

# Intérêt des marqueurs enzymatiques pour l'étude des agrumes.

## II- Application à l'étude génétique du genre *Poncirus*.

F. NORMAND\*

VALUE OF ENZYME MARKERS FOR CITRUS STUDY.  
II.- APPLICATION TO GENETIC STUDY OF THE *PONCIRUS*  
GENUS.

F. NORMAND.

*Fruits*, Nov. 1988, vol. 43, n° 11, p. 651-655.

**ABSTRACT** - Zygotic plantlets from sowings of eight *Poncirus* clones have been identified by electrophoresis analysis of eight enzyme systems. The percentage varies from 10 % to 40 % ; with a mean of 29 %. These plantlets are the result of selfing or intragenetic crossing. Study of 59 *Poncirus* in a collection has shown that this genus has low enzyme diversity.

Isozyme study has resulted in identifying a group of three individuals that had already been spotted due to the small size of their flowers.

INTERET DES MARQUEURS ENZYMATIQUES POUR L'ETUDE  
DES AGRUMES.

II.- APPLICATION A L'ETUDE GENETIQUE DU GENRE  
*PONCIRUS*.

F. NORMAND.

*Fruits*, Nov. 1988, vol. 43, n° 11, p. 651-655.

**RESUME** - L'électrophorèse de huit systèmes enzymatiques a permis l'identification de plantules zygotiques dans des semis de huit clones de *Poncirus*. Leur pourcentage varie de 10 à 40 p. 100, avec une moyenne de 29 p. 100. Ces plantules zygotiques sont issues soit d'autofécondation, soit de croisements intragénériques. L'étude de 59 *Poncirus* placés en collection montre que la diversité enzymatique dans ce genre est faible. Un groupe de trois individus, déjà repérés par la petite taille de leurs fleurs, a été mis en évidence par l'étude isozymique.

### INTRODUCTION

Le greffage est quasiment obligatoire pour les cultures d'agrumes à cause notamment de leur sensibilité à la gommose à *Phytophthora*. Les *Poncirus* ont l'intérêt d'être de bons porte-greffe dans certaines régions. Ils sont aussi largement utilisés dans des croisements intergénériques destinés à créer des porte-greffe hybrides performants.

Leur principale particularité, commune avec plusieurs espèces du genre *Citrus*, est de présenter des graines polyembryonnées. Ceci est dû au développement d'embryons somatiques issus de bourgeonnements nucellaires (FROST et SOOST, 1968). Une graine peut alors donner naissance à plusieurs plantules, dont une, en général, provient d'une fécondation (plantule zygotique), alors que la ou les autres possèdent le même génotype que la plante mère.

La polyembryonie est un inconvénient majeur dans les programmes d'amélioration et de multiplication du fait de l'existence de deux types d'embryons. En effet, les sélectionneurs cherchent à écarter les plantules nucellaires et

à garder les plantules zygotiques, donc hybrides, alors que les pépiniéristes recherchent l'inverse. Un tri précoce peut être fait visuellement à partir de caractères morphologiques (port de la plante, forme et taille des feuilles et des épines), mais il est très délicat, même pour un oeil d'expert, et des plantules non recherchées passent à travers.

Les problèmes de taxonomie chez les agrumes sont bien connus, et à l'opposé du genre *Citrus* qui présente plusieurs espèces, le genre *Poncirus* ne comporte qu'une seule espèce : *Poncirus trifoliata* L. RAFF. Plusieurs types se distinguent au sein de ce taxon par certains caractères morphologiques (JACQUEMOND, 1984).

L'objet de cette étude est l'identification de plantules zygotiques dans des semis de huit clones de *Poncirus* et l'analyse de la diversité génétique du genre *Poncirus* grâce à l'électrophorèse enzymatique.

### MATERIEL ET METHODE

L'identification de plantules zygotiques a été faite à partir de plants âgés d'un an et demi appartenant à huit clones de *Poncirus trifoliata* L. RAFF. introduits à la Station de Recherches agronomiques (SRA) de San Giuliano

\* - Station IRFA/CIRAD de Bassin-Martin - B.P. 180  
97455 SAINT PIERRE CEDEX (La Réunion)

en Corse sous forme de graines dans le but de les tester comme porte-greffe. Ce sont les clones Rich 7-5, Rich 12-2, Rich 16-6, Dwarf English, Christiansem, USDA, Yamagushi, et Jacobsen. Dix individus par clone ont été choisis au hasard et numérotés arbitrairement. De jeunes feuilles en bon état ont été prélevées dans la partie terminale des rameaux. Elles ont été lavées à l'eau distillée, lyophilisées, puis conservées à -18°C, jusqu'à utilisation.

L'analyse de la diversité enzymatique du genre *Poncirus* est basée sur l'étude de 59 individus provenant d'origines diverses. Ils font partie de la collection de la SRA de San Giuliano en Corse. Ils sont supposés être sains, des maladies virales pouvant modifier les zymogrammes observés (MEISTER *et al.*, 1971 ; PAILLY, 1986). Leur nom, origine et numéro d'identification sont donnés dans l'annexe 1. Chaque individu sera dorénavant nommé par son numéro. Les troisième et quatrième feuilles de la pousse de printemps ont été prélevées au mois de mai, tout autour de l'arbre, à une hauteur de 1,50 m environ. Ces feuilles ont été lavées à l'eau distillée, lyophilisées, puis conservées à -18°C jusqu'à utilisation.

Huit systèmes enzymatiques ont été étudiés : les endopeptidases (ENDO), les phosphatases acides (PAC), les amylases (AMY), les isocitrate déshydrogénases (IDH), les malate déshydrogénases (MDH), les phosphoglucose isomérases (PGI), les glutamate oxaloacétate transaminases (GOT), les peroxydases cathodiques (PEROX).

Les techniques de migration et de révélation, ainsi que le déterminisme génétique des différents systèmes enzymatiques ont déjà été présentés (NORMAND, 1988).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Identification de plantules zygotiques dans des semis de clones de *Poncirus*.

L'absence d'échantillons de feuilles des parents femelles ne nous permet pas de repérer directement les individus supposés nucellaires qui présentent, pour chaque clone, le même génotype que la plante mère. Notre hypothèse est que pour chaque clone, le plus grand groupe d'individus possédant le même génotype pour les locus analysés est l'ensemble des individus supposés nucellaires, les autres étant tous différents entre eux.

La contribution des différents systèmes enzymatiques à l'identification de plantules zygotiques est donnée dans le tableau 1.

Au total, 23 plantules zygotiques ont été identifiées parmi les 80 individus pris au hasard initialement. Les proportions de plantules zygotiques par clone varient de 10 p. 100 pour les clones Christiansem et Yamagushi à 40 p. 100 pour les clones Dwarf English et Rich 16-6, avec une moyenne de 29 p. 100.

Les systèmes enzymatiques sont plus ou moins discriminants pour l'identification des plantules zygotiques. Les conditions de pollinisation et l'environnement des arbres d'origine ne sont pas connus, mais il est très probable qu'il s'agisse soit d'autopollinisation, soit de pollinisation par un autre *Poncirus*. En effet, aucun allèle autre que ceux présents dans le genre *Poncirus* n'a été observé chez les plantules zygotiques aux locus présentant une différence allélique entre les genres *Citrus* et *Poncirus* (NORMAND, 1988). Ainsi, seuls les locus à l'état hétérozygote dans la plante mère permettent l'identification de plantules zygotiques dans les cas de croisements entre *Poncirus* grâce aux recombinaisons alléliques.

TORRES *et al.* (1982) ont montré que dans le cas où il n'y a pas de locus avec des allèles différents chez les parents, le pourcentage P de plantules zygotiques repérables dans un croisement est fonction du nombre n de locus hétérozygotes indépendants étudiés suivant la formule :

$$P = [1 - (0.5)^n] \times 100$$

TORRES *et al.* (1985) ont montré que les locus MDH-A et GOT-A sont étroitement liés, donc un seul des deux peut être utilisé pour le calcul de P. Sous l'hypothèse de leur indépendance, les quatre locus hétérozygotes chez les *Poncirus* MDH-A, PGI-A, GOT-B et PEROX-B permettraient de repérer 94 p. 100 des individus zygotiques dans des croisements intragénériques. Le locus AMY n'est pas pris en compte car il n'est à l'état hétérozygote que chez certains *Poncirus*. L'étude de six locus hétérozygotes indépendants augmenterait la probabilité P à 98,5 p. 100, mais au-delà, un autre locus n'apporterait guère plus d'information. La vérification de l'hypothèse d'indépendance est nécessaire afin de ne pas surestimer P.

TABLEAU 1 - Nombre de plantules zygotiques identifiées par les différents systèmes enzymatiques dans des semis de huit clones de *Poncirus*.

	ENDO	PAC	IDH	PGI	AMY	GOT	MDH	PEROX	Total
P.t. Dwarf English	0	0	0	1	1	2	1	2	4
P.t. Rich 7-5	0	0	0	3	2	2	3	4	3
P.t. Rich 12-2	0	0	0	1	1	1	1	2	3
P.t. Rich 16-6	0	0	0	3	2	2	2	4	4
P.t. Christiansem	0	0	0	0	0	0	1	0	1
P.t. Jacobsen	0	0	0	3	1	2	2	1	3
P.t. Yamagushi	0	0	0	0	0	1	1	0	1
P.t. USDA	0	0	0	2	2	1	2	2	3
Total	0	0	0	13	9	11	13	15	23
Pourcentage	0	0	0	56,5	39,1	47,8	56,5	65,2	100

Si les parents possèdent des allèles différents pour au moins un locus, toutes les plantules zygotiques du croisement sont identifiées grâce à ce locus. C'est le cas pour des croisements intergénériques ou certains croisements interspécifiques dans le genre *Citrus*. Sinon, l'étude de plusieurs locus hétérozygotes est nécessaire.

Dans les cas où l'on ne peut pas repérer tous les individus zygotiques, ceux qui n'ont pas été reconnus comme tels ne doivent pas être considérés comme nucellaires car tous ne le sont pas et d'importantes différences morphologiques sont parfois visibles entre eux (photo 1).

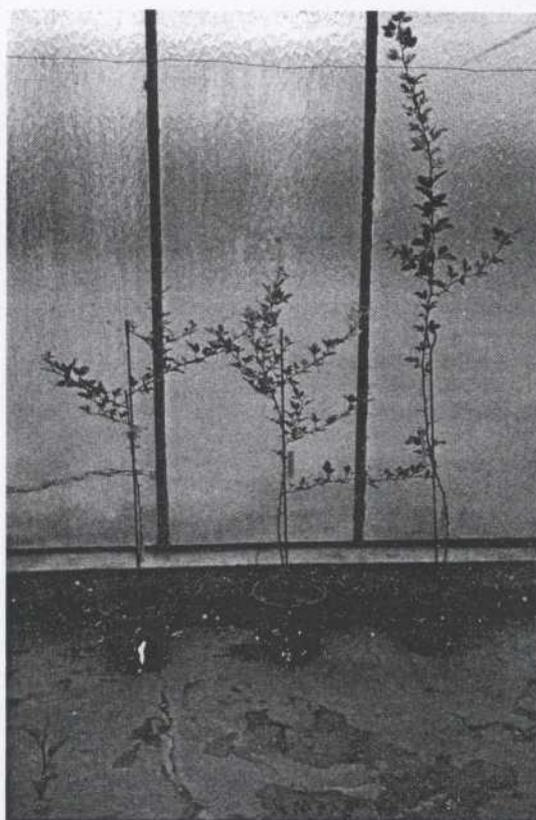


Photo 1 - Différences morphologiques présentées par des *Poncirus* issus de graines provenant du même parent femelle et non reconnus zygotiques.

KHAN et ROOSE (1988) ont étudié le pourcentage de zygotiques dans des semis de trois clones de *Poncirus* et ses variations en fonction du lieu et de l'année de prélèvement. Ce pourcentage varie de 0 à 76 p. 100, avec une moyenne de 18 p. 100, et il est influencé par l'année, et dans une moindre mesure par la saison de récolte des

graines, et par l'environnement de l'arbre.

PAILLY (1986) a effectué une identification de plantules zygotiques dans des semis de graines de 8 *Poncirus*. Le pourcentage de plantules zygotiques est très élevé et varie de 47 à 100 p. 100, avec une moyenne de 65 p. 100. Les ENDO et les IDH ont permis de repérer quelques plantules zygotiques qui sont sans doute issues de croisements intergénériques car ces deux systèmes enzymatiques sont codés chacun par un locus fixé pour des allèles différents chez les *Poncirus* et chez les *Citrus* (NORMAND, 1988).

#### Evaluation des distances génétiques entre différents types de *Poncirus*.

Les zymogrammes obtenus permettent de rassembler les 59 *Poncirus* en cinq classes de génotype identique pour les systèmes enzymatiques étudiés :

- classe 1 : R14
- classe 2 : R15 et BB1
- classe 3 : T14 et Z26
- classe 4 : Z9, Z13 et Z21
- classe 5 : 51 *Poncirus* ayant le même génotype aux locus étudiés.

Les distances de GREGORIUS (1984) ont été calculées entre ces différentes classes (tableau 2) et présentées sous la forme d'un dendrogramme (figure 1) qui fait ressortir trois groupes distincts :

- l'ensemble des 51 *Poncirus* qui présentent le même génotype aux locus étudiés, le T14 et le Z26. Tous sont francs de pied, sauf le T14 qui est greffé sur bigaradier. Parmi les arbres étudiés, le Z24 est supposé être tétraploïde (JACQUEMOND, 1984). Or sur les zymogrammes, il apparaît comme les diploïdes, ce qui fait penser que sa tétraploïdie aurait été acquise par doublement du génome et qu'il serait de nature autotétraploïde.

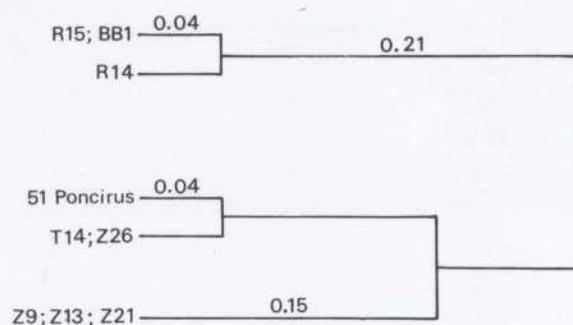


FIG. 1 - Dendrogramme sur distances de GREGORIUS. Agrégation sur les distances aux centres de gravité.

TABLEAU 2 - Matrice des distances de GREGORIUS entre les classes de *Poncirus* présentant le même génotype.

	1	2	3	4	5
1	0.00				
2	0.04	0.00			
3	0.17	0.21	0.00		
4	0.33	0.29	0.17	0.00	
5	0.21	0.17	0.04	0.13	0.00

- les trois *Poncirus* Z9, Z13 et Z21 forment un groupe relativement éloigné du précédent dont il se différencie génétiquement grâce aux locus AMY et GOT-B. Ils portent des noms différents et ont des origines différentes. JACQUEMOND (1984) a établi une classification de la plupart des *Poncirus* de la collection SRA de San Giuliano à partir de caractères morphologiques (diamètre moyen d'une fleur, poids moyen d'une feuille, poids moyen d'un fruit). Les trois individus Z9, Z13 et Z21 sont classés avec les *Poncirus* possédant des petites ou très petites fleurs. Il aurait été intéressant d'étudier d'autres *Poncirus* classés ainsi afin de voir s'ils présentent les mêmes zymogrammes que les trois individus précédents.

- les trois individus BB1, R14 et R15 sont éloignés des deux autres groupes. Ils n'ont aucun caractère particulier en commun. Ils présentent des recombinaisons sur le locus MDH-B, et aucun allèle spécifique du genre *Citrus* n'a été repéré chez ces individus. Il semble donc que ce soient initialement des plants zygotiques, issus d'autofécondation ou de croisement intragénérique, qui aient été placés en collection.

L'étude de 59 *Poncirus* de la collection de la SRA de Corse montre que la diversité enzymatique est faible dans ce genre alors que la diversité morphologique est élevée (JACQUEMOND, 1984). D'autre part, les mêmes locus se retrouvent à l'état hétérozygote pour les mêmes allèles, sauf pour les trois arbres BB1, R14 et R15. Ce résultat ne peut s'expliquer que si l'ensemble des *Poncirus* présentant le même génotype descend d'un même ancêtre par voie asexuée grâce à la polyembryonie. Les différences morphologiques au sein d'un groupe seraient dues à des mutations somatiques.

D'après ce qui précède, les graines de *Poncirus* donnent en moyenne 30 p. 100 de plantules zygotiques. Il est donc étonnant que l'on n'en trouve que trois sur les 59 individus analysés. Ceux-ci sont des individus de collection, choisis et conservés pour leurs qualités agronomiques. ROOSE et PRECHTL (1988) ont montré que les plants zygotiques de *Poncirus* sont moins performants comme porte-greffe que les plants nucellaires. Une contre-sélection a été effectuée, tendant à éliminer les plants zygotiques pour ne garder que les autres.

Les 56 *Poncirus* reconnus non zygotiques forment deux groupes, repérables au niveau enzymatique par les zymogrammes des locus AMY et GOT-B, et au niveau morphologique par la taille des fleurs. Chaque groupe pourrait descendre d'un ancêtre par voie asexuée.

La structure des populations naturelles de *Poncirus* est très certainement différente de celle trouvée dans la collection. En effet, les plantules zygotiques ne sont pas systématiquement éliminées et doivent former un ensemble d'individus présentant une importante variabilité génétique. Le pourcentage de plantules zygotiques étant en général inférieur à 50 p. 100. Il y a plus de descendants identiques à l'ancêtre initial que de recombinaisons.

PAILLY (1986) avait déjà étudié la diversité enzymati-

que de huit *Poncirus* de la collection de la SRA qui ont été repris dans notre analyse. Cette étude avait été faite sans tenir compte du déterminisme génétique des systèmes enzymatiques et une certaine variabilité avait été observée. Bien que les calculs de distances génétiques aient été faits différemment, les individus Z13 et Z21 avaient déjà été rassemblés dans un groupe à part.

## CONCLUSION

L'électrophorèse enzymatique semble être un outil bien adapté à l'étude de la diversité génétique au sein d'un genre ou d'une espèce, et au délicat problème de la reconnaissance des plantules zygotiques et nucellaires dans des croisements.

Le genre *Poncirus* apparaît bien homogène génétiquement pour les locus analysés. Un groupe de trois individus, caractérisés par des petites fleurs (JACQUEMOND, 1984), a été repéré par les données isozymiques.

Dans le cas de croisements entre *Poncirus*, on est obligé de travailler sur plusieurs locus hétérozygotes pour repérer un pourcentage correct de plantules zygotiques. Par contre, dans le cas de croisements intergénériques *Citrus x Poncirus*, tous les zygotiques sont repérables grâce à un seul des trois systèmes enzymatiques PAC, IDH ou AMY qui possèdent des allèles différents dans les deux genres (NORMAND, 1988). Dans le cas de croisements entre *Citrus*, il faut étudier les deux parents afin de savoir quels sont les systèmes enzymatiques les plus discriminants.

Il serait intéressant de déterminer le génotype des individus de plusieurs espèces et variétés de *Citrus* pour les locus connus et d'étendre cette étude au sous-genre *Papeda* et au genre *Fortunella*. Outre l'intérêt pour l'identification des plantules zygotiques dans des semis de parents connus, les résultats donneraient des renseignements d'ordre plus général :

- une approche taxonomique plus fine pourrait alors être envisagée, et notamment pour essayer de clarifier l'origine hybride de certaines espèces (BARRETT et RHODES, 1976 ; ESEN et SCORA, 1977). L'espèce *Citrus reticulata* est très hétérogène, et il serait intéressant d'étudier les différentes variétés afin de connaître les liens existant entre elles.

- l'estimation de cette diversité génétique et la connaissance des relations qui peuvent exister entre les espèces et les variétés permettraient de mieux diriger les croisements dans les programmes d'amélioration.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement M. François LELIEVRE, Directeur de la SRA de Corse qui a financé cette étude, et Mademoiselle Claire LANAUD qui m'a accueilli dans le laboratoire d'électrophorèse du CIRAD à Montpellier.

## BIBLIOGRAPHIE

- BARRETT (H.C.) et RHODES (A.M.). 1976.  
Numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives.  
*Syst. Bot.*, 1, 105-136.
- ESEN (A.) et SCORA (R.W.). 1977.  
Amylase polymorphism in *Citrus* and some related genera.  
*Amer. J. Bot.*, 64 (3), 305-309.
- FROST (H.B.) et SOOST (R.K.). 1968.  
Seed reproduction: development of gametes and embryos.  
In *Citrus Industry* vol. II. Ed. W. REUTHER, L.D. BATCHELOR, H.J. WEBBER, 290-324.
- GREGORIUS (H.). 1984.  
An unique genetic distance.  
*Biometrical J.*, (26), 13-18.
- JACQUEMOND (C.). 1984.  
Contribution à l'étude des porte-greffe des agrumes : le *Poncirus trifoliata*.  
*Fruits*, 41 (5) 303-339, (6), 381-392, (7-8) 449-463.
- KHAN (I.A.) et ROOSE (M.L.). 1988.  
Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of *Trifoliata* Orange.  
*J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 113 (1), 105-110.
- MEISTER (C.W.), ALLEN (R.M.) et CALDWELL (R.L.). 1971.  
An electrophoretic examination of selected isozymes in stubborn diseased *Citrus*.  
*Abstract. Annual Meeting Abstracts*, 61, Aug. 1971, 903.
- NORMAND (F.). 1988.  
Intérêt des marqueurs enzymatiques pour l'étude des agrumes. I. Diversité enzymatique chez les genres *Citrus* et *Poncirus*. Hypothèses de déterminisme génétique de huit systèmes enzymatiques.  
*Fruits*, oct. 1988, 43 (10) 569-577.
- PAILLY (O.). 1986.  
Contribution de l'électrophorèse enzymatique à l'étude génétique des agrumes.  
*Mémoire D.A.A., ENSA Montpellier*, 91 p.
- ROOSE (M.L.) et PRECHTL (S.N.). 1988  
Identification and performance of *Citrus* trees on nucellar and zygotic rootstocks.  
*J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 113, 100-105.
- TORRES (A.M.), MAU-LASTOVICKA (T.), WILLIAMS (T.E.) et SOOST (R.K.). 1985.  
Segregation distortion and linkage of *Citrus* and *Poncirus* isozymes genes.  
*The Journal of Heredity*, 76, 289-294.
- TORRES (A.M.), SOOST (R.K.) et MAU-LASTOVICKA (T.). 1982.  
*Citrus* isozymes: genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings.  
*The Journal of Heredity*, 73, 335-339.

ANNEXE 1 - Nom, origine et numéro d'identification des 59 *Poncirus* étudiés en collection.

Numéro	Dénomination	Origine
T3, T6, V6	<i>Poncirus trifoliata</i> Maroc	Maroc
Z1, Z2	<i>Poncirus</i> Menager	France
Z3	<i>Poncirus</i> Beneke	USA
Z5	<i>Poncirus</i> Christian	Afrique du Sud
Z7	<i>Poncirus</i> Christian	USA
Z9	<i>Poncirus</i> English	Afrique du Sud
Z13	<i>Poncirus</i> Jacompson	USA
Z15	<i>Poncirus</i> Krides	Afrique du Sud
Z17	<i>Poncirus</i> Krides	USA
Z19	<i>Poncirus</i> Pomeroy	USA
Z21	<i>Poncirus</i> Rubidoux	Afrique du Sud
Z23, Z24	<i>Poncirus</i> Rubidoux	Californie
Z25, Z26	<i>Poncirus</i> Rusk	USA
BB1	<i>Poncirus</i> S.E.A.B.	Algérie
BB3, BB4	<i>Poncirus</i> de Ferme Blanche	Algérie
BB5	<i>Poncirus</i> Luisi Corse	France
U14, U15, U16, U17	<i>Poncirus</i> S.E.A.B.	Algérie
U18, U19, U20, U21	<i>Poncirus</i> S.E.A.B.	Algérie
T14, T15, T16, T17	<i>Poncirus</i> Luisi Corse	France
T18, T19, T20, T21	<i>Poncirus</i> Argentine	Argentine
S14, S15, S16, S17	<i>Poncirus</i> Christian	Afrique du Sud
S18, S19, S20, S21	<i>Poncirus</i> Christian	USA
R14, R15, R16, R17	<i>Poncirus</i> Krides	USA
R18, R19, R20, R21	<i>Poncirus</i> Pomeroy	USA
Q14, Q15, Q16, Q17	<i>Poncirus</i> Rusk	USA
H14	<i>Poncirus</i> Brésil	Brésil

BEDEUTUNG DER ENZYM-MARKIERER FÜR DAS STUDIUM VON ZITRUSFRÜCHTEN.  
II. IHR EINSATZ BEIM GENETISCHEN STUDIUM VON *PONCIRUS*.

F. NORMAND.

*Fruits*, Nov. 1988, vol. 43, n° 11, p. 651-655.

KURZFASSUNG - Im Wege der Elektrophorese von acht Enzym-Systemen konnten zygotische Keimpflanzen in Saatbeeten von acht *Poncirus*-Klonen identifiziert werden. Ihr prozentualer Anteil schwankt zwischen 10 und 40 % bei einem Mittelwert von 29 %. Die zygotischen Keimpflanzen entstammen der Selbstbefruchtung oder intragenetischen Kreuzungen. Die 59 im Kollektiv beobachteten *Poncirus*-Pflanzen verweisen auf die schwache Enzymvielfalt dieser Spezies. Im Verlauf der isozymen Analyse wurde man auf eine Gruppe von drei Einzelpflanzen aufmerksam, die durch die Schwächigkeit ihrer Blumen bereits aufgefallen waren.

INTERES DE LOS MARCADORES ENZIMATICOS PARA EL ESTUDIO DE LOS AGRIOS.

II. APLICACION AL ESTUDIO GENETICO DEL GENERO *PONCIRUS*.

F. NORMAND.

*Fruits*, Nov. 1988, vol. 43, n° 11, p. 651-655.

RESUMEN - La electroforesis de ocho sistemas enzimáticos ha permitido la identificación de plántulas zigóticas en siembras de ocho clones de *Poncirus*. Su porcentaje varía de 10 a 40 por 100, con una media de 29 por 100. Estas plántulas zigóticas provienen o de autofecundación, o de cruzamientos intergenéticos. El estudio de 59 *Poncirus* puestos en colección muestra que la diversidad enzimática en este género es escasa. Un grupo de tres individuos, ya localizados por el pequeño tamaño de sus flores, ha sido puesto en evidencia por el estudio isozimico.