

ISOENZIMAS COMO MARCADORES GENÉTICOS NA IDENTIFICAÇÃO DE NOVE LINHAGENS DE MILHO¹

EDMUNDO HEIDRICH-SOBRINHO²

RESUMO - Nove linhagens de milho são identificadas empregando-se locos predeterminados através de padrões enzimáticos. As isoenzimas, produtos primários de ação gênica, são visualizadas na técnica da eletroforese, com substratos e corantes especiais. Os sistemas utilizados são álcool desidrogenase, catalase, peroxidase, esterase e fosfatase ácida. A presença deste ou daquele alelo em determinado loco corresponde à banda observada, permitindo, desta forma, o conhecimento do genótipo da linhagem. Apenas quatro locos em esterase diferenciaram as nove linhagens.

Termos para indexação: eletroforese, sistemas enzimáticos, ação gênica, padrões enzimáticos, peroxidase.

ISOENZIMAS AS GENETIC MARKERS TO IDENTIFY NINE CORN LINES

ABSTRACT - Nine corn lines are identified through enzymatic patterns and based on loci very well determined. Isoenzymes, primary products of gene action, are observed using electrophoresis technic with special substrates and dye. The systems used are alcohol dehydrogenase, catalase, peroxidase, esterase and acid phosphatase. The presence of the allele in special locus corresponds to the band observed, and by this way the genotype is known. Only four loci in esterase differenced the nine lines.

Index terms: electrophoresis, enzymatic systems, gene action, enzymatic patterns, peroxidase.

INTRODUÇÃO

Entre as técnicas aplicadas ao estudo de proteínas, a da eletroforese tem tido ampla e crescente aplicação em várias áreas da Biologia. Basicamente, consiste na separação de moléculas enzimáticas por sua carga elétrica, tamanho e forma, através da migração em um meio suporte e tampões adequados, sob a influência de um campo elétrico. A eletroforese de zona (Smithies 1955) constitui a técnica mais usada, seguida pela aplicação de métodos histoquímicos de coloração para poder localizar as zonas de atividade enzimática diretamente no meio suporte (Hunter & Markert 1957). Desta forma, as diferentes proteínas de um organismo podem ser separadas de conformidade com suas respectivas migrações, constituindo-se nas isozimas. Estas são praticamente produtos da ação direta dos genes e definidas como diferentes formas moleculares de proteínas, exibindo a mesma especificidade enzimática num organismo (Markert & Moller 1959), termo este substituído por isoenzima pelo "Standing Committee on Enzymes of the International Union of Biochemistry" (Webb 1965).

A mobilidade eletroforética das proteínas possibilita, segundo Hubby & Lewontin (1966), obter informações genéticas mais precisas no que se refere à detecção de diferenças fenotípicas causadas por substituições alélicas de um único loco e a estimativa de proporção de locos que mostram variação na população. Apesar de seus limites, principalmente os concernentes ao erro da técnica, a eletroforese constitui o melhor instrumento para estudos sobre variação genética e diversidade genética entre populações.

Muitos dos recentes trabalhos em isoenzimas foram cuidadosamente revistos por Scandalios (1969b e 1974) e por Shannon (1968). A revisão feita por Scandalios cobre muitos sistemas enzimáticos e a de Shannon é relativamente curta, porém fornece 256 referências relacionadas com o assunto.

Peirce & Brewbaker (1973) mostraram os vários aspectos em que a análise genética de isoenzimas de plantas pode ser aplicada, como, por exemplo, identificação de cultivares e linhagens, marcadores para estudos citogenéticos, genético-bioquímicos e do desenvolvimento, aspectos fisiológicos da heterose e da homeostasia. Referem-se, ainda, ao polimorfismo genético ilustrado pelos trabalhos de MacDonald & Brewbaker (1972a).

Três padrões básicos emergem dos estudos mencionados:

a. **Alelos codominantes.** Bandas rápidas x bandas lentas constituem os polimorfismos genéticos mais

¹ Aceito para publicação em 30 de novembro de 1981.

² Dr. Professor Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS), Bolsista do CNPq. CEP 90000 - Porto Alegre, RS.

conhecidos, cerca de 70%, envolvendo bandas com diferentes mobilidades eletroforéticas que são os produtos de alelos de um loco (MacDonald & Brewbaker 1972a, Scandalios 1969b). Isoenzimas alélicas normalmente têm as mesmas especificidades de tecido e substrato (MacDonald & Brewbaker 1972b), mas poderão mostrar diferenças bioquímicas relacionadas com a alteração nas estruturas primárias, secundárias e terciárias; a codominância, a expressão simultânea de ambos os alelos, é característica de tal loco (Beckman et al. 1964b), e os híbridos são distinguíveis pela presença das bandas paternas. O alelismo múltiplo é comum, 40% dos locos estudados em milho mostram alelos múltiplos (MacDonald & Brewbaker 1972a) e muitos locos são inadequadamente investigados. Poucos alelos produzem mais do que uma banda (MacDonald & Brewbaker 1972a).

b. Bandas híbridas. A variedade rápida x lenta caracteriza algumas - senão a maioria - das enzimas que são funcionais como dímeros ou polímeros mais expressivos (31% dos locos em milho). Os híbridos poderão ser distinguidos dos seus pais pela presença de bandas intermediárias à posição das bandas paternas rápida e lenta. Bandas híbridas ocorrem para proteínas diméricas (Schwartz & Laughner 1969), enquanto três ou mais bandas híbridas ocorrem para polímeros, como catalase em milho (Scandalios 1969a, Beckman et al. 1964a).

c. Alelos nulos. A ausência de uma banda é geralmente controlada monogeneticamente, com heterozigotos mostrando presença de banda, com aparente dominância. A ausência de uma enzima poderia também refletir uma concentração muito baixa para ser reconhecida nos géis. Caso existe em que a ausência de banda pode ser devida à produção de proteínas sem atividade enzimática. Alelos nulos têm sido indicados em cinco dos vinte e dois locos, mostrando polimorfismo no milho (MacDonald & Brewbaker 1972a). Variantes nulas (presença x ausência) têm sido somente observadas em sete regiões adicionais. Loco repressor, independente do loco estrutural da enzima, tem sido admitido para duas regiões (MacDonald & Brewbaker 1972a). Não é raro alelos simples estarem associados com mais do que uma banda nos géis (nove dos trinta e três locos no milho). Duas ou mais bandas de igual intensidade de coloração são produzidas por alelos de dois locos em milho. Uma série de bandas de atividade decrescente, usualmente separadas e muito influenciadas pela idade do tecido e outros fatores do meio, são características de sete outros locos (MacDonald & Brewbaker 1972b) denominadas por Kaplan (1968), de conformacionais.

De um modo geral, o controle genético do polimorfismo enzimático parece ser largamente monogênico. Os híbridos são seguidamente distinguíveis de seus pais e a dominância é geralmente ausente. Bandas múltiplas, numa região, poderão estar baseadas na ação de um alelo simples. Interpretações de géis, sem dados genéticos, poderão ser enganosas. Diferenças genéticas identificáveis nos zimogramas poderão servir como marcadores moleculares e como valioso auxiliar na identificação de cultivares (Fedak 1974). Espera-se que o citado método também venha a ser utilizado pelos serviços de Introdução de Plantas dos diversos países.

No presente trabalho procura-se diferenciar nove linhagens de milho através de oito locos em cinco sistemas enzimáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

O material experimental é representado por nove linhagens de diferentes origens e selecionados pelo autor (Tabela 1), com mais de 15 anos de autofecundações (Heidrich-Sobrinho & Cordeiro 1975).

Os métodos usados para o preparo do extrato ou homogenizado dos vários tecidos para uso no preparo das amostras para eletroforese, foram idênticos, na maioria dos casos, exceto do endosperma. Extratos de coleóptilo com plúmula e raízes foram obtidos de plântulas de grãos germinados aos 5-7 dias, à luz. Homogeneizados de coleóptilos com plúmula foram preparados de tecidos, depois de macerados, utilizando-se uma ponta de homogeneizador elétrico, adaptado em broca de dentista. As raízes sofreram o mesmo processo. Como apresentassem tecidos mais secos, pequena quantidade de tampão do gel foi acrescentada. As amostras de endosperma foram preparadas de espigas de milho coletadas dos 15 a 20 dias após a fertilização e utilizadas diretamente. Todos os tecidos mencionados foram armazenados em câmaras de congelamento para emprego na medida da necessidade.

Na eletroforese, como suporte, empregaram-se géis preparados de amido para álcool desidrogenase e catalase. E poli(acrilamida, para fosfatase ácida e peroxidase. Para esterase, quando o interesse do estudo estava voltado para as zonas correspondentes aos locos E₁ e E₃, empregou-se gel de amido.

No preparo dos géis e nos eletródios, usaram-se tampões indicados por Brewbaker et al. (1968). Utilizaram-se - e utilizam-se ainda - géis com 13,5% de amido, obtido na firma Connaugh Medical Research Labs., Toronto, Canadá, usando-se 40 g de amido hidrolisado em 300 ml de tampão com pH final de 8,5. O gel de poli(acrilamida é preparado dissolvendo-se 7 g de "Cyanogum-41" (E-C Apparatus Corporation, St. Petersburg, Flórida, Estados Unidos da América do Norte) em 100 ml de tampão com pH final de 8,5. Para catalisar a reação, 0,2 ml de N, N, N', N' - Tetrametiletieno-diamina (TEMED) e 1 ml de persulfato de amônio a 10% são rapidamente acrescentados à solução de "Cyanogum-41"

TABELA 1. Identificação das nove linhagens escolhidas para os estudos de padrões enzimáticos.

Linhagem	Cor e tipo do grão	Ciclo ^a	Altura	Origem
Tuxpan 94.6224	amarelo-dentado	84	alta	mexicana
Tuxpan 1020.17	amarelo-dentado	85	alta	mexicana
SLP 1026.5745	amarelo-dentado	90	alta	mexicana
T 61.984-1	amarelo-dentado	82	baixa	EUA
NC 83.7628	amarelo-dentado	81	média	EUA
FB 4.5941	amarelo-dentado	84	média	RS
Salbert 5392	amarelo-dentado	84	alta	RS
SR 201.5232	amarelo semidentado	78	média	RS
SR 527.5260	amarelo-duro	85	baixa	RS

Obs.: ^a dias de plantio à floração (pendão)

A canaleta, na qual a solução é colocada, cobre-se por uma placa siliconizada de vidro plano, que evita o contato do líquido com o O₂ do ar, permitindo a polimerização em 20 minutos aproximadamente. Em seguida, o gel é levado para uma câmara fria de 4°C, por duas horas.

Na utilização dos géis, tanto de amido como de poli-acrilamida, retiram-se as placas de vidro, deslizando-se levemente e levantando-se suavemente. Cortam-se os orifícios onde serão colocados os papéis Whatman 3 mm ou N° 1, embebidos com os homogêneos que se quer estudar, com o auxílio de um pente de aço inoxidável com 20 dentes de 4 mm de largura. Inseridos os retângulos de papel com as amostras no gel, este é colocado em cubas eletroforéticas e num ambiente a 4°C, câmara fria ou balcão refrigerado (Heidrich-Sobrinho & Cordeiro 1975). A diferença de potencial é mantida ao redor de 10 volts/cm, e faz-se migrar até que a frente atinga 9 cm do ponto de aplicação.

Para a coloração da álcool desidrogenase, o gel de amido é incubado a 37°C por aproximadamente 30 minutos mergulhado numa solução indicada por Scandalios (1969b). Concluído o trabalho, o gel é lavado com água destilada e fixado numa solução de etanol: água destilada:ácido acético glacial, na proporção de 5:5:1.

No estudo da catalase, o gel de amido é imerso numa solução de 0,5% de H₂O₂ por, aproximadamente, 30 minutos. A seguir, é lavado com água corrente destilada. Após, o gel é inundado com uma solução de iodeto de potássio a 1,5%, acidificado com ácido glacial (12 gotas em 30 ml) (Scandalios 1969b).

A peroxidase foi estudada em géis de poli-acrilamida imersos na solução indicada por Brewbaker et al. (1968). A fim de estabilizar as reações, colocar um pequeno cristal de denitro-prussianato de sódio. Após, lavar com água destilada, e fixar.

Para o estudo da esterase, os géis de poli-acrilamida ou de amido são incubados por 45 minutos a 37°C, imersos na solução indicada por Scandalios (1969b). Após, lavado e fixado.

Fosfatase ácida foi detectada, imergindo o gel de poli-acrilamida na solução indicada por Brewbaker et al. (1968). A incubação dá-se em temperatura ambiente normal. Após, o gel é lavado e fixado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os padrões enzimáticos detectados são aqui relatados por sistema.

No álcool desidrogenase, duas zonas foram observadas no endosperma em formação, em gel de amido e pH 8,5. Ante o fato de a zona mais catódica corar-se intensamente, como provável consequência de maior concentração, em virtude de uma maior atividade enzimática, ela merece maior atenção. Trata-se de loco Adh₂ estudado por Schwartz & Endo (1966).

Duas bandas foram visíveis nos géis: uma, mais catódica, que recebeu a designação de rápida (R); e outra, de menor mobilidade eletroforética, lenta (L). As linhagens homozigotas apresentaram-se em dois grupos: a) NC 83,7628, com a banda lenta; e b) as demais, com a banda rápida.

Para o estudo da catalase, optou-se pela utilização do endosperma em formação de 15 a 20 dias da fertilização, gel de amido a pH 2,3. Duas variantes eletroforeticamente distintas foram encontradas nas diferentes linhagens e apresentaram ou a banda rápida R, de maior mobilidade eletroforética, ou a banda lenta L, de menor mobilidade, assim distribuídas e pertencentes ao loco Cat₁ (Scandalios 1965):

Linhagem	Alelo
Tuxpan 94.6224	R
Tuxpan 1020.17	L
Salbert 5392	L
SR 201.5232	L
SR 527.5260	R
FB 4.5941	L
T 61.984-1	R
NC 83.7628	L
SLP 1026.5745	R

Apenas um loco em peroxidase foi estudado, observado, porém não estudado geneticamente por Brewbaker & Johnson (1972). Como suporte, utilizaram-se gel de poli-acrilamida, tampões de pH 8,3; e como tecidos, raízes primárias. A mobilidade foi determinada a partir do ponto de aplicação. O seu estudo genético foi feito por Heidrich-Sobrinho (1975), e denominado Px₁₁.

As linhagens mostraram variações para os dois alelos do loco correspondente, com a seguinte distribuição:

Linhagem	Mobilidade em cm	Alelo
Tuxpan 94.6224	1,0	L
Tuxpan 1020.17	1,0	L
Salbert 5392	1,3	R
SR 201.5232	1,3	R
SR 527.5260	1,3	R
FB 4.5941	1,0	L
T 61.984-1	1,0	L
NC 83.7628	1,0	L
SLP 1026.5745	1,0	L

As esterases - por pertencerem a um grupo complexo e heterogêneo de enzimas, que demonstram baixa especificidade de substrato, pois hidrolisam "in vitro" um grande número de ésteres, embora em taxas diferentes - mostram-se muito interessantes para estudo.

Os cálculos das mobilidades relativas (Mr) foram feitos tomando-se, como referência, a banda correspondente ao loco E₈, que se encontra em todos os tecidos, raízes primárias, coleóptilos, plúmulas e endosperma em formação, e que cora intensamente na linhagem T 61.984-1.

Em gel de amido, a pH 8,2, um grupo de esterase correspondente ao loco E₁ migra para o cátodo (Schwartz 1960). Estudos de polimorfismo realizados por Schwartz (1960) indicaram a presença dos alelos E₁^a, E₁^b e E₁^c e bandas híbridas na E₁.

No presente trabalho, duas bandas foram observadas, lenta e rápida, em cada uma das nove linhagens homozigotas:

Linhagem	Mr	alelo
Tuxpan 94.6224	- 0,20	R
Tuxpan 1020.17	- 0,20	R
Salbert 5392	- 0,20	R
SR 201.5232	- 0,10	L
SR 527.5260	- 0,20	R
FB 4.5942	- 0,10	L
T 61.984-1	- 0,20	R
NC 83.7628	- 0,10	L
SLP 1026.5745	- 0,20	R

O loco E₃, ativo também no endosperma, foi definido por Schwartz (1964) como controlando bandas que se dirigem para o cátodo muito próximo do ponto de aplicação em pH 7,5 em gel de amido, com dois alelos codominantes, produzindo, no heterozigoto, banda híbrida. A superposição das bandas dos locos E₁ e E₃ torna necessário o estudo do gene E₃, em linhagens com alelos para o tipo rápido para o loco E₁.

As nove linhagens de milho mostraram variações para as bandas pertencentes ao loco E₃, assim distribuídas:

Linhagem	Mr	alelo
Tuxpan 94.6224	- 0,02	L
Tuxpan 1020.17	- 0,02	L
Salbert 5392	- 0,10	R
SR 201.5232	- 0,10	R
SR 527.5260	- 0,10	R

FB 4.5941	- 0,10	R
T 61.984-1	- 0,10	L
NC 83.7628	- 0,02	L
SLP 1026.5745	- 0,02	L

Nas nove linhagens em estudo referente ao loco E₄, foram encontrados quatro alelos. Na designação dos mesmos, conservou-se aquela indicada por Harris (1966), de C, D, E e F, de menor para maior mobilidade eletroforética que foi determinada, tomando-se por base a banda inferior de coloração mais intensa e em relação à banda padrão do loco E₈.

As linhagens ficam assim distribuídas em relação ao loco E₃:

Linhagem	Mr	alelo
Tuxpan 94.6224, Tuxpan 1020.17, SLP 1026.5745 e NC 83.7628	0,41	C
SR 527.5260 e SR 201.5232	0,46	D
Salbert 5392 e FB 4.5941	0,51	E
T 61.984-1	0,56	F

No loco E₁₁, estudado por Heidrich-Sobrinho (1975), foi caracterizada a ação gênica dos dois alelos encontrados nas nove linhagens de milho, agindo em codominância. Pela ausência de bandas híbridas, sugere-se que a estrutura das proteínas seja monomérica.

A variação observada entre as linhagens ficou assim distribuída:

Linhagem	Mr	alelo
Tuxpan 94.6224	0,54	R
Tuxpan 1020.17	0,54	R
Salbert 5392	0,54	R
SR 201.5232	0,54	R
SR 527.5260	0,54	R
FB 4.5941	0,54	R
T 61.984-1	0,54	R
NC 83.7628	0,46	L
SLP 1026.5745	0,46	L

Na fosfatase ácida dos cinco sistemas enzimáticos estudados, este foi o que apresentou maior dificuldade para a definição e estudo das bandas que se apresentavam como pequenos borrões. Em gel de poliácridamida, com tampões 8,3 e utilizando-se raiz primária, as linhagens mostraram variações, assim distribuídas:

Linhagem	Mobilidade em cm do ponto de aplicação	Alelo
Tuxpan	2,0	L
Tuxpan	2,0	L
Salbert 5392	2,0	L
SR 201.5232	3,0	R
SR 527.5260	2,0	L
FB 4.5941	3,0	R
T 61.984-1	3,0	R
NC 83.7628	2,0	L
SLP 1026.5745	2,0	L

Uma das grandes vantagens dos marcadores enzimáticos para caracterizar linhagens e cultivares é a sua independência em relação ao ambiente. Neste sentido, as enzimas, como produtos primários dos genes, são

TABELA 2. Distribuição das bandas correspondentes aos diferentes locos das nove linhagens de milho em cinco sistemas enzimáticos.

Linhagem	Esterase				Catalase	Peroxidase	Fosfatase ácida	Álcool desidrogenase
	E ₁ ^a	E ₃ ^a	E ₄ ^b	E ₁₁ ^a	Cat ₁ ^c	PX ₁₁ ^a	Ap ₁ ^a	Adh ₂ ^c
Tuxpan 94.6224	R	L	C	R	R	L	L	R
Tuxpan 1020.17	R	L	C	R	L	L	L	R
SLP 1026.5745	R	L	C	L	R	L	L	R
T 61.984-1	R	L	F	R	R	L	R	R
NC 83.7628	L	L	C	L	L	L	L	L
FB 4.5941	L	R	E	R	L	L	R	R
Salbert 5392	R	R	E	R	L	R	L	R
SR 201.5232	L	R	D	R	L	R	R	R
SR 527.5260	R	R	D	R	R	R	L	R

Obs.: tecidos ^a plúmula com coleóptilo

^b raiz

^c endosperma em formação

Velocidade de migração R rápida

L lenta

equivalentes aos grupos sanguíneos humanos. Outro aspecto muito interessante é que a dificuldade de caracterização, pela aparência externa do indivíduo, decorre do fato de que cultivares e linhagens de espécies como o milho, arroz, feijão e outras, foram obtidas e selecionadas de ancestrais comuns, apresentando muita semelhança.

Na Tabela 2, observa-se a distribuição das bandas correspondentes aos diferentes locos das nove linhagens de milho em cinco sistemas enzimáticos. Analisando-a, pode-se observar que apenas quatro locos em esterase são suficientes para distinguir as nove linhagens de milho, justificando plenamente a utilização deste método de trabalho. Para um maior número de linhagens, maior número de locos e outros sistemas enzimáticos poderão ser empregados.

REFERÊNCIAS

- BECKMAN, L.; SCANDALIOS, J.G. & BREWBAKER, J.L. Catalase hybrid enzymes in maize. *Science*, **146**:1174-5, 1964a.
- BECKMAN, L.; SCANDALIOS, J.G. & BREWBAKER, J.L. Genetics of Leucine-Aminopeptidase isozymes in maize. *Genetics*, **50**:899-904, 1964b.
- BREWBAKER, J.L. & JOHNSON, E.H. The maize peroxidase, designation of seven loci governing peroxidase polymorphism in Maize. *Maize Genetics Coop. Newsletter*, **46**:29-33, 1972.
- BREWBAKER, J.L.; UPADHYA, M.D.; MAKINEN, J. & MACDONALD, T. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. II. Gel electrophoretic methods and applications. *Physiol. Plant.*, **21**: 930-40, 1968.
- FEDAK, G. Allozymes as aid to Canadian barley cultivar identification. *Euphytica*, **23**:166-73, 1974.
- HARRIS, J.W. The E₄ esterase. *Maize Genetics Coop. Newsletter* **40**:53-6, 1966.
- HEIDRICH-SOBRINHO, E. *Diversidade enzimática em Zea mays L. e sua correlação com a heterose*. Porto Alegre, UFRGS, 1975. Tese Doutorado.
- HEIDRICH-SOBRINHO, E. & CORDEIRO, A.R. Codominant isoenzymic alleles as markers of genetic diversity correlated with heterosis in maize (*Zea mays*). *Theor. & App. Genetics*, **46**: 197-9, 1975.
- HUBBY, J.L. & LEWONTIN, R.C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, **54**:577-94, 1966.
- HUNTER, R.L. & MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, **125**: 1294-5, 1957.
- KAPLAN, N.O. Molecular forms of enzymes in multiple molecular forms of enzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **151**:352-99, 1968.
- MACDONALD, T.; BREWBAKER, J.L. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. VIII. Genetics control and dimeric nature of two transaminase isoenzymes in maize. *J. Hered.*, **63**:11-4, 1972a.

- MACDONALD, T. & BREWBAKER, J.L. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. V. The isoesterases of maize: tissue and substrate specificities and responses to chemical inhibitors. Hawaii, s.ed., 1972b. (Agr. Expt. Sta. Tech. Bul. 89).
- MARKERT, C.L. & MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 45:753-63, 1959.
- PEIRCE, L.C. & BREWBAKER, J.L. Applications of isozyme analysis in Horticultural Science. *Hort. Sci.*, 8(1):17-22, 1973.
- SCANDALIOS, J.G. Alcohol dehydrogenase in maize: Genetic basis for isozymes. *Science*, 166: 623-4, 1969a.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple forms of enzymes in plants: A review. *Biochem. Genetics* 3:37-9, 1969b.
- SCANDALIOS, J.G. Genetics isozyme variations in *Zea mays*. Honolulu, Hawaii, University of Hawaii. 1965. Tese Doutorado.
- SCANDALIOS, J.G. Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 225-58, 1974.
- SCHWARTZ, D. Genetic studies on mutant enzymes in maize. Synthesis of hybrid enzymes by heterozygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 46: 1210-5, 1960.
- SCHWARTZ, D. Second hybrid enzyme in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 51:602-5, 1964.
- SCHWARTZ, D. & ENDO, T. Alcohol dehydrogenase polymorphism in maize-simple and compound loci. *Genetics*, 53:709, 1966.
- SCHWARTZ, D. & LAUGHNER, W.J. A molecular basis for heterosis. *Science*, 166:626-7, 1969.
- SHANNON, L.M. Plant isoenzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 19:187-210, 1968.
- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: Group variation in the serum proteins in normal human adults. *Biochem. J.*, 61:629-41, 1955.
- WEBB, E.B. The nomenclature of multiple enzyme forms. *Enzymol. Biol. Clin.*, 5:124-5, 1965.