

SECRETÁRIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

HAIKO ENOK SAWAZAKI
Engenheira Agrônoma

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM PLANTAS CÍTRICAS,
PALMEIRAS E BRÁSSICAS ATRAVÉS DE ISOENZIMAS E RAPD.

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Doutor
em Ciências.

ORIENTADOR: LADASLAV SODEK

CAMPINAS

1995

Sa96c

27272/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

DATA:	7/04/96
CHAMADA:	UNICAMP
	Sa 96c
SEDO UNV:	27272
DC:	667196
S:	<input type="checkbox"/> ID <input checked="" type="checkbox"/>
CO:	R\$ 11,00
IA:	10/04/96
CPDCM:	00086216-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Sa96c

Sawazaki, Haiko Enok

Caracterização da diversidade genética em plantas cítricas, palmeiras e brássicas através de isoenzimas e RAPD / Haiko Enok Sawazaki. - - Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador: Ladaslav Sodek.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Diversidade biológica. 2. Isoenzimas. 3. Polimorfismo (Genética). I. Sodek, Ladaslav. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 28 de fevereiro de 1996

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

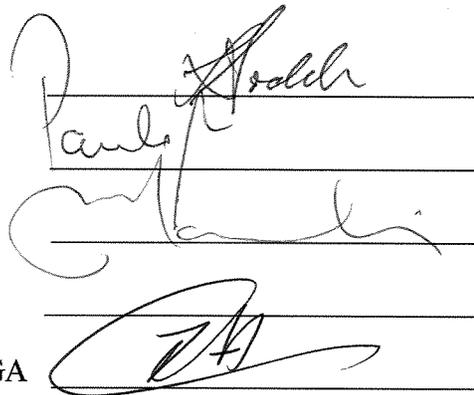
Prof. Dr. LADASLAV SODEK (Orientador)

Prof. Dr. PAULO MAZZAFERA

Profª. Dra. MARILENE LEÃO ALVES BOVI

Profª. Dra. ROSA MARIA LIZANA BALLVE

Prof. Dr. RENATO FERRAZ DE ARRUDA VEIGA

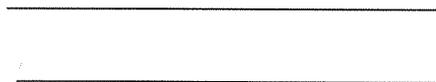


Handwritten signatures of the examiners: Ladaslav Sodek, Paulo Mazzaferra, Marilene Leão Alves Bovi, Rosa Maria Lizana Ballve, and Renato Ferraz de Arruda Veiga. Each signature is written over a horizontal line.

SUPLENTES:

Prof. Dr. CELSO VALDEVINO POMMER

Prof. Dr. JORGE VEGA



Two horizontal lines provided for the signatures of the substitute examiners, Celso Valdevino Pommer and Jorge Vega.

APROVADA

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)

Haiko Enok Sawazaki

e aprovada pela Comissão Julgadora

28/02/96

Enok

A
meus pais
Siguro e Mitico
Ofereço

A meu esposo
Eduardo
e filhos André e Paulo
Dedico

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Marcadores Isoenzimáticos	4
2.1.1.Genética de Isoenzimas	4
2.1.2.Interpretação de Zimogramas	6
2.1.3.Utilização de Isoenzimas	9
2.2. Marcadores moleculares	17
2.2.1.RFLP	17
2.2.2.Outros tipos de Polimorfismos	21
2.2.3.PCR	22
2.2.4.RAPD	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Material Vegetal	29
3.2. Metodologia para isoenzima	31
3.2.1.Preparo de amostras	31
3.2.2.Eletroforese	32
3.2.3.Detecção de enzimas	33
3.3. Metodologia para Marcadores RAPD	36
3.3.1.Extração de DNA genômico	36
3.3.2.Teste de PCR	38
3.3.3.Reação de amplificação	39
3.3.4.Análise do DNA em gel de agarose	40
3.4. Análise multivariada	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Polimorfismo enzimático e RAPD em citros	42
4.1.1.Polimorfismo Enzimático	42
4.1.2.Polimorfismo de marcadores RAPDs	59
4.2. Polimorfismo enzimático e RAPD em palmeira	63

	página
4.2.1. Polimorfismo enzimático	63
4.2.2. Polimorfismo de marcadores RAPDs	79
4.3. Polimorfismo enzimático e RAPD em couve	83
4.3.1. Polimorfismo enzimático	83
4.3.2. Dendrogramas UPGMA de isoenzimas e RAPD	92
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
6. CONCLUSÕES	103
7. RESUMO	104
8. SUMMARY	106
9. LITERATURA CITADA	108

LISTA DE FIGURAS

	página
1. Zimograma de LAP de Citros	43
2. Zimograma de GOT de citros	45
3. Zimograma de MDH de citros	47
4. Zimograma de PGM de Citros	49
5. Zimograma de ME de citros	50
6. Zimograma de IDH de Citros	51
7. Dendrograma UPGMA para isoenzimas de citros	58
8. Perfil RAPD para o primer A16 e B18 em citros	60
9 .Dendrograma UPGMA de 145 marcadores RAPD-citros	61
10.Dendrograma UPGMA de 168 marcadores RAPD-citros	62
11.Zimograma de PGI de palmácea	65
12.Zimograma de GOT de palmácea	67
13.Zimograma de EST de Palmácea	69
14.Zimograma de LAP de palmácea	71
15.Zimograma de APS de palmácea	73
16.Zimograma de MDH de palmácea	74
17.Zimograma de PRX de palmácea	76
18.Zimograma de PGM de palmácea	77
19.Dendrograma UPGMA de isoenzimas-palmáceas	78
20.Perfil RAPD para o primer B8 em palmácea	79
21.Dendrograma UPGMA de 183 marcadores RAPD-palmáceas	81
22.Dendrograma UPGMA de 229 marcadores RAPD-palmáceas	82
23.Zimograma de PGM de couve	85
24.Zimograma de EST de couve	87
25.Zimograma de PRX de couve	89
26.Zimograma de IDH de couve	91
27.Zimograma de GOT de couve	91
28.Zimograma de MDH de couve	92
29.Perfil RAPD para o primer A9 em couve	93
30.Dendrograma UPGMA de isoenzimas de couve	95

	página
31.Dendrograma UPGMA de 106 marcadores RAPD em couve	96
32.Dendrograma UPGMA de 115 isoenzimas RAPD em couve	97
33.Dendrograma UPGMA de isoenzimas-RAPD em couve	98

QUADROS

	página
1. Frequência de alelos e heterozigose em tangerinas	53
2. Frequência de alelos e heterozigose em laranjas	54
3. Avaliação da diversidade interespecífica em citros	55

ABREVIATURAS

ACP	fosfatase ácida
ADP	adenosina-5'-difosfato
ATP	adenosina-5'-trifosfato
Bis	N,N'-metileno-bis-acrilamida
CTAB	cetiltrimetilamônio
dATP	deoxinucleotídeo de adenina
dCTP	deoxinucleotídeo de citosina
dGTP	deoxinucleotídeo de guanina
dTTP	deoxinucleotídeo de timina
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilenodiaminotetracetato
EST	esterase
GOT	glutamato oxaloacetato transaminase
IDH	isocitrato desidrogenase
LAP	leucina aminopeptidase
mA	miliampere
ME	enzima málica
MTT	brometo de 3-(4-5-dimetiltiazol-il)2,5-difeniltetrazólio
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	nitroblue tetrazólio
PMS	fenazina metassulfato
PGI	fosfoglucoase isomerase
PGM	fosfoglucomutase
PRX	peroxidase
SDS	dodecil sulfato de sódio
TEMED	N, N, N',N'-tetrametiletilenodiamina
tris	tris(hidroximetil)aminometano

1. INTRODUÇÃO

A produtividade agrícola é o resultado do desenvolvimento do genótipo superior em um meio que permite a expressão de sua superioridade (BOYER, 1992). Os melhoristas precisam reunir os genes necessários à maior produção e adaptabilidade às condições ambientais como solo, clima, incidência de pragas e doenças. Os geneticistas necessitam, portanto, do conhecimento da diversidade genética para monitorar e promover sua utilização eficiente nos programas de melhoramento. O conhecimento e aumento da diversidade do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) é, portanto, imprescindível como fonte de recursos genéticos.

O Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos (CENARGEN) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) tem como principal objetivo enriquecer a variabilidade genética do germoplasma para os programas de melhoramento genético do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (FONSECA, 1995).

O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), desde sua criação, em 27 de junho de 1887, vem trabalhando com recursos genéticos vegetais, sendo cada melhorista responsável pela coleção ou banco de germoplasma, disponível em sua área. No IAC os recursos genéticos destinam-se, em cerca de 70% para a programação da Instituição, aos projetos de melhoramento genético vegetal, e está a disposição dos agricultores e pesquisadores conforme haja disponibilidade de germoplasma para o intercâmbio. O grande fluxo de germoplasma doado às Universidades, Institutos, Empresas e agricultores (do País e do exterior) reflete a importância dos recursos genéticos da Instituição na pesquisa e na Agricultura, representando uma média de 150 doações anuais, entre espécies e cultivares, no último quinquênio (VEIGA & NUCCI, 1995).

Para aproveitamento mais amplo dos recursos genéticos é necessário a caracterização e avaliação dos BAGs, baseada em

descritores morfológicos, reprodutivos e agronômicos de alta herdabilidade (VALLS, 1995).

Antes do advento do conceito "um gene-uma enzima" a análise de caracterização era realizada apenas pelos caracteres morfológicos, que muitas vezes não conseguiam distinguir adequadamente as diversas espécies devido a ação do ambiente sobre os mesmos. Com o advento de técnicas utilizando marcadores genéticos que seguem a Lei de Mendel, são codominantes e que sofrem menor influência ambiental, abriu-se um campo novo para o estudo genético tanto animal como vegetal. Neste aspecto destacaram-se os marcadores isoenzimáticos e mais recentemente, duas técnicas de Biologia Molecular RFLP (restriction fragment length polymorphism) e RAPD (random amplified polymorphic DNA).

O avanço contínuo do refinamento das metodologias e processos biotecnológicos tem sido útil para incrementar o manejo e uso do germoplasma conservado, principalmente quanto à caracterização molecular e bioquímica dos acessos (VALOIS, 1995).

A importância dos citros no Estado de São Paulo é conhecida, pois é o maior produtor de citros do País, sendo responsável por 80% da produção, enquanto o Brasil é o maior exportador de suco concentrado congelado. Pelo alto valor da agroindústria citrícola além da geração de empregos, é uma cultura de grande importância econômica (AMARO, 1984). O palmitero, embora de menor importância econômica, fornece o palmito que é um produto tipicamente brasileiro, sendo o Brasil o principal produtor e exportador mundial de palmito em conserva (BOVI, 1984). A couve, apesar de não ter muita importância econômica, é uma hortaliça bastante consumida, sendo a variedade mais apreciada a Manteiga.

Nos trabalhos envolvendo cruzamentos em citros, um dos principais problemas é a distinção, no estágio inicial de desenvolvimento, entre plantas nucelares e zigóticas das progênes. As variedades de citros, na maioria, são apomíticas e poliembriônicas

(IGLESIAS *et al.*, 1974; BUTTON *et al.*, 1976; TORRES *et al.*, 1978; TORRES *et al.*, 1982). Nos cultivares com sementes poliembriônicas, embriões assexuais se desenvolvem juntamente com embriões zigóticos, podendo originar plantas tanto nucelares (apomíticas) como zigóticas. O melhorista depende das características morfológicas das plantas, tendo que esperar às vezes a frutificação para identificar os híbridos. É importante, assim, encontrar marcadores bioquímicos ou moleculares que permitam identificar com maior antecedência a constituição genética ou predizer as características fenotípicas no estágio de plântulas.

Com relação às palmeiras que são plantas de ciclo longo, é bem evidente a necessidade do conhecimento genético dos diversos ecótipos provenientes de populações naturais mantidas no banco de germoplasma do Instituto Agronômico para direcionamento do melhoramento ou estabelecimento de marcadores bioquímicos ou moleculares de características desejáveis.

A couve, por sua vez, é uma planta rústica de ciclo curto, cujo germoplasma no Instituto Agronômico de Campinas é identificado apenas pela procedência, sendo necessário o conhecimento da diversidade genética para auxílio dos programas de melhoramento.

Trabalhos de caracterização dos BAGs de palmeiras, citros e brássicas do IAC vêm sendo realizados sob o aspecto botânico, genético e agronômico (BOVI *et al.*, 1995a, 1995b; DOMINGUES, *et al.*, 1995; NAGAI *et al.*, 1995).

Este trabalho teve como objetivo, caracterizar geneticamente, através de marcadores bioquímicos (isoenzimas) e moleculares através da metodologia de RAPD, parte dos BAGs de palmeiras, citros e couve do IAC. Além da caracterização, a adequação de metodologia como a de eletroforese de isoenzimas em géis de poliacrilamida e a de marcadores RAPD, contribui para os programas de melhoramento pelo aumento dos dados existentes acerca da variabilidade genética

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MARCADORES ISOENZIMÁTICOS

2.1.1. Genética das isoenzimas.

O termo isoenzima foi introduzido por MARKERT & MOLLER (1959) como referência a formas moleculares múltiplas de proteína com mesma atividade enzimática ocorrendo dentro de um organismo.

Vários estudos têm sido realizados com isoenzimas para entendimento da ação genética, desenvolvimento e diferenciação celular, principalmente pela possibilidade do geneticista poder finalmente estimar a variabilidade genética baseada na estrutura molecular de um produto codificado diretamente pelo gene.

Esta possibilidade decorre do conceito "um gene-uma enzima" criada por Beadle e Tatum no experimento clássico com o fungo *Neurospora* em 1946 (GARDNER *et al.*, 1991).

As isoenzimas decorrem assim de uma enzima com várias alternativas de expressão, as quais são codificadas pelos diferentes pares de alelos de cada cadeia polipeptídica específica.

Sendo cada cadeia polipeptídica codificada por um par de alelos, o termo aloenzima é empregado algumas vezes no lugar de isoenzima para definir o polimorfismo proveniente de alelos.

As isoenzimas catalizam a mesma reação, isto é, têm as mesmas propriedades biológicas e especificidade química, podendo ser produtos de diferentes loci ou alelos. Podem ser originadas por pequenas alterações na sequência dos aminoácidos decorrente de mutação, conjugação ou deleção de moléculas de aminoácidos com grupos reativos como amino, carboxil ou hidroxil; ou alterações secundárias na estrutura do polipeptídeo, tais como duplicação, ou mudanças na conformação da estrutura, resultando nas variações das

estruturas terciárias ou quaternárias dando origem aos isômeros configuracionais (SHANNON, 1968; SCANDALIOS, 1974).

Segundo WEEDEN & WENDEL (1989) as aloenzimas são mais convenientes para o estudo das isoenzimas porque além de exibirem herança mendeliana e terem expressão codominante, têm penetrância completa (ou seja, a expressão fenotípica total do genótipo) e ausência de interações pleiotrópicas (a não ocorrência de influência de uma aloenzima em mais do que uma característica) e epistáticas (a não ocorrência de interação entre aloenzimas de loci distintos). A penetrância total, ausência de interação pleiotrópica e ausência de interação epistática, indicam que as mudanças na mobilidade eletroforética das aloenzimas estão mais relacionadas a alterações na sequência da estrutura do gene do que a alterações pós-transcricionais. A observação da codominância e penetrância completa encontrada na maioria dos casos evidencia que ambos os alelos do locus da enzima são transcritos e traduzidos, sendo a atividade registrada o produto de ambos os alelos.

De acordo com WEEDEN & WENDEL (1989) os fatores para a interpretação genética dos perfis de isoenzimas são: o número de genes codificando a mesma função enzimática, o número de alelos homozigotos ou heterozigotos, a estrutura quaternária dos produtos protéicos e sua compartimentalização subcelular.

SMITH & SMITH (1992) fizeram uma revisão das espécies de plantas cultivadas de maior importância econômica, caracterizadas pela metodologia de polimorfismo do perfil de bandas de proteína ou DNA. Os trabalhos citados pelos autores identificam os parentais e progênies de plantas contendo genótipos de características desejáveis ou são estudos genéticos ou de evolução taxonômica.

Os estudos das isoenzimas em plantas com mesmo estágio de desenvolvimento mostram que estas sofrem menos a ação do meio ambiente do que as características morfológicas, porém o padrão isoenzimático pode ser influenciado pela localização intracelular,

assim como pela distribuição no organismo, pelo estágio de diferenciação e desenvolvimento celular. Segundo SHANNON (1968) a diferenciação celular sofre uma complexa sequência de alterações envolvendo o acúmulo e perda de enzimas. Portanto a síntese diferencial de novas enzimas pode ser considerada como sendo o processo elementar de diferenciação celular.

SCANDALIOS (1979) estudando a expressão e diferenciação da enzima catalase em milho, concluiu que as isoenzimas específicas são codificadas em simples indivíduos e/ou em tecidos específicos. As isoenzimas codificadas por diferentes genes exibiram mudanças temporal e espacial durante o desenvolvimento da planta; os diferentes produtos genéticos foram controlados por diferentes taxas de síntese e degradação, compartimentalização diferencial intracelular, e por um inibidor específico da catalase. O sistema, segundo o autor, responde e pode ser alterado em sua expressão por sinais externos como luz, hormônios, etc.

2.1.2. Interpretação de zimogramas

Apesar da alta capacidade em auxiliar no estudo da genética molecular, a utilização das isoenzimas requer cuidados para a obtenção de bons resultados, sendo a interpretação correta dos zimogramas de fundamental importância.

Após eletroforese e reações químicas específicas, nos locais onde ocorre alta atividade enzimática ficam visualizadas as bandas coloridas originando o perfil denominado zimograma. Para interpretação do zimograma é seguido o fundamento de que cada cadeia de polipeptídeo, correspondente a uma banda, é codificada por um gene (GARDNER *et al.* 1991).

No caso de uma proteína monomérica codificada por um locus gênico com dois alelos, A e B, três genótipos são possíveis de serem codificados neste locus: AA , AB e BB , sendo o zimograma

correspondente a uma banda para o genótipo AA, duas para o genótipo AB e uma para o genótipo BB, pois no caso do locus ser homozigoto ocorre apenas um tipo de informação genética, enquanto o locus heterozigoto fornece dois tipos de informação. O locus homozigoto codifica duas cadeias de polipeptídeos similares que se sobrepõem no gel enquanto o locus heterozigoto, dois polipeptídeos diferentes, originando duas bandas. No caso da enzima ser dimérica, isto é, formada por duas subunidades de polipeptídeos, o zimograma do locus heterozigoto corresponde a três bandas, ao invés de duas. Os monômeros codificados pelos dois alelos se combinam, dois a dois, para formar a estrutura quaternária da enzima. Sendo a combinação ao acaso, são possíveis as formações dos dímeros correspondentes aos genótipos homozigoto AA, homozigoto BB e heterozigoto AB, o qual, por ser formado por uma subunidade codificada pelo alelo A e outra codificada pelo alelo B, tem propriedade físico-química intermediária às dos dois outros dímeros, originando uma banda intermediária. Estatisticamente os dímeros são formados na proporção 1:2:1 quando codificados pelos genótipos AA, AB e BB, respectivamente (ALFENAS *et al.*, 1991).

Além dos fatores que complicam a interpretação do zimograma, como isoenzimas codificadas por mais de um locus ou com estrutura quaternária formada por várias subunidades, outros fatores podem ocorrer, como a ploidia. A ploidia pode ocorrer nos cromossomos de apenas um genoma originando a autopoliploidia ou de cromossomos provenientes de genomas diferentes originando a aloploidia. A ploidia aumenta, portanto, o número de alelos presentes no organismo, aumentando a diversidade de alelos do sistema e a intensidade das bandas decorrente da ação de um ou mais alelos (WEEDEN & WENDEL, 1989).

Outro fenômeno que pode dificultar a interpretação é a ocorrência do "alelo nulo" cuja ação codificadora é bloqueada por alguma razão. Segundo WEEDEN & WENDEL (1989) alelos nulos podem ser

reconhecidos pela taxa de segregação 3:1 (presença de atividade: ausência de atividade) para um locus enzimático. Esta taxa é gerada após autofecundação de uma planta heterozigota para um alelo nulo porque o fenótipo heterozigoto frequentemente apresenta uma banda de atividade tão intensa quanto o fenótipo do homozigoto ativo.

Segundo ALFENAS *et al.*(1991), o polipeptídeo formado nos ribossomos pode sofrer modificações posteriores em sua estrutura pela adição de compostos como açúcares e lipídeos ou radicais químicos como fosfato, acetil, etc. Essas ligações não sendo estáveis podem provocar oxidação de ligações sulfidríla nos polipeptídeos, deaminação de certos aminoácidos, digestão de parte dos polipeptídeos ou dos compostos ligados aos polipeptídeos por proteases, glicosidases, lipases e polimerização de enzimas. Diferenças na conformação das estruturas terciária ou quaternária podem também produzir modificações pós-tradução, os quais originam bandas secundárias ou rastros corados no gel. A sobreposição de bandas pode ser decorrente de enzimas codificadas por mais de um locus gênico. Muitas enzimas provenientes de locus duplicados sendo diméricas podem ter a capacidade de formar moléculas híbridas interlocus, que podem ter propriedades físico-químicas semelhantes às de outras enzimas originadas por outro locus (ALFENAS *et al.*, 1991).

Enzimas de organelas citoplasmáticas como cloroplasto e mitocôndria podem ser provenientes de genes diferentes, apresentando polipeptídeos distintos. Ainda, certos tipos de enzimas como as esterase, peroxidases e fosfatases, atuam sobre vários tipos de substrato, podendo mostrar padrões distintos de tecido para tecido e na presença de diferentes substratos fornecidos à reação de revelação. Segundo ALFENAS *et al.*(1991), a esterase pode formar grande número de bandas porque qualquer enzima capaz de quebrar a ligação naftil dá reação positiva. A reação da peroxidase pode

revelar bandas em região de atividade da catalase, uma vez que nessas regiões também há a liberação de Oxigênio.

2.1.3. Utilização de isoenzimas

SCANDALIOS (1974) faz uma revisão sobre o comportamento das isoenzimas no desenvolvimento e diferenciação celular, pois por serem as isoenzimas uma expressão da diferenciação celular, a análise das mudanças nos padrões enzimáticos durante o desenvolvimento da planta ajuda o entendimento dos mecanismos básicos destes processos.

Além da importância nos estudos fisiológicos as isoenzimas também ajudam a solucionar problemas na sistemática, dinâmica evolucionária de populações naturais ou de plantas colonizadas, estudos sobre o tipo de reprodução e melhoramento de plantas.

Na sistemática, um dos problemas mais comum entre duas populações com características morfológicas bastante semelhantes é a distinção da procedência genética, isto é, se pertencem a mesma espécie.

Segundo MITTON (1989) o processo de endogamia leva ao fenômeno conhecido como depressão, que nas plantas causam os efeitos de menores taxas de produção de sementes, germinação, viabilidade e crescimento, diminuindo a heterose. Heterose é o contrário da depressão, ocasionando maior viabilidade, crescimento e produtividade na progênie de plantas obtidas por cruzamento de linhagens. O autor dá duas teorias para geração da competência das plantas: a da sobredominância em que a competência aumenta com a heterozigose de um locus selecionado, ou seja, para locus cuja variação é balanceada por seleção natural, a competência geralmente aumenta com o número de locus heterozigotos; a da dominância em que o efeito da depressão é atribuído a exposição de alelos deletérios recessivos que aumentariam em condição homozigota.

Dois parâmetros em estudos de população têm sido extensivamente usados: a proporção de loci polimórficos por espécie (P), sendo um locus considerado polimórfico quando a frequência de seu alelo mais comum não ultrapassa 0,95; e o número efetivo de alelos por locus polimórfico (A_p), que representa o número de alelos por locus polimórfico (ALFENAS *et al.*, 1991). As equações, segundo estes autores, são:

$$P = \text{número de loci polimórfico/número total de loci}$$

$$A_p = \text{número total de alelos dos loci polimórficos/número de loci polimórficos}$$

Outra medida mais comumente relatada é o índice de diversidade proposto por NEI (1973), que utiliza a frequência de alelos, em que a heterozigose média é definida como a média da heterozigose (h) sobre todos os loci, onde (h) é igual a 1 menos a somatória do quadrado das frequências médias, ou :

$$h = 1 - \sum f_i^2$$

Sendo a heterozigose a diversidade da espécie considerando-se um único locus e f_i a frequência média do alelo i em dado locus. Heterozigose é, portanto, uma medida da diversidade definida inteiramente em função das frequências alélicas e não das genotípicas.

No melhoramento de plantas as isoenzimas além de atuarem como marcadores de características para acompanhamento das introgressões nas novas variedades, também atuam na caracterização e distinção de plantas híbridas ou na caracterização da duplicação genética, incluindo poliploidia.

Uma grande variedade de estudos com isoenzimas de citros têm sido realizados para conhecimento da diversidade genética e solucionar o problema dos melhoristas na distinção precoce entre

plântulas nucelares e zigóticas, pois a maioria das espécies de citros é apomítica e poliembriônica. Após a fecundação, formam-se nas sementes poliembriônicas, além do embrião gamético, outros assexuais originados do nucelo, sendo possível o desenvolvimento do embrião nucelar que é geneticamente idêntico a planta mãe ou o desenvolvimento do embrião zigótico. Plantas nucelares geralmente não são interessantes porque é fácil a propagação por enxertia que diminui o período de juvenilidade. Apenas nos casos de produção comercial de porta-enxertos, em que a produção é geralmente feita a partir de sementes de polinização aberta, o efeito de apomixia é desejável para a uniformização dos porta-enxertos (MOORE & CASTLE, 1988).

A identificação de plântulas zigóticas é de grande interesse, visto o reconhecimento através das características morfológicas ser difícil de ser realizado, tendo-se que esperar geralmente até a frutificação. O caráter dominante de três folhas do *Poncirus trifoliata* é utilizado quando este é o progenitor macho. Este caráter, porém, nem sempre se manifesta, pois muitas plantas de *P. trifoliata* são heterozigotas.

IGLESIAS *et al.* (1974) iniciaram os estudos enzimáticos em citros utilizando as isoenzimas de peroxidase e esterase para a distinção entre plantas nucelares e zigóticas entre espécies e cultivares de citros.

ESEN & SOOST (1976) também utilizaram a peroxidase, encontrando a existência de formas múltiplas em folhas de trinta sub-espécies de Citros e nos gêneros *Fortunella*, *Poncirus* e *Microcitrus*.

BUTTON *et al.* (1976) encontraram maior polimorfismo nas isoenzimas de peroxidase de raízes do que de folhas em cinco cultivares de tangerinas.

SPIEGEL-ROY *et al.* (1977) também utilizaram as isoenzimas de peroxidase de raízes de tangerinas, laranja doce, "grapefruit" e

pomelo, conseguindo a separação entre plântulas nucelares e zigóticas.

Estudos sobre alelos das isoenzimas foram iniciados por TORRES *et al.* (1978) com as isoenzimas de glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), fosfoglucomutase (PGM) e fosfoglucoisomerase (PGI) de folhas de vários cultivares de citros. Estas enzimas foram codificadas por quatro genes tendo dezenove alelos. Utilizando a geração F1 de cruzamento controlado conseguiram a distinção das plântulas zigóticas e pela análise de afinidades verificaram um grande padrão de uniformidade das combinações genotípicas dentro de cada espécie.

Em trabalho complementar, TORRES *et al.* (1982) estudaram os alelos de mais cinco enzimas, a malato desidrogenase (MDH), hexokinase (HK), enzima málica (ME), isocitrato desidrogenase (IDH) e leucinoaminopeptidase (LAP) em dez espécies de citros, verificando que a HK, IDH e LAP são codificadas por um simples gene, sendo a LAP e HK monoméricas enquanto a IDH é dimérica.

Em outro trabalho, TORRES *et al.* (1985) estudaram as isoenzimas da enzima málica (ME) e da superóxido dismutase (SOD), verificando a taxa de ligação entre 37 pares de genes especificando enzimas e a distorção da taxa de segregação de genes simples. Os mesmos autores verificaram que o gene da enzima málica Me2 em citros e poncíros especifica a série mais rápida de migração das isoenzimas mais avançadas, enquanto o gene Sod1 especifica a série mais lenta das isoenzimas da superóxido dismutase, sendo ambos os genes monoméricos. A taxa de segregação de gene simples foi encontrada frequentemente distorcida em várias das nove famílias resultantes do cruzamento entre *C. grandis* X *C. jambhiri* e *C. grandis* X *P. trifoliata*. Dos 37 pares de genes especificando enzimas estudadas, os pares Got-1/Mdh1, Mdh2/Me1, Mdh2/Me2 e Me1/Me2 foram encontrados ligados. A ordem dos genes foi determinada como Mdh2/Me2/Me1.

HIRAI & KOZAKI (1981) também observaram os alelos das isoenzimas de MDH e 6-fosfogluconato desidrogenase (6-PGDH) parcialmente purificadas por cromatografia de afinidade em Blue-Sepharose. Encontraram o sistema MDH como sendo dimérico, com a lima, limão, cidra e pomelo, apresentando os respectivos alelos, A e C, A e D, A e A e D e D. Sugeriram que a lima não poderia ser precursora do limão verdadeiro no caso da cidra ser uma das precursoras, pois seu alelo A, se procedente da cidra não poderia ser ao mesmo tempo da lima, visto seu outro alelo ser D. Estudos posteriores de HIRAI *et al.* (1986) confirmaram as observações da existência de uma aloenzima característica em limas doces.

Como técnica auxiliar nos novos métodos de produção de plantas através da biotecnologia, BEN-HAYYIM *et al.* (1982) utilizaram dez isoenzimas para confirmar a identidade dos híbridos somáticos originados por fusão de protoplastos em nove espécies e cultivares de citros.

Ainda no estudo de plântulas zigóticas ASHARI *et al.* (1988) discriminaram plântulas zigóticas de nucelares em cinco porta-enxertos resultantes da polinização livre de laranjas doces, ponciros, tangerinas e cidras, através da análise de oito lócus de seis sistemas enzimáticos.

Também com relação a porta-enxerto, MOORE & CASTLE (1988) avaliaram populações de plântulas de 15 cultivares através dos seis lócus enzimáticos MDH, PGM, PGI, GOT, PER e shiquimato desidrogenase (SkDH), verificando que as populações variaram no grau de poliembrionia e no polimorfismo das isoenzimas. Conseguiram também diferenciar as plântulas nucelares das zigóticas.

Outro estudo com porta-enxerto foi realizado por ROOSE & TRAUGH (1988) que utilizaram as enzimas MDH, PGI, PGM, GOT e IDH de casca e folha para a identificação entre porta-enxertos zigóticos de nove introduções de laranja, limão verdadeiro e trifoliata,

encontrando maior presença de plantas zigóticas entre as nucelares em trifoliata do que nas outras duas espécies.

REFORGIATO *et al.* (1988) utilizaram as isoenzimas de GOT, PGI e PGM como auxílio na caracterização de biótipos de limões.

Na área taxonômica, GOGORCENA & ORTIZ (1989) utilizaram o polimorfismo das isoenzimas de peroxidase e esterase, porém não conseguiram a distinção entre cultivares de laranja azeda.

OLLITRAUT (1990) avaliou a diversidade intraespecífica e a heterozigose de oito espécies de citros através de oito locos de isoenzimas encontrando três grandes agrupamentos, o constituído por *C. grandis* e *C. paradisi*, o grupo de *C. reticulata*, *C. aurantium* e *C. sinensis*, e o de *C. medica*, *C. aurantifolia* e *C. lemon*.

BALLVÉ *et al.* (1991) comprovaram a viabilidade de utilização das isoenzimas GOT, PGI, APS, PRX e ME na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros, tendo observado um alelo adicional no locus Got-2 em relação aos de trabalhos anteriores.

Em relação as palmeiras quase não foram feitos estudos com marcadores isoenzimáticos, porém, sendo uma palmaceae como tal de ciclo longo, são importantes os estudos para obtenção de marcadores bioquímicos ou moleculares como ferramenta auxiliar no direcionamento dos estudos de melhoramento genético. Segundo BOVI *et al.* (1987) uma das principais dificuldades no melhoramento de palmeiras produtoras de palmito é a adoção de parâmetros que estimem a produção futura. Segundo os autores, a medida da circunferência como estimativa da produção é inviável quando na comparação entre espécies e materiais distintos, pois o fato do palmito ser proveniente de folhas jovens em desenvolvimento, envoltas pelas bainhas das folhas mais velhas, ocorre a influência desse dois fatores.

Comercialmente, devido ao melhor sabor e qualidade, as palmeiras mais exploradas pertencem ao gênero *Euterpe*, sendo a *E.*

edulis, conhecida como juçara, nativa da região centro sul do país, enquanto a *E. oleracea* conhecida como açai é originária do norte do país.

Ambas espécies apresentam problemas na produção, pois a juçara não perfilha e é destruída com a extração do palmito, enquanto a açai apesar de perfilhar, permitindo várias extrações, tem produção menor e qualidade organoléptica inferior. Como no geral demoram de oito a doze anos para iniciar a produção, é de extremo interesse a seleção de híbridos de produção mais rápida, com estirpes múltiplos e com palmito de bom tamanho, textura e sabor.

Segundo BOVI & CARDOSO (1978) o aspecto de maior interesse a ser melhorado nos híbridos é o caráter perfilhamento, sendo importante os estudos para identificação do tipo de segregação do perfilhamento, pois em um trabalho de cruzamento recíproco da *E. edulis* X *E. oleracea* ocorreu reduzida porcentagem de plantas híbridas com perfilhamento, sugerindo herança citoplasmática materna deste fator.

TORRES & TISSERAT (1980) avaliaram sete genes especificando cinco sistemas enzimáticos, álcool desidrogenase (ADH), EST, GOT, PGI e PGM, de um tipo de palmacea. Dos 21 genótipos possíveis que resultariam da informação dos dois alelos de cada gene, 15 foram observados em plantas fêmeas e 14 em machos. Das 42 combinações possíveis entre genes resultantes dos seis possíveis cruzamentos entre os sete genes, 23 foram analisadas em 10 das 26 populações F₁, sendo a maioria identificada por seu perfil isoenzimático.

GHESEQUIÉRE (1983) trabalhou com pólen de *Elaeis guineensis* utilizando os sistemas enzimáticos MDH, IDH, glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), PGI, PGM e ACP, para a identificação de cultivares.

BALLVÉ (1988) iniciou os estudos de isoenzimas em palmitreiro, desenvolvendo um conjunto de metodologias de eletroforese em gel de

amido, tendo analisado as diversas introduções de *E. edulis* e *E. oleracea* e os híbridos entre essas duas espécies. Analisou as isoenzimas de peroxidase (PRX), EST, fosfatase ácida (APS), ADH, PGI, ME e GOT em tecidos de caule, palmito e pólen de plantas adultas, raiz de mudas e tecidos de folhas de plantas em diversas fases de desenvolvimento, encontrando a possibilidade de utilização do polimorfismo enzimático na identificação de híbridos e caracterização da origem de plantas.

A couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala*) é uma planta rústica podendo alcançar até três metros de altura e idade de dois anos, sendo a variedade mais apreciada a Manteiga, que tem as folhas mais tenras e é multiplicada vegetativamente. A susceptibilidade a pulgão é uma das características a ser melhorada que vem sendo associada as diversas variedades.

NIJENHUIS (1971) iniciou os trabalhos de análise de variação intraespecífica em *Brassica oleraceae* estudando o polimorfismo isoenzimático do sistema da fosfatase ácida (ACP).

ARÚS & SHIELDS (1983) estudaram em brássicas, além desse sistema, o polimorfismo de PGI, PGM, LAP, ADH e GOT, observando dois genes codificando os sistemas monoméricos PGM e LAP, dois loci e pelo menos um sistema dimérico em PGI e ADH, e três genes em GOT.

AMARAL, Jr. et al. (1994) utilizaram seis descritores botânico-agronômicos e sete caracteres isoenzimáticos para a quantificação da dissimilaridade genética entre os clones de sete tipos de couve, encontrando a reduzida variabilidade nas isoenzimas e a proximidade dos genomas estudados.

2.2. MARCADORES MOLECULARES

2.2.RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Com o aparecimento em 1980 da técnica de marcador genético baseada nas moléculas de DNA, através de metodologia utilizando fragmentos de DNA humano e denominada RFLP por WYMAN & WHITE (1980), foram ampliadas as possibilidades do uso de marcadores nos estudos genéticos.

RFLPs são baseados no polimorfismo de fragmentos de DNA produzidos pela digestão de moléculas de DNA com enzimas de restrição. Sendo as enzimas de restrição endonucleases que cortam a molécula de DNA apenas na região onde ocorre uma sequência de bases específicas, todas as moléculas com alterações na sequência originadas por deleção, adição ou substituição de pares de bases através de inversão, translocação ou transposição, sofrerão mudanças nos locais de restrição, originando o polimorfismo.

Em genomas de organismos superiores como os de planta são necessárias, para a detecção do polimorfismo, técnicas auxiliares. As moléculas de DNA são muito grandes e após eletroforese em gel de agarose, quando é realizada a detecção utilizando a fluorescência do brometo de etídio que se intercala nas moléculas do DNA, não é possível a distinção das bandas separadamente, pois estas ficam muito próximas. É necessário, portanto, a transferência do perfil dos fragmentos do DNA digerido para uma membrana, geralmente de nitrocelulose ou nylon pela técnica conhecida como "Southern Blotting". O procedimento seguinte é a hibridização, para a qual é realizada antes a desnaturação do DNA, pois para ocorrer o processo de pareamento é necessário que o DNA dos fragmentos digeridos e o DNA da sonda estejam na forma de fita simples. Sondas são sequências de bases de DNA ou mRNA que podem ser marcadas por radioatividade ou processo químico e se pareiam somente com a sua

sequência complementar, no processo conhecido como hibridização (KIRBY, 1992). Sua detecção no perfil dos DNAs digeridos permite o reconhecimento da existência de regiões similares no genoma, atuando, portanto, como um marcador genético.

Marcadores RFLP têm a vantagem sobre as isoenzimas porque não dependem da expressão genética, nem da manutenção da atividade da isoenzima, isto é, são inerentes às células de cada indivíduo, não sendo, portanto, afetadas pelas condições ambientais (BECHMANN & SOLLER, 1983). Estes marcadores possibilitam maior eficiência nos processos convencionais, pois a seleção de genes desejáveis é feita de forma mais direta, diminuindo as gerações de retrocruzamentos necessárias para recuperação das características desejáveis. Além disso a transferência de genes indesejáveis, ligados àqueles de interesse, pelo fenômeno conhecido como ligação de arraste, faz com que, muitas vezes, a nova planta apresente, além das características procuradas, outras sem interesse. A seleção, baseada em RFLP, pode identificar e minimizar a ligação de arraste.

Portanto, qualquer parte da planta em qualquer estágio de desenvolvimento pode ser utilizado para a amostragem do material.

Outra vantagem é que na prática um número muito maior de marcadores moleculares pode ser obtido, pois as isoenzimas são limitadas àquelas que podem ser distinguidas através de reação específica.

Segundo PATERSON *et al.* (1991) marcadores genéticos que são fortemente ligados um ao outro no mesmo cromossomo são raramente recombinados, permanecendo usualmente juntos na progênie do mesmo indivíduo. Por outro lado, marcadores que são distantes um do outro no mesmo cromossomo, ou em cromossomos diferentes, são frequentemente recombinados, ocorrendo em diferentes combinações nas progênies em relação as combinações paternas.

Este conceito da taxa de recombinação entre dois genes num mesmo cromossomo é o fundamento básico da distância de locação

entre os genes no mapeamento genético. Uma unidade de crossing-over é uma medida de distância no mapeamento genético, que é baseada no número médio de eventos de crossing-over que ocorrem durante a meiose. Um intervalo de mapeamento que é uma medida de crossing-over em distância (ou em centimorgan), implica que somente uma em cada cem cromátides, recuperada da meiose, terá sofrido um crossing-over neste intervalo (GARDNER *et al.*, 1991).

O aparecimento dos marcadores de RFLP possibilitou a identificação de regiões genômicas conhecidas como lócus de caráter quantitativo, que afeta quantitativamente caracteres herdáveis de importância econômica.

Vários trabalhos utilizando ambos os marcadores, isoenzimas e RFLP têm sido relatados no estudo taxonômico, genético e de construção de mapas genéticos, como o de CHASE *et al.* (1991) que correlacionaram a diversidade do polimorfismo de isoenzimas com o polimorfismo obtido pela técnica de RFLP em feijão, encontrando a suplementação dos marcadores RFLP aos dados de polimorfismo das isoenzimas.

Em citros GREEN *et al.* (1986) compararam através do perfil de bandas de DNA obtido pelo método de RFLP, DNA de cloroplastos de citros, utilizando como sondas DNA de cloroplastos de tabaco. Encontraram semelhanças entre os cloroplastos de cultivares de *C. limon*, *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. paradisi* e *C. grandis*. Os DNAs de cloroplastos de *P. trifoliata* e *Microcitrus spp.* foram distintos um do outro, assim como de todos os outros tipos de citros. Os autores construíram um mapa físico do genoma do cloroplasto de *C. aurantium* utilizando além das sondas de DNA de cloroplastos de tabaco, quatro sondas correspondentes aos genes da RuBP carboxilase de milho, subunidades alfa e beta da ATP-sintetase de tabaco e *psb* de Spirodela. Os autores reportaram que a laranja azeda é provavelmente procedente de pomelo e tangerina.

Em citros, VARDI (1988) trabalhando com DNA de cloroplastos, restritos por endonucleases, reportou a provável procedência da laranja de pomelo e tangerina, assim como a do limão da hibridação entre pomelo e cidra. Foram colocados também em um mesmo grupo as espécies de *C. limon*, *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. paradisi* e *C. grandis*.

KOBAYASHI *et al.* (1991) utilizaram a técnica de "fingerprinting" de DNA através da técnica de RFLP com o DNA de ribossomo de núcleo para confirmar a produção de híbridos somáticos pela fusão dos protoplastos de laranja doce com tangor. Analisaram também o DNA de cloroplasto para cada um dos 16 híbridos, verificando que continham apenas um genoma de cloroplasto de um dos parentais. Em todos os casos, os genomas mitocondriais dos híbridos somáticos foram de laranja doce. Os autores utilizaram como sondas fragmentos de DNA ribossomal nuclear de arroz, DNA de cloroplasto de tabaco e DNA de mitocôndria de milho e couve-flor.

JARREL *et al.* (1992) utilizaram a segregação de oito isoenzimas e trinta e sete loci de RFLP de sessenta progênies resultantes do cruzamento intergenérico entre *C. paradisi* X *P. trifoliata* com *C. sinensis* X *P. trifoliata*, para a construção de um mapa genético contendo 38 loci distribuídos sobre dez grupos de ligação sendo o tamanho do genoma estimado em 1700 centimorgans.

DURHAM *et al.* (1992) analisaram duas populações segregantes de citros provenientes do cruzamento intergenérico entre *C. grandis* X *P. trifoliata* e do cruzamento interespecífico entre *C. reticulata* Blanco X *C. paradisi*. Os autores encontraram um total de 11 isoenzimas e 58 RFLP segregando nas duas populações. A análise de ligação revelou que 62 loci mapearam 11 grupos de ligação, com 7 loci segregando independentemente em relação aos outros marcadores.

2.2.2. Outros tipos de polimorfismos

O polimorfismo obtido pela amplitude de variação do número de repetições das sequências de bases repetitivas, através do DNA cromossômico, denominado VNTR (número variável de repetição em tandem), vem sendo muito utilizado.

Sabe-se que a porcentagem de DNA repetitivo aumenta com a complexidade do organismo, atingindo de 20 a 50% no eucarioto (WATSON *et al.*, 1989).

Um dos sistemas de sondas utilizados para reconhecimento de polimorfismo é o VNTR (variable number of tandem repeat), que pode incluir fragmentos correspondentes aos minisatélite e microsatélite. Minisatélites consistem em agrupamentos de até centenas de unidades com 15 a 60 pares de bases, espalhadas através dos cromossomos, isto é, com repetição em "tandem", devendo cada unidade ter pelo menos um pedaço do fragmento com sequência comum, enquanto microsatélites correspondem a agrupamentos de fragmentos com sequência de 2 a 5 pares de bases repetidas em "tandem" (BRUFORD *et al.*, 1992).

Essas sondas podem ser utilizadas como específicas de um locus ou de vários locus simultaneamente. O processo de multilocus fornece maior número de bandas, não fornecendo a identificação de quais bandas derivam do mesmo locus, enquanto o de simples locus fornece baixo número, porém maior habilidade para se determinar a frequência de alelos em diferentes populações (KIRBY, 1992). O produto final da utilização destes tipos de sondas que reconhecem porções do DNA repetitivo gera um perfil conhecido como "fingerprinting" de DNA (BRUFORD *et al.*, 1992). A detecção desses tipos de sondas pode ser realizada pelos processos de hibridização, gel de sequenciamento, ou em certos casos, gel de agarose.

2.2.3. PCR (polymerase chain reaction)

A PCR é uma reação que amplifica porções específicas de uma fita de DNA que ocorrem entre sequências onde são ligados pequenos fragmentos de DNA ou oligonucleotídeos, denominados "primers". Estes "primers" possuem um final 3'-OH reativo que possibilita o início da síntese da sequência complementar ao molde de DNA, através da ação de extensão da enzima DNA polimerase em meio contendo os deoxinucleotídeos.

A repetição cíclica da reação da polimerase que consiste na desnaturação térmica do DNA para separação das duplas fitas, seguida pelo anelamento do "primer" no molde de DNA e depois sua extensão pela DNA polimerase, possibilita a amplificação de sequências de DNA desejáveis.

A automação desses ciclos assim como o aparecimento da polimerase de DNA termo-estável, que suporta vários ciclos de PCR, facilitou o processo de amplificação de fragmentos de DNA, realizado anteriormente apenas através de métodos biológicos envolvendo a clonagem em bactérias.

A Taq DNA polimerase é uma DNA polimerase termoestável com peso molecular de 94.000 originalmente purificada da bactéria termofílica *Thermophilus aquaticus* e agora disponível na forma modificada geneticamente (AmpliTaq™). A enzima tem atividade polimerásica na direção 5'-3' entre 70 a 80°C dependendo da sequência de DNA replicado (SAMBROOK et al., 1989), apresentando alta taxa de processamento podendo atingir até 150 bases/segundo/mol, perdendo sua atividade, mas não sendo denaturada a temperatura acima de 90°C e vida média de 40 minutos a 95°C (HOELZEL & GREEN, 1992). Como não tem atividade exonucleásica 3'-5', geralmente comum nas demais DNA polimerases, não possui atividade editorial, pois a atividade exonucleásica 3'-5' permite a remoção de nucleotídeo contendo a base errada e que foi recentemente

acrescentado na fita de DNA, antes do prosseguimento da extensão (WATSON *et al.*, 1989). De acordo com MCPHERSON *et al.* (1992) pode ocorrer uma taxa de erro de 1 em 9.000 e 1 em 41.000 bases sintetizadas por mudanças de pares de bases ou deleção e inserção de nucleotídeos, respectivamente. Isto ocorre porque, além da falta da atividade editorial, as moléculas de ácidos nucléicos toleram um certo número de pares de bases não pareados e ainda assim formam duplexes estáveis quando ocorre extensão suficiente. O número de ciclos de amplificação deve ser limitado àquele que produz um nível aceitável do produto, pois a frequência de erros é relacionada ao número de bases sintetizadas, aumentando com os ciclos de amplificação (ECKERT & KUNKEL, 1993).

O polimorfismo de marcadores moleculares através de PCR depende de alterações nos sítios de ligação do "primer" ou eventos de inserção e deleção, resultante da presença ou ausência de produto amplificado de um simples lócus, ou da amplitude de variação do número de repetições de sequências de bases repetitivas como no caso de microsátélites.

2.2.4.RAPD (random amplified chain reaction)

O advento da tecnologia automatizada de PCR (polymerase chain reaction) gerou um novo marcador molecular denominado RAPD (random amplified polymorphic DNA). Desde que a reação de alongamento da sequência de DNA pela DNA polimerase é iniciada no final 3'-OH do polinucleotídeo, a reação é sempre processada na direção 5'- 3'. Portanto, a partir do sítio em que o "primer" encontra sua sequência complementar e se anela é que se inicia a síntese, originando os marcadores RAPD.

Esta nova técnica foi iniciada por WILLIAMS *et al.* (1990) e WELSH & McLELLAND (1990) com o nome de amplificação arbitrária de primers, denominada depois por RAFALSKI *et al.* (1991) de RAPD.

Segundo HOELZEL & GREEN (1992) o "primer" se anela a sequência complementar a cada 1000 pares de bases. Como devido as condições da reação PCR são amplificados somente os fragmentos entre uma determinada faixa, um pequeno número de fragmentos, usualmente de cinco a dez, é amplificado pela RAPD, usualmente entre 500 a 3000 pares de bases. Portanto, pela RAPD aparecem as bandas que tem grande complementaridade. McPHERSON *et al.* (1992) reportaram que quando a reação ocorre com 100% de eficiência, somente vinte ciclos de PCR são suficientes para produzir uma amplificação de 10^6 vezes o fragmento de DNA.

Os "primers" arbitrários utilizados têm geralmente nove a dez bases. Para uniformização da temperatura de anelamento os "primers" devem conter proporção similar do conteúdo de guanina (G) e citosina (C) (entre 50 a 80%), e estrutura secundária mínima para evitar a auto-complementação (McPHERSON *et al.*, 1992). Como o número de pontes de hidrogênio entre o pareamento G-C é maior em relação ao pareamento entre as bases adenina (A) e timina (T), as forças eletrostáticas entre as primeiras é maior, implicando em maior estabilidade e temperatura de fusão (T_m), a qual é estabelecida quando 50% da fita do duplexe está na forma desnaturada. De acordo com SUGGS *et al.* (1981), a temperatura de anelamento é determinada como tendo 5°C abaixo da T_m , sendo:

$$T_m = 2 \times \text{número de base A ou T} + 4 \times \text{número de base C ou G}$$

O conteúdo de G-C, portanto, deve ficar dentro de determinada faixa para uniformização da temperatura de anelamento. A complementação no entanto não é 100%, porque a temperatura de anelamento utilizada é baixa para aumentar o número de bandas pela diminuição da estrin-gência. A estrin-gência determina a especificidade de pareamento. Assim, quanto menor a temperatura de anelamento, menor é a estrin-gência, pois as fitas dos polinucleotídeos ficam pareadas

mais facilmente, facilitando a interação. A concentração salina também influe na estringência, pois as cargas negativas dos grupos fosfatos que originam as forças eletrostáticas de repulsão entre as fitas dos polinucleotídeos podem ser anuladas por sais, aumentando a interação entre as fitas e diminuindo a estringência.

O aumento da concentração dos deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP) geralmente aumenta o índice de erro da polimerase, pelo aumento da taxa de síntese, isto é, diminui a discriminação de erro na etapa de extensão. Sendo a concentração baixa e suficiente para as reações, a enzima tem, portanto, maior fidelidade. Ainda, a concentração dos quatro dNTPs deve ser a mesma para não ocorrer desbalanceamento nucleotídico. Como já foi citado, os sais diminuem as forças eletrostáticas de repulsão, facilitando a interação entre as bases, portanto é necessária sua utilização. O íon Mg^{++} se liga a proteínas, nucleotídeo, devendo ser considerada sua concentração relativa a dos dNTPs. A diminuição da concentração do cloreto de magnésio, no entanto, é desejável por melhorar o pareamento específico de bases. A concentração ótima para a formação de um bom número de bandas deve ser, portanto, determinada empiricamente (McPHERSON *et al.*, 1992).

Segundo HOELZEL & GREEN (1992) a diminuição do pH da reação melhora a fidelidade da enzima, porém baixo pH com alta temperatura provoca dano no DNA. O tempo de desnaturação deve portanto ser rápido, mesmo porque temperatura acima de $50^{\circ}C$ diminui o pH do tampão tris. Ainda, uma velocidade mais lenta de mudança da temperatura de desnaturação para a de anelamento pode aumentar a produção, provavelmente por facilitar o anelamento. KCl em concentração máxima de até 50 mM também facilita o anelamento e pode aumentar a taxa de síntese da enzima de 50 a 60%.

Gelatina ou BSA são às vezes utilizados para ajudar a estabilizar a enzima. A concentração de DNA também é importante, pois com o aumento da quantidade de DNA, maior a concentração dos

reagentes utilizados na purificação que podem inibir a reação de PCR, como do detergente SDS, EDTA (quelante de íons metálicos) e grupos fosfatos (TAYLOR, 1992; KIRBY, 1992).

Vários aditivos são algumas vezes utilizados para aumentar a eficiência da reação PCR, como os detergentes não iônicos triton-100, tween-20 ou nonidet P40 em concentrações entre 0,1-1%. Esses compostos ajudam na estabilização da enzima e neutralizam efeitos inibitórios de contaminantes como o SDS. Detergentes não iônicos como o nonidet P-40 também ajudam a suprimir a formação de estrutura secundária, facilitando a interação entre bases. A especificidade do anelamento pode ser algumas vezes melhorada pela adição de formamida a 1-5%, DMSO (dimetilsulfóxido) a 2-10% ou TMAC (cloreto de tetrametilamônio) entre 10^{-5} a 10^{-4} M. DMSO parece reduzir a estrutura secundária do DNA (TAYLOR, 1992).

Cada locus é codificado por dois alelos que podem ter caráter dominante ou recessivo. Polimorfismo através de PCR é o resultado da presença ou ausência de banda constituída pelo fragmento de DNA amplificado após anelamento do "primer" nas duas cópias de alelos de um locus. Isto indica que locus homozigoto com duas cópias de um alelo origina o produto amplificado, enquanto locus heterozigoto em que os alelos são diferentes, não origina bandas. Marcadores RAPD são usualmente dominantes, pois indivíduos homozigotos não podem ser distinguidos de indivíduos heterozigotos. É um método indicado, portanto, para linhagens homozigotas, requerendo uma metodologia adicional para mapeamento de ligação, como a amplificação de bandas polimórficas obtidas com o RAPD para uso como sondas no RFLP (SOBRAL & RHONDA, 1993).

Trabalhos com RAPD têm sido realizados utilizando pares de NILS (near isogenic line), geralmente obtidos por introgressão, ou através da técnica de segregação massal, que permite um direcionamento na identificação de marcadores ligados, aumentando a probabilidade de sucesso (WAUGH & POWELL, 1992).

A técnica de segregação massal é conveniente quando não se tem os pares de NILS. MICHELMORE *et al.* (1991) em estudos de marcadores para resistência ao "downy mildew" em alface, utilizaram duas amostragens de DNA massal geradas de uma população segregante de um simples cruzamento. Cada agrupamento massal continha indivíduos (usualmente entre 10 a 15) que foram idênticos para uma característica particular ou região genômica, mas independente a todas as outras regiões não semelhantes. Esses dois agrupamentos contrastando para uma característica desejada foram analisados para a identificação de marcadores polimórficos entre os agrupamentos, os quais foram geneticamente ligados ao locus desta característica. Os marcadores que foram polimórficos e absolutamente ligados ao gene de interesse permitiram a detecção de diferenças entre os agrupamentos. Em contraste, locus não ligados foram heterozigotos com aproximadamente igual intensidade de bandas em cada agrupamento. Este método permitiu uma rápida investigação de marcadores segregantes na região estudada.

Uma variedade de trabalhos com marcadores RAPD já foram realizados para identificação de marcadores ligados a genes de características desejáveis, em estudos de taxonomia, mapeamento genético, caracterização.

Em citros LURO *et al.* (1992) utilizaram os marcadores RAPD para estudos de genética e taxonomia, com três "primers" feitos de uma sequência repetitiva de nucleotídeos (minisatélites). Os resultados dos autores no geral concordam com os resultados obtidos por outras metodologias sobre a filogenia e taxonomia de citros. Encontraram resultados diferentes entre os três diferentes "primers", verificando a necessidade do uso de vários "primers" para o estudo com RAPD, além da possibilidade da existência de sequências dentro das espécies de citros, não estáveis dentro da evolução.

HUE & QUIROS (1991) identificaram 14 cultivares de brócolis (*Brassica oleracea* var. *Italica*) e 12 cultivares de couve-flor (*Brassica oleraceae* var. *botrytis*) através do perfil de bandas geradas pelos marcadores RAPD usando apenas quatro "primer" de 10 mer. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 300 a 2600 pares de bases. Segundo o autor, os marcadores gerados por apenas dois ou três "primers" foram suficientes para distinguir cada um dos cultivares de brócolis e couve-flor.

HORN & RAFALSKI (1992) descreveram o ensaio RAPD em pólen imaturo derivado de embriões de *Brassica napus* relatando a possibilidade de centenas de ensaios serem realizados com o DNA obtido de um fragmento de cotilédone, permitindo que o embrião restante seja regenerado e origine plantas com o genoma discriminado.

KRESOVICH *et al.* (1992) caracterizaram a identidade genética e a diversidade de *Brassica oleracea* através de marcadores RAPD.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Para as análises isoenzimáticas e de marcadores RAPDs das espécies e cultivares de citros utilizaram-se folhas novas quase totalmente expandidas pela maior atividade enzimática e menor contaminação ambiental. Foram coletadas as folhas de laranja-doce: baianinha, hamlin, natal, valência, pera, ruby, moro e pineapple (*Citrus sinensis*); laranja-azedada (*C. aurantium*); tangerinas clementina (*C. clementina*), sunki (*C. sunki*), cleópatra (*C. reshni*) e poncã (*C. reticulata*); lima-da-pérsia (*C. limettioides*); limão galego (*C. aurantifolia*); limão cravo (*C. limonia*); trifoliata (*P. trifoliata*) e cidra (*C. medica*), retiradas de dez plantas crescidas em vasos com terra e mantidas em casa de vegetação.

Para a caracterização enzimática e/ou molecular em espécies de palmáceas utilizou-se as primeiras folhas quase totalmente expandidas retiradas de dez plântulas com quatro a seis meses de idade crescidas em sacos plásticos em casa de vegetação. Os seguintes gêneros foram estudados: *Euterpe* (juçara, açai e híbrido), *Bactris* (pupunhas com e sem espinhos), *Syagrus* (gariroba) e *Elaeis* (dendê), conforme especificado a seguir.

Gêneros, espécies e ecótipos de palmeiras utilizadas para análise.

Código	Gênero	Espécie	Ecótipo	Procedência
1	<i>Euterpe</i>	<i>E. edulis</i>	juçara branco	Pariqueraçu, SP
2		<i>E. oleracea</i>	açai roxo 1	Belém, PA
3		<i>E. oleracea</i>	açai roxo 2	Pariqueraçu, SP
4		<i>E. caatinga</i>	tadeu	Recife, PE

5		<i>E. sp</i>	açaí espada	I. Cumbú, MG
6		<i>E. sp</i>	açaí itajobi	Itajobi, MG
7		<i>E. sp</i>	açaí danilo	Pancas, ES
8		<i>E. oleraceae</i> X <i>E. edulis</i> híbrido		Pariqueraçu, SP
<hr/>				
9	<i>Bactris</i>	<i>B. gasipaes</i>	com espinhos	Yurimaguas, Peru
10		<i>B. gasipaes</i>	sem espinhos	Yurimaguas, Peru
11		<i>B. gasipaes</i>	walter c/ esp.	Belém, PA
12		<i>B. gasipaes</i>	walter s/ esp.	Belém, PA
13		<i>B. gasipaes</i>	benjamim	Benjamim Constant, AM
14		<i>B. gasipaes</i>	branca	Iquitos, Peru
15		<i>B. gasipaes</i>	ceplac 10	Itabuna, BA
16		<i>B. gasipaes</i>	EEU c/ esp.	Ubatuba, SP
17		<i>B. gasipaes</i>	EEU s/ esp.	Ubatuba, SP
18		<i>B. gasipaes</i>	t2s1	Mococa, SP
<hr/>				
19	<i>Syagrus</i>	<i>S. oleracea</i>	gariroba comum	Votuporanga, SP
20	<i>Elaeis</i>	<i>E. guineensis</i>	dendê hermes	Una, Bahia

A caracterização enzimática e molecular de couve (*Brassica oleraceae* var. *Acephala*) foi realizada utilizando-se folhas novas quase totalmente expandidas de cinco plantas desenvolvidas e mantidas em campo. Quinze variedades de couve manteiga foram investigadas: ribeirão pires 2620 (procedência Ribeirão Pires); 1811 (procedência Monte Alegre do Sul); roxa (procedência desconhecida); são roque (procedência desconhecida); gigante 915 (procedência Jardim Guanabara-Campinas); 916 (procedência Santa Elisa); crespa (procedência Piracicaba); ribeirão pires 2446 (procedência Ribeirão Pires); crespa (procedência Capão Bonito); tupi (procedência desconhecida); jundiá (procedência

desconhecida); mococa (procedência desconhecida); são José (procedência Nelson Mendonça); roxa monte alegre (procedência Monte Alegre do Sul); verde escura (procedência desconhecida),

3.2. METODOLOGIA PARA ISOENZIMAS

3.2.1. Preparo de amostras

Para os estudos com enzimas as folhas foram coletadas e manuseadas em condições de temperatura ao redor de 4°C, de modo a evitar a degradação das enzimas e manter a atividade das enzimas oxidativas e hidrolíticas baixa. Em citros foram estudados os sistemas LAP, GOT, MDH, PGM, ME e IDH, enquanto em palmeiras PGI, GOT, EST, LAP, APS, MDH, PRX e PGM, e em couve PGM, EST, PRX, IDH, GOT e MDH. Nos sistemas como a PGM, IDH, LAP, GOT, APS, que perdem atividade mais rapidamente, utilizaram-se as folhas frescas sem armazenamento. Nos sistemas PRX, EST, PGI e MDH as folhas foram conservadas em saco plástico na geladeira por até uma semana.

Foram utilizados geralmente extratos frescos obtidos pela homogeneização com almofariz ou através de homogeneizador tipo Polytron em dois tipos de tampão contendo inibidores das polifenoloxidasas. Utilizou-se dois tipos de tampões- A: tris-HCl 0,02M pH 7,4 com 12% de polivinilpirrolidona peso molecular 40.000 e 0,1% mercaptoetanol, que foi utilizado em citros. B: tris-citrato 0,02M pH 7,5 com 0,15% de cisteína hidroclicórica, 0,15% de ácido ascórbico, 1,5% PEG 40, 0,015% mercaptoetanol com a adição de cerca de 0,2g de polivilpolipirrolidona, para palmeiras e couve. Para cada quatro ml de tampão foram utilizados 0,2 a 0,5 g de tecido foliar. Os extratos das amostras foram utilizados imediatamente ou mantidos a -20°C por até uma semana.

3.2.2.Eletroforese.

A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida utilizando-se dois tipos de aparelhos eletroforéticos, o horizontal da Pharmacia (Multiphor II) e o vertical da Biorad (Protean II), em géis com 2 mm de espessura, tendo-se verificado, que pelo fato do sistema vertical permitir a utilização de maior quantidade de amostra, (de 50 a 100 μ l), a visualização mais acentuada neste sistema. O tampão B dependendo da quantidade de amostra, apresentou os melhores resultados. A quantidade de tecido foliar foi importante em plantas que apresentam alto grau de inibidores da atividade enzimática, pois o aumento da quantidade por volume de tampão pode diminuir a atividade enzimática observada.

3.2.2.1. Preparo do gel

Utilizou-se soluções estoque de 22,2% de acrilamida e 0,6% de N,N'-metilene-bisacrilamida (bisacrilamida), de modo a se ter a relação de 35:1. Empregou-se géis com cerca de 7% de acrilamida ou 7,2%T, onde %T é a percentagem incluindo gramas de acrilamida mais bisacrilamida em 100 ml (DUNBAR, 1990).

Para o preparo dos géis utilizou-se o sistema de ASHTON & BRADEN (1961) constituído pelo borato de lítio pH 8,3/ tris-citrato pH 8,3, modificando-se a constituição do tampão do gel, pela diminuição dos teores de ácido bórico/ hidróxido de lítio e aumento dos teores de tris/ citrato, que resultou em uma melhor separação das bandas, tendo-se as seguintes concentrações:

A. tampão dos eletrodos: 0,192M ácido bórico(12g/L) ajustado a pH 8,3 com hidróxido de lítio(molaridade final aproximadamente 0,038M).

B. tampão do gel:0,0057M ácido bórico; 0,0012M hidróxido de lítio; 0,0888M tris e 0,0132M ácido cítrico com pH final 8,3.

No uso rotineiro para a polimerização dos géis utilizou-se: 8,6ml da solução estoque de acrilamida; 2,4 ml de tampão tris-citrato constituído pela solução 1M de tris ajustado a pH 8,3 com ácido cítrico; 0,8ml de tampão do eletrodo/borato de lítio; 15,2 ml de água deionizada; 0,1ml de TEMED 10% e 0,1 ml de persulfato de amônia 10%, sendo estas duas últimas soluções armazenadas em geladeira por até uma semana.

A corrida eletroforética foi iniciada sob uma corrente de 10 mA, aumentando-se gradativamente para 20 mA durante as primeiras duas horas até as amostras entrarem no gel e depois mantendo-se a amperagem durante a eletroforese por cinco a seis horas.

3.2.3. Detecção de enzimas.

Os sistemas de reação enzimática para coloração das bandas foram realizados de acordo com ALFENAS(1986) para PRX, SOLTIS *et al.* (1983) para PGM,PGI,GOT,IDH,LAP e VALLEJOS(1983) para ACP, ME, MDH, com a diminuição da quantidade de reagentes pela metade para ajuste das reações em gel de poliacrilamida. Detalhes dos ensaios são relacionados a seguir.

1. Esterase (EST-EC 3.1.1.1)*

2,0 ml de alfa e beta naftil 1% em acetona 50%

50 mg de Fast blue RR

20 ml de tris-HCl 0,05M pH7,0

2.Fosfatase ácida (ACP-EC 3.1.3.2)*

1,0 ml de alfa naftil fosfato ácido de sódio

50 mg de Fast Black K salt

0,5 ml MgCl₂ 0,5M

20 ml tampão acetato de sódio 0,2M pH 5,5

3. Fosfoglucomutase (PGM-EC 5.4.2.2.)*

75 mg glucose-1-fosfato, Na₂

7 mg MTT

1 mg PMS

5 mg NAD ou NADP

20 ml tampão tris-HCl 0,1M pH 8,0

0,2ml MgCl₂ 0,5M

20 unidades de glucose-6-fosfato desidrogenase, adicionado por último. Todas as reações contendo MTT foram incubadas no escuro.

4. Fosfoglucoose isomerase (PGI-EC 5.3.1.9)*

37 mg frutose-6-fosfato, Na₂

7 mg MTT

5 mg NAD ou NADP

1 mg PMS

0,2 ml MgCl₂ 0,5M

20 ml tampão tris-HCl 0,5M, pH 8,0

20 unidades de glucose-6-fosfato desidrogenase

5. Glutamato-Oxaloacetato Transaminase (GOT- EC 2.6.1.1)*

2 mg piridoxal-5-fosfato

30 mg ácido alfa-cetoglutárico

30 mg Fast blue BB salt

2 ml ácido L-aspártico 0,5M pH 8,5

20 ml tris-HCl 0,2M, pH8,0

6. Isocitrato desidrogenase (IDH-EC 1.1.1.42 para a forma NADP e EC 1.1.1.41 para a forma NAD)*

7 mg MTT

*[A nomenclatura das enzimas é a recomendada pelo comitê da International Union of Biochemists (I.U.B, 1984) e o número da comissão de enzima (E.C.)]

5 mg NAD ou NADP
1 mg PMS
75 mg ácido isocítrico, Na₃
0,2 ml MgCl₂ 0,5M
20 ml tris-HCl 0,2M, pH 8,0

7. Leucina aminopeptidase (LAP-EC 3.4.11.1)*

50 mg Fast Black salt
20 mg L-Leucina-beta-naftilamida
1,0ml dimetil formamida
20 ml tampão fosfato de sodio 0,1M pH6,0
18 mg NAD
7 mg MTT
1 mg PMS

8. Malato desidrogenase (MDH-EC 1.1.37)*

20 ml tris-HCl 0,2M, pH 8,0
2 ml ácido málico 0,5M, pH 8,0

9. Enzima málica (ME-EC 1.1.1.40)*

7 mg MTT
5 mg NADP
1 mg PMS
0,2 ml MgCl₂ 0,5M
20 ml tris-HCL 0,1M, pH 8,0
2,0ml ácido málico 2M pH 8,0

10. Peroxidase (PRX-EC 1.11.1.7)*

12 mg O-dianisidina
17,5 ml tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 5,8
7,5 ml álcool etílico
0,16 ml H₂O₂ (3%).

Cada lócus ou gene foi referido pela abreviatura específica da enzima correspondente, seguida por número referente ao lócus para o caso de mais de um gene para a mesma enzima. A nomenclatura utilizada como referência aos diversos lócus em citros foi a de TORRES *et al.* (1978; 1982; 1985), sendo os alelos denominados de acordo com a velocidade de migração das aloenzimas, do mais rápido ao mais lento, de P (Ponciros), F (Fast), I (Intermediate), M (Medium), S (Slow), R (Retarded). Em palmeiras e couve, nas quais os estudos genéticos de isoenzimas são escassos e preliminares, as bandas observadas foram denominadas da mais lenta a mais rápida de A, B, C, D, E, F e G.

3.3. METODOLOGIA PARA MARCADORES RAPD.

3.3.1. Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi feita através do ajuste da metodologia de SHILLITO & SAUL (1988) que utiliza o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), um detergente catiônico que solubiliza as membranas celulares e forma um complexo com o DNA (MILLIGAN, 1992). Como todo detergente, atua também como inibidor da ação de Dnases, que estão presentes em todos os tecidos, razão pela qual todo o manuseio deve ser feito de preferência com luvas para evitar a contaminação. Todos os utensílios plásticos e soluções (as não autoclaváveis foram esterilizadas por filtração) foram esterilizados por autoclavagem e a vidraria por aquecimento a 180°C por no mínimo duas horas. Se o manuseio do material para análise exige mais cuidados em relação a isoenzimas, por outro lado é muito mais fácil sua obtenção devido ao fato de que sendo a molécula de DNA muito estável, pode ser extraída somente uma vez e armazenada a -20°C durante muito tempo.

Após lavagem das folhas com etanol 30% a extração seguiu a sequência de operações:

Cerca de 4 gramas de tecido pesado anteriormente à limpeza, foi triturado com nitrogênio líquido em almofariz.

1 - O material foi a seguir transferido para um tubo de 50 ml e homogeneizado, antes do descongelamento, com 10ml tampão de extração previamente aquecido a 70°C: 1 a 2% CTAB, tris-HCl 0,05M pH 8,0; 10mM EDTA, 0,7M NaCl e 0,5 a 1% de PVP.

2 - Após incubação por 30-60 minutos a 60°C, com ocasional suave agitação, foi esfriado a temperatura ambiente.

3 - Adicionou-se a seguir 10 ml de clorofórmio/alcool isoamílico(24:1) para auxiliar na purificação do DNA, misturando-se suavemente.

4 - Após centrifugação a 4.000rpm por 20min a temperatura ambiente, que deve ser maior que 18°C para não ocorrer a precipitação do CTAB juntamente com o DNA, o sobrenadante foi separado. Ao sobrenadante adicionou-se 1/10 volume solução CTAB (10% em 0,7M NaCl) e igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico.

5 - Após nova centrifugação a 4°C e separação do sobrenadante, adicionou-se o mesmo volume de tampão de precipitação: 1% CTAB, 0,05M tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA.

6 - Centrifugou-se novamente a 4°C e após o descarte do sobrenadante o pelete foi dissolvido por 1h a 65°C com 0,5ml de tampão de alta concentração salina: 10mM tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA e 1M NaCl.

7 - Após a dissolução total do pelete o DNA foi precipitado com a adição de 2 vol de etanol.

8 - O DNA foi então recuperado por centrifugação a 10.000rpm/10 minutos/ 4°C e o pelete lavado com etanol 70%, recentrifugado e seco ao ar.

9 - O DNA foi redissolvido em 250 μ l de tampão TE (1mM tris/HCl pH 8,0, 0,1M EDTA), ao qual se adicionou posteriormente 10 μ g de ribonuclease e então incubou-se por 30 minutos a 37°C.

10- Após duas extrações utilizando igual volume de fenol:clorofórmio(25:24), que degradam as proteínas ligadas ao DNA permitindo sua retirada, a fase aquosa foi separada através de centrifugação e adicionada de 0,1 vol de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2 vol etanol para a precipitação do DNA.

11 - Após nova centrifugação o DNA foi lavado duas vezes com etanol 70% e o pelete redissolvido em 100 μ l de tampão TE com menor quantidade de tris e EDTA (1/10 vol).

Este extrato foi mantido a -20°C, sendo utilizado para diluições nas concentrações necessárias quando desejado. As concentrações de DNA foram determinadas no minifluorímetro para DNA TKO 100 da HOEFER.

3.3.2. Teste de PCR

Utilizou-se os kits de "primers" de 10 mer da Operon Technologies, Alameda CA 94501, USA, denominados A e B, usuais em RAPD e o termociclador Gene Ataq da Pharmacia, que permite 40 reações de PCR por vez.

Para as reações RAPD os "primers" foram diluídos para a concentração desejada de 5 pmols, tendo as seguintes sequências:

KIT A		KIT B	
CÓDIGO	5' para 3'	CÓDIGO	5' para 3'
A1.	CAGGCCCTTC	B1.	GTTTCGCTCC
A2.	TGCCGAGCTG	B2.	TGATCCCTGG
A3.	AGTCAGCCAC	B3.	CATCCCCCTG
A4.	AATCGGGCTG	B4.	GGACTGGAGT
A5.	AGGGGTCTTG	B5.	TGCGCCCTTC

A6.	GGTCCCTGAC	B6.	TGCTCTGCCC
A7.	GAAACGGGTG	B7.	GGTGACGCAG
A8.	GTGACGTAGG	B8.	GTCCACACGG
A9.	GGGTAACGCC	B9.	TGGGGGACTC
A10.	GTGATCGCAG	B10.	CTGCTGGGAC
A11.	CAATCGCCGT	B11.	GTAGACCCGT
A12	TCGGCGATAG	B12.	CCTTGACGCA
A13	CAGCACCCAC	B13.	TTCCCCCGCT
A14	TCTGTGCTGG	B14.	TCCGCTCTGG
A15	TTCCGAACCC	B15.	GGAGGGTGTT
A16	AGCCAGCGAA	B16.	TTTGCCCGGA
A17	GACCGCTTGT	B17.	AGGGAACGAG
A18	AGGTGACCGT	B18.	CCACAGCAGT
A19	CAAACGTCCG	B19.	ACCCCCGAAG
A20	GTTGCGATCC	B20.	GGACCCTTAC

3.3.3. Reação de Amplificação

Como a reação PCR amplifica pequenas quantidades de DNA, foram tomados todos os cuidados para evitar contaminação, como limpeza dos pipetadores automáticos, área exclusiva para o manuseio, utilização de materiais e soluções esterilizadas, luvas descartáveis. Precauções foram realizadas para que as condições da reação se processarem as mais homogêneas possíveis, visto que alterações de temperatura, origem da polimerase e meio tamponante alterarem o anelamento que não é totalmente específico. Apenas as análises que produziram perfil polimórfico foram consideradas, sendo repetidas pelo menos duas vezes.

As reações foram realizadas em um volume de 25 µl de uma solução contendo 10mM tris-HCl pH 8,3; 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂; 0,1 µMol de cada deoxinucleotídeo de adenina (dATP), timina (dTTP), guanina (dGTP) e citosina (dCTP); 5 picomols de um dos "primers" de

10 mer, 20-25 ng de DNA genômico e 2,0 unidades de Taq DNA polimerase (GIBCO). Foram montados ensaios para cada um dos "primers" disponíveis.

A amplificação foi feita com aquecimento inicial a 94°C/3min para denaturação de toda fita dupla de DNA e a seguir 35 ciclos de um minuto a 94°C para a denaturação, 30 segundos a 34°C para o anelamento e 1 minuto e 30 segundos a 72°C para a síntese da cadeia complementar pela polimerase, seguida de 7 minutos a 72°C para a completa extensão de todas as cadeias complementares. Após a amplificação, o DNA foi armazenado a -20°C até análise.

3.3.4. Análise do DNA em gel de agarose.

O DNA extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE (0,04M tris-acetato; 0,001M EDTA). Na amostra de DNA amplificado foi adicionado 1/10 vol de solução para aumentar a densidade e colorir a mesma, de modo a facilitar sua submersão nas fendas do gel e o acompanhamento da corrida eletroforética: 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilene cianol FF e 50% glicerol.

Após a corrida eletroforética verificada pela distância percorrida pelo corante, que dura cerca de duas a três horas a 120V, o gel foi imerso em solução de brometo de etídio (5 µg/ml) por 30 a 40 minutos, para o brometo se intercalar nas moléculas do DNA, e a seguir o gel foi imerso em solução 1mM de MgSO₄ para a retirada do excesso de brometo no gel, por 20 minutos. O exame do perfil de DNA no gel foi então feito sob luz ultravioleta do transluminador, condição em que o brometo de etídio fluoresce permitindo a distinção das bandas de DNA, para em seguida ser tirada fotografia com a câmara Polaróid MP4+ da PHOTODYNE.

3.4. ANÁLISE MULTIVARIADA

A análise da diversidade genética foi realizada através da análise multivariada pelo programa NTSYS. A presença ou ausência de cada banda constituída pelos alelos das isoenzimas ou fragmentos de DNA amplificados foi computada como 1 ou 0 sendo feito o padrão de similaridade destas. O padrão de similaridade foi construído com os dados de "single matched" (SM) ou coincidência total, que é igual ao número de coincidência de dados/ número total de dados, para cada cultivar comparado com todos os outros, originando a matriz de similaridade. Os dendrogramas baseados no método de agrupamento UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) que utiliza o método de pareamento não ponderado através das médias aritméticas dos dados de similaridade foram a seguir contruídos. Foram consideradas apenas as bandas com grande intensidade, porque segundo HEUN & HELENTJARIS (1993), estas são mais reproduzíveis devido ao fenômeno da competição entre os fragmentos para amplificação.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.POLIMORFISMO ENZIMÁTICO E RAPD EM CITROS

4.1.1.Polimorfismo enzimático

LAP - As análises do polimorfismo do sistema LAP foram realizadas nos sistemas de eletroforese vertical e horizontal. A Figura 1 mostra a fotografia do gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as isoenzimas presentes após corrida eletroforética dos extratos das folhas. No polimorfismo de espécies e cultivares de citros no sistema vertical, que permite maior volume de amostra, as isoenzimas (10 a 16-Fig 1) foram encontradas em duas regiões distintas denominadas A e B, em vez de apenas em uma conforme TORRES *et al.* (1982). No sistema horizontal (1 a 9-Fig 1) foram observadas de duas a três bandas, enquanto os mesmos autores reportaram duas a quatro bandas e a ocorrência de bandas duplas codificadas pelos alelos S, M e F. Segundo estes autores um cultivar com uma banda dupla seria homozigoto enquanto com duas bandas duplas seria heterozigoto. Considerando-se a ocorrência da duplicação das bandas relatada por TORRES *et al.* (1982), o padrão com o fenótipo de três bandas corresponderia ao heterozigoto com um par de bandas duplas sobrepostas parcialmente, ficando neste caso com o fenótipo no gel correspondente ao genótipo FS citado por Torres *et al.* (1982). Esta região mais rápida (A-Fig 1), caracterizada e denominada como Lap-1 por Torres *et al.* (1982), apresentou na laranja-doce (1, 10-Fig 1) e tangerina clementina (3, 11-Fig 1) três bandas ficando com o genótipo F1S1 de acordo com TORRES *et al.* (1982). As demais espécies apresentaram uma banda dupla correspondente aos fenótipos observados e denominados de acordo com TORRES *et al.* (1982), de PP para o trifoliata (4, 5-Fig 1); FF para as tangerinas (6, 7, 14 a 16-Fig 1), laranja-azeda (2-

Fig 1), lima-da-pérsia (13-Fig 1) e limão-cravo (9-12 Fig 1); MM para o limão-galego (8-Fig 1). Na região mais lenta (B-Fig 1) observou-se pela eletroforese vertical a ocorrência de uma banda avançada mais forte.

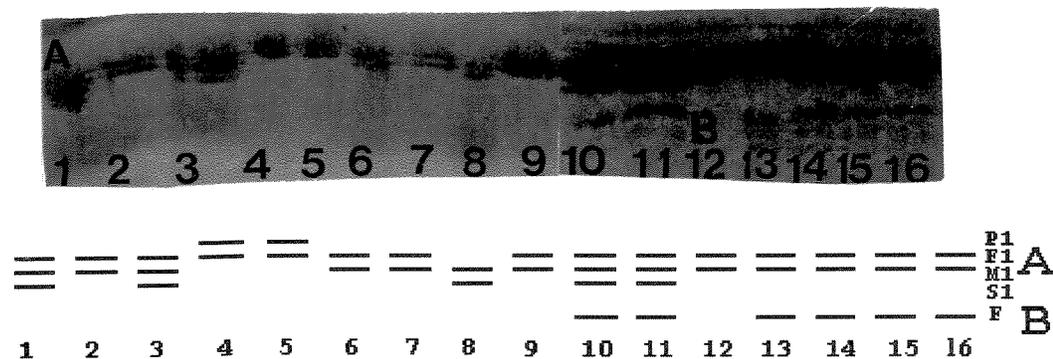


Figura 1. Zimograma de LAP de citros. Início na parte inferior, ânodo no topo: 1= 10= laranja doce com uma banda na região (B) e Lap-1 (A): F1S1; 2= laranja azeda F1F1; 3= 11= tangerina clementina FF e F1S1; 4= 5= trifoliata P1P1; 6= 7= 14= 15= 16= tangerinas sunki, poncã, sunki, poncã, cleópatra F1F1; 8= limão galego M1M1; 9 = 12= limão cravo F1F1; 13 = lima-da-pérsia F1F1.

GOT - A Figura 2 mostra um gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as isoenzimas de extratos de folhas do sistema GOT, presentes após eletroforese vertical. As isoenzimas do sistema GOT ocorreram em duas regiões denominadas A e B. A região mais próxima a origem (B- Fig 2) apresentou o fenótipo de uma a três bandas das proteínas diméricas, semelhante ao observado em géis de amido por TORRES *et al.* (1978). Nesta região mais lenta (B- Fig 2), no lócus denominado Got-1 por TORRES *et al.* (1978) foram observados os quatro alelos denominados P, F, M e S pelo mesmo autor. O lócus homozigoto, foi observado nas tangerinas (1 a 4-Fig 2), laranjas doce (5-Fig 2) e azeda (6-Fig 2) com o genótipo homozigoto SS e no limão-galego (10-Fig 2) com o FF, confirmando os dados de TORRES *et al.* (1978). As demais apresentaram as três bandas correspondente ao genótipo heterozigoto. A lima-da-pérsia (7-Fig 2) e o limão-cravo (9-Fig 2), o genótipo FS, e o trifoliata (8-Fig 2), o PM. As aloenzimas de migração mais rápida (região A- Fig 2) correspondentes as codificadas pelo gene denominado Got-2 por TORRES *et al.* (1978), apresentaram na tangerina clementina (4-Fig 2), laranjas doce (5-Fig 2) e azeda (6-Fig 2), lima-da-pérsia (7-Fig 2) e limão-cravo (9-Fig 2), três bandas e nos outros cultivares apenas duas. TORRES *et al.* (1978) consideraram os conjuntos de duas e de três bandas pertencentes a um mesmo lócus simples. SOOST & TORRES (1980) consideraram a hipótese de o gene Got-2 ser um lócus duplicado com formação de heterodímero intralócus, seguida por BALLVÉ *et al.* (1991). BALLVÉ *et al.* (1991) sugeriram, após observações em progênies provenientes de autofecundação de limão-cravo, a existência de dois locos independentes. Como, porém, as observações não foram conclusivas, seguiu-se a hipótese de SOOST & TORRES (1980). Tendo as laranjas e a tangerina clementina apresentado o fenótipo de três bandas, sendo uma mais avançada em relação as demais, ficou evidenciada a existência de um alelo intermediário entre os F e M observados por

TORRES *et al.* (1978), também observado e denominado I por BALLVÉ *et al.* (1991). Desta forma, nas tangerinas poncã, sunki e cleópatra (1 a 3-Fig 2) foram observados o genótipo II/MM, enquanto na tangerina clementina (4-Fig 2), laranjas doce (5-Fig 2) e azeda (6-Fig 2) o genótipo FF/MM; lima-da-pérsia (7-Fig 2) e limão cravo (9-Fig 2) II/SS; trifoliata (8-Fig 2) e limão galego (10-Fig 2) MM/SS.

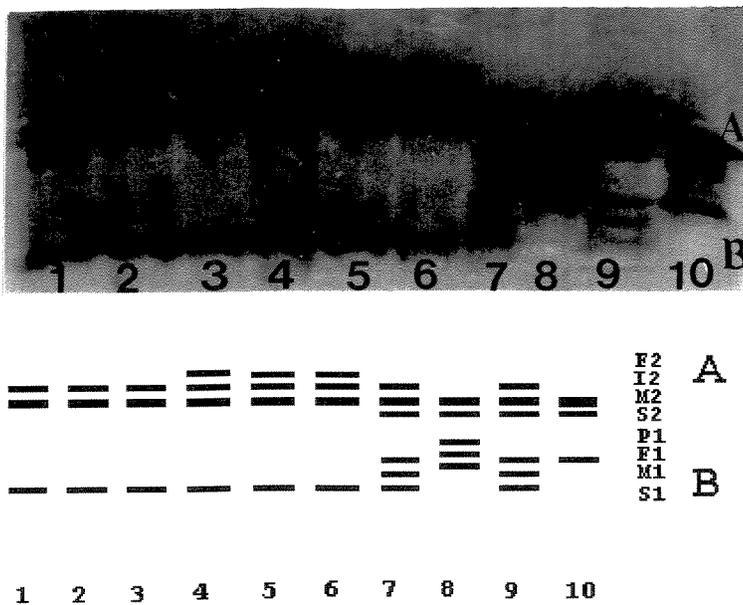


Figura 2. Zimograma de GOT em citros: Início na parte inferior, ânodo no topo: 1 = 2 = 3 = tangerinas poncã, cleópatra, sunki com Got-1(B): S1S1 e Got-2(A): I2I2/M2M2; 4 = 5 = 6 = tangerina clementina, laranja azeda e laranja doce S1S1 e F2F2/M2M2; 7 = lima-da-pérsia F1S1 e M2M2/S2S2; 8 = trifoliata P1M1 e M2M2/S2S2; 9 = limão cravo F1S1 e I2I2/S2S2; 10 = limão galego F1F1 e M2M2/S2S2.

MDH - A Figura 3 mostra um gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as isoenzimas do sistema MDH em extratos de folhas, submetidas à eletroforese vertical e horizontal. De acordo com TORRES *et al.* (1982) as isoenzimas do sistema MDH são codificadas na forma dímera em dois loci denominados Mdh-1 e Mdh-2, parcialmente sobrepostos e não formando heterodímeros interloci. Pela eletroforese horizontal (1-10-Fig 3) foram visualizadas de uma a três bandas. Verificou-se que a banda de migração mais rápida, apresentou-se forte em quase todos os cultivares, exceto trifoliata (6-Fig 3) e limão galego (3-Fig 3). Esta banda deve ser na realidade constituída por duas bandas, como pode ser melhor visualizada pela eletroforese vertical (11 a 13-Fig 3), em todos os cultivares, exceto trifoliata e limão galego. Considerando-se a codificação por dois loci, Mdh-2 e Mdh-1, de acordo com TORRES *et al.* (1982), as laranjas doce e azeda (1, 2-Fig 3) e tangerinas (7 a 13-Fig 3) apresentaram as duas bandas correspondentes aos genótipos homocigotos denominados por estes autores como F2F2 e F1F1. O limão galego (3 -Fig 3) apresentou, portanto, a banda de migração mais rápida seguida por três bandas correspondentes aos genótipos homocigoto denominado F2F2 por TORRES *et al.* (1982) e heterocigoto M1S1 por HIRAI & HOZAKI (1981) e HIRAI *et al.* (1986). Este alelo M foi observado por estes autores como característico de limas doces (*C. aurantifolia*). MOORE & CASTLE (1988) também reportaram alelos adicionais aos F1 e S1 encontrados por TORRES *et al.* (1982). O limão cravo (4, 13-Fig 3) e a lima-da-pérsia (5-Fig 3) apresentaram o fenótipo das duas bandas mais avançadas seguidas por outras duas, correspondentes aos genótipos homocigoto F2F2 e heterocigoto F1S1. Estes resultados concordam com os de HIRAI & KOZAKI (1981) e HIRAI *et al.* (1986) que encontraram o perfil de três bandas para o sistema MDH, ao invés das seis bandas de TORRES *et al.* (1982) em limas. O trifoliata (6-Fig 3) apresentou

o perfil de 2 bandas bem separadas, correspondentes aos genótipos denominados F2F2 e S1S1 por TORRES *et al.* (1982).

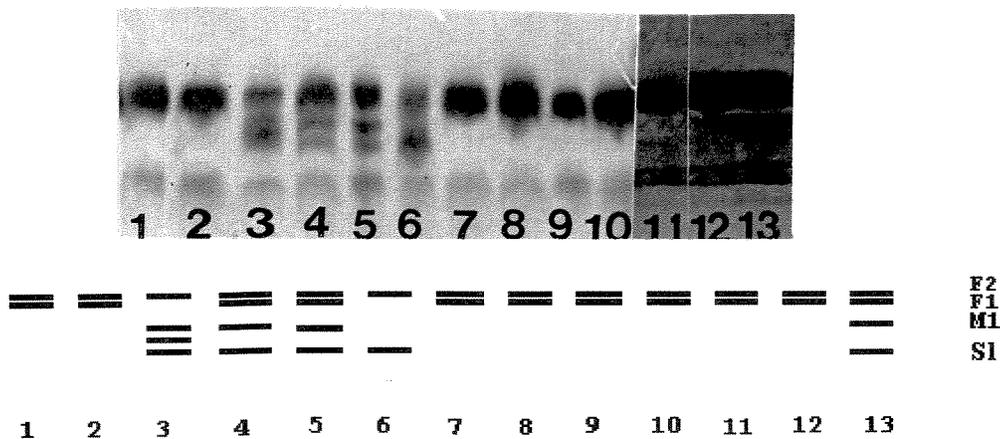


Figura 3. Zimograma de MDH de citros. Início na parte inferior, ânodo no topo. 1=2= laranjas doce e azeda com Mdh-1: F1F1 e Mdh-2: F2F2; 3= limão galego M1S1 e F2F2; 4= 13= limão cravo F1S1 e F2F2; 5=lima-da-pérsia F1S1 e F2F2; 6= trifoliata F1F1 e F2F2; 7=8=9=10=11=12= tangerinas sunki, cleópatra, poncã e clementina, sunki, cleópatra F1F1 e F2F2.

PGM - A Figura 4 mostra um gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as isoenzimas de extratos de folhas do sistema PGM, presentes após eletroforese vertical. As isoenzimas do sistema PGM apresentaram-se como monoméricas em duas regiões denominadas A e B, com uma ou duas bandas. Como, pelos estudos de TORRES *et al.* (1978), o sistema PGM parece ser codificado por um gene simples que controla a produção de proteínas monoméricas e neste trabalho foram encontradas de duas a quatro bandas, pode ser considerada a hipótese da existência de outro gene, além do Pgm-1 relatado na literatura. O Pgm-1 apresentou-se na região mais rápida (A-Fig 4), de acordo com os dados de TORRES *et al.* (1982), com os alelos F, I, P, M e S. Os fenótipos heterozigotos das laranjas doce (6-Fig 4) e azeda (1-Fig 4), lima-da-pérsia (4-Fig 4), limão galego (2-Fig 4), trifoliata (5-Fig 4) e tangerina clementina (7-Fig 4) apresentaram portanto, os genótipos, FS, FS, FS, FM, PM e FI, respectivamente. As outras tangerinas (8 a 10-Fig 4) e o limão-cravo (3-Fig 4) apresentaram a banda correspondente ao genótipo homozigoto FF. A observação de um locus na região B-Fig 4, migrando catodicamente em relação ao anterior e mais intensamente em tecidos de floema do que folha, foi relatado e denominado de Pgm-2 por ROOSE & TRAUGH (1988). Neste trabalho foram observadas de uma a duas bandas nesta região, denominadas de acordo com a velocidade de migração de A, B, C e D. Nas laranjas doce (6-Fig 4) e azeda (1-Fig 4) e no limão-galego (2-Fig 4) foram observadas as duas bandas B e C, A e C, B e C, respectivamente. As demais espécies, uma banda, a B no limão-cravo (3-Fig 4), lima-da-pérsia (4-Fig 4) e tangerinas sunki (8-Fig 4) e cleópatra (10-Fig 4); C, nas tangerinas clementina (7-Fig 4) e poncã (9-Fig 4), e D, no trifoliata (5-Fig 4). Este sistema apresentou maior diferenciação entre as espécies, tendo diferenciado, a tangerina clementina da laranja-doce.

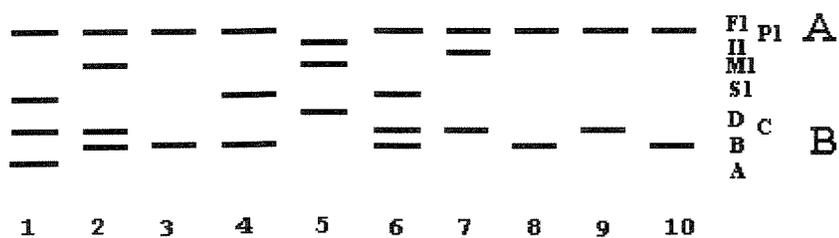
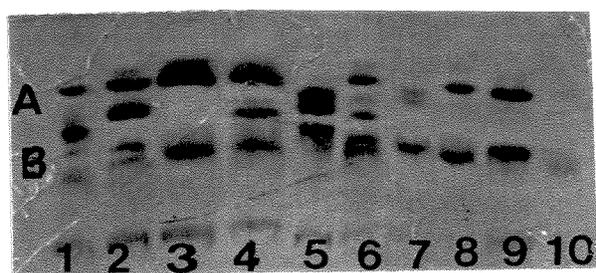


Figura 4. Zimograma de PGM de citros. Início na parte inferior, ânodo no topo. 1=laranja azeda com Pgm-1(A):F1S1 e bandas na região B: A e C; 2=limão galego F1M1 e B e C; 3=limão cravo F1F1 e B; 4=lima-da-pérsia F1S1 e B; 5=trifoliata P1M1 e D; 6=laranja doce F1S1 e B e C; 7=tangerina clementina F1I1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

ME - A Figura 5 mostra a fotografia do gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as isoenzimas de extrato de folha do sistema ME, presentes após eletroforese vertical. As isoenzimas do sistema ME das espécies estudadas apresentaram bandas na região mais rápida com coloração muito fraca, de acordo com TORRES *et al.* (1978), que não foram consideradas. A região considerada correspondeu ao gene observado codificando proteínas monoméricas e denominado Me-1 por TORRES *et al.* (1978), onde o trifoliata (6-Fig 5) se apresentou com as duas bandas correspondente ao heterozigoto FR, e as demais, com uma banda correspondente ao genótipo homozigoto II, de acordo com este mesmo autor.

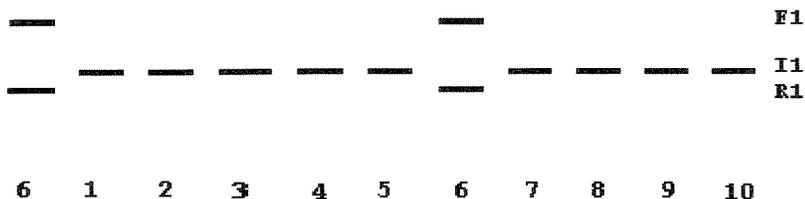
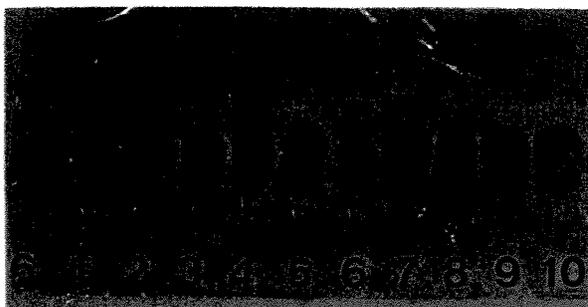
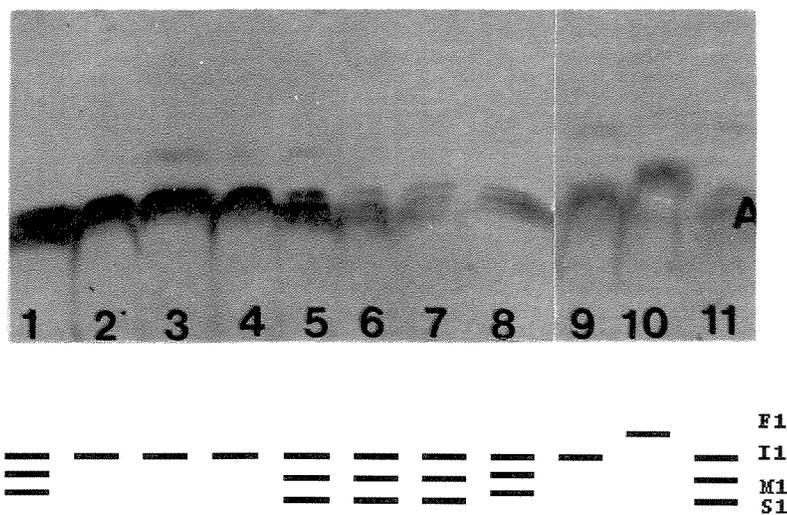


Figura 5. Zimograma de ME de citros. Início na parte inferior, ânodo no topo. 1=2=3=4=5=laranja-doce, laranja-azeda, limão-cravo, lima-da-pérsia, tangerina clementina com Me-1 (A):I1I1;6= trifoliata F1R1; 7=8=9=10=limão galego, tangerinas sunki, poncã e cleópatra I1I1.

IDH - A Figura 6 mostra a fotografia do gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as isoenzimas de extratos de folhas do sistema IDH, presentes após eletroforese vertical. No sistema IDH as isoenzimas apresentaram-se em uma região com uma a três bandas caracterizando serem diméricas e codificadas pelos quatro alelos S, M, I e F, confirmando os dados de TORRES *et al.* (1982). O limão cravo (5-Fig 6), o limão galego (6-Fig 6) e a lima-da-pérsia (7-Fig 6) apresentaram três bandas correspondentes ao genótipo heterozigoto IS, enquanto a laranja doce (8-Fig 6) e a tangerina clementina (1-Fig 6), as três bandas correspondentes ao heterozigoto IM. O trifoliata (10-Fig 6), as tangerinas (2 a 4-Fig 6) e a laranja azeda (9-Fig 6), uma banda codificada pelos alelos F, I e I, respectivamente.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
 Figura 6. Zimograma de IDH de citros. 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 azeda II; 10= trifoliata FF; 11=lima da pérsia IS.

Os dados apresentados para as várias isoenzimas confirmam 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 em relação à literatura. O sistema PGM apresentou duas regiões distintas de bandas, sugerindo a existência de um locus adicional ao conhecido Pgm-1, também observado e denominado Pgm-2 por ROOSE & TRAUGH (1988) em tecidos de floema. O sistema MDH apresentou um alelo não relatado por TORRES *et al.* (1982), mas observado e denominado de M por HIRAI & KOZAKI (1981) e HIRAI *et al.* (1986). O LAP foi também considerado como tendo bandas duplas (TORRES *et al.*, 1982), com a diferença de que o locus heterozigoto com um par de bandas duplas apresentou apenas três bandas, em vez das quatro esperadas, pois uma quarta banda foi observada pela eletroforese vertical em outra região. Os demais sistemas mostraram-se de acordo com a literatura.

Foram observados para a lima-da-pérsia e o limão cravo fenótipos semelhantes provenientes de Got-1, Got-2, Lap-1, Idh-1, e Me-1, indicando um relacionamento entre ambas as espécies. O limão galego mostrou fenótipo similar ao da lima-da-pérsia nos codificados pelo Got-2, Idh-1 e Me-1 e ao limão cravo pelo Me-1 e Idh-1, mostrando uma ligação entre as três variedades. As isoenzimas da tangerina clementina assemelharam-se mais às da laranja doce, pois foram diferentes apenas no sistema PGM.

Os dados concordam com os de TORRES *et al.* (1978, 1982). de que os cultivares dentro de cada espécie apresentam uma combinação única de genótipos tendo a maioria dentro de uma espécie combinação idêntica de genótipos, sugerindo que os cultivares foram originados de algum progenitor comum por meios assexuais. Com exceção das

tangerinas, que apresentaram-se como grupo morfológicamente variado, o restante apresentou baixa variabilidade.

Partindo-se deste princípio de semelhança entre os cultivares de citros foi feita a medição da heterozigose, embora com baixo número de amostra, entre as laranjas doces, em que não foi possível constatar a diferenciação, e as tangerinas que mostraram variabilidade por enzimas, através do índice de diversidade de NEI (1973).

A partir dos dados do quadro 1 e 2 que fornecem a frequência de alelos das tangerinas e laranjas, calculou-se a heterozigose média correspondente a média dos oito lócus, encontrando-se o valor de 0,144 para as tangerinas e 0,250 para as laranjas, indicando a maior diversidade esperada das laranjas.

Quadro 1. Frequências alélicas e heterozigose correspondente as tangerinas (clementina, sunki, cleópatra e poncã)

Frequências dos alelos						
lócus	f(F)	f(I)	f(M)	f(S)	f(W)	h ⁽¹⁾
Got-1	-	-	-	1,000	-	0,000
Got-2	0,500	-	0,500	-	-	0,500
Mdh-1	-	1,000	-	-	-	0,000
Mdh-2	-	-	1,000	-	-	0,000
Pgm-1	0,875	0,125	-	-	-	0,219
Me-1	-	1,000	-	-	-	0,000
Idh-1	-	0,875	0,125	-	-	0,219
Lap-1	0,875	-	-	0,125	-	0,219

(1) h= heterozigose a cada lócus gênico

Quadro 2. Frequências alélicas e heterozigose correspondentes as laranjas doces (hamlin, natal, valência, pineapple, ruby, moro, pera).

lócus	Frequências alélicas				h ⁽¹⁾
	f(F)	f(I)	f(M)	f(S)	
Got-1	-	-	-	1,00	0,00
Got-2	0,50	-	0,50	-	0,50
Mdh-1	-	1,00	-	-	0,00
Mdh-2	-	-	1,00	-	0,00
Pgm-1	0,50	-	-	0,50	0,50
Me-1	-	1,00	-	-	0,00
Idh-1	-	0,50	0,50	-	0,50
Lap-1	0,50	-	0,50	-	0,50

(1) h= heterozigose a cada lócus gênico

Considerando-se oito lócus em seis sistemas enzimáticos, o número efetivo de alelos por lócus polimórfico (Quadro 3) foi mais baixo para as tangerinas, igual a 1,20, do que em laranjas doces, igual a 1,50, indicando novamente que a diversidade esperada foi maior para as laranjas em relação as tangerinas.

A ausência de identificação pelas isoenzimas entre as variedades de *C. sinensis*, apesar do maior número efetivo de alelos por lócus polimórfico e maior heterozigose, em relação as tangerinas, reforça a teoria de que a origem da diversificação varietal pode ser decorrente de mutação.

Quadro 3. Avaliação da diversidade interespecífica de citros com nove loci enzimáticos.

Locus	Espécies(1)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de alelos por locus										
	1,50	1,50	1,10	1,10	1,10	1,60	1,50	1,50	1,50	1,25
Genótipos dos cultivares										
Got-1	SS	SS	SS	SS	SS	FS	FF	FS	PM	SS
Got-2	FM	FM	IM	IM	IM	MS	MS	IS	MS	FM
Mdh-1	FF	FF	FF	FF	FF	FS	MS	FS	SS	FF
Mdh-2	FF	FF	FF	FF	FF	FF	FF	FF	FF	FF
Pgm-1	FS	FI	FF	FF	FF	FS	FM	FF	PM	FS
Me-1	II	II	II	II	II	II	II	II	FR	II
Idh-1	IM	IM	II	II	II	IS	IS	IS	FF	II
Lap-1	FS	FS	FF	FF	FF	FF	MM	FF	PP	FF

(1) 1: *Citrus sinensis* (baianinha, hamlin, natal, valência, pineapple, ruby, moro, pera); 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*.

Por outro lado, a ocorrência de diferenças entre as tangerinas clementina e poncã em relação às sunki e cleópatra, apesar do baixo número efetivo de alelos por locus polimórfico e baixa heterozigose, reforça a teoria de que a diversificação varietal das tangerinas foi oriunda de hibridação.

Lima-da-pérsia mostrou maior número de alelos seguida pelo trifoliata, limão galego, limão cravo, laranja doce, tangerina clementina, laranja azeda e tangerinas.

Dentro da taxonomia convencional de citros o número de espécies considerado variou de duas, *C. medica* e *C. aurantium*, classificadas por Linneu, a 149 espécies, classificadas por Tanaka. Os estudos preliminares de BARRET & RHODES (1976) utilizando 146 caracteres fenotípicos, indicaram as espécies de *C. grandis*, *C. medica* e *C. reticulata* como as verdadeiras ancestrais, que teriam dado origem a todas as outras espécies.

Esta hipótese vem sendo confirmada por vários estudos tanto enzimáticos (ESEN & SCORA, 1977), como pelo perfil do DNA de cloroplasto (VARDI *et al.*, 1987) ou do DNA genômico através da metodologia de RFLP (ROOSE, 1988).

A hipótese de que *C. sinensis* (laranja doce) seria híbrido entre *C. grandis* (pomelo) e *C. reticulata* (poncã), foi reportada inicialmente por TATUM *et al.* (1974) e depois por VARDI (1988). Além da laranja doce, também a laranja azeda (*C. aurantium*) foi reportada como sendo híbrido entre pomelo e tangerina por GREEN *et al.* (1986), que colocaram num mesmo grupo os cultivares de *C. limon*, *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. grandis* e *C. paradisi* (grapefruit); ficando em grupos separados as espécies *C. reticulata* e *C. medica* (cidra) e mais distante a *P. trifoliata*. *C. medica* foi encontrada como altamente homozigota e relativamente monomórfica para isoenzimas e RFLP.

MALIK *et al.* (1974) iniciaram a hipótese de que o limão seria um trihíbrido originado da cidra, pomelo e uma outra fonte não identificada também relatada por BARRET & RHODES (1976), os quais incluíram a lima como provável trihíbrido proveniente de cidra, pomelo e *Microcitrus*. VARDI (1988), porém, trabalhando com DNA de cloroplastos, sugeriu que o limão seria originado apenas da hibridação entre pomelo e cidra, pois o fato da cidra, pomelo e *Microcitrus* serem monoembriônicos desfavoreceria a trihibridação, assim como a cidra ter subunidades protéicas encontradas apenas em sua espécie e seu citoplasma não ter sido encontrado em nenhum híbrido.

O dendrograma baseado no método de agrupamento UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) que utiliza o método de pareamento não ponderado através das médias aritméticas obtidas das trinta e sete bandas polimórficas dos alelos das isoenzimas da Figura 7, confirmou o agrupamento entre as diferentes espécies de tangerinas, tendo a poncã ficado mais próxima a sunki que a cleópatra, e mais distante, a clementina que se ligou ao grupo das laranjas doces, confirmando a natureza híbrida proveniente do grupo das laranjas. As laranjas doces formaram um grupo homogêneo e fortemente ligado que se ligou a laranja azeda. Num outro distinto agrupamento o limão galego e a lima-da-pérsia, mais próximos, se ligaram ao limão cravo, indicando a proximidade entre estas espécies. A trifoliata ficou claramente bem distante dos demais grupos, confirmando a procedência de gêneros diferentes.

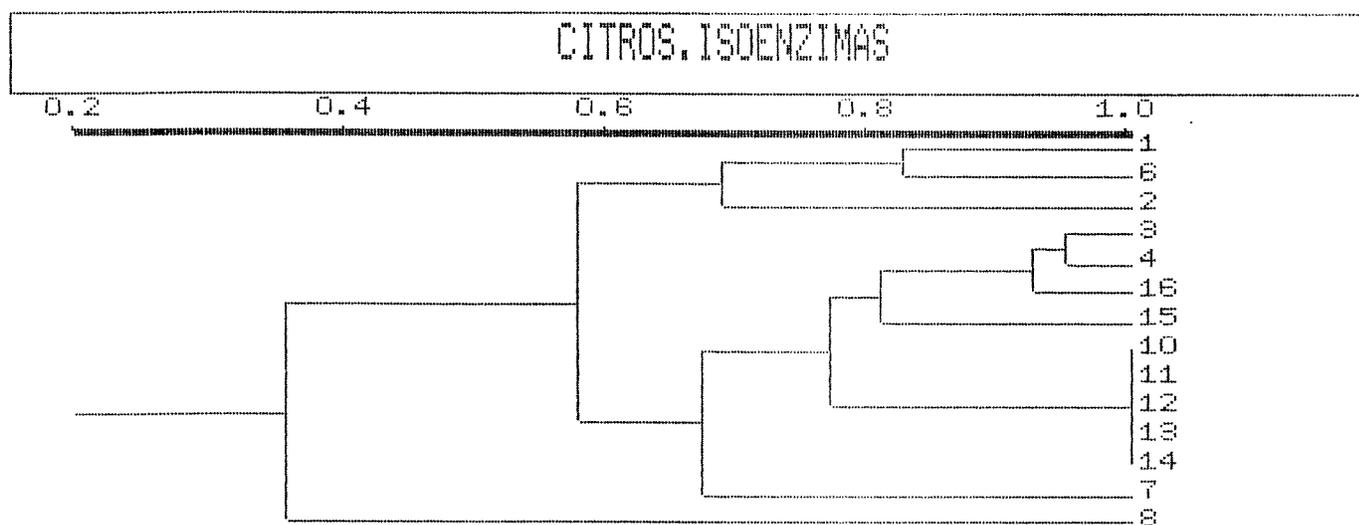


Figura 7. Dendrograma UPGMA para as 37 bandas polimórficas das isoenzimas de citros. 1=limão galego; 2=limão cravo; 3=4=tangerinas poncã e sunki; 6=lima-da-pérsia; 7=laranja azeda; 8=trifoliata; 10=baianinha; 11=pera; 12=valência; 13=hamlin; 14=natal; 15=16=tangerinas clementina e cleopatra.

4.1.2. Polimorfismo de marcadores RAPDs.

A fotografia apresentada na Figura 8 exemplifica as ampliações polimórficas do DNA genômico, inicializadas pelos "primers" de acordo com as condições da metodologia RAPD, sendo correspondente as realizadas pelos "primers" A16 (A-Fig 8) e B18 (B-Fig 8). Verifica-se que foram amplificadas 10 bandas correspondentes a cada um dos "primers," entre as espécies e cultivares de citros, não sendo constatado polimorfismo apenas nas bandas I, J e K, procedentes do "primer" A16, indicando o alto polimorfismo existente. Somente por estes "primers" já pode ser notado que as laranjas doces não diferem entre si, a maior semelhança entre os limões cravo, galego e lima-da-pérsia, a distinção entre o grupo das tangerinas e a dissimilaridade do trifoliata e cidra. Pelo "Primer" B18 verifica-se que as bandas corresponderam a fragmentos entre 500 a 2000 pb. Os dados de polimorfismo obtidos através dos "primers" foram analisados pelo programa NTSYS, adicionando-se os resultados provenientes de cada "primer" a medida em que as análises foram sendo realizadas.

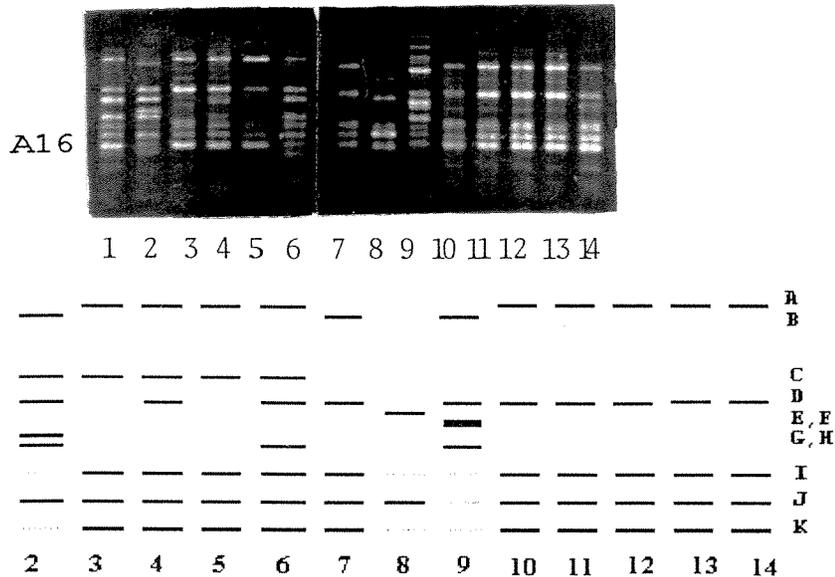
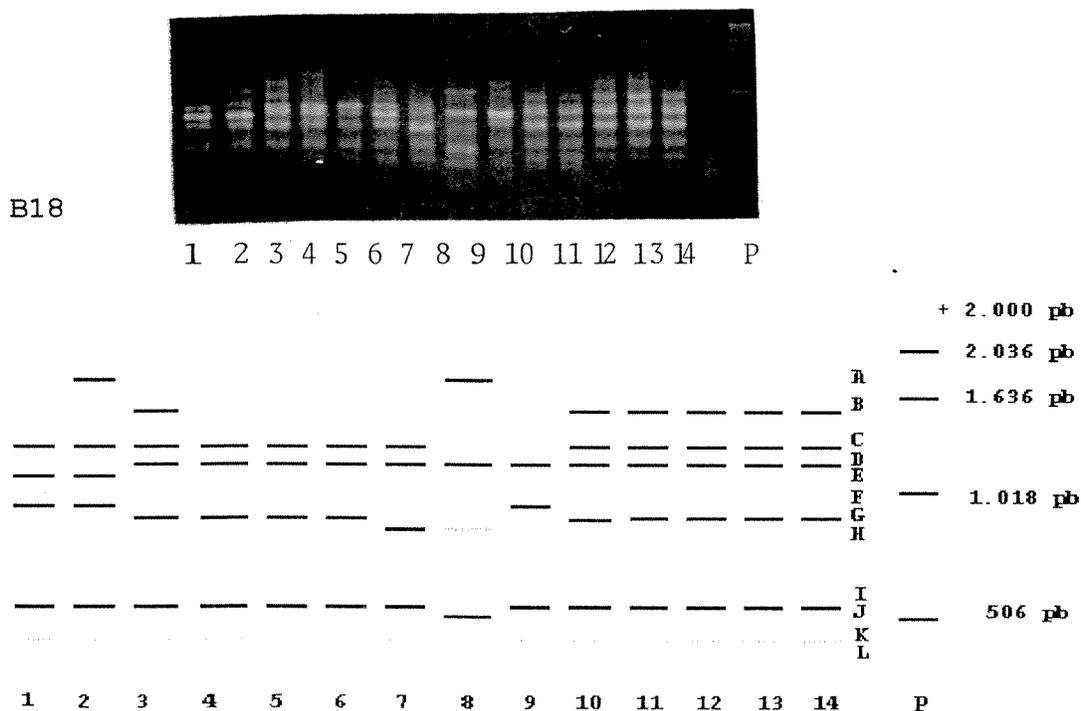


Figura 8. Perfil RAPD para os primers A16 e B18 em citros. 1=limão galego; 2=limão cravo; 3=4=5=tangerinas poncã, sunki, cravo; 6=lima-da-pérsia; 7=laranja azeda; 8=trifoliata; 9=cidra; 10=bai-aninha; 11=pera; 12= valência; 13=hamlin; 14=natal; P=padrão.

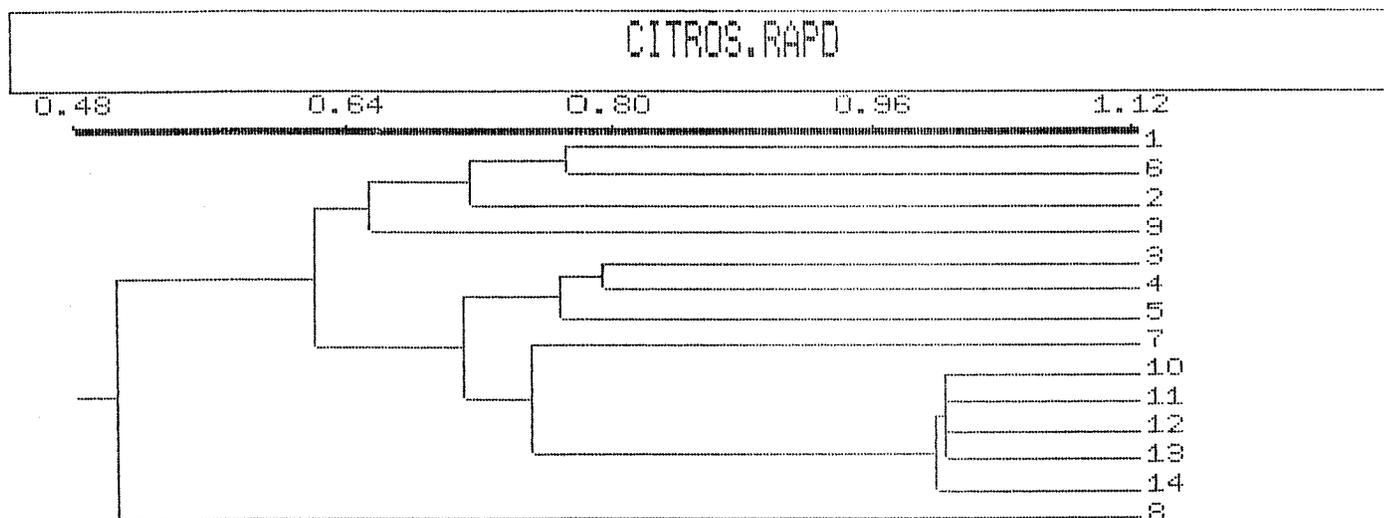


Figura 10. Dendrograma UPGMA de marcadores RAPD obtido com 168 bandas polimórficas em citros. 1= limão galego; 2=limão cravo; 3=4=5=tangerinas poncã, sunki, cravo; 6= lima-da-pérsia; 7= laranja azeda; 8= trifoliata; 9= cidra; 10= baianinha; 11= pera; 12= valência; 13= hamlin; 14= natal.

Verificou-se também a grande semelhança com o obtido pelas enzimas, pois ocorreu apenas a alteração da ordem de ligação da laranja azeda que pelas isoenzimas ligou-se ao grupo das laranjas doces com tangerinas e pelo RAPD entre as laranjas doces e tangerinas (cf. Fig 7 e Fig 9, 10), confirmando que todas as bandas observadas foram produtos de expressão gênica.

Considerando-se que pela literatura a *C. reticulata* e a *C. grandis* são relatadas como ancestrais da laranja azeda e que a laranja doce também é proveniente de *C. grandis*, a ligação da laranja azeda entre tangerinas e laranjas doces é preferível para confirmar a procedência a partir de *C. reticulata* e *C. grandis*.

A ligação mais próxima entre a lima-da-pérsia e o limão galego, considerado um falso limão e pertencente ao mesmo grupo das limas, confirma a proximidade entre as duas espécies.

A interação da cidra com o limão cravo, o limão galego e a lima-da-pérsia num mesmo agrupamento ficou de acordo com a hipótese da origem destas a partir da cidra.

4.2. POLIMORFISMO ENZIMÁTICO E RAPD EM PALMEIRAS

4.2.1. Polimorfismo enzimático

PGI - A Figura 11 mostra um gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as isoenzimas de extratos de folhas do sistema PGI, presentes após eletroforese vertical. As isoenzimas do sistema PGI ocorreram em duas regiões denominadas A e B, sendo que a mais próxima da origem apresentou o fenótipo característico de três bandas de uma enzima dímera codificada por lócus heterozigoto. Esta região apresentou em adição as bandas do padrão básico, outras secundárias que migraram mais rápido, sombreando as outras. Este fenômeno foi também observado em dendê por TORRES & TISSERAT (1980), os quais reportaram como sendo provavelmente provenientes

de modificações pós-transcrição devido às condições da eletroforese. Como muitas vezes se observou um padrão característico de seis bandas no híbrido (5-Fig 11), poderia ser sugerida a existência de bandas múltiplas ou a existência de dois loci apresentando-se com bandas muitas vezes sobrepostas, pois de acordo com WEEDEN & WENDEL (1989) o sistema PGI pode ter formas de enzimas no citossol e no plastídio. Porém, a suposição da procedência das seis bandas decorrente das dos parentais reforça a ocorrência de bandas fantasmas devido modificações pós-transcrição sugerida por TORRES & TISSERAT (1980). Nesta região (A-Fig 11), TORRES & TISSERAT (1980) observaram o sistema de proteínas diméricas e dois alelos, F e S, correspondentes ao locus denominado Pgi-1. Neste trabalho, foram observadas de três a seis bandas, denominadas de acordo com a velocidade de migração de A, B, C, D e F. Foram, portanto, observados as bandas A e C na dendê hermes (1-Fig 11), A e B na juçara (2, 4-Fig 11), A e B na gariroba (3-Fig 11), A, B e D no híbrido juçara e açai (5-Fig 11), B e D na açai (6-Fig 11), E e F nas pupunhas Yurimaguas com e sem espinho e walter (7 a 10-Fig 11). A região B do locus Pgi-2 codificando um sistema observado como variável por TORRES & TISSERAT (1980), apresentou bandas difusas sendo no entanto verificado que as bandas da dendê hermes (1-Fig 11) e pupunhas (7 a 10-Fig 11) migraram mais rápido, as das euterpes (2, 4 e 6-Fig 11) e híbrido (5-Fig 11), intermediariamente e a da gariroba (2-Fig 11) mais tardiamente. Pela Figura verifica-se que a gariroba apresentou bandas em duas regiões, padrão este observado somente algumas vezes, indicando a instabilidade da isoenzima e que o sistema pode ser dimérico. Estas três bandas mais atrasadas que podem ser provenientes de alterações secundárias na estrutura, ou de dois genes correspondentes aos sistemas enzimáticos provenientes do citossol e plastídio, indicam a necessidade de estudos mais detalhados.

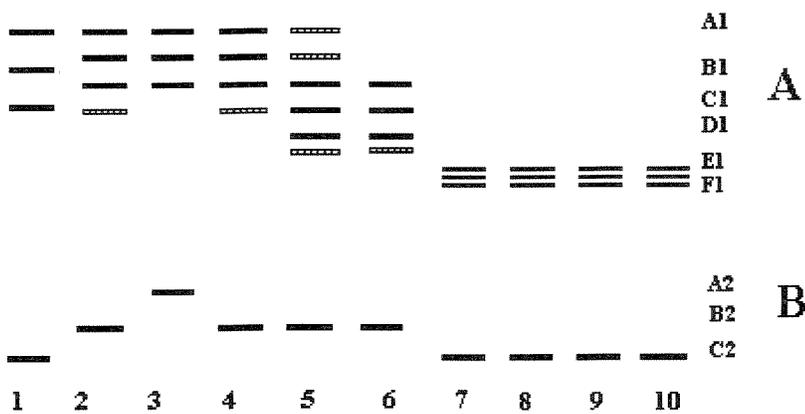
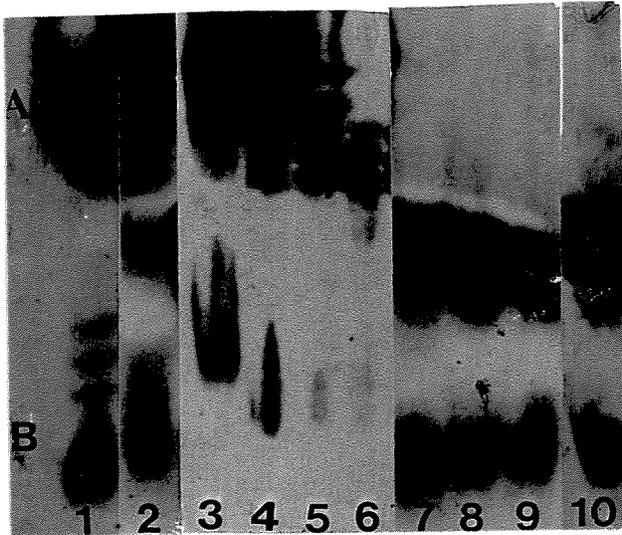


Figura 11. Zimograma de PGI de palmeiras. Início na parte superior, ânodo no final. 1= dendê hermes com bandas na região A: A1 e C1 e bandas na região B: C2; 2=4 juçara A1, B1 e B2; 3= gariroba; A1, B1 e A2; 5= híbrido B1, D1 e B2 ; 6= açaí B1, D1 e B2; 7=8=9=10= yurimaguas sem e com espinho, walter e yurimaguas E1, F1 e C2.

GOT - A Figura 12 mostra um gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes às isoenzimas de extrato de folha do sistema GOT, presentes após eletroforese vertical. O zimograma do sistema enzimático GOT formou bandas em duas regiões que ficaram sobrepostas devido ao fato de que as bandas da primeira região da dendê e gariroba, mais avançadas em relação as outras espécies, terem ficado na mesma altura das da segunda região das demais. A região mais lenta (A-Fig 12) correspondeu a codificada pelo locus denominado Got-1 por TORRES & TISSERAT (1980), que em dendês observou o sistema dimérico e dois alelos, F e S. Nesta região foram caracterizados neste trabalho seis bandas, denominadas de acordo com a velocidade de migração de A1, B1, C1, D1, E1 e F1, sendo também encontrada de uma a três bandas. A presença de uma banda correspondente ao locus homozigoto foi observada na gariroba (3, 5-Fig 12) e pupunhas (1, 9, 10-Fig 12), as quais apresentaram as bandas F1 e D1, respectivamente, tendo algumas vezes a pupunha walter apresentado três bandas. As demais apresentaram as três bandas correspondentes ao genótipo heterozigoto, sendo as E1 e F1 na dendê hermes (2, 4-Fig 12), A1 e B1 na açai (6-Fig 12) e híbrido (7-Fig 12) e B1 e C1 na juçara (8-Fig 12). Algumas vezes foi observada a não formação do híbrido heterozigoto na dendê hermes, como mostrado na amostra 2 da Figura 12. TORRES & TISSERAT (1980) observaram em dendês, na região correspondente ao Got-2, um ou dois alelos denominados F e S, codificando uma ou duas bandas do sistema monomérico. Neste trabalho foi encontrada apenas uma banda com três diferentes velocidade de migração, A2, B2 e C2. Foram, portanto, observadas as bandas, C2 na dendê hermes (2, 4-Fig 12) e gariroba (3, 5-Fig 12), A2 na açai (6-Fig 12), híbrido (7-Fig 12) e juçara (8-Fig 12) e B2 nas pupunhas (1, 9, 10-Fig 12).

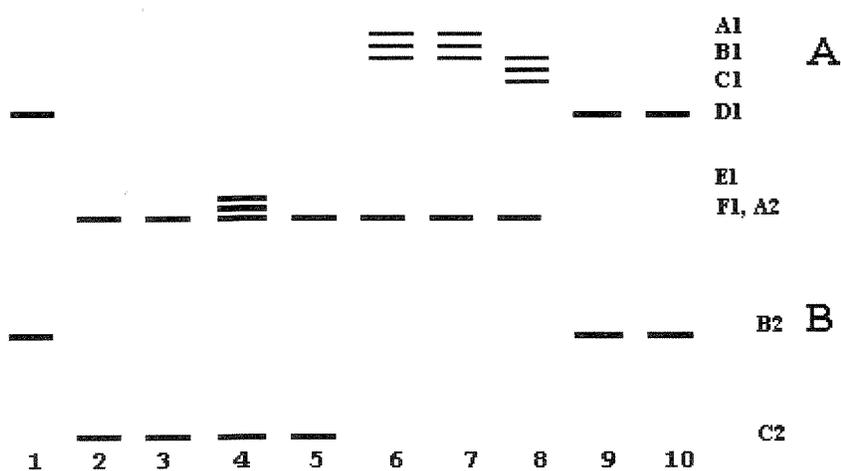
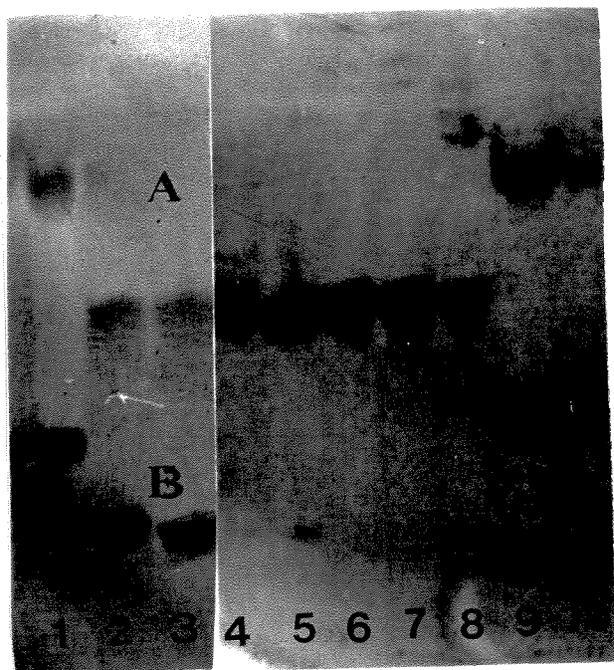


Figura 12. Zimograma de GOT de palmeiras. Início na parte superior, ânodo no final. 1=walter com bandas na região A: D1 e bandas na região B:B2; 2=4=dendê hermes E1, F1 e C2; 3=5=gariroba F1 e C2; 6=açaí=7=híbrido= A1, B1 e A2; 8=juçara B1, C1 e A2; 9=10=yurimaguas sem e com espinho D1 e B2.

EST - A Figura 13 mostra a fotografia do gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as isoenzimas de extrato de folha do sistema EST, presentes após eletroforese horizontal. O perfil das isoenzimas de EST mostrou bandas em duas regiões, sendo que na mais próxima a origem (A-Fig 13), as euterpes açai (2-Fig 13), híbrido (3, 4-Fig 13) e juçara (5-Fig 13) apresentaram uma ou duas bandas, também verificadas por BALLVÉ (1988). As pupunhas (1, 6-Fig 13) porém, não apresentaram bandas nesta região, configurando a hipótese do alelo nulo, ou suas bandas, mais avançadas, estariam deslocadas para a segunda região (B-Fig 13). Considerando-se a hipótese do alelo nulo o sistema poderia ser monomérico com duas aloenzimas, tendo a açai (2-Figura 13) e híbrido (3, 4-Fig 13) uma aloenzima mais retardada e a juçara (5-Fig 13) duas aloenzimas, enquanto as pupunhas (1, 6-Fig 13) teriam a ausência de fenótipo, ficando, portanto, caracterizadas as euterpes. Se for considerado o deslocamento das bandas o sistema poderia ser dimérico pela presença de três bandas nas pupunhas. Como, porém, a juçara tem apenas duas bandas, esta hipótese é menos provável. A segunda região apresentou várias bandas provavelmente decorrentes da multiplicidade de ação desta enzima em vários substratos (ALFENAS, 1991; WEEDEN & WENDEL, 1989), configurando provável codificação por dois ou mais loci. As bandas mais atrasadas desta região também diferenciaram a açai e híbrido da juçara, pois a juçara apresentou ausência das bandas mais retardadas.

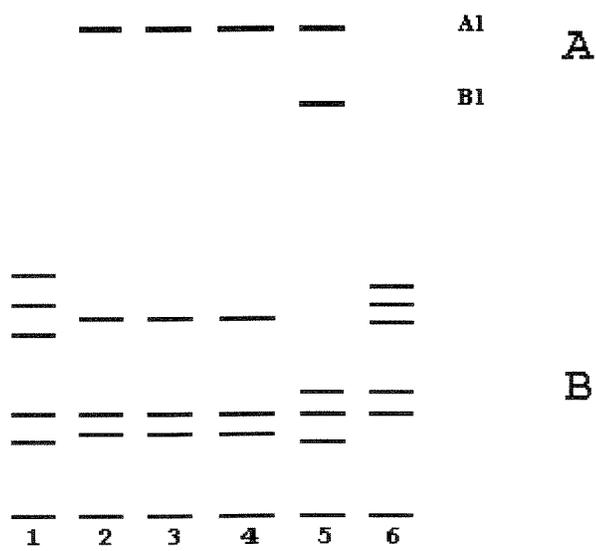
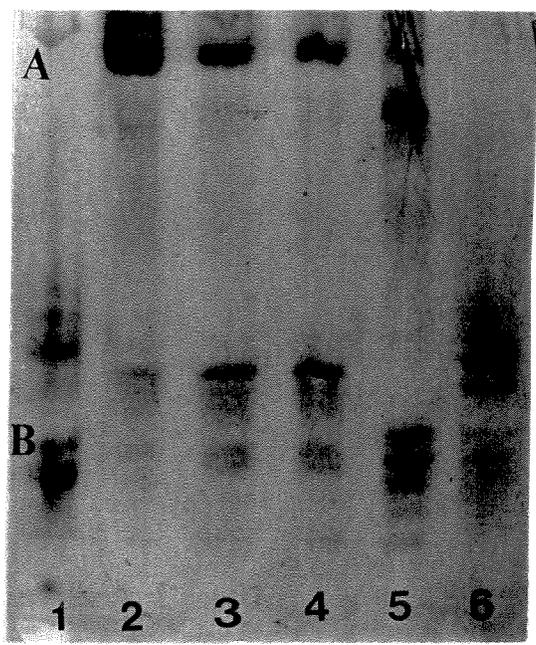


Figura 13- Zimograma de EST de palmeiras. Início na parte superior, ânodo no final. 1= yurimaguas; 2=açai; 3=4=híbrido; 5=juçara; 6=walter.

LAP - A Figura 14 mostra um gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as isoenzimas do sistema LAP, presentes após eletroforese vertical. O sistema LAP apresentou nas pupunhas um padrão de duas bandas bem separadas e nas demais duas bandas em uma só região, caracterizando ser monomérico com um locus heterozigoto, ou com dois loci homozigotos, em todos os cultivares. Considerando-se apenas um locus, os prováveis genótipos heterozigotos seriam decorrentes da codificação por sete alelos, enquanto se forem considerados dois loci homozigotos, um codificando a região mais próxima a origem (A-Fig 14) e um a região mais avançada (B-Fig 14), ocorreriam quatro alelos na região A e três alelos na região B. Foram, portanto, observadas as bandas A e G nas pupunhas (1 a 3-Fig 14), B e E na dendê hermes (10-Fig 14), D e F na gariroba (9- Fig 14) e C e E nas euterpes (4 a 8-Fig 14).

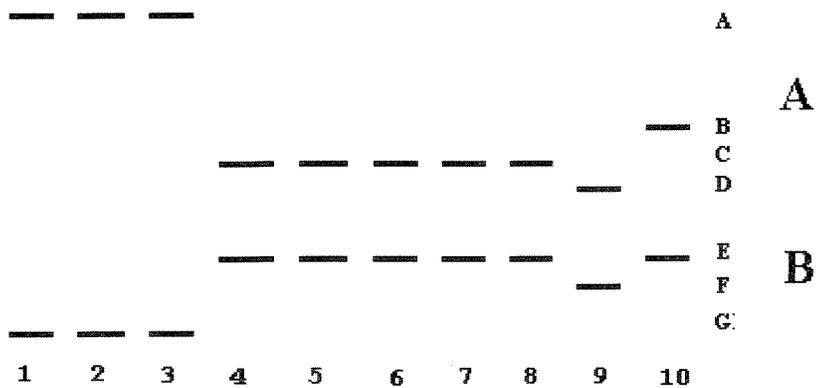
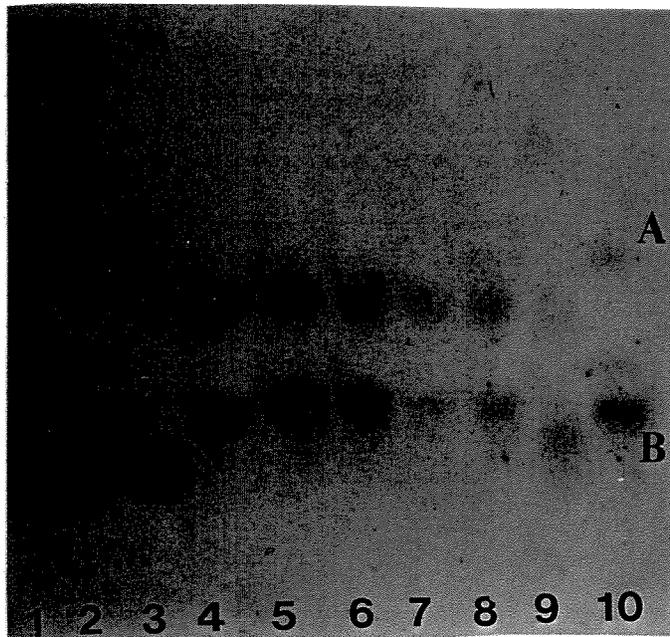


Figura 14. Zimograma de LAP de palmeiras. Início na parte superior, ânodo no final. 1=walter=2=3=yurimaguas com e sem espinho com bandas A e G; 4=açaí=5=6=7=híbrido=8=juçara com bandas C e E; 9=gariroba com bandas D e F; 10=dendê hermes com bandas B e E.

APS - A Figura 15 mostra a fotografia do gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as isoenzimas do sistema APS, presentes após eletroforese horizontal. O sistema APS apresentou bandas em duas regiões, tendo, a mais próxima a origem, o fenótipo de uma a três bandas característico do sistema dimérico, enquanto a mais distante apresentou apenas uma, podendo ser caracterizados, portanto, dois prováveis lócus. A região mais próxima a origem (A-Fig 15), apresentou uma banda mais retardada denominada A1 nas pupunhas (11 a 13-Fig 15) e Euterpes (6 a 8-Fig 15) e mais adiantada, B1, na gariroba (4, 9-Fig 15), sendo que algumas vezes a banda não chega a ser visualizada nas pupunhas (1 a 3-Fig 15). Na dendê hermes (5, 10-Fig 15) foi observado o fenótipo de três bandas característico do genótipo heterozigoto, tendo a mais atrasada a velocidade de migração da banda B1 e a mais avançada a denominada C1. A região mais adiantada (B-Fig 15) apresentou apenas uma banda, com duas velocidades de migração, sendo a mais retardada A2, observada somente na gariroba (4, 9-Fig 15) e a mais avançada B2, nas demais.

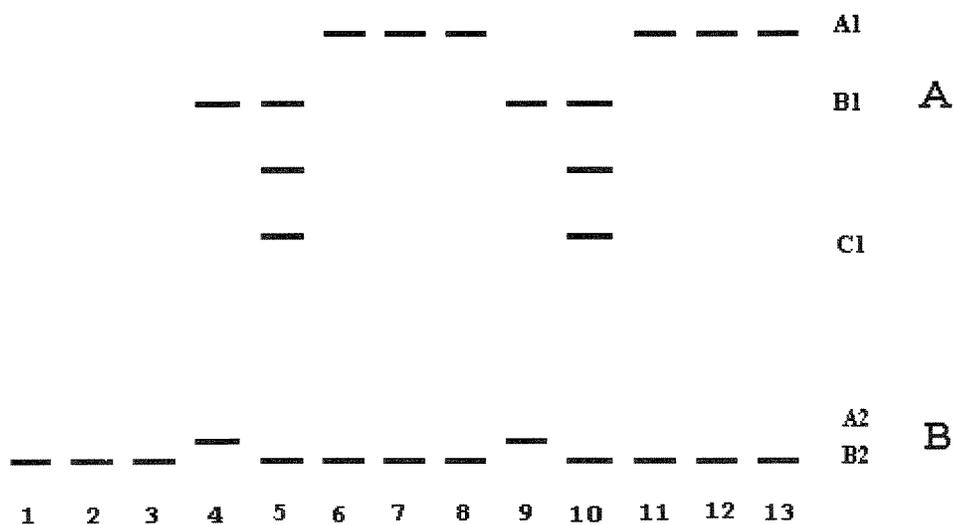
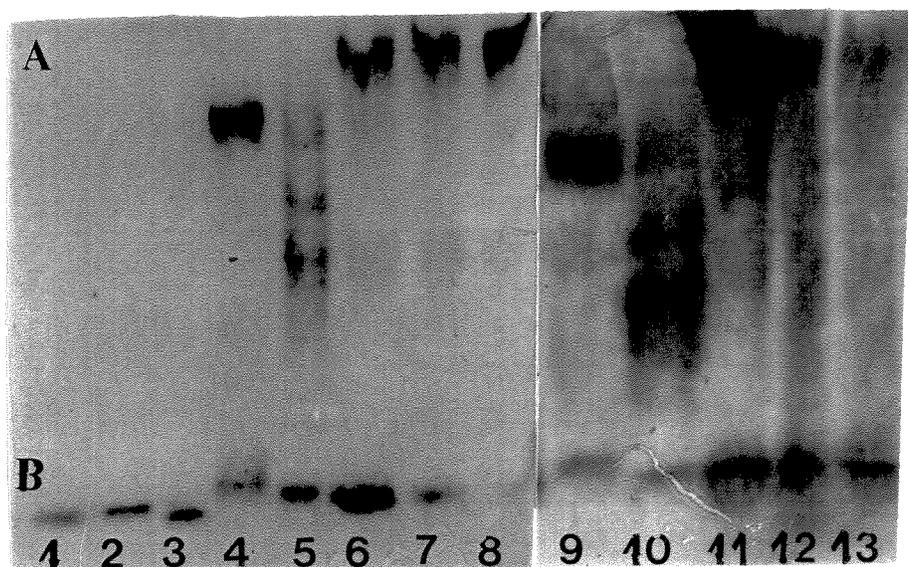


Figura 15. Zimograma de APS de palmeiras. Início na parte superior, ânodo no final. 1=2=3=11=12=13=walter, yurimaguas com e sem espinho, walter, yurimaguas com e sem espinho com bandas na região A: A1 e região B: B2; 4=9=gariroba B1 e A2; 5=10=dendê hermes B1, C1 e B2; 6=juçara=7=açaí=8=híbrido A1 e B2.

MDH - A Figura 16 mostra um gel representando os fenótipos correspondentes as isoenzimas de MDH após eletroforese vertical. O sistema MDH apresentou muita variação, sendo, porém, caracterizada a variabilidade das pupunhas dentro de um mesmo lote, pelo padrão característico de ausência ou presença de uma banda (representada por flecha) inicialmente teorizada como característica de ausência de espinhos, mas que provavelmente deve ser responsável por outra característica.

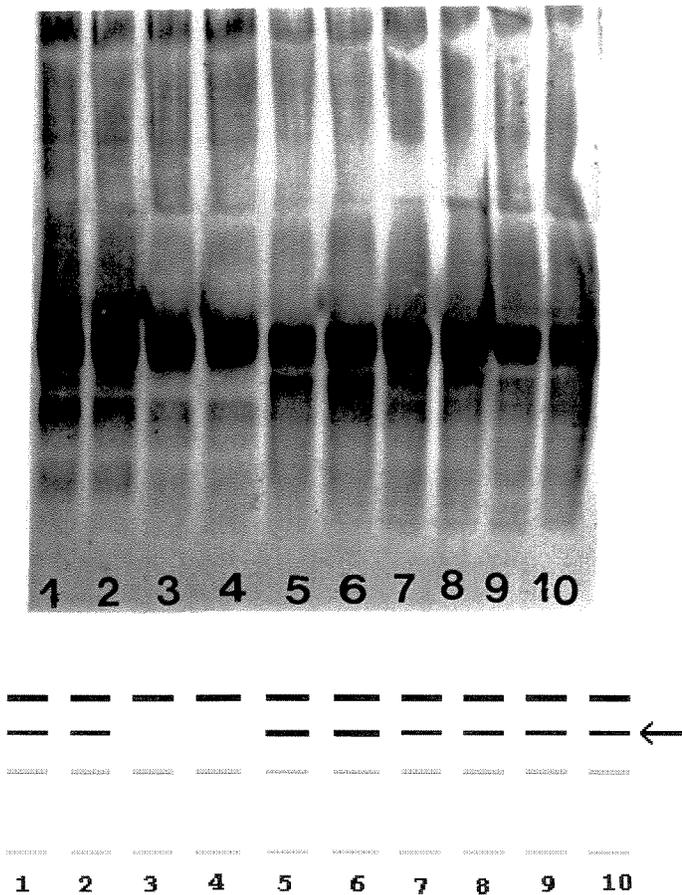


Figura 16. Zimograma de MDH de palmeiras. Início na parte superior, ânodo no final. De 1 a 10 yurimaguas provenientes de sementes de formas e tamanhos diferentes: 1=2=sem espinho/pequena bicuda; 3=4=com espinho/grande redonda; 5=6= sem espinho/grande redonda; 7=8=com espinho/grande bicuda; 9=10=sem espinho/grande bicuda.

PRX - A Figura 17 mostra a fotografia do gel representando os fenótipos correspondentes as isoenzimas do sistema PRX, presentes após eletroforese vertical (A-Fig 17) e horizontal (B-Fig 17). O sistema PRX (A-Fig 17) apresentou bandas em duas regiões distintas, sendo que na mais próxima a origem (A1-Fig 17) as euterpes (3 a 5, 9 a 11-Fig 17A) apresentaram uma banda difusa, tendo a juçara às vezes três bandas (9-Fig 17), enquanto as demais apenas uma banda, caracterizando que podem ser codificadas por um locus. Na eletroforese horizontal (B-Fig 17) as bandas aparecem como três na açai (2-Fig 17B) e uma na juçara (1-Fig 17B), como reportado por BALLVÉ (1988). Na região mais avançada (B1-Fig 17) as pupunhas (6 a 8-Fig 17A e 3, 5, 6-Fig 17B) apresentaram uma banda muito difusa e variável, enquanto as da gariroba (2-Fig 17A) e dendê hermes (1-Fig 17A) são muitas vezes fracas, originando a hipótese de que os locus podem ser produtos de genes estruturalmente não relacionados, próprios de enzimas com múltiplos substratos, como é o caso da peroxidase (ALFENAS, 1991). A multiplicidade de substratos possibilita a expressão de diferentes modos, podendo ocasionar a fraca atividade da gariroba e dendê hermes. As euterpes apresentaram um padrão de quatro ou cinco a sete ou oito bandas na açai (3, 11-Fig 17A e 2-Fig 17B), seis na juçara (5, 9-Fig 17A e 1-Fig 17B) e três ou quatro a sete ou oito bandas numa posição intermediária característica no híbrido (4, 10-Fig 17A e 4-Fig 17B). A açai apresentou bandas sempre mais atrasadas que a juçara, ficando o híbrido caracterizado por uma banda atrasada intermediária entre as dos parentais.

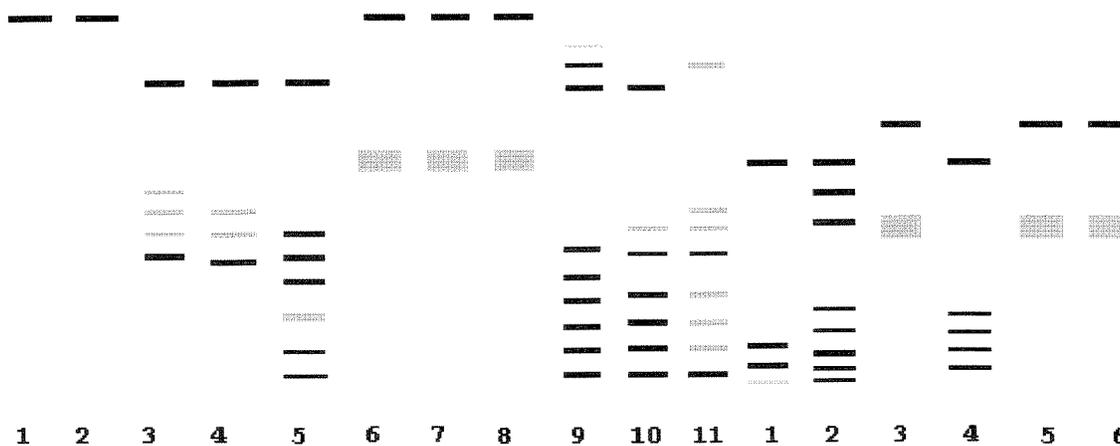
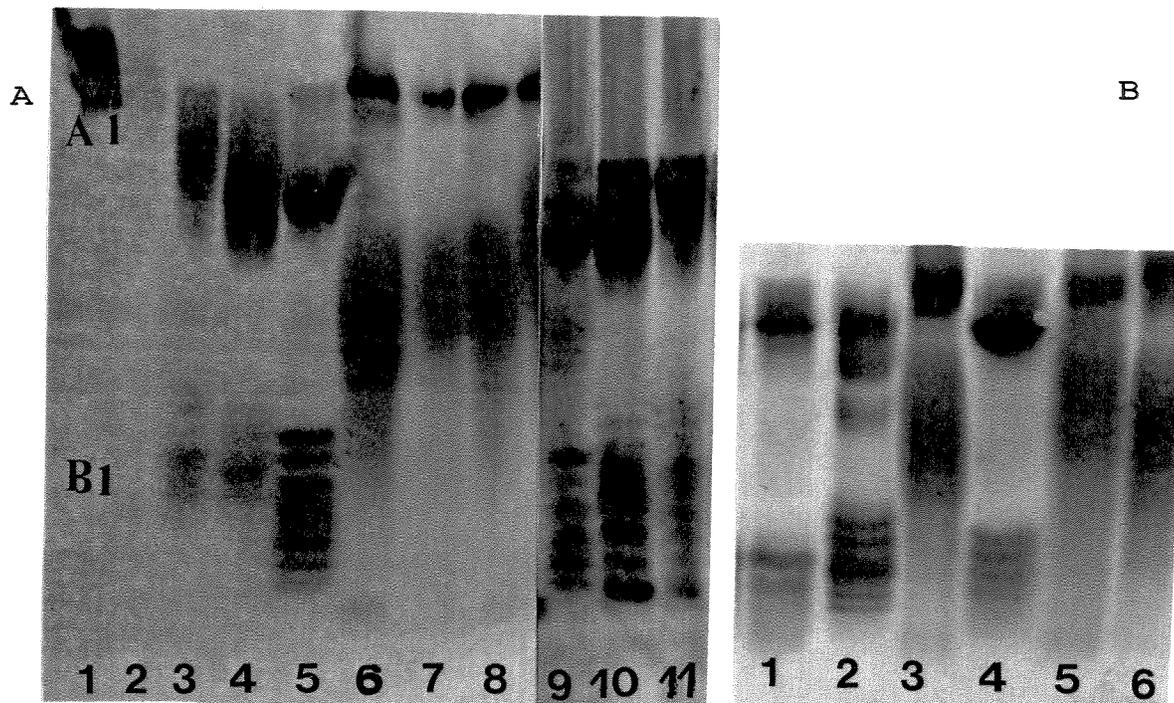


Figura 17. Zimograma de PRX de palmeiras. Início na parte superior, ânodo no final. A: 1=dendê hermes; 2=gariroba; 3=11=açaí; 4=10=híbrido; 5=9=juçara; 6=7=yurimaguas sem e com espinho; 8=walter. B: 1=juçara; 2=açaí; 3=5=yurimaguas; 4=híbrido; 6=walter.

PGM - A Figura 18 mostra um gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as isoenzimas do sistema PGM, presentes após eletroforese vertical. O sistema PGM apresentou-se com uma a duas bandas em uma região caracterizando um lócus codificando proteínas monoméricas, como reportado por TORRES & TISSERAT (1980) que observaram os alelos F e S em dendês. Como foram observadas seis bandas, estas foram denominadas de acordo com a velocidade de migração de A1, B1, C1, D1, E1 e F1. Na dendê hermes (9-Fig 18) e pupunhas (1 a 3-Fig 18) foi observada apenas uma banda, correspondente a E1 e F1, respectivamente, sendo que a Walter (1-Fig 18) sempre apresentou um padrão de uma banda menos deslocada, podendo caracterizar uma outra aloenzima. As demais apresentaram o padrão de duas bandas correspondentes ao genótipo heterozigoto, sendo observados os fenótipos com as bandas A1 e D1 na gariroba (8-Fig 18), C1 e E1 na açai (7-Fig 18),) e híbrido (5, 6-Fig 18) e B1 e E1 na juçara (4-Fig 18).

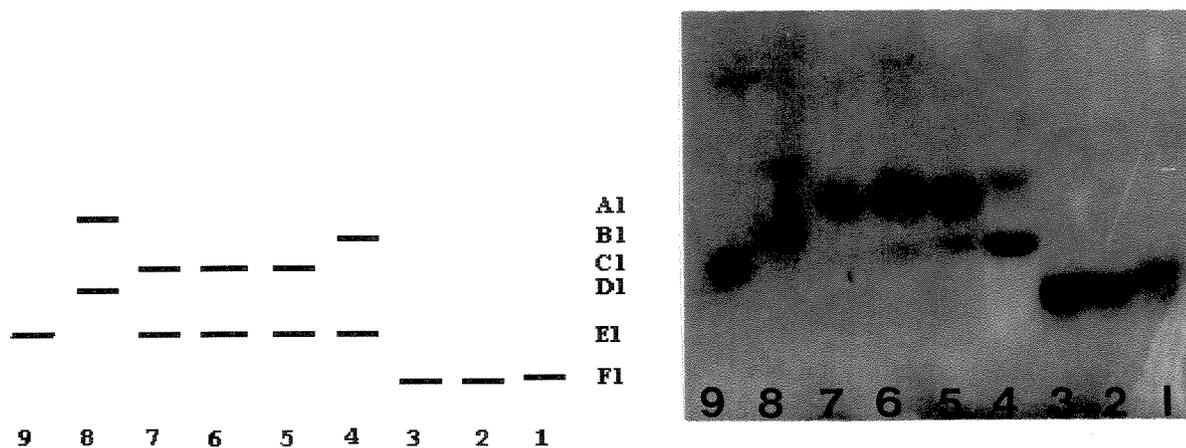


Figura 18. Zimograma de PGM de palmeiras. Início na parte superior, ânodo no final. 1=walter=2=3=pupunhas sem e com espinho com as bandas F1; 4=juçara B1 e E1; 5=6=híbrido C1 e E1; 7=açai C1 e E1; 8=gariroba A1 e D1; 9=dendê hermes E1.

Pelo dendrograma da Figura 19, baseado no método de agrupamento UPGMA (unweighted pair-group method) que utiliza o método de pareamento não ponderado através das médias aritméticas e construído a partir das oitenta e quatro bandas polimórficas das isoenzimas, verificou-se o forte agrupamento entre as pupunhas, ficando as yurimaguas sem e com espinho mais ligadas que a walter, sendo este grupo bem distante das euterpes, nas quais o híbrido ficou intermediário aos parentais e mais ligado a açai do que a juçara. A gariroba e a dendê hermes embora de gêneros diferentes formaram um grupo que foi intermediário ao das euterpes e das pupunhas.

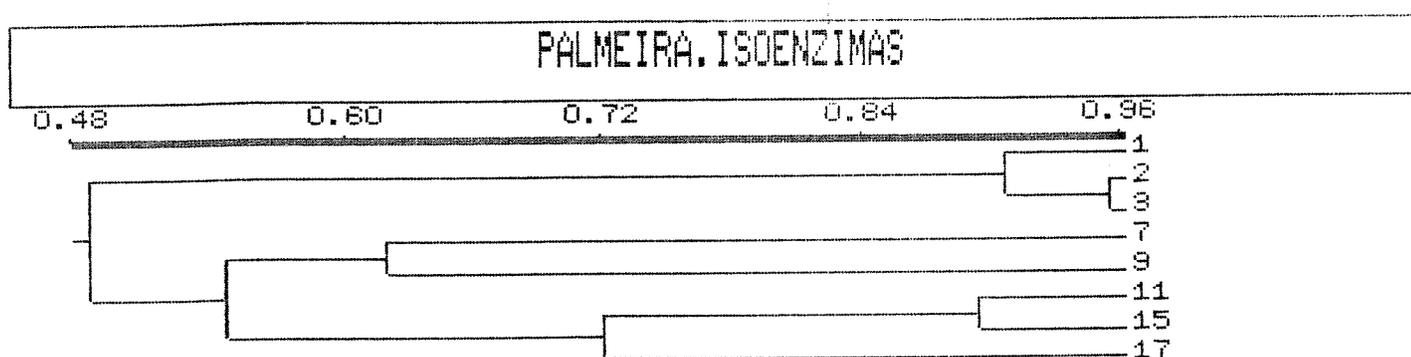


Figura 19. Dendrograma UPGMA das 84 bandas polimórficas das isoenzimas de palmeiras. 1=walter; 2=3=yurimaguas com e sem espinho; 7= dendê hermes; 9=gariroba; 11=açai; 15=híbrido; 17=juçara.

4.2.2. Polimorfismo de Marcadores RAPDs

A fotografia apresentada pela Figura 20 exemplifica as ampliações polimórficas do DNA genômico através das extensões inicializadas pelos primers de acordo com as condições da metodologia RAPD. Verifica-se que as ampliações realizadas pelo primer B8 produziram 13 bandas, todas polimórficas, entre as espécies e ecótipos das palmeiras, indicando o alto polimorfismo existente.

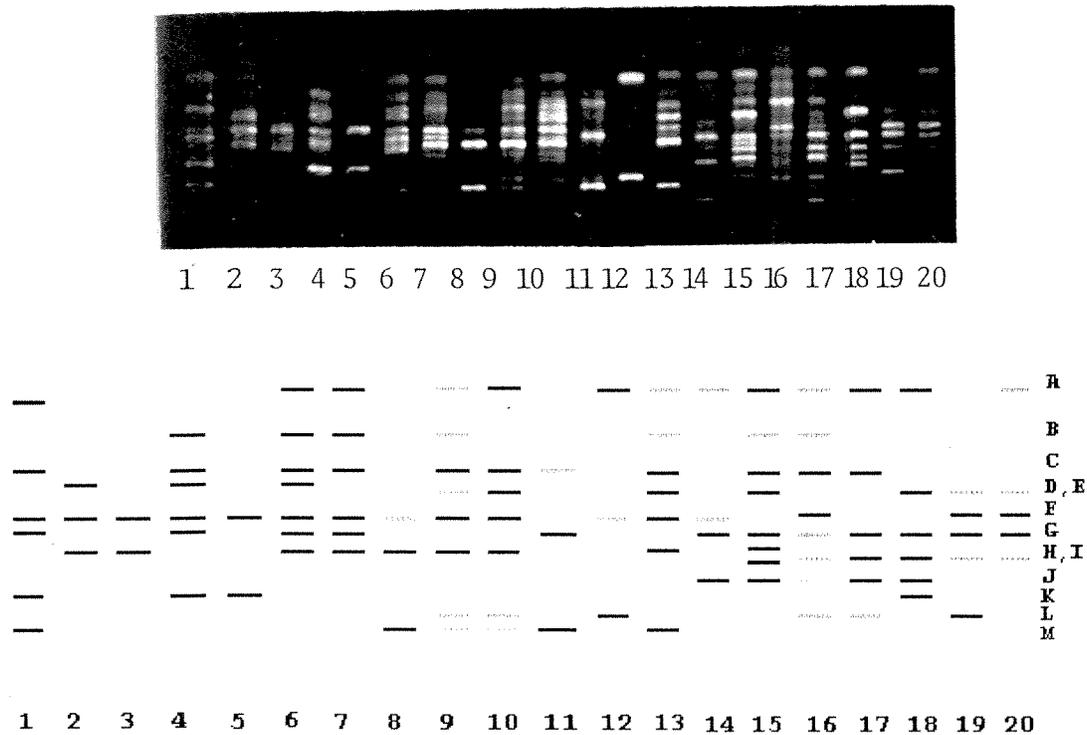


Figura 20. Perfil RAPD para o primer B8 em palmeiras. 1=yurimaguas; 2=benjamim constant; 3=branca una; 4=t2s1; 5=6=E.E.U. sem e com espinho; 7=dendê hermes; 8=euterpe tadeu; 9=gariroba; 10-11=12=13=14=açaís itajobi, açai, espada, pariquera, danilo; 15=16=híbridos AS e GE; 17=18=19=juçaras GE,T,AS; 20=ceplac 10.

Os resultados polimórficos obtidos pelos "primers" foram analisados pelo programa NTSYS adicionando-se os dados a medida em que as análises foram sendo realizadas. Pelos dados dos marcadores RAPD correspondentes a 183 e 229 bandas polimórficas foram construídos os respectivos dendrogramas UPGMA da Figura 21 e 22. Verifica-se por estes dendrogramas que apenas a ordem de ligação entre as açaís comum, espada e pariquera sofreu alteração, o que pode ser justificado pela proximidade entre estes ecótipos. As demais ordens de ligações permaneceram inalteradas, atestando que o número de análises foi suficiente. Todas as pupunhas ficaram num mesmo agrupamento, em que as pupunhas EEU com e sem espinho, mais próximas ficaram ligadas por ordem crescente de afinidade as benjamim constant, yurimaguas, ceplac 10 e branca una. O grupo das pupunhas ficou ligado a seguir a dendê hermes e depois ao agrupamento entre a pupunha t2s1 e gariroba. A estreita proximidade entre as juçaras GE, T e AS, confirmou a origem de um mesmo lote, assim como a ligação intermediária dos híbridos AS e GE, entre as juçaras e as açaís comum, espada e pariquera, a origem híbrida destas. Neste agrupamento as euterpes ficaram ligadas a seguir as açaís itajobi, danilo e finalmente a euterpe tadeu. A diversidade das ligações entre os diferentes ecótipos de açaí comprova a variabilidade genética existente, ficando porém evidente a distinção deste grupo das euterpes com o grupo das pupunhas.

Verificou-se que o dendrograma das isoenzimas foi semelhante ao obtido pelos marcadores RAPD indicando que as bandas observadas foram produtos de expressão gênica.

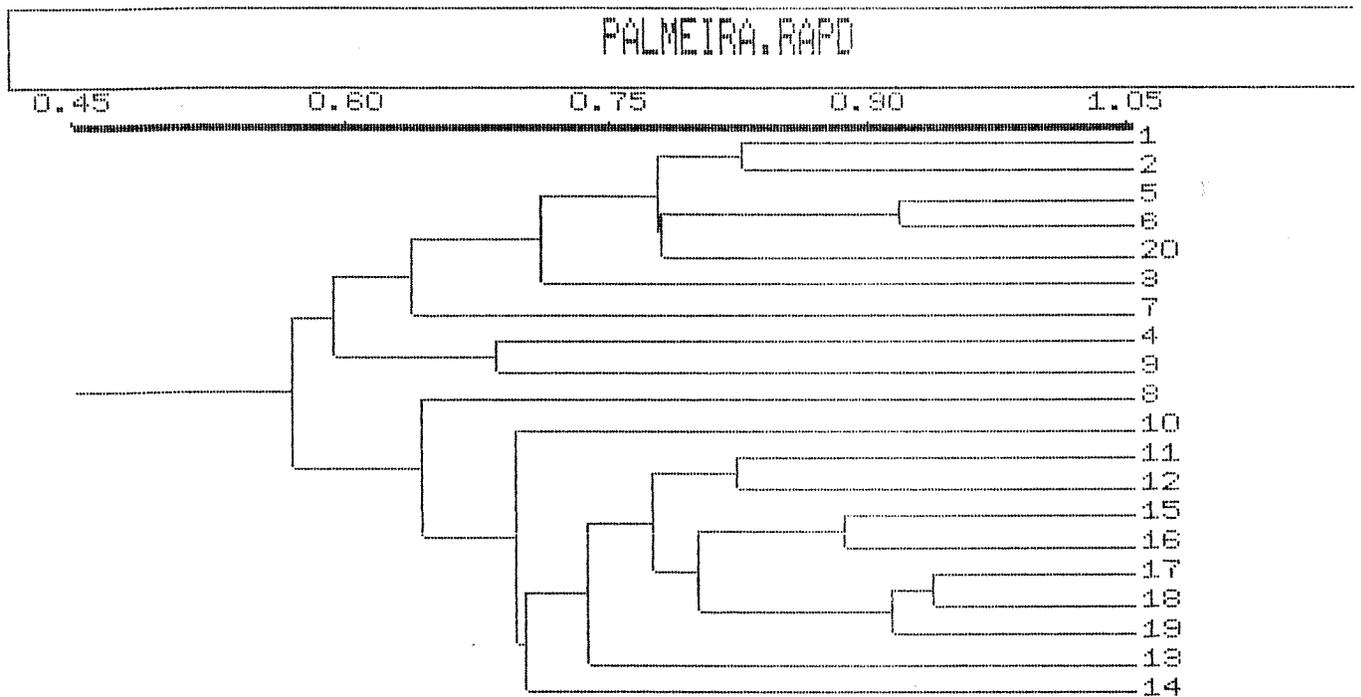


Figura 21. Dendrograma UPGMA de marcadores RAPD obtido com 183 bandas polimórficas em palmeiras. 1=yurimaguas; 2=benjamim constant; 3=branca una; 4=t2s1; 5=6=EEU com e sem espinho; 7= dendê hermes; 8=euterpe tadeu; 9= gariroba; 10=11=12=13=14=açaís itajobi, comum, espada, pariquera, danilo; 15=16=híbridos AS e GE, 17=18=19=juçaras GE,T,AS; 20 ceplac 10.

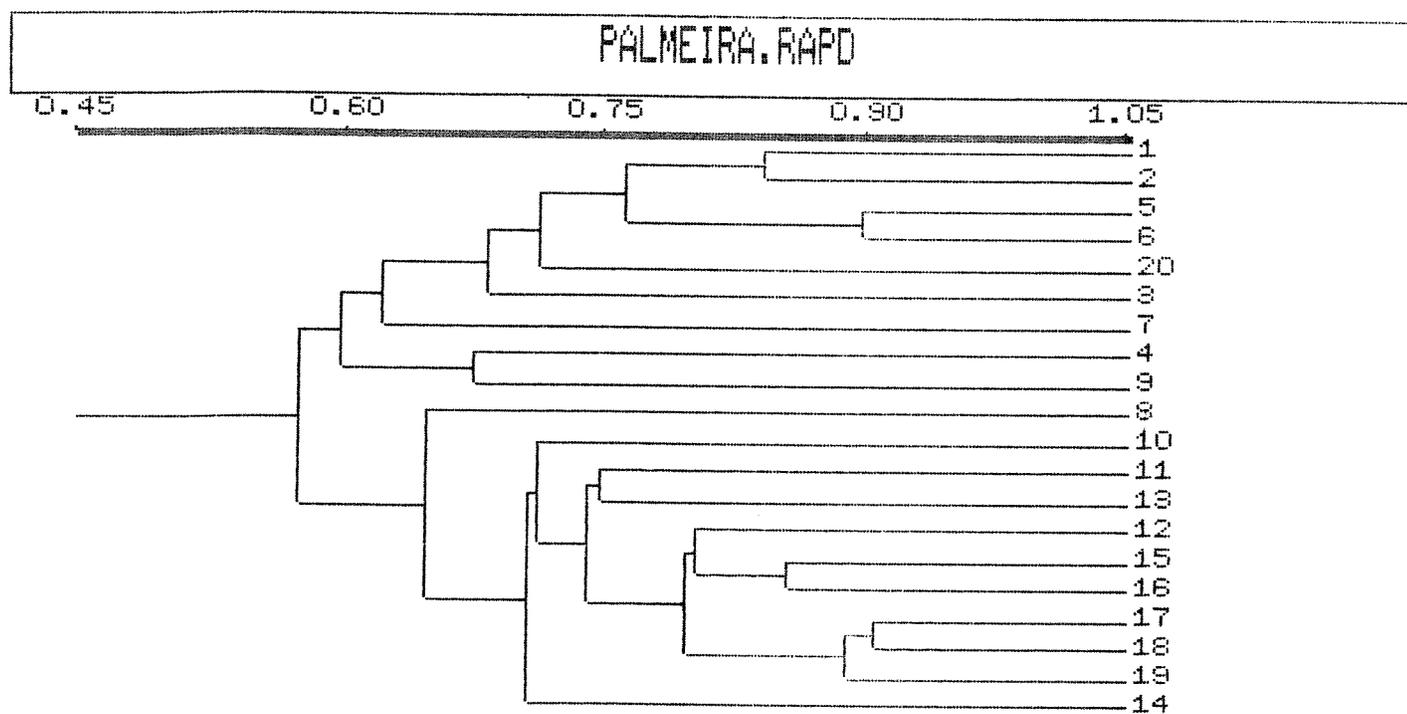


Figura 22. Dendrograma UPGMA de marcadores RAPD obtido com 229 bandas polimórficas em palmeiras. 1=yurimaguas; 2= benjamim constant; 3=branca una; 4= t2s1; 5=6=EEU com e sem espinho; 7= dendê hermes; 8= euterpe tadeu; 9= gariroba; 10=11=12=13=14=açais itajobi, comum, espada, pariquera, danilo; 15=16= híbridos AS e GE; 17=18=19=juçaras GE,T,AS; 20=ceplac 10.

4.3. POLIMORFISMO ENZIMÁTICO E RAPD EM COUVE

4.3.1. Polimorfismo enzimático

PGM - A Figura 23 mostra um gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as isoenzimas do sistema PGM, presentes após eletroforese vertical. As isoenzimas de PGM apresentaram o maior polimorfismo, sendo encontradas de duas a cinco bandas em uma mesma região que não diferenciaram apenas três variedades. ARÚS & SHIELDS (1983), trabalhando com brássicas, observaram dois genes codificando para o PGM, denominados Pgm-1 e Pgm-2, sendo as aloenzimas de Pgm-1 de migração mais rápida. Segundo estes autores cada alelo do locus Pgm-1 codificou o fenótipo de um par de bandas, sendo a mais rápida de cada par menos ativa que a de migração mais lenta. De acordo com estes autores o sistema protéico foi monomérico, constituído de 4 aloenzimas. Por outro lado, como foi verificada ocasionalmente a formação de três bandas ao invés de duas nas variedades roxa (3-Fig 23) e tupi (10-Fig 23), pode também ser formulada a hipótese de ocorrerem dois loci codificando o sistema dimérico com a formação eventual da banda do heterodímero interlocus. Esta hipótese explicaria a presença de cinco bandas pela formação do heterodímero interlocus em adição as quatro bandas, sendo três codificadas pelo locus heterozigoto e uma pelo locus homozigoto. A presença de duas bandas, porém, na região codificada pelo locus Pgm-2, indica a presença de proteínas monoméricas. É, portanto, mais provável a ocorrência de dois loci codificando sistemas monoméricos, denominados Pgm-1, mais próximo ao frente e Pgm-2, mais distante, de acordo com ARÚS & SHIELDS (1983). Como, porém, não foi observado o fenótipo de um par de bandas correspondente a cada alelo do gene pgm-1, denominou-se as bandas de acordo com a velocidade de migração nas duas regiões observadas. A variedade ribeirão pires 2620 (1-Fig 23) apresentou o

fenótipo de três bandas, ou quatro, se a mais rápida for considerada como sendo duas muito próximas, sendo denominadas B, E, G, H. Na variedade 1811 (2-Fig 23) foram observadas duas bandas correspondentes as C e G. A roxa (3-Fig 23) apresentou quatro bandas correspondentes as B, C, G, H. A são roque (4-Fig 23) e a gigante 915 (5-Fig 23) apresentaram cinco bandas correspondentes as A, C, E, G, H; C, D, F, G, H, respectivamente. As variedades 916 (6-Fig 23), ribeirão pires 2446 (8-Fig 23), tupi (10-Fig 23) e são José (13-Fig 23) apresentaram três bandas correspondentes as C, G, H; C, G, H; B, G, H; C, G, H, respectivamente. As variedades cressa piracicaba (7-Fig 23), cressa capão bonito (9-Fig 23), jundiaí (11-Fig 23) e mococa (12-Fig 23) apresentaram três ou quatro bandas correspondentes as A, E, G, H; C, E, G; C, F, I; C, E, I, respectivamente. A roxa monte alegre (14-Fig 23) e a verde escura (15-Fig 23) apresentaram quatro e cinco bandas correspondentes as A, C, F, I; A, C, E, F, I, respectivamente.

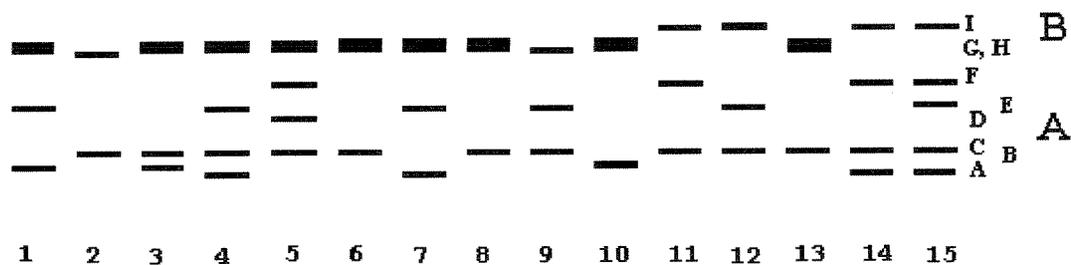
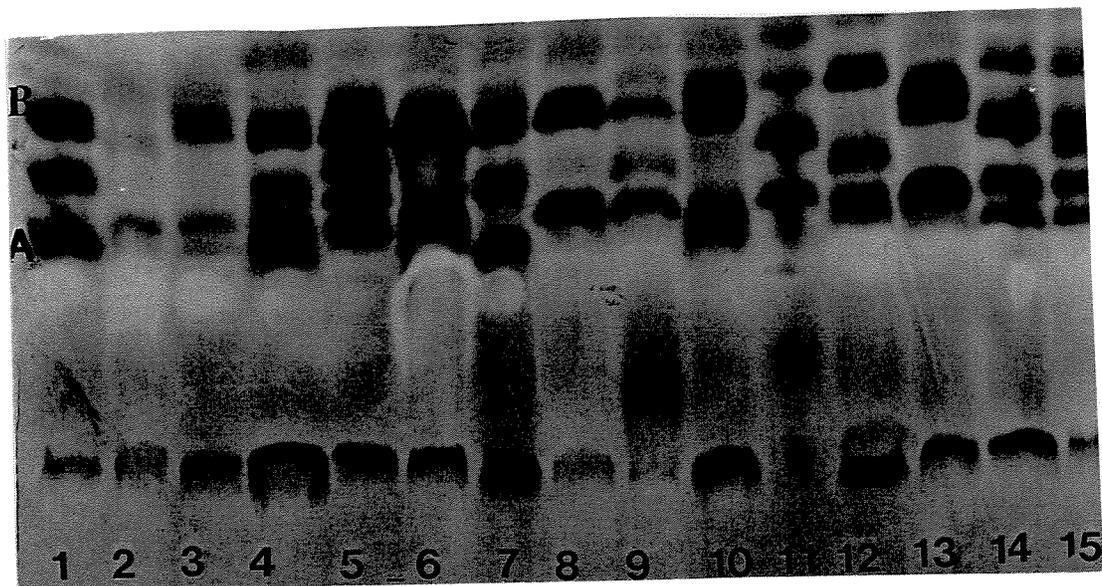


Figura 23. Zimograma de PGM de couve. Início na parte inferior, ânodo no topo. 1=ribeirão pires 2620 com bandas na região A e B: B, E, G, H; 2=1811 C, G; 3=roxa B, C, G, H; 4=são roque A, C, E, G, H; 5=gigante C, D, F, G, H; 6=916 C, G, H; 7=crespa piracicaba A, E, G, H; 8=ribeirão pires 2446 C, G, H; 9=crespa capão bonito C, E, G; 10=tupi B, G, H; 11=jundiaí C, F, I; 12=mococa C, E, I; 13=são José C, G, H; 14=roxa monte alegre A, C, F, I; 15=verde escura A, C, E, F, I.

EST - A Figura 24 mostra um gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as isoenzimas do sistema EST, presentes após eletroforese vertical. O zimograma de EST apresentou bandas em duas regiões denominadas A e B. Na região mais próxima a origem (A-Fig 24) as variedades apresentaram um padrão similar de uma ou duas bandas mais avançadas seguidas por uma difusa e novamente uma banda distinta. Esta região polimórfica mais avançada constituída por uma ou duas bandas pode ser definida por um lócus codificando proteínas monoméricas. As outras bandas que podem ser codificadas por outros lócus, não foram consideradas. A jundiaí (11-Fig 24) e a mococa (12-Fig 24) apresentaram, portanto, o fenótipo de duas bandas denominadas A1 e B1, e as restantes apenas a banda A1. Na região mais rápida (B-Fig 24), as variedades apresentaram polimorfismo apenas nas bandas mais avançadas, às quais se seguiram uma banda mais atrasada e difusa, semelhante para todas. Esta região mais avançada com o fenótipo de uma a duas bandas observada pela Figura B-24, é na realidade dividida em duas regiões, como se constata pela Figura B1-24, que separou mais as bandas, tendo uma banda mais avançada igual para todas as variedades seguida por um padrão polimórfico de uma ou duas bandas. Nesta região polimórfica foram observadas uma ou duas bandas, podendo caracterizar proteínas monoméricas, com quatro diferentes migrações denominadas A, B, C e D. As variedades ribeirão pires 2620 (1-Fig 24), 1811 (2-Fig 24), roxa (3-Fig 24), 916 (6-Fig 24), crespa piracicaba (7-Fig 25), crespa capão bonito (9-Fig 25), tupi (10-Fig 24), são José (13-Fig 24), roxa monte alegre (14-Fig 24) e verde escura (15-Fig 24) apresentaram a banda B2 enquanto a são roque (4-Fig 24), gigante 915 (5-Fig 24) e mococa (12-Fig 24), a banda C2. A ribeirão pires 2446 (8-Fig 24) e a jundiaí (11-Fig 24) apresentaram as duas bandas, A2, C2 e B2, D2,, respectivamente.

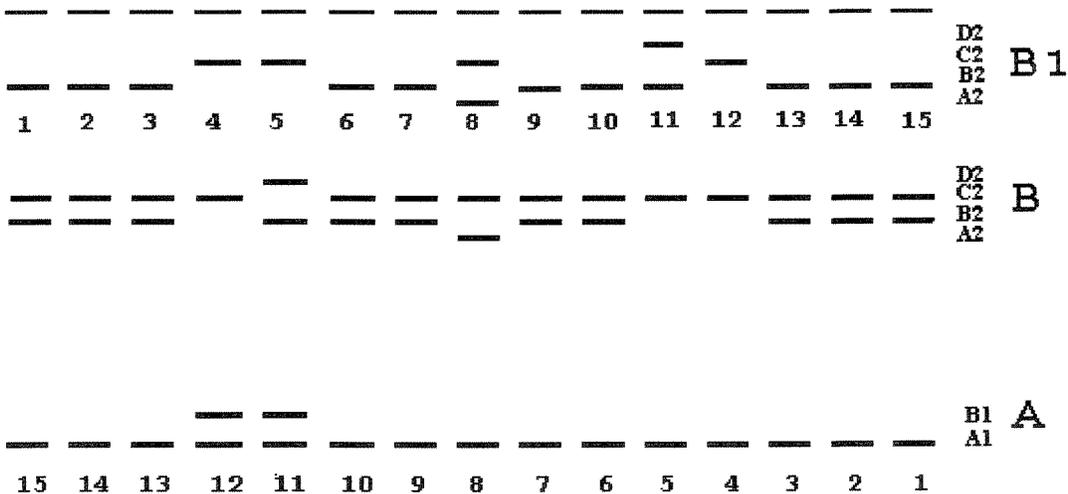
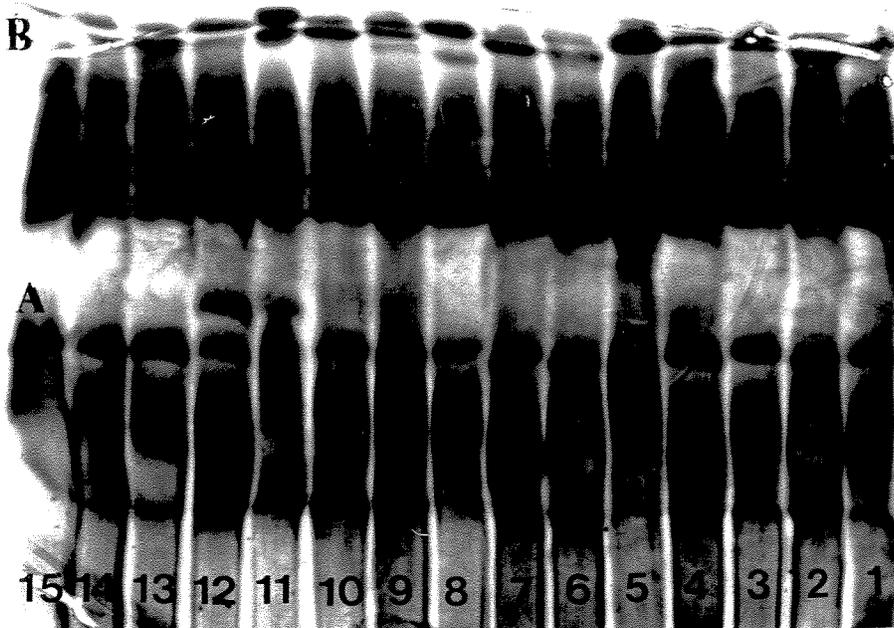
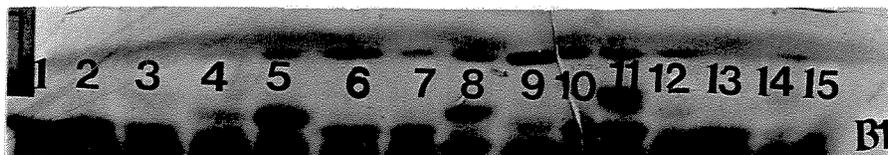


Figura 24. Zimograma de EST de couve. Início na parte inferior, ânodo no topo. 1=ribeirão pires 2620 com bandas na região A:A1 e região B:B2; 2=1811 A1 e B2; 3=roxa A1 e B2; 4=são roque A1 e C2; 5=gigante 915 A1 e C2; 6=916 A1 e B2; 7=crespa piracicaba A1 e B2; 8=ribeirão pires 2446 A1 e A2,C2; 9=crespa capão bonito A1 e B2; 10=tupi A1 e B2; 11=jundiá A1, B1 e B2, D2; 12=mococa A1, B1 e C2; 13=são José A1 e B2; 14=roxa monte alegre A1 e B2; 15=verde escura A1 e B2.

PRX - A Figura 25 mostra um gel e um diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as isoenzimas do sistema PRX, presentes após eletroforese vertical. O sistema PRX apresentou bandas em duas regiões, sendo que a região mais distante a origem (B-Fig 25) apresentou uma banda monomórfica, forte e similar para todas as variedades. A região mais lenta (A-Fig 25) apresentou o polimorfismo de uma ou duas bandas, antecedida por uma banda que por não ser sempre constante não foi considerada. Nesta região mais próxima a origem foi observado o fenótipo de uma ou duas bandas denominadas A e B. As variedades ribeirão pires 2620 (1-Fig 25), 1811 (2-Fig 25), roxa (3-Fig 25), 916 (6-Fig 25), crespia piracicaba (7-Fig 25), ribeirão pires 2446 (8-Fig 25), tupi (10-Fig 25), jundiaí (11-Fig 25), mococa (12-Fig 25), são José (13-Fig 25) e roxa monte alegre (14-Fig 25) apresentaram a banda B1 enquanto a gigante 915 (5-Fig 25) e a verde escura (15-Fig 25) a banda A1. A são roque (4-Fig 25) e a crespia capão bonito (9-Fig 25) as duas bandas A1 e B1.

Foram observadas, portanto, duas bandas, A1 e B1 na região polimórfica considerada.

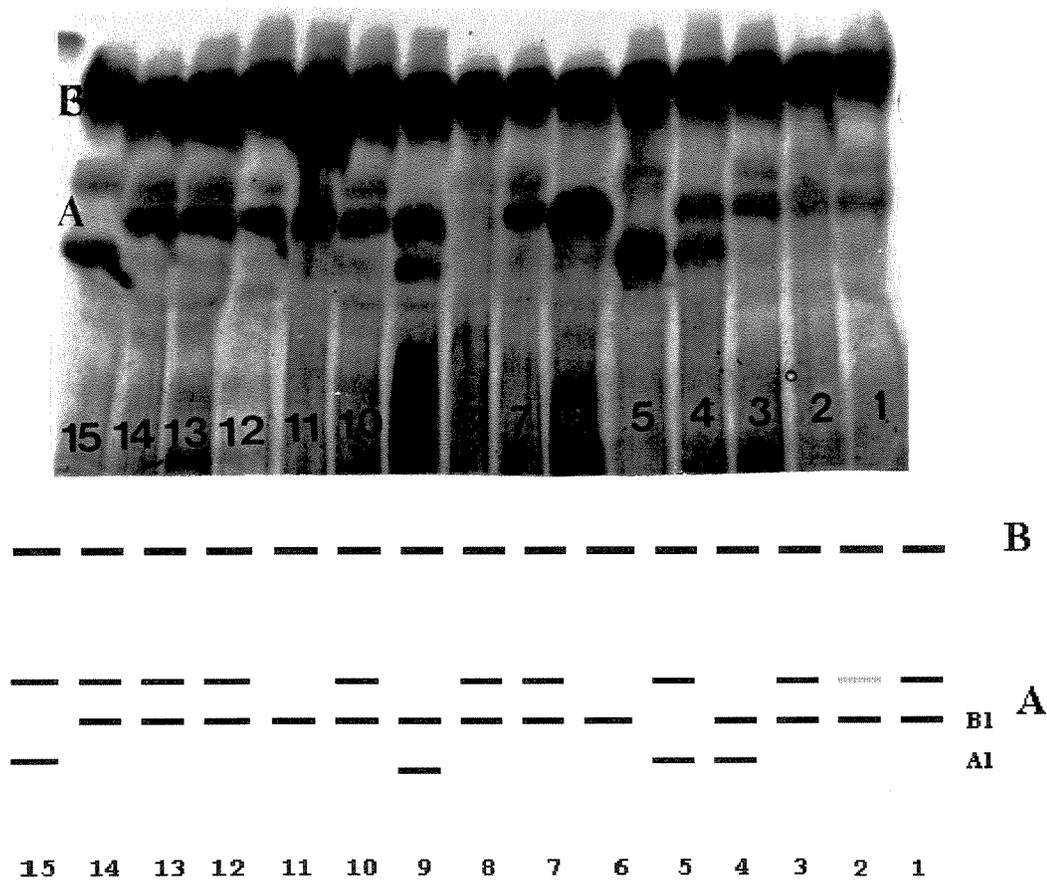


Figura 25. Zimograma de PRX de couve. Início na parte inferior, ânodo no topo. 1=ribeirão pires 2620 com bandas na região A: B1 Região B com banda monomórfica; 2=1811 B1; 3=roxa B1; 4=são roque A1 e B1; 5=gigante 915 A1; 6=916 B1; 7=crespa piracicaba B1; 8=ribeirão pires 2446 B1; 9=crespa capão bonito A1 e B1; 10=tupi B1; 11=jundiaí B1; 12=mococa B1; 13=são José B1; 14=roxa monte alegre B1; 15=verde escura A1.

IDH - A Figura 26 mostra um gel representando os fenótipos correspondentes as isoenzimas do sistema IDH, presentes após eletroforese vertical. O sistema IDH apresentou bandas em duas regiões, tendo na mais avançada, uma banda similar para todas as variedades, caracterizando ser codificada por um provável locus. A região mais próxima a origem apresentou um padrão mais polimórfico, porém, com bandas que não foram repetitivas e não foram consideradas.

GOT - A Figura 27 mostra um gel representando os fenótipos correspondentes as isoenzimas do sistema GOT, presentes após eletroforese vertical. O sistema GOT também não apresentou muito polimorfismo sendo verificado um padrão, de pelo menos três bandas em uma região, similar em todas as variedades, com exceção da roxa monte alegre (14-Fig 27) e verde escura (15-Fig 27) que apresentaram quatro a cinco bandas. Como segundo ARÚS & SHIELDS (1983) o sistema GOT é codificado por três loci sendo o mais próximo a origem dimérico, o fenótipo de cinco bandas pode provavelmente estar indicando o genótipo heterozigoto na roxa monte alegre e verde escura.

MDH - A Figura 28 mostra a fotografia do gel representando os fenótipos correspondentes as isoenzimas do sistema MDH, presentes após eletroforese vertical. O sistema MDH não se apresentou bem definido, sendo, porém, verificada a existência de bandas em uma região mais avançada antecedida por um padrão de rastro variável. Esta região apresentou de uma a três bandas de um sistema formado provavelmente por proteínas diméricas. Se esta região fosse codificada por um locus, as variedades roxa monte alegre (14-Fig 28) e verde escura (15-Fig 28) apresentaram o padrão de três bandas correspondentes ao genótipo heterozigoto enquanto as demais o genótipo homozigoto.

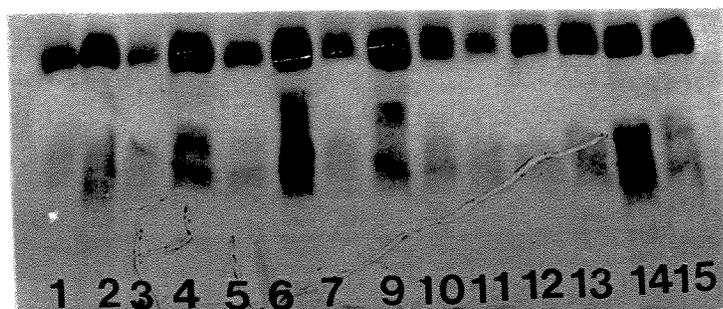


Figura 26. Zimograma de IDH de couve. Início na parte inferior, ânodo no topo. 1=ribeirão pires 2620; 2=1811; 3=roxa; 4=são roque; 5=gigante 915; 6=916; 7=crespa piracicaba; 9=crespa capão bonito; 10=tupi; 11=jundiaí; 12=mococa; 13=são josé; 14=roxa monte alegre; 15=verde escura.

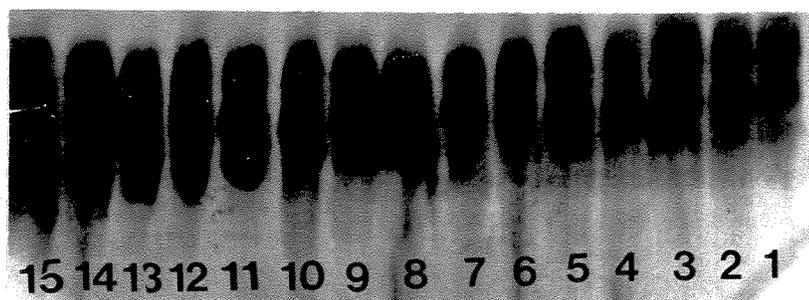


Figura 27. Zimograma de GOT de couve. Início na parte inferior, ânodo no topo. 1=ribeirão pires 2620; 2=1811; 3=roxa; 4=são roque; 5=gigante 915; 7=crespa piracicaba; 8=ribeirão pires 2446; 9=crespa capão bonito; 10=tupi; 11=jundiaí; 12=mococa; 13=são josé; 14=roxa monte alegre; 15=verde escura.



Figura 28. Zimograma de MDH de couve. Início na parte inferior, ânodo no topo. 1=ribeiro pires 2620; 2=1811; 3=roxa; 4=são roque; 5=gigante 915; 6=916; 7=crespa piracicaba; 8=ribeirão pires 2446; 9=crespa capão bonito; 10=tupi; 11=jundiaí; 12=mococa; 13=são josé; 14=roxa monte alegre; 15= verde escura.

4.3.2. Dendrogramas UPGMA de isoenzimas e RAPD.

A Figura 29 mostra a fotografia do gel e o diagrama representativo dos fenótipos correspondentes as ampliações polimórficas do DNA genômico através das extensões inicializadas pelo "primer" A9 produzindo sete bandas entre as espécies e cultivares de couve, exemplificando as ampliações obtidas. O exemplo ilustra a ocorrência de polimorfismo nas bandas B, D, E e F. A banda B diferencia as variedades cressa piracicaba (7), ribeirão pires (8) e jundiaí (11), enquanto a D e E as variedades são Roque (4), cressa piracicaba (7), cressa capão bonito (9), tupi (10), jundiaí (11), mococa (12) e roxa monte alegre (14), das demais. A banda F diferencia a variedade gigante 915 das demais.

O dados de polimorfismo obtidos através dos "primers" foram analisados pelo programa NTSYS, adicionando-se os resultados a medida em que foram sendo obtidos.

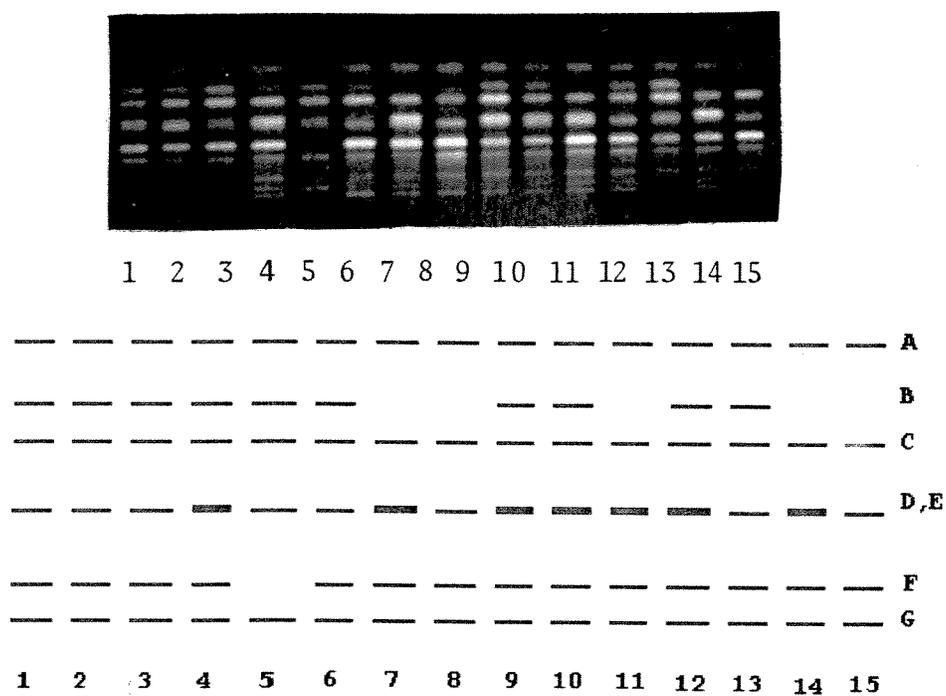


Figura 29. Perfil RAPD para o primer A9 em couve. 1=ribeirão pires 2620; 2=1811; 3=roxa; 4=são roque; 5=gigante 915; 6=916; 7=crespa piracicaba; 8=ribeirão pires 2446; 9= crespa capão bonito; 10=tupi; 11=jundiaí; 12=mococa; 13=são José; 14=roxa monte alegre; 15=verde escura.

Os dendrogramas construídos pelas dezesseis bandas polimórficas correspondentes as isoenzimas e pelas 106 e 115 bandas polimórficas dos marcadores RAPD representados pelas Figuras 30, 31 e 32 evidenciaram diferenças acima de 50% dos grupos de ligação entre o obtido pelas isoenzimas e marcadores RAPD, provavelmente devido aos poucos dados das isoenzimas, pois não foi obtida muita variabilidade genética em vários sistemas enzimáticos, resultado este de acordo com AMARAL *et al.*(1995). De acordo com estes autores, o fato da principal forma de reprodução ser por via assexuada pode ter conduzido ao estreitamento genético, em razão da reduzida variabilidade isoenzimática dos clones avaliados. Entre os dendrogramas obtidos pelos marcadores RAPD a única alteração observada foi a ligação não direta da jundiaí a são José, porém através do grupo formado pela são José com a roxa monte alegre e verde escura, não sendo alterada no entanto, a ordem de ligação entre as variedades, confirmando que o número de dados foi suficiente. Pela Junção dos dendrogramas de isoenzimas e o de cento e quinze bandas polimórficas dos marcadores RAPD representada pela Figura 33, verificou-se que pelo novo dendrograma não ocorreu alteração da ordem de ligação entre todas variedades, sendo reconstituída a proximidade entre a jundiaí e são José. Foi comprovada, portanto, a maior eficácia dos marcadores RAPD em relação as isoenzimas de couve que expressaram pouco polimorfismo.

O agrupamento mais próximo ocorreu entre as ligações dos grupos formados pela roxa monte alegre com verde escura mais jundiaí com são José ao da roxa com a 916 mais a 1811. Este agrupamento foi ligado a seguir com o da gigante 915 mais crespia piracicaba com crespia capão bonito. Depois ao agrupamento da ribeirão pires 2620 com são Roque mais tupi com mococa e finalmente por último a ribeirão pires 2446.

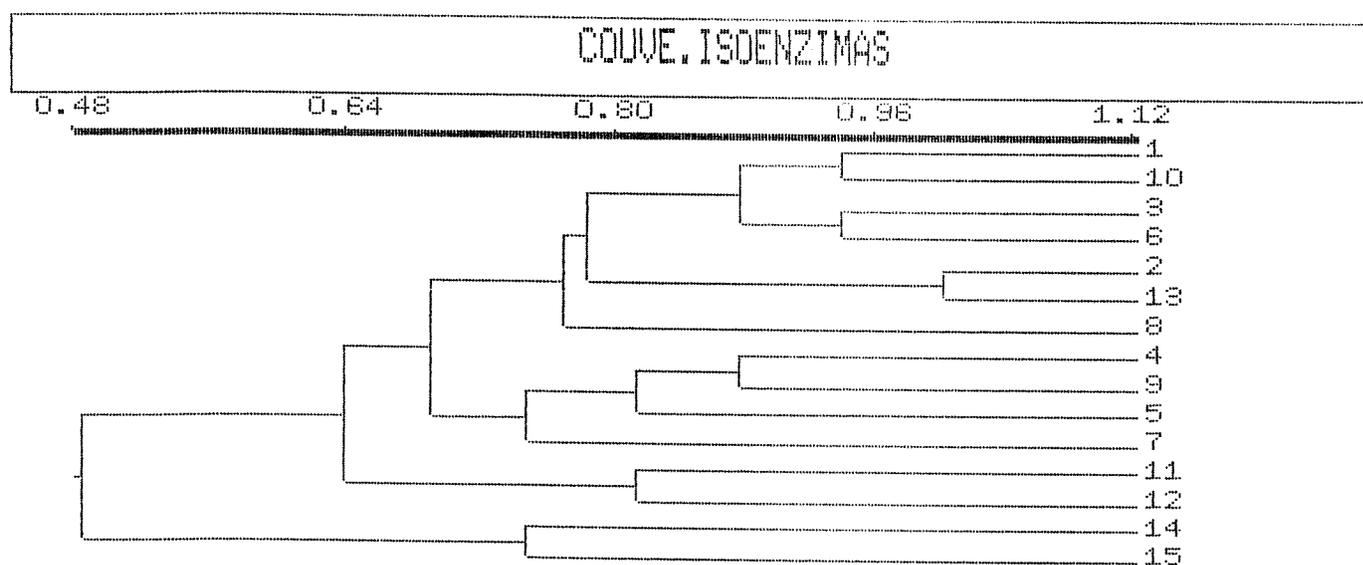


Figura 30. Dendrograma das dezesseis bandas polimórficas das isoenzimas de couve. 1=ribeirão pires 2620; 2=1811; 3=roxa; 4=são roque; 5=gigante 915; 6=916; 7=crespa piracicaba; 8=ribeirão pires 2446; 9=crespa capão bonito; 10=tupi; 11=jundiaí; 12=mococa; 13=são josé; 14=roxa monte alegre; 15=verde escura.

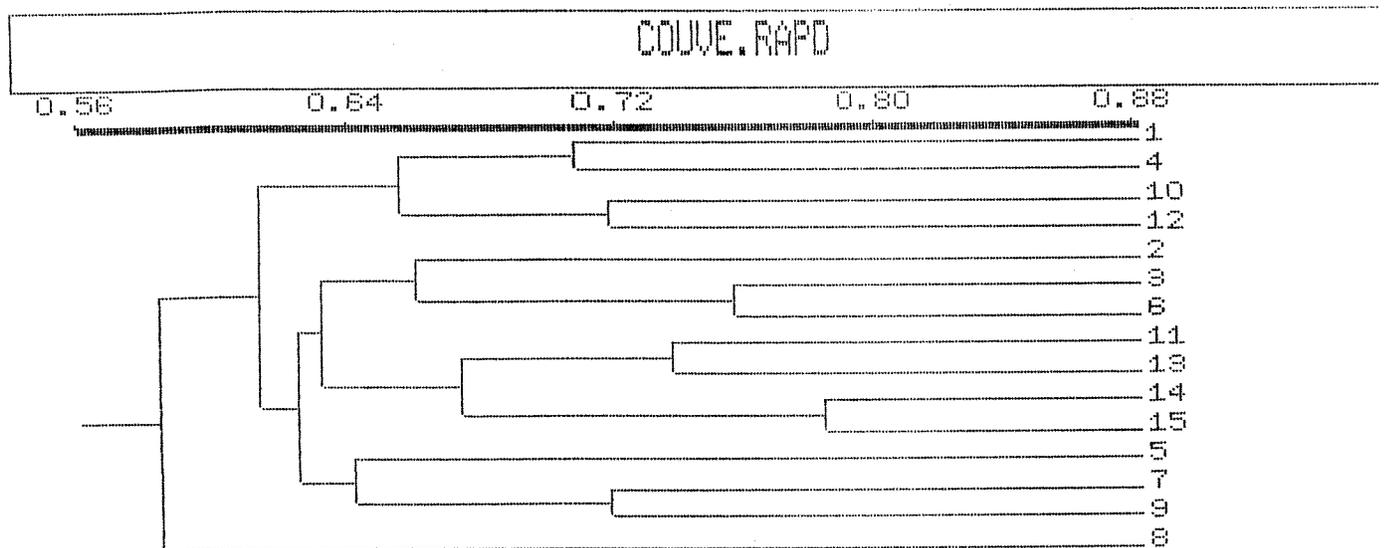


Figura 31. Dendrograma das 106 bandas polimórficas dos marcadores RAPD em couve. 1=ribeirão pires 2620; 2=1811; 3=roxa; 4=são roque; 5=gigante 915; 6=916; 7=crespa piracicaba; 8=ribeirão pires 2446; 9=crespa capão bonito; 10=tupi; 11= jundiaí; 12=mococa; 13=são josé; 14= roxa monte alegre; 15=verde escura.

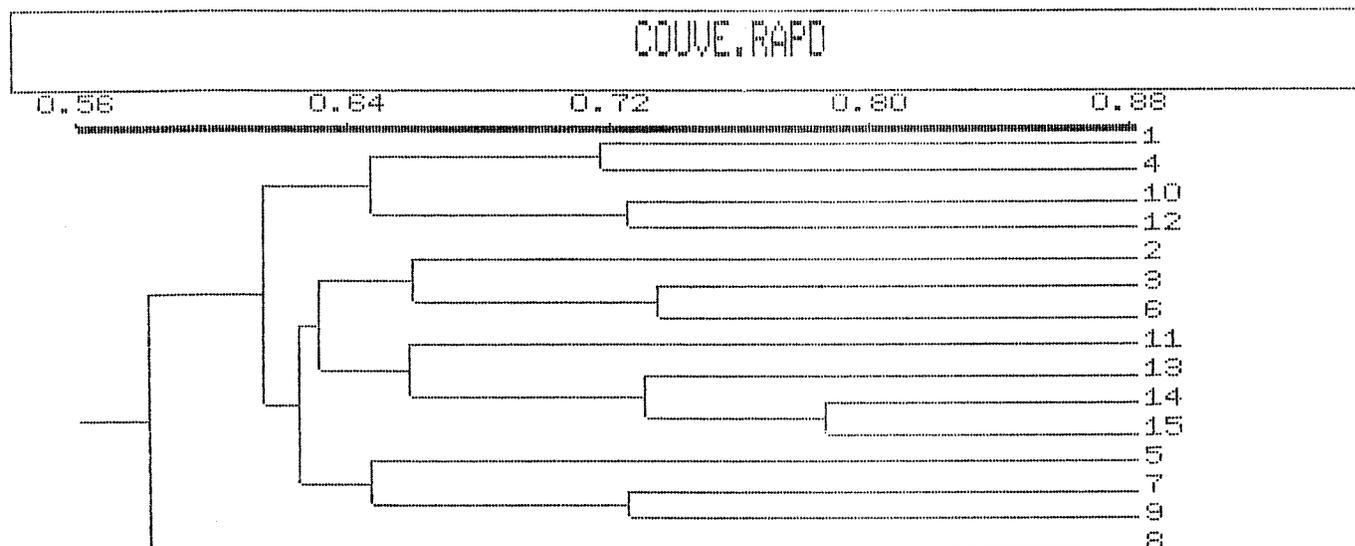


Figura 32. Dendrograma UPMGA de marcadores RAPD obtido com 115 bandas polimórficas em couve. 1= Ribeirão Pires 2620; 2=1811; 3=roxa; 4= são roque; 5= gigante 915; 6= 916; 7= crespas piracicaba; 8= ribeirão pires 2446; 9= crespas Capão bonito; 10= tupi; 11= jundiaí; 12= mococa; 13= são José; 14= roxa monte alegre; 15= verde escura.

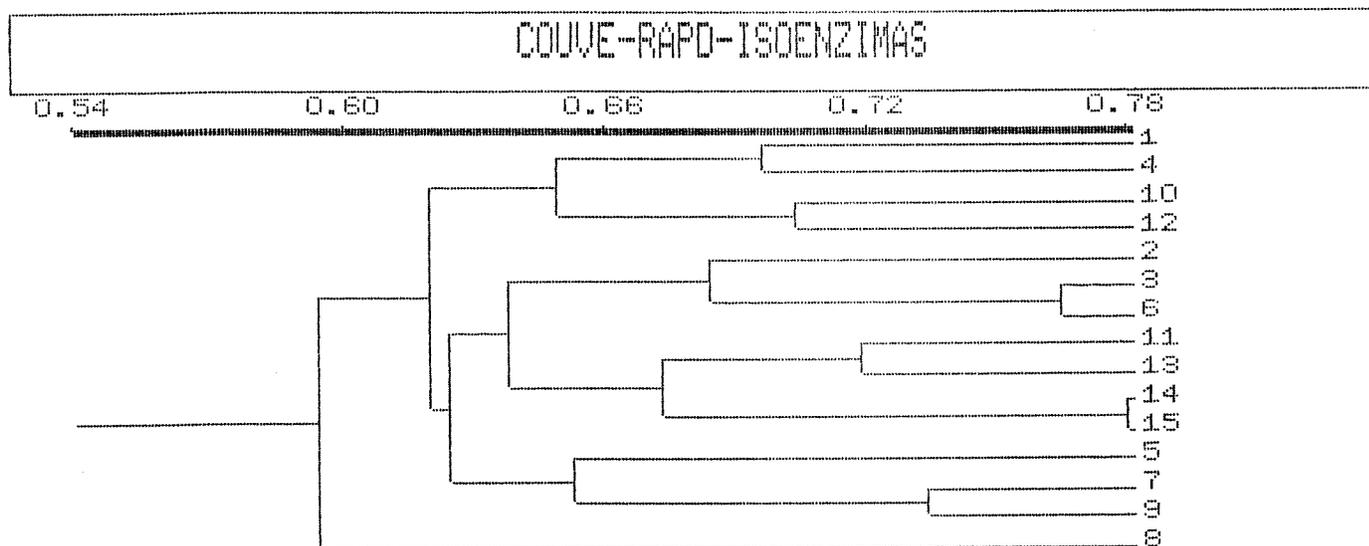


Figura 33. Dendrograma UPGMA de isoenzimas e marcadores RAPD em couve. 1=ribeirão pires 2620; 2=1811; 3=roxa; 4=são roque; 5=gigante 915; 6=916; 7=crespa piracicaba; 8=ribeirão pires 2446; 9=crespa capão bonito; 10=tupi; 11=jundiaí; 12=mococa; 13=são josé; 14= roxa monte alegre; 15=verde escura.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O polimorfismo enzimático e de RAPDs observado em citros, palmeiras e couve possibilitou a diferenciação entre espécies e/ou cultivares existentes nos BAGs.

Não foram encontrados marcadores isoenzimáticos ou RAPD para a diferenciação entre os cultivares de *C. sinensis*.

Os dados de isoenzimas em citros foram semelhantes aos encontrados na literatura, tendo-se verificado apenas um aumento do número de bandas nos sistemas enzimáticos MDH e PGM. No heterozigoto com um par de aloenzimas do sistema LAP relatado por TORRES et al. (1982), foram observadas três bandas em vez das quatro descritas pelo mesmo autor, pois uma quarta banda foi observada em outra região. Os outros sistemas GOT, ME e IDH foram similares aos encontrados na literatura.

A ocorrência de variabilidade, tanto enzimática como por marcadores RAPD foi observada em tangerinas, apesar de apresentarem menor número efetivo de alelos por locus polimórfico e menor heterozigose em relação as laranjas doces, ratificando a teoria de que a origem da diversificação varietal pode ser decorrente de hibridação.

A ausência de diversidade do polimorfismo enzimático e por marcadores RAPD foi observada entre as laranjas doces, apesar do maior número efetivo de alelos por locus polimórfico e heterozigose em relação as tangerinas, corroborando a teoria de que a origem da diversificação pode ser decorrente de mutação.

Os dendrogramas construídos pelas bandas das isoenzimas e marcadores RAPD foram muito semelhantes, sugerindo que as bandas observadas foram produtos de expressão gênica. Foi verificado o agrupamento entre tangerinas, sendo a mais próxima à poncã (*C. reticulata*), considerada como uma das três ancestrais em citros, a sunki, seguida pela cleópatra, cravo e clementina, que ficou

bastante ligada às laranjas doces, reforçando a hipótese da procedência da tangerina clementina a partir destas.

Sendo a *C. sinensis* considerada procedente da *C. grandis*, outra ancestral em citros, a ligação da laranja azeda (*C. aurantium*) entre as tangerinas e laranjas reforça a hipótese de que a laranja azeda pode ser originada de *C. reticulata* e *C. grandis*.

O agrupamento formado pelo limão galego (*C. aurantifolia*) com a lima-da-pérsia (*C. limmetioides*), limão cravo (*C. limon*) e cidra (*C. medica*), considerada também ancestral em citros, ficou bem diferenciada dos demais grupos. A estreita ligação entre o limão galego e a lima-da-pérsia confirma a proximidade entre estas duas espécies. Também ficou corroborada a hipótese da procedência das três espécies a partir da cidra. A *P. trifoliata* ficou bem distante dos demais grupos confirmando a diversidade genética.

Pelos zimogramas das palmeiras foram observadas várias bandas não relatadas por trabalhos anteriores. No sistema PGI relatado por TORRES & TISSERAT (1980) como dimérico e codificado por dois loci foram observadas de uma a três bandas em duas regiões com nove diferentes velocidades de migração. Este sistema algumas vezes caracterizou o híbrido entre as euterpes juçara e açai. No GOT, reportado por TORRES & TISSERAT (1980) como dimérico e codificado por dois loci, foram observadas de uma a três bandas em duas regiões com nove diferentes velocidade de migração. No LAP foram observadas de uma a duas bandas com sete diferentes migrações. No APS foram observadas duas regiões de bandas com cinco diferentes velocidades de migração, tendo pelo menos um sistema o fenótipo dimérico característico. No PGM, reportado por TORRES & TISSERAT (1980) como monomérico, foi observada uma região com uma a duas bandas com seis diferentes migrações. Os sistemas EST e PRX apresentaram várias bandas em duas regiões, sendo que uma banda da PRX caracterizou o híbrido entre as euterpes juçara e açai por se apresentar sempre em uma posição intermediária entre elas. Pelo

sistema MDH foi caracterizada a variabilidade genética entre as pupunhas.

Os dendrogramas produzidos pelas bandas das isoenzimas e marcadores RAPD foram bastante semelhantes em palmeiras, sugerindo que as bandas observadas foram produtos de expressão gênica.

As pupunhas formaram um agrupamento distinto ligando-se as EEU com e sem espinho a benjamim constant, yurimaguas, ceplac 10, branca una e por último a T2S1. Pelo agrupamento das euterpes, verificou-se a estreita ligação entre as juçaras, a posição intermediária dos híbridos entre as juçaras e acaís comum, espada e pariquera, e a seguir a ligação com as açais itajobi, danilo e a euterpe tadeu. A diversidade das ligações entre os diferentes ecótipos da açai comprovou a existência de variabilidade genética. A gariroba (*Syagrus oleraceae*) e a dendê hermes (*Elaeis guineensis*) ficaram mais próximas as pupunhas.

Pelos zimogramas da couve verificou-se que o sistema PGM apresentou o maior polimorfismo. Neste sistema relatado por ARÚS & SHIELDS (1983) como dimérico e originado de dois locos, foram observadas de duas a cinco bandas com nove diferentes velocidades de migração que não diferenciaram apenas três variedades. O sistema enzimático EST apresentou várias bandas em duas regiões sendo caracterizadas pelo menos duas regiões polimórficas com uma ou duas bandas e seis diferentes velocidades de migração. O sistema PRX apresentou uma banda monomórfica na região mais avançada e uma região polimórfica com uma ou duas bandas na região mais próxima a origem. Os sistemas MDH, IDH e GOT não apresentaram muito polimorfismo.

Os dendrogramas produzidos pelas bandas das isoenzimas e marcadores RAPD em couve não foram semelhantes, provavelmente devido ao baixo número de dados das isoenzimas, porém a junção dos dois produziu um dendrograma similar ao dos marcadores RAPD comprovando seu alto potencial pela maior facilidade de obtenção de

grande número de dados. O agrupamento mais próximo ocorreu entre as ligações da roxa monte alegre com a verde escura mais jundiá com são José ao da roxa com a 916 mais a 1811 que foi a seguir ligado ao grupo formado pela gigante 915 mais cressa piracicaba com cressa capão Bonito e depois ao da ribeirão pires 2620 com a são Roque mais tupi com mococa e por último a ribeirão pires 2446.

Foi comprovada a técnica complementar dos marcadores RAPD a das isoenzimas para a diferenciação das espécies estudadas.

6. CONCLUSÕES

1. A caracterização através do polimorfismo enzimático e marcadores RAPDs revelou-se bastante útil no conhecimento da variabilidade genética nos germoplasmas de citros, palmeiras e couve estudados.
2. Os resultados obtidos em gel de poliacrilamida confirmaram os relatados em gel de amido, além de possibilitarem a observação de novas bandas.
3. Os dendrogramas de enzimas e RAPDs foram, de modo geral, semelhantes e de acordo com as informações taxonômicas e morfológicas existentes.

7. RESUMO

Estudou-se, mediante polimorfismo enzimático em gel de poliacrilamida e polimorfismo de DNA baseado na amplificação de segmentos de DNA ao acaso denominado RAPD, a variabilidade genética em citros, palmeiras e couve. Em citros, as espécies e cultivares de laranja doce Hamlim, Natal, Valência, Pera, Baianinha (*C. sinensis*); laranja azeda (*C. aurantium*); tangerinas clementina, - sunki, cleópatra e poncã (*C. clementina*, *sunki*, *reshni*, *reticulata*); lima-da-pérsia (*C. limettioides*); limão-galego (*C. aurantifolia*); limão-cravo (*C. limonia*) e trifoliata (*Poncirus trifoliata*). Em palmeiras, as espécies e ecótipos de açai (*E. oleracea*) itajobi, pariquera, danilo; juçara (*Euterpe edulis*); euterpe tadeu; híbrido açai X juçara; pupunhas yurimaguas, benjamim constant, branca una, t2s1, EEU, ceplac 10, walter (*Bactris gasipae*); dendê hermes (*Elaeis guineensis*); gariroba (*Syagrus oleraceae*). Em couve as variedades de couve manteiga ribeirão pires 2620; 1811; roxa; são roque; gigante 915; 916; crespa piracicaba; ribeirão pires 2446; crespa capão bonito; tupi; jundiaí; mococa; são josé; roxa monte alegre; verde escura. Os extratos de folhas foram analisados para as isoenzimas de malato desidrogenase (MDH), enzima málica (ME), leucinoaminopeptidase (LAP), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), fosfoglucoisomerase (PGI), fosfoglucomutase (PGM), isocitrato desidrogenase (IDH), peroxidase (PRX), esterase (EST) e para os marcadores RAPD utilizando os quarenta primers do kit A e B da Operon Technologies. Verificou-se grande variabilidade genética interespecífica, comprovada pelos dendrogramas UPGMA, para citros, palmeiras e couve, com reconhecimento de híbridos nas palmeiras, porém nenhum polimorfismo entre os cultivares de laranjas doces. Foram observadas bandas além das referidas pela literatura em gel de amido. As relações

filogenéticas entre as espécies e cultivares ficaram de acordo com a literatura existente. Foi comprovada a maior eficácia dos marcadores RAPD em relação aos de isoenzimas, pois possibilita facilmente a análise de grande número de marcadores genéticos, de especial interesse nos casos em que as isoenzimas não expressam polimorfismo.

8. SUMMARY

CHARACTERIZATION OF GENETIC DIVERSITY BY MEANS OF ENZYMATIC POLYMORPHISM AND RAPD OF CITRUS, PALM AND CABBAGE PLANTS.

Genetic diversity was studied by means of enzymatic polymorphism using polyacrilamide gel electrophoresis and a DNA polymorphism assay based on the amplification of random DNA segments denominated RAPD, for citrus, palm and cabbage plants. The following citrus species were analyzed: sweet orange (*C.sinensis*), Hamlin, Natal, Valencia, Pera and Baianinha; clementine, sunki, cleopatra and mandarin tangerines (*C.clementina*, *C.sunki*, *C.cleopatra*, *C.reticulata*); Palestine lime (*C. limettioides*); West Indian lime (*C.aurantifolia*); Rangpur lime (*C.limonia*); Sour orange (*C. aurantium*); citron (*C.medica*) and *Poncirus trifoliata*. For palms species the following were studied: *Euterpe oleracea* varieties, açai, açai itajobi, pariquera, danilo; *Euterpe edulis* varieties, juçara; euterpe tadeu; hybrids from *E. edulis* X *E.oleracea*; *Syagrus oleracea* var gariroba; *Elaeis guineensis* var dendê hermes; *Bactris gasipae*, varieties E.E.U., t2s1, branca una, uurimaguas, ceplac 10, benjamim contant and walter. For cabbage, fifteen varieties of Campinas Agronomic Institute were studied. Citrus, palm and cabbage 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), isocitrate dehydrogenase (IDH), peroxidase (PRX) and esterase (EST). Polymorphism was also investigated by the RAPD technique using forty primers obtained from Operon Technologies. Inter-specific differences were observed in citrus, palms and cabbage as well as distinctive patterns for palm hybrids; on the other hand,

no variation between intraespecific *C. sinensis* cultivars was observed. Some bands were observed in addition to those cited in the literature where starch gel electroporesis was used for enzymatic polymorphism. The conclusions with regard to polymorphic patterns obtained using the RAPD technique confirmed those observed with isozymes, with the advantages of its greater efficiency and ability to process a large number of samples.

9.LITERATURA CITADA

- ALFENAS, A.C. 1986. Isoperoxidasas of *Cryphonectria cubensis* and their possible role in the fungal pathogenicity. Fitopatologia Brasileira, 11:873-879.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I; WALTER, B. & PASSADOR, C.G. 1991. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 242p.
- AMARAL, Jr., A.T.; SILVA, D.J.H.; SEDIYAMA, M.A.N.; CASALI, V.W.D.; CRUZ, C.D. 1994. Dissimilaridade genética de descritores botânico-agronômicos e isozimáticos em clones de couve-comum. Hort. Bras., 12(2): 113-117.
- AMARO, A.A. 1984. Subsídio a uma política para a citricultura. In: Laranja, 5, p. 29-47. Cordeirópolis (SP).
- ARÚS, P. & SHIELDS, C.R. 1983. Cole Crops (*Brassica oleracea* L.). In: Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B. (ed. Tanksley, S.D. & Orton, T.J.). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. p. 339-350.
- ASHTON, G.C. & BRADEN, W.R. 1961. Serum beta-globulin polymorphism in mice. Aust. J. Biol. Sci. 14:248-254.
- ASHARI, S.; ASPINALL, D. & SEDGLEY, M. 1988. Discrimination of zygotic and nucellar seedlings of five polyembryonic citrus roostocks by isozyme analysis and seedling morphology, J. Hort. Sci., 63(4):695-703.
- BALLVÉ, R.M.L. 1988. Isoenzimas como marcadores genéticos em palmitreiro (*Euterpe spp*). 1988. Tese de Mestrado- Unicamp. 95p.
- BALLVÉ, R.M.L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; SIQUEIRA, W.J.; TEÓFILO SOBRINHO, J. & POMPEU JÚNIOR, J. 1991. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros. Bragantia, Campinas, 50(1): 57-76.

- BARRET, H.C. & RHODES, A.M. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationship in cultivated Citrus and its close relatives. Syst. Bot. 1:105-136.
- BECHMANN, J.S. & SOLLER, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. Theor. Appl. Genet., 67:35-42.
- BEN-HAYYIM, G.; SHANI, A. & VARDI, A. 1982. Evaluation of isozyme systems in citrus to facilitate identification of fusion products. Theor., Appl. Genet., 64:1-5.
- BOVI, M.L.A. & CARDOSO, M. 1978. Pesquisas com o palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.). Campinas, Instituto Agronômico de Campinas, 46p.
- BOVI, M.L.A. 1984. Pesquisas em desenvolvimento com o açazeiro no Instituto Agronômico. O Agrônomo, Campinas, 36(2):155-178.
- BOVI, M.L.A.; GODOY JÚNIOR, J. & SÁES, L.A. 1987. Híbridos interspecíficos de palmitreiro (*Eurterpe oleraceae* X *E.edulis*). Bragantia, 46(2):343-363.
- BOVI, M.L.A.; SPIERING, S.H.; SÁES, L.A. & GODOY, Jr., G. 1995a. Coleta e Caracterização morfológica de germoplasma de *Euterpe*. Simpósio Nacional de Recursos Genéticos Vegetais, Campinas. p.34.
- BOVI, M.L.A.; GERMEK, E.B.; GALLO, P.B.; SÁES, L.A.; GODOY, Jr., G.; MARTINS, A.L.M.; PAULO, E.M.; KANTHACK, R.A.D.; MARTINS, F.P.; SANTOS, R.R.; BORTOLETTO, N.; CAMPANA, M.P. & CAMARGO, A.P. 1995b. Conservação e caracterização de germoplasma de pupunheira (*Bactris gasipaes*) em uso no Instituto Agronômico. Simpósio Nacional de Recursos Genéticos Vegetais, Campinas. p.66.
- BOYER, J.S. 1992. Plant productivity and environment. Science, 218:443-448.
- BRUFORD, M.W.; HANOTTE, O.; BROOKFIELD, J.F.Y. & BURKE, T. 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Molecular

- Genetic Analysis of populations (ed.HOELZEL,A.R.). IRL Press. Oxford. p. 225-269.
- BUTTON,J.; VARDI,A, & SPIEGEL-ROY, P. 1976. Root peroxidase isoenzymes as an aid in Citrus breeding and taxonomy. Theor. Appl. Genet., 47:119-123.
- CHASE, C.D.; ORTEGA, V.M. & VALLEJOS, C.E. 1991. DNA restriction fragment length polymorphisms correlate with isozyme diversity in *Phaseolus vulgaris* L. Theor. Appl. Genet., 81:806-811.
- DOMINGUES, E.T.;POMPEU, Jr., J.; MACHADO, M.A.; TEÓFILO SOBRINHO, J. 1995. Banco ativo de germoplasma de citros do centro de citricultura Sylvio Moreira/IAC. Simpósio Nacional de Recursos Genéticos Vegetais,Campinas. p.68.
- DUNBAR,B.S. 1990. Two dimensional electrophoresis and immunological techniques.Plennum Press, New York, 372p.
- DURHAM, R.E.; LIOU, P.C.; GMITTER,F.G. & MOORE, G.A. 1992. Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in Citrus. Theor. Appl Genet., 84:39-48.
- ECKERT, K.A. & KUNKEL, T.A. 1993. The fidelity of DNA polymerases used in the polymerase chain reactions. In: PCR-A Practical Approach(ed. Mcpherson, M.F.; Quirke, P & Taylor, G.R.) IRL Press-Oxford. p. 225-243.
- ESEN, A. & SOOST, R.K. 1976. Peroxidase polymorphism in Citrus. J. Heredity, 67:199-203.
- ESEN,A. & SCORA, R.W. 1977. Amylase polymorphism in Citrus and some related genera. Amer. J Bot., 64:305-309.
- FONSECA, N.L. 1995. Diretrizes de quarentena de recursos genéticos. Simpósio Nacional de Recursos Genéticos Vegetais, Campinas. p.3.
- GARDNER, E.D.; SIMMONS, M.J.; SNUSTADAD, D.P. 1991. Principles of Genetics. John Wiley & Sons, Inc.; New York. 119p.

- GREEN, R.M.; VARDI, A. & GALUN, E. 1986. The plastome of Citrus. Physical map, variation among Citrus cultivars and species and comparison with related genera. Theor. Appl. Genet., 72:170-177.
- GHESEQUIÉRE, M. 1983. Contribution a l'étude de la variabilité génétique du palmier à huile (*Elaeis guineensis*): le polymorphisme enzymatique. Doctoral Thesis, Université de Paris-Sud Centre D'orsay, Paris.
- GOGORCENA, Y. & ORTIZ, J.M. 1989. Characterisation of Sour Orange (*Citrus aurantium*) cultivars. J.Sci. Food Agric., 48:275-284.
- HIRAI, M. & KOZAKI, I. 1981. Isozymes of citrus leaves. Proc. Int. Soc. Citriculture, 1: 10-13.
- HIRAI, M.; KOZAKI, I. & KAJIURA, I. 1986. Isozyme analysis and Phylogenetic Relationship of Citrus. Japan J. Breed.; 36:377-389.
- HEUN, M. & HELENTJARIS, T. 1993. Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. Theor. Appl. Genet., 85:961-968.
- HOELZEL, A.R. & GREEN, A. 1992. Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. In: Molecular Genetic Analysis of Populations (ed. Hoelzel, A.R.). A Practical Approach. IRL Press-Oxford. p.159-186.
- HU, E. J. & QUIROS, C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Reports., 10:505-511.
- HORN, P. & RAFALSKI, A. 1992. Non-Destructive RAPD Genetic Diagnostic of Microspore-Derived Brassica Embryos. Plant Molecular Biology Reports. 10(3):285-293.
- IGLESIAS, L.; LIMA, H.; SIMON, J.P. 1974. Isoenzyme identification of zygotic and nucellar seedlings in citrus. J. Heredity, 6:81-84.
- JARREL, D.C.; ROOSE, M.L.; TRAUGH, S.N. & KUPPER, R.S. 1992. A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. Theor. Appl. Genet., 84:4956.

- KIRBY, L.T. 1992. DNA Fingerprinting. An Introduction. W.H. Freeman & Company -New York. 365p.
- KRESOVICH, S.; WILLIAMS, J.G.K.; McFERSON., J.R.; ROUTMAN., E.J. & CHAAL., B.A. 1992. Characterization of genetic identities and relationship of Brassica oleraceae L. via a random amplified polymorphic DNA array. Theor. Appl. Genet., 85:190-196.
- KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, T.; FUJIWARA, K. & OIYAMA, I. 1991. Analysis of cytoplasmic genomes in somatic hybrids between navel orange (C. sinensis Osb.) and "Murcott" tangor. Theor. Appl. Genet., 8:6-10.
- LURO, F.; LAIGRET, F. & BOVE, J.M. 1992. Application of Random Amplified Polymorphic DNA (R.A.P.D.) to Citrus Genetics and Taxonomy. Proc. Int. Soc. Cit., 13p.
- MACPHERSON, M.J.; OLIVER, R.D. & GURR, S.J. 1992. The polymerase chain reaction. In: Molecular Plant Pathology. A Practical Approach (ed. Gurr, S.J.; Mcpherson, M.J. & Bowles, D.J.). Oxford University Press. p 123-145.
- MALIK, M.N.; SCORA, R.W. & SOOST, R.K. 1974. Studies on the origin of the lemon. Hilgardia, 41:361-382.
- MARKERT, C.F. & MOLLER, F. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 45:753-763.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I. & KESSEL, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9828-832.
- MILLIGAN, B.G. 1992. Plant DNA Isolation. In: Molecular Genetic Analysis of populations. (ed. HOELZEL, A.R.). IRL-Press-Oxford. p. 59-86.

- MITTON, J.B. 1989. Physiological and demographic variations associated with allozyme variation. In: *Isozymes in Plant Biology* (ed. Soltis & Soltis). p. 127 a 145.
- MOORE, G.A. & CASTLE, W.S. 1988. Morphological and isozymic analysis of open-pollinated citrus rootstock. J. of Heredity, 79:59-63.
- NAGAI, H.; AZEVEDO, FILHO, J.A.; MELO, A.M.T.; PASSOS, F.A.; BETTI, J.A.; RODRIGUES, B.M.; SIQUEIRA, W.J. & TAVARES, M. 1995. Recursos Genéticos na Seção de Hortaliças do IAC. Simpósio Nacional de Recursos Genéticos Vegetais, Campinas. p. 71.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Nat. Acad. USA 70: 3321-3.
- NIJENHUIS, G. TE. 1971. Estimation of the proportion of inbred seed Brussels sprouts hybrid seed by acid phosphatase isoenzyme analysis. Euphytica, 20: 498-507.
- OLLITRAULT, P. 1990. Isozymes and DNA restriction fragment length Polymorphisms as genetic markers in citrus selection. Asia-Pacific Internat. Conf. Citrus Rehabilitation. Chiangmai, Thailand.
- PATERSON, A.; TANKSLEY, S.D. & SORRELS, M.E. 1991. DNA markers in Plant Improvement. Adv. Agron. 46:39-90.
- RAFALSKI, J.A.; SCOTT, V. T. & WILLIAMS, G.K. 1991. RAPD Marker- A New Technology for Genetic Mapping and Plant Breeding. AgBiotech News Inform. 3:645-648.
- REFORGIATO, G.; LEONARDIS, W.; PICCIONE, V. & ZIZZA, A. 1988. A study on the identification of some lemon biotypes with leaf isozymes analysis and pollinic morphobiometry. Proc. Sixth Intern. Citrus Congress, 167-174.
- ROOSE, M.L & TRAUGH, S.N. 1988. Identification and performance of citrus trees on nucellar and zygotic rootstocks. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 113:(1):100-105.

- ROOSE, M.L. 1988. Isozymes and DNA restriction Fragment Length Polymorphisms in citrus breeding and systematic. Proc. of the Sixth International Citrus Congress, 155-165.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. p.5:50.
- SCANDALIOS, J.G. 1974. Isozymes in development and differentiation. Ann. Rev. Plant Physiol., 25:225-58.
- SCANDALIOS, J.G. 1979. Control of gene expression and enzyme differentiation. Physiol. Gen., 63-107.
- SHANNON, L.M. 1968. Plant Isoenzymes. Ann. Rev. Plant Physiol., 18:187-240.
- SHILLITO, R.D. & SAUL, M.W. 1988. Protoplast isolation and In: Plant Molecular biology. A practical approach (ed. Shaw, C.H.). p.161-185.
- SMITH, J.S. & SMITH, O.S. 1992. Fingerprinting crop varieties. Adv. Agron., 47:85-140.
- SOBRAL, B.W.S; RHONDA, J.H. 1993 . Genetics, plants, and the polymerase chain reaction. In: The Polymerase Chain Reaction (ed. Mullis, K.B. & Ferre, F.). p.1-18.
- SOLTIS, D.E.; HAUFLER, C.H.; DARROW, D.C.; GASTONY, G.J. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, and staining schedules. American Fern Journal, 73:9-27.
- SOOST, R.K.; WILLIAMS, T.E. & TORRES, A.M. 1980. Identification of nucellar and zygotic seedlings of Citrus with leaf isozymes. HortScience, Alexandria, 15(6):728-729, 1980.
- SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A. & SHANI, A. 1977. Peroxidase isozymes as a tool for early separation of nucellar and zygotic citrus seedlings. Proc. Int. Soc. Citriculture, 2:619-624.
- SUGGS, S.U. ; HIROCE, T.; MIYAKE, T.; KAWASHIMA, E.H.; JOHNSON, M.J.; ITAKURA, I. & WALLACE, R.B. 1981. Use of synthetic

oligodeoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences. ICN-UCLA Symp. Mol.Cell. Biol., 23:683.

TATUM, J.H. & BERRY, R.E. & HEARN, C.J. 1974. Characterization of Citrus cultivars and separation of nucellar and zygotic citrus seedlings by thin layer chromatograph. Proc. Florida State Hort. Soc., 87:75-81.

TAYLOR, G.R. 1992. Polymerase chain reaction basic principles and automation. In: PCR- A Practical Approach (ed. Mcpherson, M.J.; QUIRKE, P. & TAYLOR, G.R.). IRL Press-Oxford. p1-13.

TORRES, A.M.; SOOST, R.K.; DIEDENHOFEN, U. 1978. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. 1978. Amer. J. Botany, 65(8):869-881.

TORRES, A.M.; SOOST, R.K. & LASTOVICKA, T.M. 1982. Citrus isozymes. J. Heredity, 73:335-339.

TORRES, M.A.; LASTOVICKA, M.; WILLIAMS, T.E. & SOOST, R.K. 1985. Segregation distortion and linkage of citrus and poncirus isozyme genes. J. Heredity, 76:289-294.

TORRES, A.M. & TISSERAT, B. 1980. Leaf Isozymes as genetic markers in date palms. Amer. J. Bot., 67:162-167.

VALLS, J.F.M. 1995. Potencial de utilização de descritores morfológicos, reprodutivos e agronômicos na caracterização de germoplasma. Simpósio Nacional de Recursos Genéticos Vegetais, Campinas. p.11.

VALLEJOS, C.E. 1983. Enzyme activity staining. In: Isozyme in Plant Genetics and Breeding. (eds. Tanksley, S.D, & ORTON, T.J.. Elsevier, New York, p.469-516.

VALOIS, A.C.C. 1995. Conservação "in situ" e "ex situ" de germoplasma vegetal. Simpósio Nacional de Recursos Genéticos Vegetais, Campinas. p.5.

VARDI, A.; BREIMAN, A. & GALUN, E. 1987. Citrus cybrids: production by donor-recipient protoplast-fusion and verification by

- mitochondrial - DNA restriction profiles. Theor. Appl Genet. 75: 51-58.
- TARDI, A. 1988. Application of recent taxonomical approaches and new techniques to citrus breeding. Proc. sixth Intern. Citrus Congress, 303-308.
- TEIGA, R.F.A. & NUCCI, T.A. 1995. O Instituto Agronômico e seus recursos genéticos. Simpósio Nacional de Recursos Genéticos Vegetais, Campinas. p. 69.
- WATSON, J.D.; HOPKINS, N.A.; ROBERTS, J.W.; SUTZ, J.A.; WEINER, A.M. 1989. Molecular Biology of the gene. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc-California. 1163p.
- VAUGH, R. & POWELL, W. 1992. Using RAPD Markers for Crop Improvement. FOCUS (10): 186-191.
- WEEDEN, N.F. & WENDEL, J.F. Genetics of Plant Isozymes. 1989. In: Isozymes & Plant Biology (ed. Soltis & Soltis). Dioscorides Press. p. 46-73.
- WELSH, J. & McCLELLAND, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res., 18:7213-7218.
- WENDEL, J.F & WEEDEN, N.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Isozymes in Plant Biology (ed. Soltis & Soltis). Dioscoride Press- Portland, Oregon.pp 5-45.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, K. & LIVAK, J.; RAFALSKI, TINGEY, S.V.. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res., 18:6531-6535.
- WYMAN, A.R. & WHITE, R. 1980. A highly polymorphic locus in human DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77:6754-6758.