

## VARIABILIDADE ISOENZIMÁTICA EM PROGÊNIOS DE BIÓTIPOS APOMÍTICOS DE *PASPALUM DILATATUM* (POACEAE)

### ISOENZYMATIC VARIABILITY IN SIB SEEDLINGS OF APOMICTIC BIOTYPES OF *PASPALUM DILATATUM* (POACEAE)

Luciane Gauer<sup>1</sup> Maria Helena Albarus<sup>1</sup> Suzana Cavalli-Molina<sup>2</sup>

#### RESUMO

*Paspalum dilatatum*, espécie de alto valor forrageiro, apresenta uma ampla variedade de biótipos, tendo formas sexuais e apomíticas. Os biótipos *P. dilatatum* anteras roxas e Torres são descritos como tendo reprodução assexuada por apomixia, conclusão esta baseada apenas em análises citológicas do saco embrionário. O presente trabalho teve como objetivo confirmar o modo de reprodução destes dois biótipos, analisando a ocorrência de variabilidade entre plântulas-irmãs e entre endospermas, através de eletroforese de isoenzimas. Os sistemas de IDH, ME, PGM, SOD e GOT não foram informativos por não apresentarem polimorfismo intra-específico ou dentro de cada biótipo. Para o sistema das AMI, observou-se grande variação isoenzimática entre os endospermas de sementes de uma mesma linhagem, com ausência de variação entre as plântulas-irmãs, o que poderia sugerir a ocorrência de pseudogamia. Entretanto, para os sistemas das MDH e PER foi observado a ocorrência de variabilidade na progênie de plantas individuais, o que pode ser indicativo de segregação gênica e sugerir a ocorrência de reprodução sexual.

**Palavras-chave:** *Paspalum dilatatum*, apomixia, isoenzimas, testes de progênie.

#### SUMMARY

*Paspalum dilatatum* is a plant species of high forage value with a wide range of biotypes, with sexual and apomictic types. Purple-anthered and Torres biotypes are described as apomictic based only on cytological analysis of embryonic sac. The present research aimed at analyzing the occurrence of variability among sib seedlings and endosperms of these biotypes through gel electrophoresis. Enzymatic systems of GOT, IDH, ME, PGM, and SOD were not informative because they did not show intra-specific or intra-biotype polymorphism. AMY revealed large isoenzymatic variation among endosperms from the same strain but without variation among sib seedlings. This could suggest occurrence of pseudogamy. However, for

MDH and PER, the occurrence of variability among sib seedlings was observed, which can be indicative of genic segregation and suggests the occurrence of sexual reproduction.

**Key words:** *Paspalum dilatatum*, apomixis, isoenzymes, progeny tests.

#### INTRODUÇÃO

O gênero *Paspalum* ocupa um lugar de destaque entre as gramíneas brasileiras por reunir o maior número de espécies nativas e o maior número de espécies com alto valor forrageiro (VALLS, 1987), constituindo importante alimento para o gado. Também apresenta papel relevante na conservação do solo, principalmente em zonas litorâneas. Suas sementes servem de alimento para um grande número de pássaros e é utilizado no fabrico do papel (PRESTES *et al.*, 1976). O gênero *Paspalum* apresenta um total de 20 grupos taxonômicos (BARRETO, 1974), dos quais o grupo Dilatata é de grande interesse para a área subtropical, onde convivem biótipos sexuais e apomíticos de três espécies: *P. dilatatum*, *P. urvillei* e *P. pauciciliatum* (VALLS & POZZOBON, 1987).

A espécie *P. dilatatum*, objeto de estudo deste trabalho, apresenta grande importância forrageira, principalmente em solos úmidos no sul do Brasil (MORAES-FERNANDES, 1971), apresentando uma ampla variedade de biótipos. Estes biótipos distinguem-se pelo nível de ploidia, modo de reprodução, características morfológicas e

<sup>1</sup>Biólogo, Mestre em Genética.

<sup>2</sup>Biólogo, Doutor em Ciências (Genética), Professor Adjunto, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS. E-mail: suzana.molina@ufrgs.br. Autor para correspondência.

área de distribuição. Entre os biótipos assexuais destaca-se *P. dilatatum* comum ou anteras roxas e *P. dilatatum* Torres. *P. dilatatum* comum possui anteras roxas, 50 cromossomos, sendo descrito na literatura como tendo reprodução assexual por apomixia obrigatória, do tipo aposporia, com ocorrência de pseudogamia (BASHAW & FORBES Jr., 1958). Este biótipo representa uma forrageira amplamente adaptada às condições ecológicas do sul da América do Sul. Embora possua excelentes características forrageiras, apresenta alta suscetibilidade ao ataque do fungo *Claviceps paspali*, baixa viabilidade do pólen e baixa qualidade de sementes (BASHAW & FORBES Jr., 1958). Esta última característica é a maior limitação para seu uso extensivo como forrageira cultivada. *P. dilatatum* Torres apresenta anteras amarelas com bordos roxos e possui 60 cromossomos. MORAES-FERNANDES (1971) citou que seu modo de reprodução deve ser apomítico, sendo que, na análise de óvulos de um acesso deste biótipo, BURSON *et al.* (1991) encontraram somente sacos embrionários apomíticos apospóricos com a ocorrência de pseudogamia.

A apomixia é um método geneticamente controlado de reprodução em plantas, em que o embrião desenvolve-se a partir de divisões mitóticas de células do óvulo, ocorrendo a formação de sementes férteis, sem haver a união do gameta feminino com o masculino como na reprodução sexual. Na apomixia do tipo apospórico, o embrião desenvolve-se a partir de alguma célula somática do óvulo, diferente da célula-mãe do megásporo, formando um saco embrionário não-reduzido. Como o embrião apospórico se origina a partir de divisões mitóticas de uma célula somática, ele possui exatamente o mesmo complemento cromossômico e constituição genética da planta-mãe. Devido a isto, a aposporia suprime a troca de genes, levando a heterozigose fixada. Em muitas formas de aposporia, ocorre a fecundação dos núcleos polares do saco embrionário por um núcleo do grão de pólen levando a formação do endosperma, sem ocorrer a fecundação da oosfera, fenômeno este denominado de pseudogamia (BASHAW, 1980).

SAVIDAN (1987) indicou a necessidade de estudar melhor a natureza do modo de reprodução de cada espécie do gênero *Paspalum*, porque sua determinação foi baseada apenas em análises citológicas de sacos embrionários. Embora observações sobre a origem e o desenvolvimento da célula que origina o embrião sejam essenciais para identificar o mecanismo de reprodução, elas não indicam qual a frequência de sementes sexuais e

assexuais formadas em apomíticos facultativos. Esta informação só é obtida pela observação da porcentagem de plantas idênticas à planta-mãe entre a descendência.

O interesse em se detectar algum nível de sexualidade em plantas apomíticas reside no fato de que a apomixia obrigatória não permite a realização de programas convencionais de melhoramento genético. E, no caso específico dos biótipos estudados, isso seria particularmente interessante para a melhoria na produção da qualidade das sementes. No momento que são encontradas plantas sexuais com características agrônômicas desejáveis, elas podem servir como plantas femininas que receberão o pólen de uma planta apomítica. Neste caso, ocorrerá a segregação de indivíduos sexuais e apomíticos na F<sub>2</sub> e, entre os apomíticos, poderão ser selecionadas as plantas com as características desejáveis. A reprodução assexual se encarregará de manter tais características ao longo das gerações.

A eletroforese de isoenzimas tem sido um importante instrumento na análise do modo de reprodução de diversos organismos, por permitir analisar a ocorrência de variabilidade genética entre plântulas-irmãs. O propósito deste trabalho é verificar a ocorrência de variabilidade genética entre indivíduos irmãos e/ou a ocorrência de pseudogamia nos biótipos anteras roxas e Torres de *P. dilatatum*, através de eletroforese de isoenzimas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas plântulas-irmãs de 10 linhagens (plantas obtidas a partir de uma única planta-mãe da natureza) de *Paspalum dilatatum* anteras roxas e 13 linhagens de *P. dilatatum* Torres (Tabela 1).

As plântulas foram obtidas a partir da germinação de sementes de plantas coletadas em diferentes pontos dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. As sementes foram desinfectadas com líquido de Dakin (solução de hipoclorito de sódio com teor aproximado de 1% de cloro ativo), escarificadas com nitrato de potássio 0,2%, semeadas em placas de Petri e mantidas na presença permanente de luz e à temperatura constante de 32°C. Cada plântula foi congelada quando apresentava a primeira folha com aproximadamente 2,5cm de comprimento.

Para os testes de progênie, foi analisada a ocorrência de variabilidade entre plântulas irmãs (média de 16 plântulas por linhagem), através de seus padrões isoenzimáticos de oito sistemas: malato desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD), enzima málica (ME), isocitrato

Tabela 1 - Origem, número de plantas analisadas (N), indicação de variabilidade (S) ou não (ñ) dentro da progênie (Segr), para os sistemas enzimáticos malato desidrogenase (MDH), amilase (AMI) e peroxidase (PER), das linhagens analisadas de *P. dilatatum* anteras roxas e Torres. Porto Alegre, RS, 2000.

BIÓ-TIPO	LINHA-GEM <sup>(1)</sup>	ORIGEM		MDH	AMI <sup>(2)</sup>	PER <sup>(2)</sup>
A N T E R A S	V8067	Ubirici (SC)	N	-	50(e)	22(f)
			Segr	-	S	S
	V8132	Bom Retiro (SC)	N	9	-	-
			Segr	S	-	-
	V8214	Curitibanos (SC)	N	-	7(e)	-
			Segr	-	S	-
	V11297	Ponta Grossa (SC)	N	12	-	-
			Segr	S	-	-
	V11956	Lages (SC)	N	17	-	8(f)8(e)
			Segr	S	-	S ñ
	V12030	Lages (SC)	N	9	8(f)2(e)	8(f)8(e)
			Segr	S	ñ ñ	S S
R O X A S	V12031	Lages (SC)	N	-	8(f)5(e)	8(f)4(e)
			Segr	-	ñ ñ	S ñ
	V12049	Lages (SC)	N	-	8(f)8(e)	8(f)8(e)
			Segr	-	ñ ñ	S S
S	MD274	Campo Belo (SC)	N	-	32(e)	26(f)
			Segr	-	S	S
	MD403	Mafra (SC)	N	-	47(e)	30(f)
			Segr	-	S	S
T O R R E S	V4019	Osório (RS)	N	-	25(e)	34(f)54(e)
			Segr	-	S	S S
	V4020	Osório (RS)	N	10	-	-
			Segr	S	-	-
	V4032	Torres (RS)	N	-	-	-
			Segr	-	-	-
	V4441	São Joaquim (SC)	N	-	-	-
			Segr	-	-	-
	V8120	Alfredo Wagner (SC)	N	-	34(e)	-
			Segr	-	S	-
	V8262	Lages (SC)	N	17	11(e)	18(f)6(e)
			Segr	S	S	ñ ñ
R	V10113	Laguna (SC)	N	9	21(f)21(e)	11(f)33(e)
			Segr	ñ	ñ S	ñ S
E	V11103	Balsa Nova (SC)	N	23	-	-
			Segr	ñ	-	-
S	V11146	Quatro Barros (SC)	N	9	-	-
			Segr	S	-	-
	V12000	Alfredo Wagner (SC)	N	17	-	-
			Segr	S	-	-
	V12003	Alfredo Wagner (SC)	N	24	7(f)7(e)	4(f)7(e)
			Segr	S	ñ S	ñ ñ
	V12005	Alfredo Wagner (SC)	N	12	-	7(f)6(e)
			Segr	S	-	ñ S
	V12021	Alfredo Wagner (SC)	N	31	17(f)15(e)	8(f)7(e)
			Segr	S	ñ S	S ñ

<sup>(1)</sup> número do coletor= V: José F. Montenegro Valls – CENARGEN-EMBRAPA, MD: Miguel Dall'Agnol – EMPASC.

<sup>(2)</sup> (f)=primeira folha; (e)=endosperma.

desidrogenase (IDH), fosfoglicoisomerase (PGM), glutamato oxalacetato transaminase (GOT), peroxidase (PER) e amilase (AMI). A análise eletroforética foi realizada em géis de

poliacrilamida, utilizando-se diferentes condições de migração para cada sistema enzimático. GOT: gel a 7% e tampões descritos por POULIK (1957); IDH: gel a 8% e tampões citados por COUSINEAU & DONNELLY (1992); ME: gel a 7% e tampões de SCANDALIOS (1969); PER: gel a 6% e 8% e tampões de SCANDALIOS (1969); MDH e SOD: gel a 7% e tampões de ROOSE & GOTTLIEB (1976); PGM: gel a 7% e tampões de SOLTIS *et al.* (1983); AMI: gel a 8% e tampões de SCANDALIOS (1969).

As colorações histoquímicas utilizadas foram feitas de acordo com os seguintes autores: GOT: VALLEJOS (1983), modificada; IDH: GASTONY & GOTTLIEB (1982); ME: SOLTIS *et al.* (1983); PER: GOTTLIEB (1973); MDH e SOD: BREWER (1970); PGM: SOLTIS *et al.* (1983); AMI: CHAO & SCANDALIOS (1972), modificada.

O tecido analisado da plântula foi a primeira folha (para todos os sistemas enzimáticos). Para AMI e PER, também foi analisado o endosperma. O padrão eletroforético da planta-mãe foi analisado em um pedaço da ponta de uma folha jovem. A ocorrência de variabilidade em cada progênie, típica da reprodução sexual, foi inferida pela análise de plântulas-irmãs e a ocorrência de pseudogamia pela ocorrência de variabilidade entre endospermas de sementes da mesma progênie.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sistemas enzimáticos IDH, ME, SOD, PGM e GOT não apresentaram polimorfismo, tendo todas as plantas analisadas mostrado padrões eletroforéticos idênticos, o que tornou estes sistemas não informativos quanto à ocorrência de eventos sexuais de reprodução nos dois biótipos considerados apomíticos, pois mesmo que ocorresse algum evento de reprodução sexual nestas plantas, este não seria detectado por eletroforese.

Para o sistema MDH, verificaram-se basicamente três padrões eletroforéticos distintos. Cada padrão é caracterizado pela presença de duas ou três bandas eletroforéticas, possivelmente uma

isoenzima principal e outra(s) secundária(s), que apresentam diferentes mobilidades eletroforéticas em diferentes indivíduos. Foi observada a ocorrência de dois ou três padrões distintos na progênie de uma mesma planta-mãe, o que pode ser indicativo de segregação gênica (Figura 1A e Tabela 1). Entretanto, não foi detectada a ocorrência de nenhum padrão que correspondesse a um genótipo heterozigoto, com duas ou três bandas principais (ou mais por se tratar de poliplóides). Isto pode indicar que a segregação não está ocorrendo no loco estrutural de MDH, que possuiria interação alélica de co-dominância, mas num loco modificador onde os alelos apresentariam interação de dominância x recessividade, e o padrão eletroforético do genótipo dominante seria o mesmo que o do heterozigoto. A presença de um alelo específico neste gene modificador causaria alterações pós-síntese na molécula enzimática, alterando assim sua mobilidade eletroforética. As folhas da planta adulta não apresentaram atividade para MDH.

A atividade amilásica na primeira folha foi baixa, com um total de três bandas detectadas. O padrão obtido foi constante, não havendo variação nem entre, nem dentro das progênies. Para o endosperma, observaram-se 19 bandas, a maioria delas com boa resolução e forte atividade. Entretanto, devido a complexidade dos padrões (sistema com grande número de bandas e organismos poliplóides), não foi possível determinar o controle genético das isoenzimas de AMI. Independente da determinação do controle genético, a presente análise detectou grande variabilidade entre endospermas de sementes da

mesma linhagem (Figura 1B e Tabela 1). A ocorrência de variabilidade nos endospermas associada à ausência de variabilidade nas plântulas-irmãs da mesma linhagem, sugere a ocorrência de pseudogamia, ou seja, apesar da oosfera não ser fecundada pelo núcleo do grão de pólen, os núcleos polares do saco embrionário são fecundados para formar o endosperma. Deste modo, não há variação entre plântulas, mas há variação entre os endospermas de sementes irmãs. Entretanto, a ausência de variabilidade entre plântulas-irmãs associada à presença de variação no endosperma não indica obrigatoriamente a não ocorrência de nenhum evento sexual. Isto pode ser devido à falta de polimorfismo nos poucos locos de AMI ativos na folha.

Para o sistema PER foram detectadas 24 bandas eletroforéticas, ocorrendo grande variação entre plântulas-irmãs, tanto para o biótipo anteras roxas como para o biótipo Torres (Figura 1C e Tabela 1). As diferenças entre plântulas-irmãs foram tanto em nível quantitativo, ou seja, diferenças na intensidade de uma mesma banda entre diferentes indivíduos, quanto em nível qualitativo, caracterizada pela presença e ausência de bandas, bem como pela substituição de uma banda por outra em indivíduos distintos de uma mesma progênie, o que pode estar refletindo a ocorrência de segregação gênica. Estes resultados sugerem a ocorrência de eventos de reprodução sexual nos dois biótipos analisados de *P. dilatatum*. No endosperma, a atividade peroxidásica foi menor, com um total de 12 bandas. Variação entre endospermas da mesma linhagem também foi encontrada. Também em PER, a complexidade dos padrões obtidos não permitiu determinar o controle genético das bandas analisadas e, conseqüentemente, não foi possível confirmar a origem desta variabilidade.

O fato de ter sido encontrada variação isoenzimática entre os endospermas de certas linhagens, para AMI, enquanto que para a primeira folha foi observado um padrão constante, poderia sugerir a ocorrência de apomixia com pseudogamia. Entretanto, a ocorrência de variação isoenzimática entre indivíduos irmãos, para os sistemas MDH e PER, enfraquece esta hipótese e fornece evidências da ocorrência de eventos sexuais de reprodução.

Considerando que a variabilidade encontrada nos biótipos anteras roxas e Torres é realmente devida à reprodução sexual (evidências mostradas na presente análise), haveria uma elevada taxa de sexualidade para os mesmos. Em *P. dilatatum* anteras roxas, 100% das progênies analisadas para MDH e/ou PER apresentaram variação, e no biótipo Torres, 89%. Devido ao fato

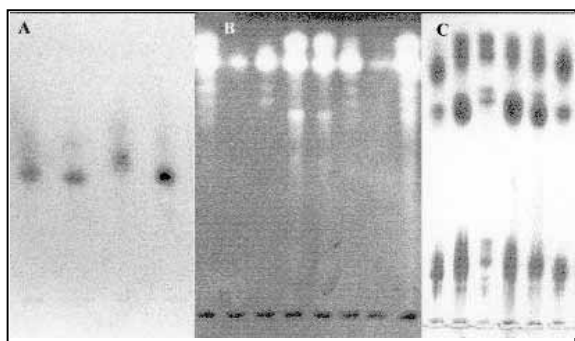


Figura 1 - Padrões isoenzimáticos de diferentes linhagens dos biótipos anteras roxas e Torres de *P. dilatatum*, mostrando a ocorrência de variabilidade. A, padrões de MDH de 4 indivíduos irmãos da linhagem V12005 (biótipo Torres), B, padrões de AMI de 8 endospermas da linhagem V8067 (antenas roxas), C, padrões de PER de 6 plântulas-irmãs da linhagem MD403 (antenas roxas). Porto Alegre, RS, 2000.

dos biótipos anteras roxas e Torres de *P. dilatatum* serem descritos como apomíticos, sendo o primeiro considerado apomítico obrigatório, não seria esperado encontrar variabilidade em suas progênes. Entretanto, no presente trabalho foi detectada variabilidade entre plântulas-irmãs, embora não tenha sido possível definir sua origem. Poder-se-ia relacionar a ocorrência de variabilidade isoenzimática nestas plântulas com modificações na expressão gênica devido a variações ambientais. Entretanto, todo o experimento foi realizado em condições controladas em que todas as sementes foram armazenadas da mesma maneira e as condições de germinação e congelamento foram as mais semelhantes possíveis, a fim de evitar qualquer variação ambiental. Esta variabilidade pode ser proveniente de outros processos, além da reprodução sexual, como mutação gênica e eventos de transposição. A mutação gênica, contudo, é um evento cuja taxa de ocorrência é baixa e certamente não originaria toda a variabilidade encontrada nas progênes dos biótipos estudados. Diferentemente, eventos de transposição podem causar um alta frequência de mutações instáveis. Por análises eletroforéticas não há como comprovar a presença de transposons, pois estes não causam um padrão eletroforético característico. Pode-se, entretanto, presumir sua presença quando ocorre segregação não-mendeliana. Entretanto, não foi possível determinar o controle genético das bandas analisadas e nem o tipo de segregação que está ocorrendo. Portanto, um fato concreto e indiscutível é a presença de uma grande variabilidade isoenzimática entre plântulas-irmãs, não sendo possível, entretanto, concluir indubitavelmente se esta variabilidade pode ser atribuída à ocorrência de reprodução sexual ou a outros fatores. Isso indica a necessidade de estudos mais aprofundados a fim de confirmar o modo de reprodução destes dois biótipos de *P. dilatatum*.

## CONCLUSÕES

Análises isoenzimáticas mostraram ocorrência de variabilidade entre indivíduos irmãos dos biótipos anteras roxas e Torres de *P. dilatatum*. Estes resultados sugerem a ocorrência de reprodução sexual nestes biótipos descritos como apomíticos. Entretanto, os resultados obtidos não permitem confirmar indubitavelmente a origem desta variabilidade encontrada.

## AGRADECIMENTOS

À FINEP pelo apoio financeiro. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas. Ao Dr. José Francisco Montenegro

Valls, CENARGEN-EMBRAPA, por seu auxílio nas expedições de coleta e pela identificação taxonômica das plantas estudadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRETO, I.L. **O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre – RS, 1974. 258p. Tese (Livre docência em Fitotecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1974.
- BASHAW, E.C. Apomixis and its application in crop improvement. In: FEHR, W.R., HADLEY, H.H. **Hybridization of crop plants** Madison : American Society of Agronomy and Crop Science Society of America Publ., 1980. p.45-63.
- BASHAW, E.C., FORBES Jr., I. Chromosome numbers and microsporogenesis in dallisgrass, *Paspalum dilatatum* Poir. **Agronomy Journal**, Madison, v.50, p.441-445, 1958.
- BREWER, G.J. Specific electrophoresis systems. In: BREWER, G.J. **An introduction to isozyme techniques**. New York : Academic, 1970. 175p.
- BURSON, B.L., VOIGT, P.W., EVERS, G.W. Cytology, reproductive behavior and forage potential of hexaploid dallisgrass biotypes. **Crop Science**, Madison, v.31, n.3, p.636-641, 1991.
- CHAO, S.E., SCANDALIOS, J.G. Developmentally dependent expression of tissue specific amylases in maize. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v.115, p.1-9, 1972.
- COUSINEAU, J.C., DONNELLY, D.J. Use of isoenzyme analysis to characterize raspberry cultivars and detect cultivar mislabeling. **Hortscience**, Alexandria, v.27, n.9, p.1023-1025, 1992.
- GASTONY, G.J., GOTTLIEB, L.D. Evidence for genetic heterozygosity in a homosporous fern. **American Journal of Botany**, Columbus, v.69, n.4, p.634-637, 1982.
- GOTTLIEB, L.D. Genetic differentiation, sympatric speciation, and the origin of a diploid species of *Stephananomeria*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.60, p.545-553, 1973.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B. de **Citogenética e evolução do gênero *Paspalum* (Gramineae): contribuição ao estudo das espécies naturais do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre – RS, 1971. 193 p. Tese (Doutorado em Genética) – Curso de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1971.
- POULIK, M.D. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. **Nature**, London, v.180, n.4600, p.1477-1479, 1957.
- PRESTES, P.J.Q., FREITAS, E.A.G. de, BARRETO, I.L. Hábito vegetativo e variação estacional do valor nutritivo das principais gramíneas da pastagem nativa do Rio Grande do Sul. **Anuário Técnico do Instituto de Pesquisas Zootécnicas – Francisco Osório**, Porto Alegre, v.3, p.516-531, 1976.
- ROOSE, M.L., GOTTLIEB, L.D. Genetic and biochemical consequences of poliploidy in *Tragopon*. **Evolution**, Lawrence , v.30, p.818-830, 1976.

- SAVIDAN, Y. A apomixia das gramíneas forrageiras tropicais e subtropicais. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE *PASPALUM*, 1987, Nova Odessa, SP. **Resumos...** Nova Odessa : Inst. Zootecnia – CPA/SA, 1987. p.16.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v.3, n.1, p.37-79, 1969.
- SOLTIS, D.E., HAUFLE, C.H., DARROW, D.C., *et al.* Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, Burlington, v.73, n.1, p.9-27, 1983.
- VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S.D., ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding**, part A. Amsterdam : Elsevier Science, 1983. p.469-512.
- VALLS, J.F.M. Recursos genéticos de espécies de *Paspalum* no Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE *PASPALUM*, 1987, Nova Odessa, SP. **Resumos...** Nova Odessa : Inst. Zootecnia – CPA/SA, 1987. p.4-6.
- VALLS, J.F.M., POZZOBON, M.T. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE *PASPALUM*, 1987, Nova Odessa, SP. **Resumos...** Nova Odessa : Inst. Zootecnia – CPA/SA, 1987. p.7-9.