

ISOENZIMAS NA IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DE HÍBRIDOS E CLONES NUCELARES NO MELHORAMENTO DE CITROS (1)

ROSA MARIA LIZANA BALLVE (2.º), RITA BORDIGNON (3.º),
HERCULANO PENNA MEDINA FILHO (2.º), WALTER JOSE SIQUEIRA (2.º),
JOAQUIM TEÓFILO SOBRINHO (3.º) e JORGINO POMPEU JÚNIOR(4.º)

RESUMO

Um dos problemas relacionados ao melhoramento de citros é a poliembrião e a conseqüente dificuldade, após cruzamentos controlados, de distinguir clones nucelares dos híbridos. Estudou-se um método para eletroforese de isoenzimas em gel de amido para doze sistemas isoenzímicos, desenvolvendo-se procedimento apropriado para a resolução simultânea dos sistemas fosfatase ácida, peroxidase anódica e catódica, glutamato oxaloacético transaminase, fosfoglucoisomerase, fosfoglucomutase e enzima málica. Caracterizaram-se por esses sistemas 31 clones de citros com possível interesse para o programa de melhoramento do IAC. Estão envolvidos 7 locos e 25 alelos, permitindo uma identificação precoce de híbridos antes do plantio no campo para avaliações agrônômicas. Implicações desses estudos básicos no melhoramento e na determinação da taxa de *seedlings* nucelares de porta-enxertos comerciais são discutidas.

Termos de indexação: citros, genética, melhoramento, isoenzimas, híbridos, clones nucelares, embriões zigóticos.

ABSTRACTS

ISOZYMES IN THE EARLY IDENTIFICATION OF HYBRIDS AND NUCELLAR CLONES IN CITRUS BREEDING

One of the problems related to citrus breeding is the polyembryony and the ensuing difficulty in distinguishing nucellar clones from hybrids obtained from controlled crosses. Twelve isozyme systems using starch gel electrophoresis were studied. A procedure for simultaneous resolution of acid phosphatase, anodic and cathodic peroxidase, glutamate oxaloacetate transaminase, phosphoglucoisomerase, phosphoglucomutase and malic enzyme was developed. Thirty one clones with possible use in the Instituto Agronômico de Campinas,

(1) Recebido para publicação em 6 de agosto de 1990 e aceito em 30 de março de 1991.

(2) Seção de Genética, Instituto Agronômico (IAC), Caixa Postal 28, 13001 Campinas (SP).

(3) Estação Experimental Dr. Sylvio Moreira, IAC.

(4) Seção de Citricultura, IAC.

(5) Com bolsa de pesquisa do CNPq.

(6) Com bolsa CAPES/UNICAMP.

State of São Paulo, Brazil breeding program were characterized. Seven loci and twenty five alleles are involved allowing for an early identification of hybrids before transplanting them into the field for agronomic evaluations. Implications in breeding strategies and in the determination of the degree of nucellar embryony of commercial rootstocks are discussed.

Index terms: citrus, genetics, breeding, isozymes, hybrids, nucellar clones, zygotic embryos.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de citros e o maior exportador de suco concentrado de laranja do mundo. Entre as frutíferas, os citros ocupam, em escala mundial, o segundo lugar em produção, logo após a uva (FAO, 1988).

Um programa de melhoramento de citros utilizando a técnica de eletroforese foi recentemente iniciado no Instituto Agrônômico, tendo por objetivo a diversificação de porta-enxertos e a obtenção de novos clones de laranjas e tangores com características desejáveis para industrialização e exportação *in natura*.

Diversos são os problemas associados ao melhoramento de citros. Trata-se de uma espécie perene, de longo ciclo reprodutivo, longo período de juvenildade e ocorrência generalizada de poliembrionia (CAMERON & FROST, 1968; SOOST & CAMERON, 1975).

Em consequência da poliembrionia, surge a dificuldade de identificação das plantas híbridas originadas de cruzamentos controlados. As progênes, por via de regra, constituem-se numa mistura de híbridos e de clones nucleares idênticos ao progenitor feminino. Essa identificação é tradicionalmente feita no campo através da análise de caracteres morfológicos. Tal procedimento é demorado, dispendioso e incerto. Grande número de plantas tem que ser mantido no campo até a primeira frutificação, para o reconhecimento dos híbridos, o que é extremamente difícil, principalmente quando tais híbridos resultam de cruzamentos entre clones morfológicamente semelhantes. Seria de grande conveniência que se fizesse esse reconhecimento ainda no estágio de *seedlings*, antes do plantio no campo. Atualmente, o método mais promissor de identificação precoce de híbridos de citros é através da análise de padrões isoenzímicos obtidos por eletroforese (IGLESIAS et al., 1974; TORRES et al., 1978b, 1982; MOORE & CASTLE, 1988; ROOSE, 1988; ROOSE & TRAUGH, 1988).

Essa técnica vem sendo também bastante utilizada em estudos com outras espécies frutíferas, como identificação de híbridos de pêssago (PARFITT et al., 1985; ARULSEKAR et al., 1986) e mamão (MANSHARDT & WENSLAFF, 1989); como marcadores isoenzímicos em abacate (TORRES et al., 1978a), noz (ARULSEKAR et al., 1985) e uva (LOUKAS et al., 1983), e para caracterização de cultivares de damasco (BYRNE & LITTLETON, 1989), morango (BRINGHURST

et al., 1981), maçã (WEEDEN & LAMB, 1985), amêndoa (HAUAGGE et al., 1987) e ameixa (BYRNE & LITTLETON, 1988). Outras aplicações potenciais e exemplos práticos em genética e melhoramento de plantas são conhecidas (TANKSLEY et al., 1981, 1982; MEDINA FILHO, 1983).

Devido às inúmeras variações nos equipamentos, sistemas e condições de laboratório que influenciam os resultados dessas investigações, a técnica de eletroforese deve ser estudada de maneira a adequá-la às condições e aos interesses específicos. Para tanto, pesquisaram-se aspectos relativos ao método, como condições de eletroforese, sistemas isoenzímicos e tipos de tecidos vegetais, para que pudessem ser utilizados na caracterização de vários clones e híbridos de citros de interesse no referido programa de melhoramento. Os resultados dessas investigações são relatados neste trabalho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os clones utilizados no desenvolvimento deste trabalho fazem parte do Banco de Germoplasma do IAC, localizado na Estação Experimental Dr. Sylvio Moreira, em Cordeirópolis, SP. No quadro 1, esses clones são apresentados de acordo com a classificação botânica de TANAKA (1954).

Estudaram-se as principais variações que influenciam a qualidade e resolução de bandas em eletroforese, destacando-se aquelas relativas ao gel de amido, aos tecidos apropriados, à preparação das amostras vegetais e sistemas isoenzímicos. O equipamento e os procedimentos laboratoriais utilizados encontram-se detalhados em TANKSLEY (1979) e MEDINA FILHO & BALLVE (1989).

Para a preparação do gel, utilizou-se amido hidrolisado de batata (Sigma), numa concentração de 11,9%, determinada previamente, e solução tampão inicial contendo 2,5% de TRIS 0,015 M e 2,5% de ácido cítrico 0,036 M. Foram testados diversos valores de pH do gel no intervalo 7,5 a 8,5, obtidos com o aumento da concentração de TRIS ou citrato, avaliando-se o efeito na resolução e migração de bandas em diversos sistemas isoenzímicos.

Quanto às amostras vegetais, foram testadas folhas de plantas adultas em diversos estádios de desenvolvimento e os padrões obtidos, comparados com aqueles observados em cotilédones e folhas do primeiro, segundo e terceiro pares em *seedlings* originados dessas plantas adultas. Esses tecidos foram macerados em solução de extratores contendo diversas combinações e concentrações de antioxidantes como sacarose, ácido ascórbico e glutatona reduzida, comparando-se os resultados com os obtidos com a maceração feita em solução TRIS pH 7,5 ou simplesmente água destilada. Para auxiliar o processo de maceração, foi testada também a adição de sílica lavada como abrasivo.

QUADRO 1. Clones estudados de porta-enxertos e de copas e seus genótipos para sete locos isoenzímicos

Clones	Introdução	<i>Aps-1</i>	<i>Me-1</i>	<i>Got-1</i>	<i>Got-2</i>	<i>Pgi-1</i>	<i>Pgm-1</i>	<i>Prx_a-1</i>
Porta-enxertos								
<i>(C. aurantium)</i> Laranja-								
-azedada São Paulo	235	CC	II	SS	FM/MM	WS	FS	FS
<i>(C. limonia)</i> Limão-cravo								
Limreira	863	CC	II	FS	FS/MM	FS	FF	MM
---	519	CC	II	FS	FS/MM	FS	FI	MM
<i>(C. reshni)</i> Cleópatra	352	CC	II	SS	FF/MM	FF	FF	FF
<i>(C. sunki)</i> Sunki	375	CC	II	SS	FF/MM	FF	FF	FM
<i>(Poncirus trifoliata)</i>								
Trifoliata Davis A	84B	nulo	RR	PM	MT/SS	FS	PM	FF
Copas								
<i>(C. sinensis)</i> Laranjas-doces								
Hamlin	602	CC	II	SS	FI/MM	FS	FS	FF
Lima graúda	1587	CC	II	SS	FI/MM	FS	FS	FF
Mortera	84	CC	II	SS	FI/MM	FS	FS	FF
Natal	321	CC	II	SS	FI/MM	FS	FS	FF
Pêra	RG043	CC	II	SS	FI/MM	FS	FS	FF
Valência	716	CC	II	SS	FI/MM	FS	FS	FF
Valência folha murcha ..	RG004	CC	II	SS	FI/MM	FS	FS	FF
Westin	231	CC	II	SS	FI/MM	FS	FS	FF
<i>(C. reticulata)</i> Tangerinas								
Carvalhoes	732	CC	II	SS	FI/MM	FS	FI	FF
Clementina	288	CC	II	SS	FI/MM	WS	FI	FF
Cravo	313	CC	II	SS	FI/MM	FS	FI	FM
Dancy	351	CC	II	SS	FF/MM	FF	FF	FM
Fremont	741	CC	II	SS	FF/MM	FS	FI	FF
Hansen	1507	CC	II	SS	FF/MM	WS	FF	FF
Kara	392	CC	II	SS	FF/MM	FF	FS	FM
Mel	260	CC	II	SS	FI/MM	FS	FS	FF
Paraguai	-	CC	II	SS	FF/MM	FS	FS	FF
Ponkan	380	CC	II	SS	FF/MM	FF	FF	MM
Vermelha	-	CC	II	SS	FF/MM	FS	FI?	FM
<i>(C. nobilis)</i> King	-	CC	II	SS	FF/MM	FF	FF	MM
<i>(C. unshiu)</i> Satsuma	438	CC	II	SS	---	FS	FF	FF
Híbridos								
Tangerina Lee	427	CC	II	SS	FF/MM	FS	FI	FF
Tangor Murcote	RG005	CC	II	SS	FF/MM	FF	FF	FF
Tangelo Nova	1583	CC	II	SS	FF/MM	FS	FI	FF
Tangerina Osceola	429	CC	II	SS	FF/MM	--	--	FF

Foram pesquisados doze sistemas isoenzímicos: ADH (álcool desidrogenase); G6PDH (glucose-6-fosfato desidrogenase); PGI (fosfoglucoisomerase), PGM (fosfoglucomutase); GOT (glutamato oxaloacético transaminase); PRX (peroxidase); APS (fosfatase ácida); EST (esterase); MDH (malato desidrogenase); ME (enzima málica), SKDH (ácido shikímico desidrogenase); 6PGDH (6-fosfogluconato desidrogenase), e IDH (isocitrato desidrogenase). As soluções de revelação para esses sistemas são especificadas em SHAW & PRASAD (1970) e VALLEJOS (1983).

Investigações iniciais em relação à voltagem e amperagem mostraram que, para um período de inserção das amostras de 25 minutos, usando-se nos eletrodos solução de ácido bórico 0,3M, pH 8,3 ajustado com NaOH 4N, bons resultados são obtidos aplicando-se um máximo de 25mA, sem ultrapassar 150V. Após a remoção das amostras, dos resíduos e do excesso de extrato aderido ao gel, manteve-se um máximo de 150V por aproximadamente 60 minutos, período no qual a amperagem se reduz para cerca de 12,5mA. Esta é então reajustada para 30mA, resultando num máximo de 300V. Essa voltagem, mantida por duas horas e meia, promove a migração do frente para o ânodo em cerca de 8,0cm da origem. A posição das bandas relativa à migração do frente é referida na porção anódica do gel com valores positivos de R_f (migração da banda/migração do frente) e negativos quando as bandas se localizam na porção catódica. Em geral, os valores de R_f para isoenzimas em eletroforese de gel de amido estão sujeitos a pequena variação, influenciada principalmente pelo pH do gel e pela distância de migração do frente. Nas condições metodológicas especificadas neste trabalho, tais valores são, no entanto, bem constantes.

Cada sistema isoenzímico foi estudado quanto à estabilidade e qualidade da resolução de bandas em relação às variações metodológicas, aos diversos tecidos e às condições de preparação das amostras. Posteriormente, para aqueles que se mostraram promissores, determinaram-se as condições apropriadas que permitissem que o mesmo gel fosse revelado para diversos sistemas. Após definido o método e os sistemas mais indicados, os clones selecionados, como de interesse para o plano de melhoramento, foram caracterizados quanto aos padrões de isoenzimas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Método da eletroforese

De acordo com a resolução, distinguem-se, nos limites metodológicos investigados, três grupos de isoenzimas. No primeiro, encontram-se MDH, GDH, SKDH e IDH, sistemas de atividade estável, porém de resolução difusa, não se visualizando bandas. O segundo grupo inclui ADH, EST e 6PGDH. Apesar de estes

sistemas apresentarem bandas nítidas, com boa resolução, a atividade enzimática é, no entanto, bastante instável, parecendo ser afetada por fatores ambientais e/ou interações complexas não determinadas. No terceiro grupo, mais promissor para as condições testadas, constam PGI, GOT, APS, PRX, PGM e ME, sistemas de expressão estável com resolução de bandas nítidas. Para esses sistemas, procurou-se otimizar o método.

Variações de pH do gel resultaram em diferenças quanto à resolução e migração relativa das bandas. Verificou-se para PGI, APS e ME, que o aumento do pH resultou apenas em menor migração relativa ao frente, sem, porém, alterar significativamente a resolução. PRX anódica apresentou bandas de resolução difusa acompanhando as principais, fenômeno conhecido como modificação pós-tradução. Com pH menor que 8,0, esse fenômeno é mais intenso, dificultando a interpretação dos géis. PRX catódica mostrou alteração na expressão e na migração relativa entre as bandas. Em pH maior que 8,3, algumas bandas migram muito próximas e com pH menor que 7,9, bandas adicionais são resolvidas. Esses efeitos são mais bem evidenciados quando ocorre maior migração do frente. Para PGM, o pH limite é 8,3, pois valores maiores resultam em géis de pouca atividade e com bandas de alguns genótipos migrando muito próximas. GOT mostrou-se bastante dependente do pH. Em pH abaixo de 8,0, verifica-se que a banda de menor migração é resolvida no cátodo e que uma das bandas da região distal do ânodo subdivide-se em três, fato ainda sob investigação, porém sem resultados conclusivos.

Esses testes indicaram que, utilizando-se pH entre 8,0 e 8,3, os sistemas PGI, PGM, GOT, APS, PRX e ME são revelados apropriada e simultaneamente numa mesma corrida, apresentando bandas estáveis, nítidas e com separação adequada.

Com relação aos diversos extratores testados, verificou-se que o melhor deles foi a água destilada, adicionando-se 0,2ml a 60mg de tecido vegetal. Nenhuma outra solução extratora se apresentou vantajosa em relação à água destilada, nem mesmo para aqueles sistemas que se mostraram insatisfatórios, referidos no primeiro e segundo grupos. O emprego de 7mg de sílica lavada como abrasivo facilitou sobremaneira a operação de maceração, sem alterar a qualidade do gel.

3.2. Tecidos pesquisados

Quanto aos tecidos estudados, verificou-se não haver diferenças nos padrões isoenzimáticos de folhas em diversos estádios de desenvolvimento, provenientes de plantas adultas. O mesmo se observou em relação às folhas dos *seedlings* nucelares que apresentaram exatamente os mesmos padrões das plantas adultas que lhes deram origem. As folhas dos *seedlings* constituem, portanto, material ideal para análises de isoenzimas visando à identificação precoce de híbridos.

As análises revelaram que as folhas, uma vez destacadas, umedecidas, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em geladeira (10°C), mantêm a atividade enzimica e seus padrões inalterados durante quatro semanas. Isso permite uma flexibilidade operacional das análises laboratoriais das plantas mantidas em localidades distantes.

Os *seedlings* analisados originaram-se de sementes das quais foram removidas a testa e o tegumento, germinadas em placas de Petri com papel de filtro umedecido e, posteriormente, numeradas e transplantadas para bandejas tipo *speedling*. Idealmente, seria desejável que a análise isoenzímica fosse feita anteriormente a essa operação de transplante e identificação das plantas a serem analisadas. Para tanto, tentou-se utilizar parte dos cotilédones dos embriões em início de germinação, quando ainda nas placas de Petri. Embora apresentassem boa resolução para diversos sistemas, a remoção de parte desse tecido de reserva do embrião compromete bastante a sobrevivência dos *seedlings*, principalmente nos casos em que os cotilédones são de reduzido tamanho. O tecido de cotilédone não se mostrou, portanto, apropriado para tal objetivo.

3.3. Análises isoenzímicas

Utilizando-se folhas de plantas adultas, estudaram-se 31 clones do Banco de Germoplasma, alguns híbridos em fase de *seedling* de trifoliata 'Davis A' com laranja-azedada 'São Paulo' e com tangerina 'Sunki', bem como *seedlings* de limão-cravo 'Limeira' obtidos por livre polinização. Na figura 1 estão representados, esquematicamente, os alelos e seus respectivos Rfs para os sistemas isoenzímicos e no quadro 1, os genótipos correspondentes a cada clone.

ME - Segundo TORRES et al. (1982, 1985), esse sistema apresenta duas regiões de resolução. Uma delas, próxima ao fronte, denominada *Me-2*, é de pouca coloração e sem variabilidade em *Citrus*. A outra, de coloração intensa, foi identificada como loco *Me-1* codificando para uma enzima monômera. Cinco alelos foram descritos: F, I, M, S e R. Os alelos M e S ocorrem em condição heterozigota (MI) em limão-rugoso (*Citrus jambhiri*) e (SI) em lima (*Citrus aurantifolia*). O alelo R foi encontrado somente em clones de *Poncirus trifoliata* em estado heterozigoto (FR). O alelo F, além de *Poncirus*, foi encontrado também em cidras (*Citrus medica*). O alelo I é de distribuição generalizada, sendo homozigotas as laranjas, as tangerinas e a laranja-azedada (*Citrus aurantium*).

Nas condições do presente trabalho, a região do loco *Me-2* não foi observada, somente *Me-1*, no qual se verificou o genótipo II para todo o germoplasma com exceção de *Poncirus trifoliata* clone 'Davis A', o qual é homozigoto RR (Figura 2). Ele se mostrou diferente dos sete clones analisados por TORRES et al. (1982), todos FR. O clone 'Davis A', como é distinto dos demais, torna-se de relativa valia no programa de melhoramento. *Me-1* serve, portanto, como um bom

marcador nos cruzamentos em que o 'Davis A' é utilizado como genitor feminino, uma vez que, sendo homozigoto RR e os demais clones de porta-enxertos II, nucelares e híbridos deverão ser facilmente distinguíveis.

APS - Na porção anódica do gel, **APS** se expressa em três regiões. Com Rf 0,95 próximo ao fronte, existe nessa região uma banda de resolução nítida, porém instável, nem sempre se expressando. Nas ocasiões em que foi observada, essa banda se localizou na mesma posição para todos os clones estudados.

Na segunda região, de Rf 0,77, encontra-se uma banda nítida, de coloração intensa e expressão uniforme presente em todos os clones estudados, exceto no trifoliata 'Davis A', que não apresenta banda alguma nessa região. Em cruzamentos desse clone com tangerina 'Sunki' e com laranja-azeda, os híbridos, identificados por *Got-1*, também foram reconhecidos facilmente por **APS**, porquanto todos eles apresentaram essa banda. Nos *seedlings* nucelares, à semelhança do 'Davis A', ela está ausente. Tais observações sugerem que essa

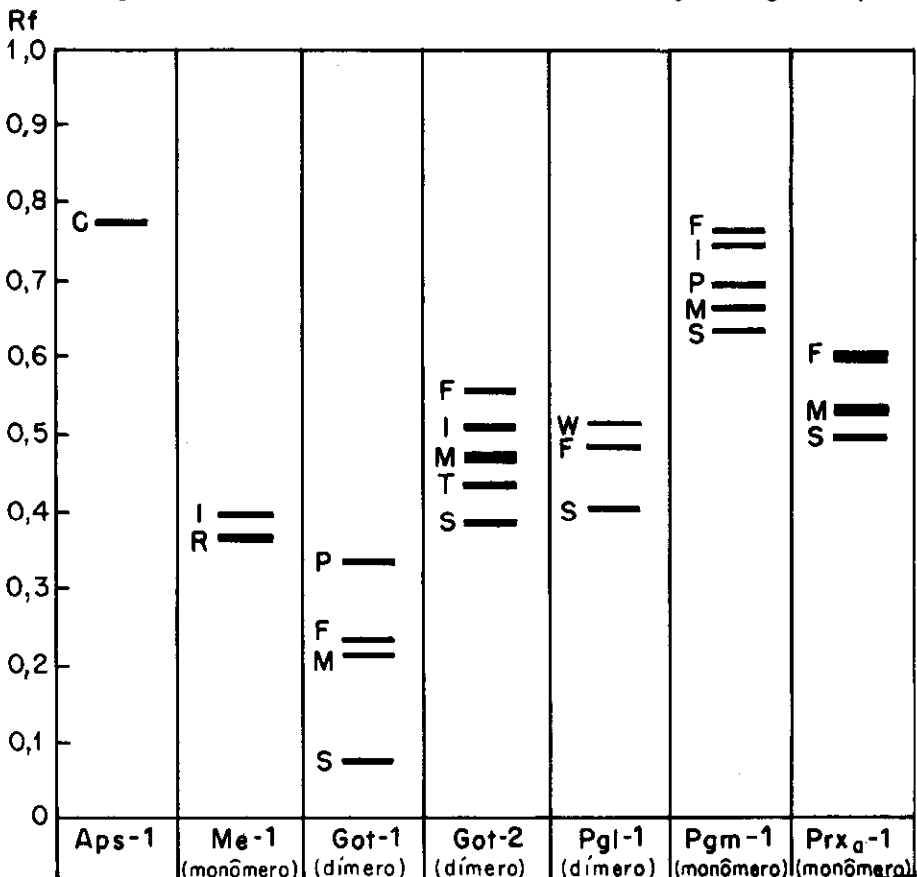


FIGURA 1. Representação esquemática dos alelos de sete locos isoenzímicos e seus respectivos Rfs. Entre parênteses é indicada a estrutura quaternária da isoenzima.

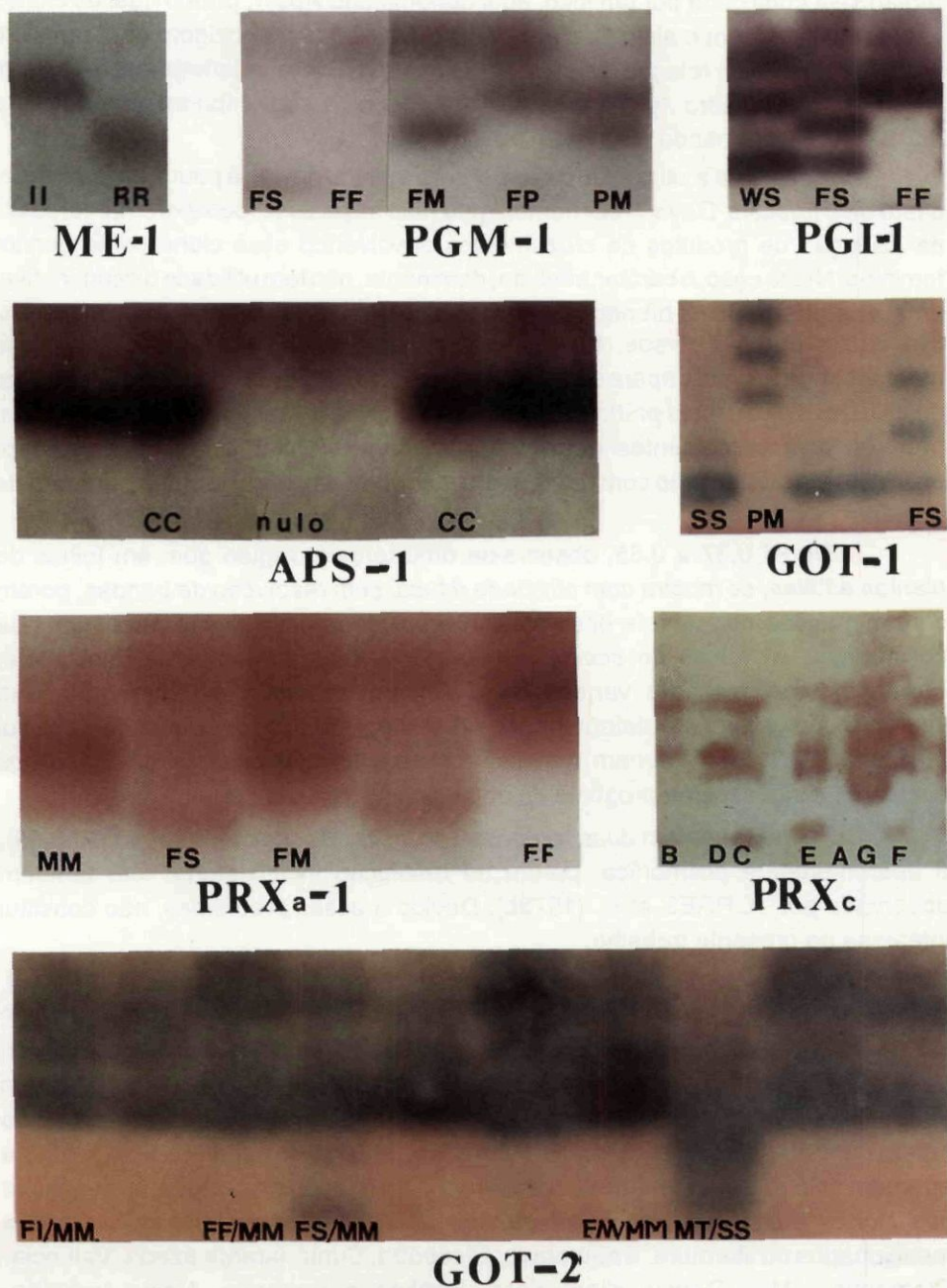


FIGURA 2. Zimogramas de citros em gel de amido. Genótipos de sete locos isoenzímicos e padrões de PRX catódica.

região seja codificada por um loco, aqui denominado *Aps-1*, para o qual os clones estudados possuem o alelo C, e *P. trifoliata* 'Davis A' é homocigoto para um alelo nulo, recessivo em relação ao alelo C. Tangerina 'Sunki' e laranja-azedada seriam homocigotos CC para *Aps-1*, uma vez que todos os seus híbridos com trifoliata apresentam essa banda (Figura 2).

Apesar de a utilização de *Aps-1* ser pequena devido à pouca variabilidade, o fato de o trifoliata 'Davis A' ser homocigoto nulo torna esse loco extremamente útil na distinção de produtos de cruzamentos envolvendo esse clone como genitor feminino. Neste caso, o caráter trifoliata, dominante, não tem utilidade discriminativa, uma vez que tanto os híbridos como os nucelares apresentam folhas trifoliadas. Em cruzamentos inversos, isto é, utilizando-o como genitor masculino, esse marcador morfológico, aparentemente homocigoto no 'Davis A', seria, sem dúvida, de utilização muito mais prática. Casos existem em que, apesar disso, pode-se dar preferência a cruzamentos desse trifoliata como genitor feminino, como, por exemplo, em hibridações com tangerina 'Sunki', devido ao seu pequeno número de sementes.

De Rf 0,37 a 0,55, observa-se uma terceira região que, em folhas de plantas adultas, se mostra com atividade difusa, sem resolução de bandas, porém com migrações certamente diferentes. A resolução dessa região em tecidos de cotilédones e folhas de *seedlings* de até 30 dias apresenta-se bem nítida, observando-se evidente variabilidade. A caracterização dessa região, sua interpretação genética e determinação de seu potencial como marcador, não foi realizada. Para tanto, seriam necessários estudos dos padrões em *seedlings* nucelares e zigóticos na progênie de cada clone.

PGI - É visto em duas regiões. A primeira, de maior migração (Rf 0,60), é aparentemente polimórfica, porém de resolução insatisfatória, fato também observado por TORRES et al. (1978b). Devido a esses problemas, não constitui interesse no presente trabalho.

A segunda região, codificada por *Pgi-1*, foi estudada por TORRES et al. (1978b, 1985; SOOST & TORRES (1981); MOORE & CASTLE (1988) e ROOSE & TRAUGH (1988), tendo sido descritos os alelos W (Rf 0,51), F (Rf 0,48) e S (Rf 0,40) e P (Rf < 0,40). O W foi encontrado em *C. aurantium* (laranja-azedada), *C. limon* (limões verdadeiros) e *C. reticulata* (tangerinas), tipicamente em condição heterocigota, associado a S ou F, ocorrendo, porém, em condição homocigota apenas no clone 'Willowleaf' de *C. aurantium*. Com relação a esse loco, os genótipos dos clones estudados encontram-se no quadro 1. Desses clones, doze são mencionados na literatura: limão-cravo, Cleópatra, Sunki, laranja-azedada, Valência, Clementina, Mel, Dancy, King, Kara, Ponkan e Satsuma. Neste trabalho, confirmaram-se os seus genótipos e a natureza dimérica dessa isoenzima pela ocorrência de heterodímeros em indivíduos heterocigotos. Uma confirmação

adicional do dimerismo dessa enzima foi obtida em géis de grãos de pólen de clones heterozigotos. Nesses, não se observaram os heterodímeros, mas somente os dois homodímeros.

Verificou-se que, no germoplasma analisado, três foram os genótipos de *Pgi-1* encontrados: FS, FF e WS (Figura 2). O potencial de utilização desse loco na distinção de clones nucelares e híbridos é dependente dos genótipos dos clones envolvidos em cada cruzamento específico, variando de 0 a 100%. Nas seis possíveis combinações entre os genótipos desse germoplasma, o potencial, independente da direção dos cruzamentos, é indicado entre parêntesis: FS x FS (50%); FS X FF (50%); FS X WS (75%); FF X FF (0%); FF x WS (100%) e WS x WS (50%). Por exemplo, em cruzamentos FF x WS, todos os híbridos serão FW ou FS, enquanto os nucelares terão o genótipo materno, distinto dos híbridos. Neste caso, identificam-se, portanto, 100% dos híbridos obtidos. Em cruzamentos FS x FS, metade dos híbridos terá o genótipo FS, indistinguível dos clones nucelares, sendo, portanto, reconhecíveis, por esse loco apenas 50% dos híbridos.

PGM - São conhecidos dois locos para essa enzima: *Pgm-2*, de migração catódica, expressa-se em tecidos do floema e foi estudado por ROOSE & TRAUGH (1988). Em tecidos de folha, observa-se somente a expressão do loco *Pgm-1*, de migração anódica e codificando para uma enzima monômera. TORRES et al. (1978b) descreveram cinco alelos: F (Rf 0,76), I (Rf 0,74), P (Rf 0,68), M (Rf 0,65) e S (Rf 0,63), ocorrendo todos também no germoplasma analisado no presente trabalho nas combinações FI, FS e PM. Padrões de indivíduos dos genótipos FS, FF, FM, FP e PM são mostrados na figura 2. Dos clones estudados, aqueles doze comuns aos caracterizados por TORRES et al. (1978b) tiveram seus genótipos confirmados, à exceção da tangerina 'King' e do limão-cravo.

A tangerina 'King', que deveria ser FS, na análise deste trabalho mostrou ser FF. Essa 'King' foi introduzida da Califórnia e é, provavelmente, produto de recombinação. O limão-cravo 'Limeira', de ampla utilização como porta-enxerto no Estado de São Paulo, também parece ser produto de origem zigótica. É homozigoto FF, enquanto a introdução 519, bem como o 'Rangpur Lime', analisado por TORRES et al. (1978b), é de genótipo FI.

Com os genótipos observados (FF, FI, FS e PM), são possíveis dez diferentes combinações de cruzamentos. O potencial desse loco na identificação de híbridos varia de 0 (FF x FF) a 100% (FF, FI e FS x PM), independente da direção do cruzamento.

GOT - Duas são as regiões observadas e identificadas por TORRES et al. (1978b). Em *Got-1*, próximo à origem, ocorrem quatro alelos codificando para uma enzima dímera de Rf 0,36 (P), 0,25 (F), 0,23 (M) e 0,06 (S). Alelos M e P ocorrem em *Poncirus*, *Fortunella* e outros gêneros, enquanto F e S são comuns a *Citrus*.

No germoplasma analisado, esses quatro alelos também estão presentes, sendo *P. trifoliata* PM, limão-cravo FS e os demais, todos SS (Figura 2). Embora a resolução seja de excelente qualidade e os alelos, de migração bastante distinta, a utilização deste loco como marcador fica restrito a cruzamentos envolvendo *Poncirus* ou limão-cravo, uma vez que os demais são SS. A segregação deste loco em indivíduos oriundos por autofecundação do limão-cravo 'Limeira' é absolutamente normal para proporção mendeliana de 1FF : 2FS : 1SS ($\chi^2 = 1,29ns$).

Got-2, na porção mediana do gel, apresenta em *Citrus* os alelos F, M, S e T. Um provável novo alelo, aqui denominado I, tem migração intermediária entre F e M, estando presente apenas nas laranjas-doces e na tangerina 'Cravo' (Quadro 1). SOOST & TORRES (1982) se referem a *Got-2* como um loco duplicado responsável por uma enzima dimérica com formação de heterodímero somente intraloco.

De acordo com a hipótese de um loco duplicado com formação de heterodímero intraloco, os genótipos dos clones são listados no quadro 1 e mostrados na figura 2. No presente trabalho, a interpretação dos genótipos de *Got-2* dos diversos clones não é definitiva por razões discutidas a seguir.

SOOST & TORRES (1982) apresentaram como evidência da hipótese de um loco duplicado que a progênie de autofecundação de tangerina 'Clementina' (FF/MM), com padrão de duas bandas, não segregava. Na presente investigação, da mesma forma que 'Clementina', a tangerina 'Sunki' tem para *Got-2* idêntico padrão de duas bandas. Indivíduos zigóticos obtidos por autofecundação de 'Sunki', identificados por segregação de *Prx_a-1*, também apresentaram esse padrão de duas bandas para *Got-2*, à semelhança do observado com 'Clementina'. Esses resultados não constituem, entretanto, evidências que *Got-2* é um loco duplicado, mas apenas que dois locos em homozigose estão envolvidos e que, realmente, heterodímeros interlocos não se formam. Se esses dois locos fossem independentes, ter-se-ia exatamente o mesmo padrão observado na progênie de 'Sunki' e o que foi relatado para 'Clementina'.

Na laranja-azedada, que tem um padrão de três bandas, estão envolvidos também os alelos F e M como em 'Sunki' e 'Clementina'. Neste caso, porém, F, em pelo menos um dos locos, é alelo de M. A evidência que nesse clone o alelo M está associado a F em um dos locos, é que gel de tecido somático, como folha, apresenta três bandas, enquanto gel de grãos de pólen, da mesma planta, apresenta somente duas, faltando a banda intermediária, a qual seria o heterodímero intraloco.

O limão-cravo, aqui interpretado como sendo de genótipo FS/MM, por autofecundação originou 83 plantas zigóticas (inequivocamente identificadas por outros sistemas isoenzimáticos) de fenótipos que puderam ser claramente interpretados como de genótipo FF/MM, FS/MM e SS/MM, na proporção de 1:2:1 ($\chi^2 = 1,19ns$). Isso mostra que, no limão-cravo, F é alelo de S em um loco e o outro loco é

homozigoto MM. Esse resultado evidencia que realmente existem dois locos na região de *Got-2*. Apesar de um deles estar em heterozigose, o fenótipo visualizado no gel seria também o mesmo se *Got-2* correspondesse a um loco duplicado ou a dois locos independentes.

Nenhum dos resultados apresentados aqui ou na literatura realmente prova a validade da hipótese de SOOST & TORRES (1982). A interpretação definitiva depende da análise genética em progênie de autofecundação ou de cruzamentos envolvendo indivíduos heterozigotos para ambos os locos, com a complicação adicional se se considerar que esses dois locos, caso duplicados, poderiam se apresentar na disposição *cis* ou *trans*.

Considerando-se a autofecundação de um indivíduo de genótipo duplamente heterozigoto FM, se *Got-2* fosse um loco duplicado, na disposição *cis*, a progênie visualizada no gel seria constituída de: indivíduos com uma banda avançada (genótipo FF/FF); indivíduos com três bandas, uma avançada, uma retardada e o heterodímero (genótipo FM/FM), e indivíduos com uma banda retardada (genótipo MM/MM), respectivamente, na proporção de 1:2:1. Se estivesse em *trans*, na progênie encontrar-se-iam indivíduos com duas bandas (FF/MM e MM/FF) e indivíduos com três bandas (FM/MF) na proporção 1:1. Alternativamente, caso fossem dois locos independentes, a progênie seria constituída de: indivíduos com uma banda avançada (FF FF); indivíduos com uma banda retardada (MM MM); indivíduos com duas bandas, uma avançada e uma retardada (FF MM e MM FF), e indivíduos com três bandas (doze diferentes genótipos heterozigotos para, pelo menos, um loco), ocorrendo, respectivamente, na proporção de 1:1:2:12. Estudos a esse respeito foram iniciados recentemente na Seção de Genética do IAC.

PRX - Atividade de peroxidase nas condições deste trabalho é verificada tanto no ânodo quanto no cátodo.

PRX anódica - Foi estudada por IGLESIAS et al. (1974); BUTTON et al. (1976); ESEN & SOOST (1976); SPIEGEL-ROY et al. (1977); LLANOS & LIMA (1981) e GERACI et al. (1981) em gel de poliacrilamida, principalmente com respeito a sua utilização na distinção de plantas zigóticas e nucelares comparando-se os diferentes zimogramas.

A única menção sobre locos e alelos desta região é feita no trabalho de MOORE & CASTLE (1988) em gel de amido. Determinaram *Prx_a-1* codificando uma enzima monômera com três alelos F (Rf 0,58), M (Rf 0,52) e S (Rf 0,49), caracterizando quinze diferentes porta-enxertos. Salientaram o potencial de PRX na distinção entre plantas zigóticas e nucelares em cinco dessas quinze populações.

Nas condições do presente trabalho, verificaram-se esses três alelos para *PRX anódica*. O alelo F é comum ao germoplasma analisado, não se restringindo particularmente a nenhum grupo. Nesse germoplasma, o S foi encontrado apenas

em laranja-azeda, associado a F, e o M foi observado em homozigose no limão-cravo e na tangerina 'Ponkan' e, associado ao F, em alguns outros clones de tangerinas (Figura 2, Quadro 1).

Esse loco apresenta bom potencial para a identificação de híbridos quando se consideram cruzamentos entre porta-enxertos e de tangerinas com laranjas. Não é adequado, porém, para híbridos entre laranjas-doces, uma vez que esse grupo é monomórfico para o alelo F.

PRX catódica - Informações sobre *PRX catódica* em géis de amido ou mesmo sobre a genética desse sistema são inexistentes na literatura.

O sistema foi analisado por SPIEGEL-ROY et al. (1977) e GERACI et al. (1981), em gel de poliácridamida utilizando tecidos de raiz, e mostrou-se inadequado na distinção de clones devido à complexidade dos zimogramas e inconstância dos padrões.

Realmente, a expressão de *PRX catódica* mostra-se sensível não somente a variações de pH do gel e tempo de corrida como ao estado fisiológico dos *seedlings*. Verifica-se, em geral, a ocorrência de diversas bandas com nitidez e intensidade de coloração diferentes. Nos *seedlings* com menos de 60 dias de idade, observa-se que certas plantas não expressam algumas bandas, vindo, porém, a expressá-las uniformemente e, em posições constantes, aos 120 ou mais dias de idade, podendo então ser empregadas na distinção de híbridos. Em folhas de plantas adultas, tais bandas têm uma expressão uniforme e migração relativa entre si constante, podendo ser utilizadas para a caracterização de clones (Figura 2).

A interpretação genética dessas bandas de *PRX catódica* não foi ainda realizada extensivamente, razão pela qual são indicados somente os padrões dos clones com os Rfs das bandas observadas, não lhes tendo sido atribuída nomenclatura genética - Figura 3. Os dados até o presente indicam que a banda de Rf - 0,17, presente na tangerina 'Sunki' e no trifoliata 'Davis A', parece ser condicionada por um loco em homozigose. Híbridos 'Davis A' e 'Sunki', identificados por *Got-1*, *Aps-1* e *Me-1*, invariavelmente apresentam também a mesma banda. No trifoliata 'Davis A', caracteristicamente, duas outras bandas de Rfs, -0,25 e -0,32, são observadas e, aparentemente, pertencem a outro loco, heterozigoto, codificando para uma enzima monômera. Nos mesmos híbridos 'Davis A' x 'Sunki', alguns indivíduos apresentam a banda retardada (Rf -0,32) e outros, a banda mais avançada (Rf -0,25) de *P. trifoliata*.

Apesar de a interpretação genética não estar ainda concluída, é evidente o potencial desse sistema na identificação de híbridos, visto a variabilidade observada e constância dos padrões.

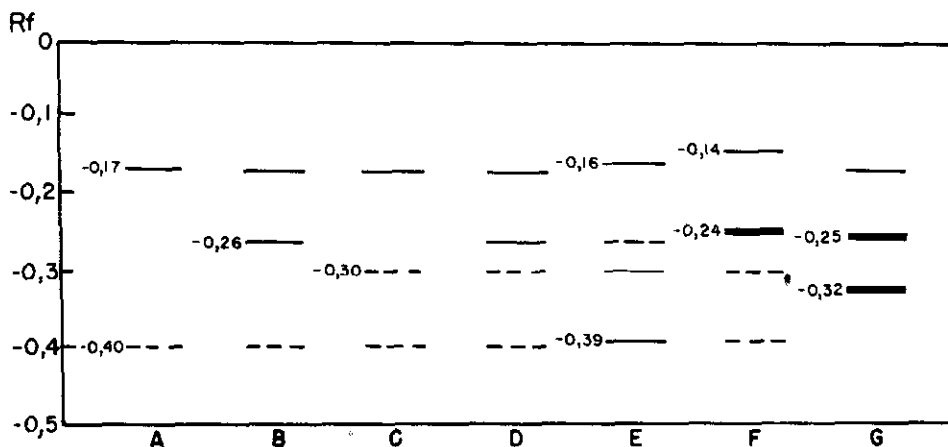


FIGURA 3. Padrões isoenzímicos (A-G), intensidade relativa e Rfs observados para o sistema de PRX catódica nos diversos clones estudados.

A: Fremont, Sunki, tangerina Cravo;

B: Carvalhaes, Cleópatra, Dancy, Nova, Osceola, Ponkan;

C: Hamlin, Hansen, Lima graúda, Mortera, Natal, Paraguai, Pêra, Satsuma, Valência folha murcha, Vermelha, Westin;

D: Clementina, Kara, King, Lee, Mel, Murcote;

E: Limão-cravo Limeira;

F: Laranja-azedada São Paulo;

G: Trifoliata Davis A.

3.4. Utilizações das análises genéticas

O conhecimento e a análise genética de clones de citros têm importantes implicações não-somente no melhoramento genético como em outros aspectos práticos da citricultura.

Com relação ao melhoramento, um dos problemas existentes é a poliembrionia. Quando se realizam cruzamentos controlados, as progênes resultantes constituem uma mistura de indivíduos híbridos e de clones nucleares geneticamente idênticos ao genitor feminino. A caracterização dos clones pelos padrões de isoenzimas e a determinação dos genótipos dos diversos locos aqui pesquisados são a base para a identificação de híbridos. O potencial de cada loco, quando analisado separadamente, já foi discutido na seção anterior, podendo variar de 0 a 100%, de acordo com o cruzamento específico. Como a distinção dos híbridos, em muitos casos, pode ser feita através de mais de um loco, a eficiência desse método é bastante aumentada, como explicado a seguir.

Exemplificando, supondo-se o cruzamento de um clone A como genitor feminino de genótipo FS, FS, FS/MM, MM, FF, com um clone B de genótipo FF, SS, FF/MM, FF FF, respectivamente, para os locos *Pgi-1*, *Got-1*, *Got-2*, *Prx-1* e *Pgm-1*. Por PGM, não seria possível reconhecer híbridos pelo fato de serem ambos os

genitores FF. Baseando-se em cada um dos demais locos, separadamente, distinguir-se-ia apenas metade dos híbridos, os quais seriam, respectivamente, para esses locos, aqueles de genótipo FF, SS, FF/MM e FM, pois os híbridos possuindo os genótipos alternativos FS, FS, FS/MM e MM seriam indistinguíveis dos genótipos nucleares. No entanto, quando esses quatro primeiros locos são analisados conjuntamente, a probabilidade de que um híbrido não seja identificado corresponde à probabilidade da ocorrência simultânea daqueles quatro genótipos alternativos idênticos aos maternos, ou seja, $(1/2)^4$. Em outras palavras, para esse cruzamento, tem-se a possibilidade de identificar 93,75% dos híbridos obtidos e separá-los para estudos posteriores, descartando-se apenas 6,25% deles juntamente com os nucleares.

Essa grande eficiência na identificação reside, portanto, no fato de a análise basear-se no genótipo de vários locos. O método aqui desenvolvido apresenta ainda a vantagem operacional de determinar, simultaneamente, todos esses genótipos numa mesma corrida. Isso é possível porque os vários sistemas isoenzímicos são satisfatoriamente resolvidos numa mesma condição eletroforética e cada gel pode ser seccionado horizontalmente em até sete camadas.

Cabe chamar a atenção que as considerações acima se referem exclusivamente à eficiência da eletroforese na identificação dos híbridos obtidos, nada tendo a ver com a porcentagem de híbridos produzidos em cada cruzamento. Esta, por sua vez, depende dos genitores envolvidos e de suas características, como grau de compatibilidade, viabilidade do zigoto e taxa de embrionia.

A identificação de híbridos é de extrema valia para o melhoramento de espécies perenes como o *Citrus*. Para qualquer programa de melhoramento, existe uma limitação prática e econômica quanto ao número de indivíduos a serem mantidos no campo durante vários anos. É evidente o valor dessa identificação precoce, pois as avaliações agronômicas poderão ser realizadas em lotes experimentais constituídos apenas de indivíduos sabidamente híbridos, visto que os nucleares são descartados antes do plantio no campo.

Outra aplicação imediata da eletroforese se refere à identificação de indivíduos zigóticos em progênies de autofecundação ou cruzamentos controlados para estudos básicos sobre herança da resistência a doenças ou de outros caracteres agronômicos.

Um aspecto de grande importância prática se refere aos estudos da biologia da reprodução, não-somente dos futuros porta-enxertos resultantes do programa de melhoramento como daqueles já comumente utilizados em nossas lavouras.

Embora a ocorrência da embrionia nuclear seja um problema para o melhoramento, o emprego extensivo de porta-enxertos nas lavouras cítricas depende, no entanto, da sua alta frequência.

Raramente são realizados experimentos para determinar a porcentagem exata de clones nucelares em progênie de polinização aberta de porta-enxertos, devido ao espaço e tempo necessários para a identificação inequívoca dos nucelares pelas características de seus frutos em plantas adultas. É comum admitir que um alto grau de poliembrião implica uma alta proporção de *seedlings* nucelares e que *seedlings* zigóticos podem ser morfológicamente identificados principalmente pelo tamanho discrepante das plantas na sementeira. Esse procedimento, embora prático, não fornece indicações seguras sobre a porcentagem de *seedlings* nucelares. Para alguns porta-enxertos, a distinção morfológica é eficiente, mas, para outros, é extremamente falha, como, por exemplo, no limão 'Volkamericano' e *P. trifoliata*, nos quais os *seedlings* zigóticos, identificados através da análise de isoenzimas, são morfológicamente semelhantes aos nucelares (MOORE & CASTLE, 1988).

Para os clones de porta-enxerto extensivamente utilizados no Brasil, não se têm informações a esse respeito. Tais pesquisas foram recentemente iniciadas.

4. CONCLUSÕES

1) As folhas de *seedlings* constituem um tecido apropriado para análise de isoenzimas de citros, visto que seus padrões são os mesmos das plantas adultas. A análise de isoenzimas permite uma identificação precoce dos híbridos, clones nucelares e produtos de autofecundação.

2) No preparo das amostras para eletroforese, bastam 60mg de tecido de folhas. É desnecessária a utilização de extratores especiais, pois bons resultados são obtidos com 0,2ml de água destilada. A adição de 7mg de sílica lavada, por amostra, facilita o processo de maceração e não altera a resolução de bandas.

3) A utilização de TRIS (0,015M)-citrato (0,036M) pH 8,0-8,3 para o gel e ácido bórico (0,3M) pH 8,3 para os eletrodos permitiu a resolução simultânea dos locos *Pgi-1*, *Got-1*, *Got-2*, *Aps-1*, *Pgm-1*, *Me-1*, *Prx₂-1* e *PRX catódica*, numa mesma corrida, efetuada a 300V, sem ultrapassar 30mA. Com o sistema utilizado, até sete camadas podem ser obtidas de um único gel.

4) Em alguns cruzamentos, a identificação dos híbridos pôde ser feita com base em apenas um loco. Em outros, a análise conjunta de sistemas aumentou a eficiência do método por diminuir a probabilidade que *seedlings* zigóticos tenham os mesmos genótipos heterozigotos dos nucelares para vários locos.

5) Definiu-se o loco *Aps-1*, até então desconhecido. *P. trifoliata* 'Davis A' possui um alelo nulo, recessivo. Os demais clones analisados possuem o alelo C. *Aps-1* constitui ótimo sistema para identificação de híbridos desse clone como genitor feminino.

6) *PRX catódica*, ainda não geneticamente caracterizada, parece ser codificada por mais de um loco que se expressa uniformemente em folhas de plantas adultas e em *seedlings* com 120 ou mais dias de idade. A ampla variabilidade e aparente segregação em cruzamentos sugerem sua utilização na identificação de híbridos. Entre os 31 clones estudados, sete padrões distintos foram observados.

7) Um novo alelo para *Got-2* é descrito. Denominado I, tem migração intermediária entre os alelos F e M, sendo encontrado nas laranjas-doces e na tangerina 'Cravo'. Dois locos, duplicados ou independentes, codificam para *Got-2*. No limão-cravo, um dos locos é homocigoto MM, cujo homodímero tem a mesma migração do heterodímero entre os alelos F e S do outro loco. Na laranja-azeda, um dos locos é provavelmente homocigoto MM, porém é certo que o outro loco é heterocigoto FM. Somente heterodímero intraloco é formado e se encontra ausente em preparações de tecido haplóide dos grãos de pólen.

8) Trinta e um clones de possível interesse para o melhoramento foram caracterizados isoenzimicamente. Vários deles haviam sido também referidos na literatura. Embora a maioria tenha tido seus genótipos confirmados, alguns clones do germoplasma analisado são geneticamente distintos, teoricamente possíveis de ser obtidos através de recombinação genética por autofecundação, o que sugere uma origem zigótica dessas introduções.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARULSEKAR, S.; PARFITT, D.E.; BERES, W. & HANSCH, P.E. Genetics of malate dehydrogenase isozymes in peach. *Journal of Heredity*, Washington, **77**(1):49-51, 1986.
- ; ————— & McGRANAHAN, G.H. Isozyme gene markers in *Juglans* species: inheritance of GPI and AAT in *J. regia* and *J. hindsii*. *Journal of Heredity*, Washington, **76**(2):103-106, 1985.
- BRINGHURST, R.S.; ARULSEKAR, S.; HANCOCK JUNIOR, J.F. & VOTH, V. Electrophoretic characterization of strawberry cultivars. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, Alexandria, **106**(5):684-687, 1981.
- BUTTON, J.; VARDI, A. & SPIEGEL-ROY, P. Root Peroxidase isoenzymes as an aid in *Citrus* breeding and taxonomy. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, **47**:119-123, 1976.
- BYRNE, D.H. & LITTLETON, T.G. Characterization of isozyme variability in apricots. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria **114**(4):674-678, 1989.
- & —————. Electrophoretic characterization of diploid plums of the southeastern United States. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, **113**(6):919-924, 1988.

- CAMERON, J.W. & FROST, H.B. Genetics, breeding, and nucellar embryony. In: REUTHER, W., BATCHELOR, L.D. & WEBBER, H.J., eds. *The citrus industry*. v.II. Anatomy, physiology, genetics, and reproduction. Riverside, University of California-Division of Agricultural Science, 1968. cap.5, p.325-370.
- ESEN, A. & SOOST, R.K. Peroxidase polymorphism in *Citrus*. *Journal of Heredity*, Washington, 67(4):199-203, 1976.
- FAO TRADE YEARBOOK. Rome, FAO, v.42, 1988.
- GERACI, G.; MANZOCCHI, L.A.; TUSA, N.; OCCORSO, G.; RADOGNA, L. & DE PASQUALE, F. Comparison of different methods for identifying zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 5. TOKYO, 1981. *Proceedings*. Tokyo, 1982. v.1, p.1-4.
- HAUAGGE, R.; KESTER, D.E.; ARULSEKAR, S.; PARFITT, D.E. & LIU, L. Isozyme variation among California almond cultivars: II. Cultivar characterization and origins. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 112(4):693-698, 1987.
- IGLESIAS, L.; LIMA, H. & SIMON, J.P. Isoenzyme identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. *Journal of Heredity*, Washington, 65(2):81-84, 1974.
- LLANOS, J.L. & H. LIMA. Peroxidase in healthy grapefruit trees and those affected by blight. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 5., Tokyo, 1981. *Proceedings*. Tokyo, 1982. v.1, p.476-478.
- LOUKAS, M.; STAVRAKAKIS, M.N. & KIMBRAS, C.B. Inheritance of polymorphic isoenzymes in grape cultivars. *Journal of Heredity*, Washington, 74(3):181-183, 1983.
- MANSHARDT, R.M. & WENSLAFF, T.F. Zygotic polyembryony in interspecific hybrids of *Carica papaya* and *C. cauliflora*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 114(4):684-689, 1989.
- MEDINA FILHO, C.P. Eletroforese em gel de amido: aplicações em genética e melhoramento de plantas. Campinas, Instituto Agronômico. 1983. 15p. (Circular, 121)
- & BALLVE, R.M.L. Protocolo laboratorial para preparação e corrida de géis de amido e revelação para isoenzimas vegetais. In: CURSO TEÓRICO-PRÁTICO DE ELETROFORESE, 5., Nova Odessa, 1989. Nova Odessa, Instituto de Zootecnia, 1989. 59p.
- MOORE, G.A. & CASTLE, W.S. Morphological and isozymic analysis of open-pollinated *Citrus* rootstock population. *Journal of Heredity*, Washington, 79(1):59-63, 1988.
- PARFITT, D.E.; ARULSEKAR, S. & RAMMING, D.W. Identification of plum x peach hybrids by isoenzyme analysis. *HortScience*, Alexandria, 20(2):246-248, 1985.
- ROOSE, M.L. Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in citrus breeding and systematics. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 6., Tel Aviv, 1988. *Proceedings*. Philadelphia Rehovot, Balaban, 1988. p.155-165.
- & TRAUGH, S.N. Identification and performance of citrus trees on nucellar and zygotic rootstocks. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 113(1):100-105, 1988.

- SHAW, C.R. & PRASAD, R. Starch gel eletrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochemical Genetics*, New York, 4:297-320, 1970.
- SOOST, R.K. & CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J. & MOORE, J.N., eds. *Advances in fruit breeding*. West Lafayette, Purdue University Press, 1975. p.507-540.
- & TORRES, A.M. Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 5., Tokyo, 1981. *Proceedings*. Tokyo, 1982. v.1, p.7-10.
- SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A. & SHANI, A. Peroxidase isozymes as a tool for early separation of nucellar and zygotic citrus seedlings. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 3., Orlando, 1977. *Proceedings*. Orlando, 1977. v.2, p.619-624.
- TANAKA, T. *Species problem in citrus: a critical study of wild and cultivated units of Citrus, based upon field studies in their native homes*. Tokyo, Japanese Society for the Promotion of Science, 1954. 152p.
- TANKSLEY, S.D. An efficient and economical design for starch gel electrophoresis. *Report of the Tomato Genetics Cooperative, Davis* (29):37-38, 1979.
- ; MEDINA FILHO, H.P. & RICK, C.M. The effect of isozyme selection on metric characters in an interspecific backcross of tomato: basis of an early screening procedure. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 60:291-296, 1981.
- ; ————— & —————. Use of naturally-occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. *Heredity*, London, 49(1):11-25, 1982.
- TORRES, A.M.; DIEDENHOFEN, U.; BERGH, B.O. & KNIGHT, R.J. Enzyme polymorphisms as genetic markers in the avocado. *American Journal of Botany*, Baltimore, 65(2):134-139, 1978a.
- ; MAU-LASTOVICKA, T.; WILLIAMS, T.E. & SOOST, R.K. Segregation distortion and linkage of *Citrus* and *Poncirus* isozyme genes. *Journal of Heredity*, Washington, 76(4):289-294, 1985.
- ; SOOST, R.K. & DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. *American Journal of Botany*, Baltimore, 65(8):869-881, 1978b.
- ; ————— & MAU-LASTOVICKA, T. Citrus isozymes: genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings. *Journal of Heredity*, Washington, 73(5):335-339, 1982.
- VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J., eds. *Isozymes in plant genetics and breeding: part A*. Amsterdam, Elsevier, 1983. p.469-516.
- WEEDEN, N.F. & LAMB, R.C. Identification of apple cultivars by isozyme phenotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 110(4):509-515, 1985.