

# IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE CITROS MEDIANTE POLIMORFISMO ENZIMÁTICO <sup>(1)</sup>

HAIKO ENOK SAWAZAKI <sup>(2,3,7)</sup>, LADASLAV SODEK <sup>(4)</sup>,  
ROSE MARY PIO <sup>(5)</sup> e GERD WALTER MÜLLER <sup>(6,7)</sup>

## RESUMO

Estudou-se, mediante polimorfismo enzimático em gel de poliacrilamida, a variabilidade genética das espécies de laranja-doce (*Citrus sinensis*); laranja-azedá (*C. aurantium*); tangerinas clementina (*C. clementina*), sunki (*C. sunki*), cleópatra (*C. reshni*) e poncã (*C. reticulata*); lima-da-pérsia (*C. limettoides*); limão-galego (*C. aurantifolia*); limão-cravo (*C. limonia*) e trifoliata (*Poncirus trifoliata*). Extratos de folhas foram analisados para as isoenzimas de malato desidrogenase (MDH), enzima málica (ME), leucino amino peptidase (LAP), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), fosfoglucoisomerase (PGI), fosfoglucomutase (PGM) e isocitrato desidrogenase (IDH). Verificou-se grande variabilidade genética interespecífica, porém nenhuma entre os cultivares de laranja-doce. Foram encontradas algumas aloenzimas, além das referidas pela literatura em gel de amido, como aquelas de uma região próxima ao loco conhecido por Pgm-1, responsável por proteínas monoméricas. Este sistema, denominado PGM, revelou a maior diferenciação entre as espécies, tendo apresentado duas regiões distintas com 9 alelos. No sistema MDH, foram considerados dois locos codificando para proteínas dimericas com 7 alelos; no ME, um loco com 3 alelos; no LAP, possivelmente dois locos responsáveis por proteínas monoméricas com 4 alelos; no GOT, dois locos com 7 alelos; no PGI, um loco com 3 alelos e no IDH, um loco com 4 alelos.

**Termos de indexação:** citros, isoenzimas, identificação de espécies.

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION OF CITRUS SPECIES BY MEANS OF ENZYMATIC POLYMORPHISM

The genetic diversity of citrus cultivars was studied by polyacrylamide gel electrophoresis on sweet orange (*C. sinensis*); tangerines (*C. clementina*, *C. sunki*, *C. reshni*, *C. reticulata*); Palestine lime (*C. limettoides*); West Indian lime (*C. aurantifolia*); Rangpur lime (*C. limonia*), Sour orange (*C. aurantium*) and *Poncirus trifoliata*. Citrus leaf extracts were analysed for isozymes of malate dehydrogenase (MDH), malic enzyme (ME), leucine aminopeptidase (LAP), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), phosphoglucose isomerase (PGI), phosphoglucose mutase (PGM) and isocitrate dehydrogenase (IDH). Interspecific differences were observed; but, none between intraspecific *C. sinensis* cultivars. Some allozymes were observed in addition to those referred in the literature on starch gel; e.g., allozymes located next to the known Pgm-1 loci. The PGM system revealed the best differentiation between the cultivars. It showed monomeric proteins and 9 alleles. The MDH system had two loci with 7 alleles; the ME system one locus with 3 alleles; the LAP system one possible locus next to the known Lap-1 and 4 alleles; the GOT two loci for dimeric proteins with 7 alleles; the PGI one locus with 3 alleles; and, the IDH one locus with 4 alleles.

**Index terms:** citrus, isozymes, cultivars identification.

<sup>(1)</sup> Recebido para publicação em 2 de janeiro e aceito em 23 de outubro de 1992.

<sup>(2)</sup> Seção de Fitoquímica, Instituto Agrônomo (IAC), Caixa Postal 28, 13001-970 Campinas (SP).

<sup>(3)</sup> Com auxílio da "International Foundation For Science" (IFS).

<sup>(4)</sup> Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, UNICAMP, Caixa Postal 6001, 13081-970 Campinas (SP).

<sup>(5)</sup> Seção de Citricultura, IAC.

<sup>(6)</sup> Seção de Virologia, IAC.

<sup>(7)</sup> Com bolsa de pesquisa do CNPq.

## 1. INTRODUÇÃO

Como o melhoramento exige manipulação de fontes genéticas e o estabelecimento de programas para recombinação das características desejáveis, é necessário, além do bom conhecimento acerca da organização genética de citros e do sistema de reprodução, uma coleção de germoplasma com características definidas para fornecimento do material para melhoramento. Nos trabalhos envolvendo cruzamentos de citros, um dos principais problemas é distinguir plantas nucelares e zigóticas nas progênies resultantes no estágio inicial de desenvolvimento. Como as variedades, na maioria, são apomíticas e poliembriônicas, ocorre em citros embrionia nucelar em que embriões assexuais se desenvolvem juntamente com embriões zigóticos. O melhorista depende das características vegetativas das plântulas, muitas vezes não discriminantes, tendo que esperar grande número de progênies frutificar para identificar os híbridos. É importante, assim, encontrar, em nível bioquímico, marcadores que permitem descrever a organização genética de citros ou predizer características fenotípicas. A eficácia dos marcadores para identificação dos cultivares depende do polimorfismo dos marcadores estudados, assim como do tipo de diversificação varietal, se decorrente de hibridizações ou mutações, visto que a hibridização modifica toda estrutura do genoma, enquanto a mutação, que ocasiona a modificação dos caracteres fisiológicos ou morfológicos do cultivar, provavelmente não seja decorrente da modificação das isoenzimas. As taxas de identificação de cultivares de citros são, portanto, diferentes, de acordo com as espécies. O presente estudo teve por finalidade obter e analisar zimogramas de vários sistemas isoenzimáticos em espécies e cultivares de citros, mediante géis de poliacrilamida, em vez de amido, que é mais comumente utilizado (Torres et al., 1978, 1982, 1985; Soost et al., 1980; Soost & Torres, 1981; Khan & Roose, 1988; Roose & Traugh, 1988; Ballvé et al., 1991). Trata-se de uma tentativa de melhorar a resolução de isoenzimas e permitir, assim, uma eficiente caracterização, com base em literatura específica, de alguns clones de citros provenientes da Seção de Virologia do Instituto Agrônomo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para caracterização enzimática, utilizaram-se folhas dos cultivares de laranja-doce: hamlin, natal, valência, pineapple, ruby, moro, pêra (*Citrus sinensis*); tangerina clementina (*C. clementina*); tangerina sunki (*C. sunki*); tangerina cleópatra (*C. reshni*); tangerina poncã (*C. reticulata*); lima-da-pérsia (*C. limettioides*); limão-galego (*C. aurantifolia*), limão-cravo (*C. limonia*), trifoliata (*Poncirus trifoliata*) e laranja-azedo (*C. aurantium*), retiradas de plantas desenvolvidas e mantidas em casa de vegetação. Foram utilizados os extratos frescos de folhas novas inteiramente expandidas, obtidas pela maceração em tampão tris-HCl 0,02M pH 7,4 com 12% de polivinilpirrolidona e 0,5% mercaptoetanol, correspondendo, em proteína, a cerca de 4 mg/ml. Aplicaram-se 50  $\mu$ l de cada amostra no gel de placa com 14 X 11 X 0,05 cm para eletroforese vertical e 10  $\mu$ l no gel 25 X 11 X 0,05 cm para eletroforese horizontal, sendo o vertical feito com ou sem gradiente de poliacrilamida de 4 a 11% e gel de sobreposição a 3,4%. A corrida eletroforética foi realizada de 10 a 20 mA por gel, dependendo do tampão e do sistema empregado durante cinco a seis horas. Foram examinados os sistemas enzimáticos isocitrato desidrogenase (IDH); malato desidrogenase (MDH); glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), leucinoaminopeptidase (LAP), enzima málica (ME), fosfoglucoisomerase (PGI) e fosfoglucomutase (PGM). Os sistemas de reação enzimática para coloração das bandas foram realizados de acordo com Torres et al. (1978, 1982).

Cada loco ou gene foi referido pela abreviatura da enzima específica, seguida por um número referente ao loco para o caso de mais de um gene para a mesma enzima. Os alelos foram denominados, de acordo com a velocidade de migração das aloenzimas, do mais rápido ao mais lento, de P, W, F, I, M, S e R.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No sistema vertical, que permite maior volume de amostra, as isoenzimas de LAP - 1 a 3 e 14 e 15 da Figura 1 - foram encontradas em duas regiões

distintas, em vez de apenas em uma conforme Torres et al. (1982), enquanto no sistema horizontal as bandas assemelharam-se às encontradas pelos mesmos autores. Observou-se que ocorreu na região mais lenta uma banda mais forte (FF) e duas muito fracas, sendo a mais intensa provavelmente a referida por Torres et al. (1982) como parte das bandas duplas com o genótipo SS. A presença deste possível genótipo FF com os alelos numa taxa de densidade diferente da 1:2:1, associada com o genótipo heterozigoto de uma enzima dimérica, é indicativa de que pode estar ocorrendo a duplicação dos locos ou poliploidia e que as subunidades polipeptídicas não estariam presentes em uma taxa 1:1. A região mais rápida, conhecida como *Lap-1* e caracterizada por Torres et al. (1982), apresentou nas laranjas-doce e tangerina clementina as três bandas com os alelos na taxa de densidade de 1:2:1. Considerando-se a ocorrência da duplicação das bandas, este loco heterozigoto com três bandas caracterizando uma enzima dímera, corresponderia, na realidade, ao heterozigoto de duas aloenzimas com parcial sobreposição das bandas duplas. Este genótipo, correspondente ao FS citado por Torres et al. (1982), ficou como tendo o genótipo hipotético FM. Os demais apresentaram o sistema de proteínas monoméricas com duplas bandas correspondentes aos genótipos FF para as tangerinas, laranja-azedo, lima-da-pérsia e limão-cravo, MM para o limão-galego e PP para o trifoliata.

As isoenzimas do sistema GOT ocorreram em duas regiões - Figura 2 - codificando para proteínas diméricas, semelhante ao observado em géis de amido. Na região mais lenta, o loco denominado *Got-1* por Torres et al. (1978) apresentou-se com os quatro

alelos P, F, M e S. O loco homozigoto, onde as subunidades de apenas um tipo homodimerizam para formar um só tipo de enzima, foi observado nas laranjas doce e azeda e nas tangerinas com os genótipos homozigotos SS e no limão-galego com o FF. As demais apresentaram as três bandas do genótipo heterozigoto que produz dois tipos de subunidades, formando três aloenzimas: dois homodímeros e um heterodímero de migração intermediária. A lima-da-pérsia e o limão-cravo, o genótipo FS, e o trifoliata, o PM. As aloenzimas de migração mais rápida correspondentes ao gene *Got-2* apresentaram no limão-cravo três bandas e nos outros cultivares apenas duas. Torres et al. (1978) consideraram as duas e as três bandas pertencentes a um mesmo loco simples. Soost & Torres (1978) consideraram a hipótese de o gene *Got-2* ser um loco duplicado com formação de heterodímero intraloco, que foi considerada não definitiva, porém, seguida por Ballvé et al. (1991). Como, em trabalho posterior, Torres et al. (1985) interpretaram o gene *Got-2* como sendo um loco simples, seguiu-se esta referência. O limão-cravo apresentou, portanto, o genótipo FS; as laranjas doce e azeda e as tangerinas, o FM, e a lima-da-pérsia, o trifoliata e o limão-galego, o MS.

As isoenzimas do sistema PGI - Figura 3 - apresentaram pelo menos duas bandas bem definidas catodicamente em relação às duas regiões relatadas pela literatura. A região mais rápida apresentou-se pouco resolvida, com uma ou mais bandas, de acordo com a literatura. Na região intermediária, denominada *Pgi-1* pela literatura (Torres et al., 1978; Soost & Torres, 1982; Moore & Castle, 1988; Roose & Traugh, 1988; Ballvé et al., 1991), as laranjas doces,

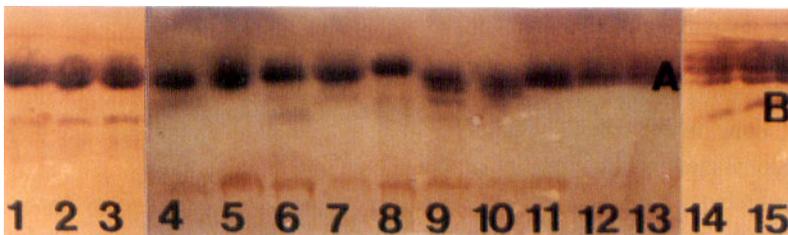


Figura 1. Zimograma de LAP. Início na parte inferior, ânodo no topo: 1 = 2 = 3 = tangerinas sunki, cleópatra e poncã, com possível genótipo FF(B) e *Lap-1*(A); 4 = laranja-azedo F1F1; 5 = limão-galego M1M1; 6 = limão-cravo F1F1; 7 = lima-da-pérsia F1F1; 8 = trifoliata P1P1; 9 = laranja-doce F1M1; 10 = tangerina clementina F1M1; 11 = 12 = 13 = tangerina sunki, poncã e cleópatra F1F1; 14 = laranja-doce FF e F1M1; 15 = tangerina clementina FF e F1M1.

trifoliata, lima-da-pérsia e limão-cravo apresentaram as três bandas do sistema de proteínas diméricas do genótipo heterozigoto FS e a laranja-azedada e a tangerina clementina as do WS. As demais apresentaram a banda da aloenzima homodímera do genótipo homozigoto SS para o limão-galego e FF para as outras tangerinas.

Considerando-se que as isoenzimas do sistema MDH (Figura 4) são codificadas na forma dímera em dois locos parcialmente sobrepostos e não formam heterodímeros interlocos, efetuaram-se pequenas alterações na denominação dos alelos com relação aos conhecidos, para referência das bandas encontradas. Na região mais rápida, correspondente ao loco *Mdh-2*, o homozigoto de uma banda denominado FF por Torres et al. (1982) nas laranjas e tangerinas, ficou como sendo MM pelo fato de serem considerados os alelos F(3,4), M(3,2) e S(2,5), em vez de apenas os alelos F e S do mesmo autor. Os heterozigotos de três bandas no trifoliata, lima-da-pérsia, limão-galego e limão-cravo foram, respectivamente, FS, FS, FM e FF. Na região média do gene *Mdh-1*, foram considerados os dois alelos I e M também relatados por Moore & Castle (1988), sendo observados os alelos F(3,2), I(3,0), M(2,6) e S(2,2). O trifoliata, a lima-da-pérsia, o limão-galego e o limão-cravo apresentaram as três bandas dos genótipos heterozigotos FS, FS, MS e IS respectivamente.

As isoenzimas do sistema PGM - Figura 5 - apresentaram-se como monoméricas em duas regiões com uma ou duas bandas. Como, pelos estudos de Torres et al. (1978), o sistema PGM foi codificado por um gene simples que controla a produção de proteínas monoméricas e neste trabalho foram encontradas de duas a quatro bandas, considerou-se a hipótese da existência de outro gene, além do *Pgm-1* relatado pela literatura. O *Pgm-1* apresentou-se na região mais rápida, de acordo com Torres et al. (1982), com os alelos F, I, P, M e S. Os sistemas heterozigotos das laranjas doce e azeda, lima-da-pérsia, limão-galego, trifoliata e tangerina clementina apresentaram os genótipos FS, FS, FS, FM, PM e FI respectivamente. As outras tangerinas e o limão-cravo apresentaram a banda do genótipo homozigoto FF. Na região *Pgm-2*, provavelmente o

mesmo loco observado migrando catodicamente em relação ao anterior e mais intensamente em tecidos de floema do que folha, por Roose & Traugh (1988), as laranjas doce e azeda e o limão-galego apresentaram duas bandas com os alelos F e S, F e R e F e S respectivamente, enquanto as demais, uma banda com os alelos S no limão-cravo, lima-da-pérsia e tangerinas sunki e cleópatra; F, nas tangerinas clementina e poncã, e P, no trifoliata. Este sistema apresentou maior diferenciação entre as espécies, tendo diferenciado, juntamente com PGI, a tangerina clementina da laranja-doce.

As isoenzimas do sistema ME - Figura 6 - das espécies estudadas apresentaram-se em duas regiões, com a mais rápida de coloração muito fraca, de acordo com Torres et al. (1978). A região mais lenta correspondeu ao conhecido gene *Me-1*, responsável por proteínas monoméricas, onde o trifoliata se apresentou com as duas bandas do heterozigoto FR, e as demais, com uma banda do genótipo homozigoto II.

No sistema IDH - Figura 7, as isoenzimas apresentaram-se como diméricas com os quatro alelos S, M, I e F, em uma região, confirmando os dados de Torres et al. (1982). O limão-cravo, o limão-galego e a lima-da-pérsia apresentaram as três bandas do heterozigoto IS, enquanto a laranja-doce e a tangerina clementina, as do heterozigoto IM. O trifoliata, as tangerinas e a laranja-azedada, uma banda dos genótipos homozigotos FF, II e II respectivamente.



Figura 2. Zimograma de GOT. Início na parte inferior, ânodo no topo: 1 = limão-galego com *Got-1*(A): F1F1 e *Got-2*(B): M2S2; 2 = limão-cravo F1S1 e F2S2; 3 = trifoliata P1M1 e M2S2; 4 = lima-da-pérsia F1S1 e M2S2; 5 = 6 = 7 = 8 = 9 = 10 = laranja-azedada e laranja-doce, tangerinas clementina, sunki, cleópatra e poncã S1S1 e F2M2.

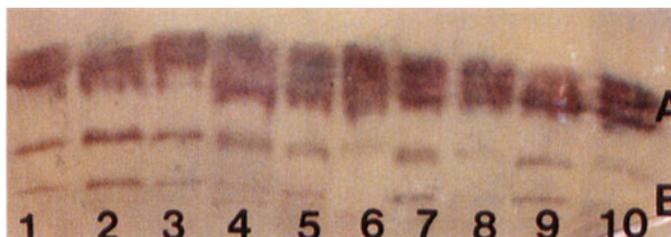


Figura 3. Zimograma de PGI. Início na parte inferior, ânodo no topo. 1 = 2 = 3 = tangerinas cleópatra, sunki e poncã com Pgi-1(A) = FF e bandas não relatadas (B); 4 = tangerina clementina WS; 5 = 6 = 7 = 8 = laranja-doce, trifoliata, limão-cravo e lima-da-pérsia FS; 9 = limão-galego SS; 10 = laranja-azeda WS.

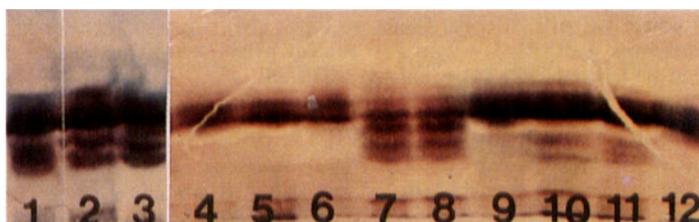


Figura 4. Zimograma de MDH. Início na parte inferior, ânodo no topo. 1 = limão-galego com Mdh-1: M1S1 e Mdh-2: F2F2; 2 = limão-cravo I1S1 e F2F2; 3 = lima-da-pérsia F1S1 e F2S2; 4 = 5 = 6 = tangerinas sunki, cleópatra e poncã I1I1 e M2M2; 7 = 8 = trifoliata F1S1 e F2S2; 9 = tangerina clementina I1I1 e M2M2; 10 = limão-cravo I1S1 e F2F2; 11 = limão-galego M1S1 e F2M2; 12 = laranja-doce I1I1 e M2M2.

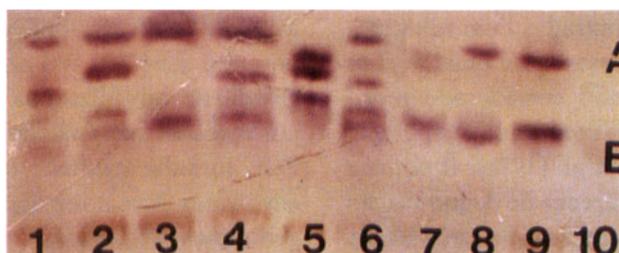


Figura 5. Zimograma de PGM. Início na parte inferior, ânodo no topo. 1 = laranja-azeda com Pgm-1(A): F1S1 e Pgm-2(B): F2R2; 2 = limão-galego F1M1 e F2S2; 3 = limão-cravo F1F1 e S2S2; 4 = lima-da-pérsia F1S1 e S2S2; 5 = trifoliata P1M1 e P2P2; 6 = laranja-doce F1S1 e F2S2; 7 = tangerina clementina F1I1 e F2F2; 8 = tangerina sunki F1F1 e S2S2; 9 = tangerina poncã F1F1 e F2F2; 10 = tangerina cleópatra F1F1 e S2S2.

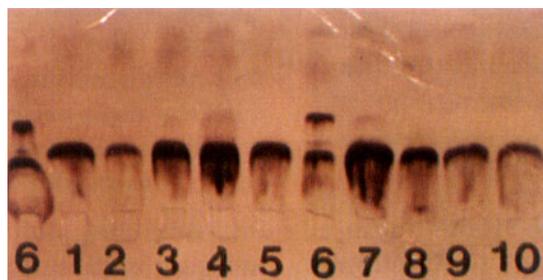


Figura 6. Zimograma de ME. Início na parte inferior, ânodo no topo. 1 = 2 = 3 = 4 = 5 = laranja-doce, laranja-azeda, limão-cravo, lima-da-pérsia, tangerina clementina com Me-1(A): I1I1; trifoliata F1R1; 7 = 8 = 9 = 10 = limão-galego, tangerinas sunki, poncã e cleópatra I1I1.



Figura 7. Zimograma de IDH. Início na parte inferior, ânodo no topo. 1 = tangerina clementina com *Idh-1(A)*: IM; 2 = 3 = 4 = tangerinas sunki, cleópatra, poncã II; 5 = 6 = 7 = lima-da-pérsia, limão-cravo, limão-galego IS; 8 = laranja-doce IM; 9 = laranja-azedada II; 10 = trifoliata FF; 11 = lima-da-pérsia IS.

Os dados apresentados sugerem a diversidade genética entre as espécies estudadas, indicando a facilidade de identificação mediante polimorfismo enzimático. Embora não tenham sido realizadas análises das gerações após cruzamento interespecífico para confirmação dos sistemas genéticos, verificou-se que apenas ocorreram mais aloenzimas, sendo pequenas as diferenças encontradas com relação à literatura. O sistema PGM apresentou duas regiões distintas de aloenzimas, sendo considerado teoricamente um loco adicional ao conhecido *Pgm-1*, que foi semelhante ao de Torres et al. (1978). O sistema MDH apresentou alguma diferença de denominação dos alelos porque foram considerados três alelos não relatados por Torres et al. (1982). O LAP foi também considerado como monomérico (Torres et al. (1982), com a diferença de que o loco heterozigoto de duas aloenzimas duplas apresentou apenas três bandas, em vez das quatro, pois a quarta banda mostrou-se como sendo de outro loco. Embora o PGI tenha apresentado mais aloenzimas, o loco considerado foi similar ao da literatura. Os demais sistemas mostraram-se de acordo com a literatura.

A lima-da-pérsia e o limão-cravo tiveram perfis semelhantes no *Got-1*, *Lap-1*, *Idh-1*, *Pgi-1* e *Me-1*, indicando um relacionamento entre ambas as espécies. O limão-galego mostrou perfil diferente das demais nos sistemas *Got-1* e *Got-2*, *Lap-1*, *Mdh-1* e *Mdh-2* e *Pgi-1* e semelhante ao da lima-da-pérsia nos genes *Pgm-2*, *Me-1* e *Idh-1* e ao limão-cravo

no *Idh-1* e no *Me-1*, sugerindo a provável procedência do limão-cravo e da lima-da-pérsia a partir de hibridizações do limão-galego. As isoenzimas da tangerina clementina assemelharam-se mais às da laranja-doce, pois foram diferentes apenas no sistema PGM e PGI, indicando a procedência a partir de hibridizações entre tangerinas que possuam o alelo W e laranjas-doces. Se a tangerina clementina possui o genótipo WS no sistema PGI e se for originada de hibridizações entre tangerinas e laranjas-doces, as quais não possuem o alelo W no sistema PGI, torna-se evidente que as supostas tangerinas envolvidas devem ter o alelo W na sua constituição genotípica. Segundo a literatura, encontram-se pelo menos duas tangerinas que possuem o alelo W: Hansen e mexerica-do-rio (Torres et al., 1978).

Considerando-se dez locos em sete sistemas enzimáticos, o número de alelos por loco - Quadro 1 - foi alto para trifoliata, limão-cravo e lima-da-pérsia; médio para laranja-doce e azeda e limão-galego e baixo para as tangerinas, enquanto a taxa de heterozigosidade foi alta para a lima-da-pérsia, trifoliata, limão-galego e laranja-doce; média para a laranja-azedada, a tangerina clementina e o limão-cravo e baixa para as tangerinas em geral.

A ausência de identificação pelas isoenzimas entre as variedades de *C. sinensis*, apesar do número médio de alelos por loco e alta heterozigosidade, sugere que a origem da diversificação varietal pode ser decorrente de mutação. Por outro lado, a ocor-

rência de diferenças entre as tangerinas clementina e poncã em relação à sunki e à cleópatra, apesar do baixo número de alelos por loco e baixa heteroziguidade, confirma que a diversificação varietal

das tangerinas foi oriunda de hibridização. As bandas excedentes encontradas em relação à literatura em gel de amido confirmam o maior poder de resolução do gel de poliácridamida.

Quadro 1. Avaliação da diversidade interespecífica de citros com dez locos enzimáticos

Locos	Espécies <sup>(1)</sup>									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Número de alelos por loco									
	1,90	1,80	1,20	1,20	1,20	2,30	2,00	2,20	2,20	1,50
	Heteroziguidade									
<i>Got-1</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Got-2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pgi-1</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>Mdh-1</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>Mdh-2</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Lap-1</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Me-1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Idh-1</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Pgm-1</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Pgm-2</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+

<sup>(1)</sup> 1: *Citrus sinensis*; 2: *C. clementina*; 3: *C. sunki*; 4: *C. reshni*; 5: *C. reticulata*; 6: *C. limettioides*; 7: *C. aurantifolia*; 8: *C. limonia*; 9: *Poncirus trifoliata*, e 10: *C. aurantium*.

#### 4. CONCLUSÕES

1. A diversidade genética entre as espécies de citros indicou a facilidade de identificação pelo polimorfismo enzimático.

2. A ausência de diversidade do polimorfismo enzimático entre os cultivares de *C. sinensis*, apesar do número médio de alelos por loco e da alta heteroziguidade, confirmou a origem da diversificação varietal decorrente de mutação.

3. Verificou-se o polimorfismo enzimático indicativo da procedência de limão-cravo e lima-da-pérsia a partir do limão-galego (*C. aurantifolia*) e da procedência da tangerina clementina a partir da laranja-doce (*C. sinensis*).

4. O sistema PGM foi o que mais diferenciou as espécies de citros.

5. A observação de bandas não relatadas pela literatura comprovou o alto grau de resolução do gel de poliácridamida.

6. A ocorrência de diferenças entre as tangerinas, apesar do baixo número de alelos por loco e da baixa heteroziguidade, ratificou a origem da diversificação varietal decorrente de hibridação.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALLVÉ, R.S.L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; SIQUEIRA, W.J.; TEÓFILO SOBRINHO, J. & POMPEU JÚNIOR, J. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros. *Bragantia*, Campinas, 50(1):57-76, 1991.
- KHAN, I.A. & ROOSE, M.L. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliolate orange. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 13(1):105-110, 1988.
- MOORE, G.A. & CASTLE, W.S. Morphological and isozymic analysis of open pollinated citrus rootstock populations. *Journal of Heredity*, Buckeystown, 79(1):59-63, 1988.
- ROOSE, M.L. & 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.
- SOOST, R.K. & 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.
- SOOST, R.K.; WILLIAMS, T.E. & TORRES, A.M. Identification of nucellar and zygotic seedlings of Citrus with leaf isozymes. *HortScience*, Alexandria, 15(6):728-729, 1980.
- TORRES, A.M.; MAU-LASTOVICKA, T.; WILLIAMS, T.E. & SOOST, R.K. Segregation distortion and linkage of citrus and poncirus isozyme genes. *Journal of Heredity*, Washington, D.C., 76:289-294, 1985.
- TORRES, A.M.; SOOST, R.K. & DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetic markers in Citrus. *American Journal of Botany*, Baltimore, 65(8):869-881, 1978.
- TORRES, A.M.; SOOST, R.K. & MAU-LASTOVICKA, T. Citrus isozymes: genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings. *Journal of Heredity*, Washington, D.C., 73(5):335-339, 1982.