentescos e testes de paternidade.

Os resultados obtidos ainda sugerem que existem uniões não aleatórias de gametas contribuindo para o desequilíbrio de ligação nas progênes. Vários dos fatores que contribuem para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg em nível de locos individuais também contribuem para o desequilíbrio de ligação, como, por exemplo subdivisão das populações, diferenças nas frequências alélicas entre indivíduos masculinos e femininos, seleção zigótica (Roberds e Brotschol, 1985) ou mesmo ocorrência de heterozigose elevada na população (Gois et al., 2009).

CONCLUSÃO

A herança mendeliana simples foi confirmada para a maioria dos locos avaliados em *Peltophorum dubium*. Contudo, alguns pares desses locos parecem não estar segregando de forma independente, de forma que alguns devem ser excluídos de análises genéticas que requeiram a pressuposição de equilíbrio de ligação.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao técnico de informática e aluno do curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Estadual do Tocantins, José Francisco de Sousa Ferreira, pela melhoria na qualidade da imagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, W.T.; Joly, R.J. (1980). Genetics of allozymes variants in Loblolly Pine. **The Journal of Heredity** 71: 33-40.

- Allard, R.W. (1971). **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA. 381p.
- Borém, A.; Caixeta, E.T. (2006). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 374p.
- Botrel, M.C.G.; Souza, A.M., Carvalho, D.; Pinto, S.I.C.; Moura, M.C.O.; Estopa, R.A. (2006). Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. em duas populações de mata ciliar. **Revista Árvore** 30(5):821-827.
- Brown, A.H.D.; Allard, R.W. (1970). Estimation of mating system in open-pollinated maize populations using isozymes polymorphisms. **Genetics** 66(1): 133-145.
- Carvalho, P.E.R. (1994). **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso de Madeira**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ. 640p.
- Cheliak, W.M.; Pitel, J.A. (1985). Inheritance and linkage of allozymes in *Larix laricina*. **Silvae Genetica** 34: 142-148.
- Clayton, J.W.; Tretiak, D.N. (1972). Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada** 29(8): 1169-1172. <http://dx.doi:10.1139/f72-172>
- El-Kassaby, Y.A.; Yeh, F.C.; Sziklai, O. (1982). Inheritance of allozyme variants in Coastal Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). **Canadian Journal of Genetics and Cytology** 24(3): 325-335. <http://dx.doi:10.1139/g82-034>
- Fallour, D.; Fady, B.; Lefèvre, F. (2001). Evidence of variation in segregation patterns within a *Cedrus* population. **Journal of Heredity** 92(3): 260-266.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1996). **Panel of experts on forest gene resources**. Roma: FAO. 64p.
- Feres, J.M.; Sebbenn, A.M.; Guidugli, M.C.; Mestriner, M.A.; Moraes, M.L.T.; Alzate-Marin, A.L. (2012). Mating system parameters at hierarchical levels of fruits, individuals and populations in the Brazilian insect-pollinated tropical tree, *Tabebuia roseo-alba* (Bignoniaceae). **Conservation Genetics** 13(2): 393-405. <http://dx.doi:10.1007/s10592-011-0292-z>
- Furnier, G.R.; Knowles, P.; Aleksyuk, M.A.; Dancik, B.P. (1986). Inheritance and linkage of allozymes in seed tissues of whitewbark pine. **Canadian Journal of Genetics and Cytology** 28(4): 601-604. <http://dx.doi:10.1139/g86-088>
- Gillet, E.; Hattemer, H.H. (1989). Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity** 63: 135-141. <http://dx.doi:10.1038/hdy.1989.84>
- Gois, I.B.; Silva-Mann, R.; Ferreira, R.A. (2009). Variabilidade genética em *Spondias lutea* L. em uma população do baixo São Francisco sergipano por meio de isoenzimas. **Scientia Forestalis** 37(81): 55-60.
- Konnert, M.; Ruetz, W.; Fromm, M. (2001). Genetic variation in *Acer pseudoplatanus* L. inheritance of isozymes variants. **Forest Genetics** 8(1): 25-37.
- Lewandowski, A. (2000). Inheritance and linkage of some allozymes in *Pinus armandii* Franch. **Silvae Genetica** 49(2): 79-82.

- Martins, C.C.; Bovi, M.L.A.; Mori, E.S.; Nakagawa, J. (2007) Isoenzimas na diferenciação de sementes de três espécies do gênero *Euterpe*. **Revista Árvore** 31(1): 51-57. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622007000100007>
- Morgante, M.; Vendramin, G.G.; Giannini, R. (1993). Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Pinus leucodermis* Ant. **Silvae Genetica** 42: 231-236.
- Mori, E.S.; Sebbenn, A.M.; Tambarussi, E.V.; Guries, R.P. (2013). Sistema de reprodução em populações naturais de *Peltophorum dubium*. **Scientia Forestalis** 41(99): 307-317.
- Perry, D.J.; Knowles, P. (1989). Inheritance and linkage relationships of allozymes of eastern white cedar (*Thuja occidentalis*) in northwestern Ontario. **Genome** 32(2): 245-250. <http://dx.doi.org/10.1139/g89-435>
- Ribas, L.A.; Sebbenn, A.M.; Kageyama, P.Y. (2004). Herança e desequilíbrio gamético em sete locos isoenzimáticos de *Cecropia pachystachya* Trec. **Revista do Instituto Florestal** 16(1): 21-40.
- Roberds, J.H.; Brotschol, J.V. (1985). Linkage disequilibrium among allozyme loci in natural populations of *Liriodendron tulipifera* L. **Silvae Genetica** 34: 137-141.
- Ritland, K. (1997). **Multilocus mating system program MLTR. Version 1.1**. Toronto: University of Toronto. Disponível em <<http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>> Acesso em 16 dez. 2016.
- Sebbenn, A.M.; Carvalho, A.C.; Freitas, M.L.; Moraes, S.M.; Gaino, A.P.; Silva, J.M.; Jolivet, C.; Moraes, M.L. (2011). Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity** 106(1): 134-145. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2010.33>.
- Soltis, D.E.; Haufler, C.H.; Darrow, D.C.; Gastony, G.J. (1983). Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal** 73(1): 9-27. <http://dx.doi.org/10.2307/1546611>
- Sousa, V.A.; Hattemer, H.H.; Robinson, I.P. (2002). Inheritance and linkage relationships of isozyme variants of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvae Genetica** 51(5/6): 191-196.
- Strauss, S.H.; Conkle, M.T. (1986). Segregation, linkage, and diversity of allozymes in knobcone pine. **Theoretical and Applied Genetics** 72(4): 483-493.
- Stuber, C.W.; Wendel, J.F.; Goodman, M.N.; Smith, J.S.C. (1988). **Techniques and scoting procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.)**. Raleigh, North Carolina: North Carolina Agricultural Research Service. 87p.
- Weir, B.S.; Cockerham, C.C. (1979). Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. **Heredity** 42: 105-111. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.1979.10>
- Weir, B.S. (1979). Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics** 35(1): 235-254. <http://dx.doi.org/10.2307/2529947>
- Yamada, M.M.; Guries, R.P. (1989). **A manual for starch gel electrophoresis – New chocolate**

- lovers edition**. Staff Paper Series n° 39. Madison: University of Wisconsin. 22p.
- Yeh, F.C.; Yang, R.C.; Boyle, T. (1999) Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis. **Popgene, version 1.32**. Disponível em <<http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>> Acesso em 14 out. 2016.
- Ying, L.; Morgenstern, E.K. (1990). Inheritance and linkage relationships of some isozymes of *Larix laricina* in New Brunswick, Canada. **Silvae Genetica** 39(5/6): 245-251.
- Zhelev, P.; Gömöry, D.; Paule, L. (2002). Inheritance and linkage of allozymes in a Balkan endemic, *Pinus peuce* Griseb. **The Journal of Heredity** 93(1): 60-63.