

IDENTIFICAÇÃO DO ESTÁDIO ADEQUADO PARA REALIZAÇÃO DE ANÁLISES ISOENZIMÁTICAS NA CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE ARROZ¹

GASPAR MALONE², PAULO DEJALMA ZIMMER³, MARIAALICE DA SILVA DE CASTRO⁴, IRENI CARVALHO⁴, GERIE DUARDO MENEGHELLO⁵, SILMAR TEICHERT PESKE⁶

RESUMO - Os sistemas enzimáticos comumente utilizados na caracterização de cultivares são produtos da expressão gênica, e, portanto, altamente influenciados pelo estágio de desenvolvimento da plântula, pelo tecido vegetal e pelo ambiente. Esses fatores normalmente não são considerados no momento de realizar uma análise conjunta de vários sistemas enzimáticos para uma determinada espécie, decorrendo assim numa inadequada e ineficiente leitura e interpretação dos resultados. No presente trabalho objetivou-se determinar o momento adequado no qual cada sistema enzimático apresenta máxima expressão fenotípica para ser utilizado na caracterização isoenzimática de cultivares de arroz. Dois lotes, um de alta e um de baixa qualidade fisiológica, para cada uma das variedades de arroz El Paso L144, IRGA 417 e EEA 406, foram analisados utilizando-se os sistemas enzimáticos Esterase, Fosfatase Ácida, Glutamato Desidrogenase, Glutamato Oxalacetato Transaminase, e Malato Desidrogenase. Seis estádios de desenvolvimento (0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias) foram avaliados para a extração de proteínas. Dos resultados obtidos pode se inferir que: cada sistema enzimático analisado apresenta um momento adequado para extração de proteínas; não foi possível identificar um estágio de desenvolvimento onde coincidira a máxima expressão fenotípica de todos os sistemas enzimáticos; a análise simultânea de vários sistemas isoenzimáticos, a partir de uma única extração de proteína não é recomendada. A qualidade fisiológica das sementes da cultivar EEA 406 afetou a análise isoenzimática dos sistemas Esterase e Glutamato Oxalacetato Transaminase.

Termos para indexação: *Oryza sativa*, eletroforese, isoenzimas, qualidade fisiológica, extração de proteínas

IDENTIFICATION OF THE ADEQUATE STAGE TO PERFORM ISOENZYMATIC ANALYSIS IN RICE CULTIVAR CHARACTERIZATION

ABSTRACT - Enzymatic systems commonly used in cultivar characterization are products of gene expression and are, therefore, highly influenced by development stages, the organ from which they are collected and the environment. Usually, these factors are not considered when several enzymatic complexes are used from a single protein extraction, resulting in an inefficient reading and interpretation of the results. This study was carried out to evaluate the adequate stage for protein extraction for each enzymatic complex, when there is a maximum phenotypic expression, to be used in rice isoenzymatic characterization. Two lots, one of high and one of low physiologic quality, for each of the rice varieties El Paso L144, IRGA 417 and EEA 406, were analyzed using the Esterase, Acid Phosphatase, Glutamate Dehydrogenase, Glutamate Oxalacetate Transaminase, and Malate Dehydrogenase analyses. Six development stages (0, 2, 4, 6, 8 and 10 days) were used

¹ Submetido em 10/03/2005. Aceito para publicação em 18/11/2005;

² Geneticista, M.Sc., Doutorando em Ciência e Tecnologia de Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, RS. Campus Universitário s/n. CEP: 96010-100, Caixa Postal 354, gmalone@ufpel.edu.br;

³ Eng. Agrônomo, Dr., Prof. Adjunto. Departamento de Fitotecnia/FAEM/UFPel;

⁴ Técnica em Química. Técnica do Laboratório de Bio Sementes/FAEM/UFPel;

⁵ Eng. Agrônomo, M.Sc., Doutorando em Ciência e Tecnologia de Sementes/FAEM/UFPel;

⁶ Eng. Agrônomo, Ph.D., Prof. Titular. Departamento de Fitotecnia/FAEM/UFPel.

for protein extraction. Results suggested that each isoenzymatic complex requires an adequate moment for protein extraction; it was not possible to identify a development stage where the maximum phenotypic expression of the Esterase, Acid Phosphatase, Glutamate Dehydrogenase, Glutamate Oxalacetate Transaminase, and Malate Dehydrogenase isoenzymatics complexes presented the same profile; it is not recommended to analyze several isoenzymatics complexes from a single protein extraction; the physiologic quality of EEA 406 seeds affected the Esterase and Glutamate Oxalacetate Transaminase isoenzymatic profiles.

Index terms: *Oryza sativa*, electrophoresis, isoenzymes, physiologic quality, proteins extraction.

INTRODUÇÃO

A análise da atividade enzimática constitui-se em uma das técnicas de marcadores bioquímicos mais utilizados na caracterização de cultivares desde a década de 60. A caracterização de cultivares por meio de métodos bioquímicos e moleculares tem sido muito utilizada para auxiliar na manutenção da pureza varietal e identificação de contaminações genéticas em sementes (Malone et al., 2004; Schuster et al., 2004). No entanto, são necessários protocolos padronizados e a certificação da veracidade da análise, a fim de oferecer repetibilidade e confiabilidade aos resultados.

A análise por isoenzimas é uma técnica acessível e que fornece ampla informação genética para diversas aplicações (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Isoenzimas têm sido utilizadas na caracterização de cultivares de soja (Pinto et al., 1995; Anti, 2000), arroz (Bonow et al., 2001), pinus (Carmo Pinto et al., 2004), batata (Gomes Rocha et al., 2001), bananeira (Ulisses et al., 2002), mandioca (Schmidt et al., 2003) e na identificação de hibridações naturais entre arroz cultivado e arroz vermelho (Lagenvin et al., 1990).

Contudo, a análise por isoenzimas apresenta algumas desvantagens com relação às demais técnicas de caracterização bioquímico/molecular utilizadas atualmente. As enzimas são proteínas monoméricas ou multiméricas que exercem funções catalíticas específicas quando combinadas com um substrato específico. O termo isoenzima faz referência as diferentes formas moleculares (alelos) que uma determinada enzima pode apresentar, mas reagem sempre com o mesmo substrato (Market e Moller, 1959). As isoenzimas são produtos da expressão gênica e, conseqüentemente, altamente influenciadas pelo ambiente. Isto, sem dúvida, constitui-se numa grande desvantagem em relação aos marcadores moleculares de DNA, os quais não são influenciados pelo ambiente. A atividade enzimática é também altamente influenciada pela idade da planta, pois os genes que controlam a sua expressão manifestam-se em determinados estádios do desenvolvimento e em órgãos e tecidos específicos (Ramírez

et al., 1991). Por outro lado, as isoenzimas são marcadores do tipo co-dominante, o que possibilita a identificação de todos os alelos (variantes) para um mesmo gene. O polimorfismo gerado pelas isoenzimas pode ser do tipo genético, quando genes diferentes codificam para cada uma das cadeias polipeptídicas da proteína, ou pós traducional, quando o produto gênico é modificado após a tradução (Ramírez et al., 1991).

A literatura disponível referente à utilização de isoenzimas na caracterização de cultivares de arroz raramente específica o estádio no qual foi coletado o material para extração de uma determinada enzima. Também é muito comum encontrar na literatura análise de um grande número de sistemas enzimáticos, a partir de uma única extração de proteínas, sendo que cada isoenzima é produto de um único *loci* gênico, o qual apresenta níveis máximos de expressão em idades, órgãos vegetais, estádios do desenvolvimento e ambientes diferentes.

No presente trabalho procurou-se identificar o momento adequado para a extração de material vegetal para os sistemas enzimáticos Esterase, Fosfatase Ácida, Glutamato Desidrogenase, Glutamato Oxalacetato Transaminase e Malato Desidrogenase, visando a caracterização de cultivares de arroz.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bio Sementes do Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Dois lotes de sementes, com dois níveis de qualidade fisiológica, foram analisados, para cada uma das três variedades de arroz utilizadas (El Paso L144, IRGA 417 e EEA 406). A qualidade fisiológica dos lotes foi determinada pelo teste de germinação.

Cinquenta sementes, por repetição, num total de 200, foram semeadas em rolo de papel, e acondicionadas em germinador regulado a 25°C, segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). O material vegetal (sementes e plântulas) para extração de proteínas foi coletado aos 0, 2, 4,

6, 8 e 10 dias após as sementes terem sido submetidas ao teste de germinação. Dez sementes ou plântulas coletadas aleatoriamente foram maceradas em gral de porcelana sobre cubos de gelo, para cada um dos seis lotes estudados. De cada uma das amostras, 200mg do extrato vegetal foram colocados em tubo *ependorf* acrescidos de solução extratora (tampão do gel + 0,15% de 2-mercaptoetanol) na proporção 1:2 (p/v). A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida 7%, colocando 20µL de cada amostra, em orifícios feitos com o auxílio de um pente de acrílico. Três aplicações (repetições) para cada uma das amostras foram realizadas. Os padrões enzimáticos foram analisados pelo sistema de tampões, descrito por Scandalios (1969). Os géis foram colocados em cubas eletroforéticas verticais mantidas em câmara fria com temperatura entre 4 e 6°C. As migrações eletroforéticas foram realizadas com uma diferença de potencial de 10 V cm⁻¹, até que a linha de frente formada pelo azul de bromofenol atingisse 9 cm do ponto de aplicação. Os géis foram revelados, para os sistemas enzimáticos Esterase, Fosfatase Ácida, Glutamato Desidrogenase, Glutamato Oxalacetato Transaminase e Malato Desidrogenase, conforme Scandalios (1969) e Alfenas (1998). Os géis de eletroforese foram fixados em solução 5:5:1, de água destilada: metanol: ácido acético.

A interpretação dos resultados foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando em consideração a presença/ausência, bem como a intensidade de cada uma das bandas eletroforéticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 37 alelos (bandas eletroforéticas) foram identificados e analisados (Tabela 1). O número de alelos variou de um mínimo de dois para os sistemas enzimáticos Glutamato Desidrogenase, Glutamato Oxalacetato Transaminase e Malato Desidrogenase, até um máximo de quatro para os sistemas enzimáticos Esterase e Fosfatase Ácida. Em cada sistema enzimático foram observadas variações na intensidade e no momento da expressão alélica. Em função disso, cada sistema foi abordado e analisado individualmente.

O sistema isoenzimático Esterase é constituído por um complexo e heterogêneo grupo de enzimas reativas com uma ampla gama de substratos específicos (Scandalios, 1969). As variantes destas proteínas encontradas em plantas, por exemplo, são geralmente monoméricas ou diméricas (Weeden e Wendel, 1990), com um alto nível de variabilidade (Gillespie e Langley, 1974). Esterase é desta forma, um dos sistemas

TABELA 1. Número de alelos obtidos com cada um dos cinco sistemas enzimáticos utilizados. Bio Sementes/UFPEL - Pelotas, 2005.

Cultivar	Sistema enzimático	Número de alelos
IRGA 417	EST	2
	ACP	3
	GDH	2
	GOT	2
	MDH	2
EEA 406	EST	4
	ACP	4
	GDH	2
	GOT	2
	MDH	2
El Paso L144	EST	2
	ACP	4
	GDH	2
	GOT	2
	MDH	2
Total de alelos		37

EST – Esterase; ACP – Fosfatase Ácida; GDH – Glutamato desidrogenase; GOT - Glutamato oxalacetato transaminase; MDH – Malato desidrogenase.

isoenzimáticos mais polimórficos em plantas (Weeden e Wendel, 1990).

O número de alelos identificados com este sistema enzimático variou de dois, nas cultivares IRGA 417 e El Paso L144, até quatro, na cultivar EEA 406 (Tabela 1). Este sistema enzimático tem sido o mais estudado em arroz (Endo e Morishima, 1983), e os resultados obtidos concordam com Wu et al. (1997), os quais, analisando isoenzimas de Esterase em 848 acessos de arroz, concluíram que a maioria deles apresentava de duas a quatro bandas eletroforéticas. Além disso, a intensidade da expressão também se mostrou diferencial durante o processo de germinação das sementes. A expressão do sistema enzimático Esterase variou consideravelmente à medida que avança o processo de germinação das sementes, sendo que, a partir dos quatro dias de germinação a intensidade de expressão se estabilizou. Portanto, recomenda-se realizar a extração das proteínas em plântulas de quatro a dez dias. Na Figura 1 é ilustrado o padrão eletroforético da Esterase para a cultivar El Paso L144, padrão que foi mantido nas demais cultivares avaliadas.

Para a Fosfatase Ácida o número de alelos identificados variou de três, na cultivar IRGA 417, até quatro, nas cultivares EEA 406 e El Paso L144 (Tabela 1). Este número de alelos é inferior ao encontrado por Bonow et al. (2000) e Guidolin (1993) que estudando os padrões isoenzimáticos em plântulas de arroz de 8 dias de idade identificaram 7 alelos para Fosfatase

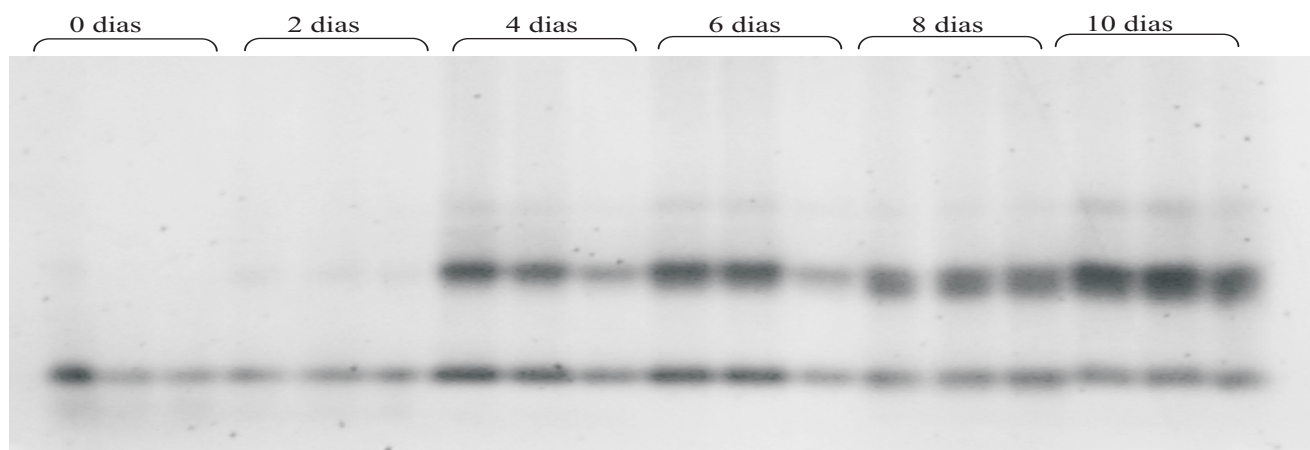


FIGURA 1. Padrão eletroforético da cultivar El Paso L144, obtido com o sistema enzimático Esterase. Bio Sementes/UFPEL – Pelotas, 2005.

Ácida. Provavelmente, em função de terem analisado acesos de arroz preto e vermelho, o que acrescenta maior variabilidade genética ao estudo. A expressão do sistema Fosfatase Ácida mostrou-se mais uniforme ao longo de todas as extrações de proteínas analisadas, porém, esta deverá ser realizada, preferencialmente, aos 10 dias, quando os quatro alelos são expressos (Figura 2). A função da enzima Fosfatase Ácida é hidrolisar os fosfomonoésteres de um grande número de reações bioquímicas vegetais, entre elas, a formação de sacarose durante a fotossíntese (Tanksley, 1983).

Analisando os géis do sistema Glutamato Desidrogenase, foi possível observar que pelo menos um dos dois alelos identificados neste sistema enzimático (Tabela 1) foi expresso

em todas as extrações de proteínas, embora com diferentes intensidades. Resultados similares foram obtidos por Lizhi et al. (2002), porém, com apenas um alelo identificado para Glutamato Desidrogenase. No entanto, a totalidade dos alelos (dois) somente foi expressa até os quatro dias, apresentando considerável variação na intensidade de expressão de cada um dos alelos individuais. Por outro lado, Kanamori et al. (1972), identificaram uma maior intensidade de expressão da Glutamato Desidrogenase em plântulas de duas semanas de idade com adição de amônio na solução de cultivo. Segundo análise visual da Figura 3, até os quatro dias, incluindo extração direta de sementes (0 dias), a análise do sistema Glutamato Desidrogenase pode ser realizada sem interferências

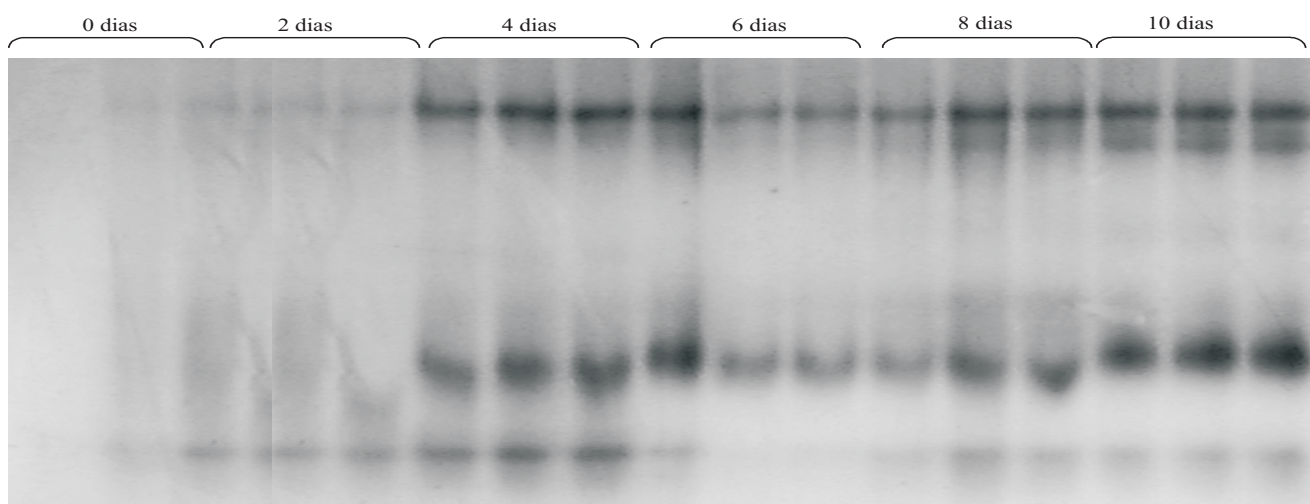


FIGURA 2. Padrão eletroforético da cultivar IRGA 417, obtido com o sistema enzimático Fosfatase Ácida. Bio Sementes/UFPEL – Pelotas, 2005.

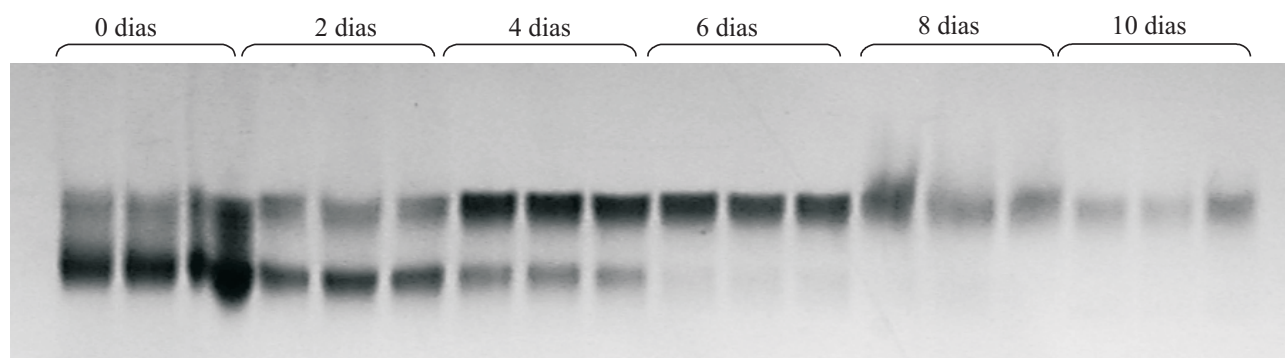


FIGURA 3. Padrão eletroforético da cultivar EEA 406, obtido com o sistema enzimático Glutamato Desidrogenase. Bio Sementes/UFPEl – Pelotas, 2005.

na interpretação dos resultados. Essa enzima é, aparentemente, comandada pela expressão de dois loci (Gdh1 e Gdh2), não ligados (Misharin et al., 1979; Sukhorzhevskaya, 1978, 1980).

Embora com diferenças nos níveis de intensidade, a manifestação fenotípica dos dois alelos identificados no zimograma da enzima Glutamato Oxalacetato (Tabela 1) foi uniforme em todos os estádios avaliados (Figura 4). Isso permite que o sistema Glutamato Oxalacetato Transaminase possa ser utilizado em combinação com outros sistemas isoenzimáticos sem influir consideravelmente na veracidade dos resultados. A Glutamato Oxalacetato Transaminase tem uma importante participação em reações de transaminação, durante a eliminação do Nitrogênio dos aminoácidos e na formação de grupos Ceto para o Ciclo de Krebs e

gluconeogenese (Tanksley, 1983).

No sistema Malato Desidrogenase foi evidenciado variação na expressão dos dois alelos identificados (Tabela 1). O número de alelos identificados foi similar ao pesquisado por Lizhi et al (2002), que analisando 149 acessos de arroz selvagem identificaram 3 alelos para o sistema Malato Desidrogenase. Até os quatro dias de germinação a expressão foi intensa, sendo que a partir dos seis dias a intensidade na expressão decresceu consideravelmente, a ponto de comprometer a definição das bandas. Sugere-se que a análise deste sistema enzimático seja realizada até os quatro dias de germinação das sementes (Figura 5). Vale ressaltar que o sistema isoenzimático Malato Desidrogenase é constituído por enzimas, na grande maioria diméricas, que estão envolvidas na oxidação do Malato para Oxalacetato em

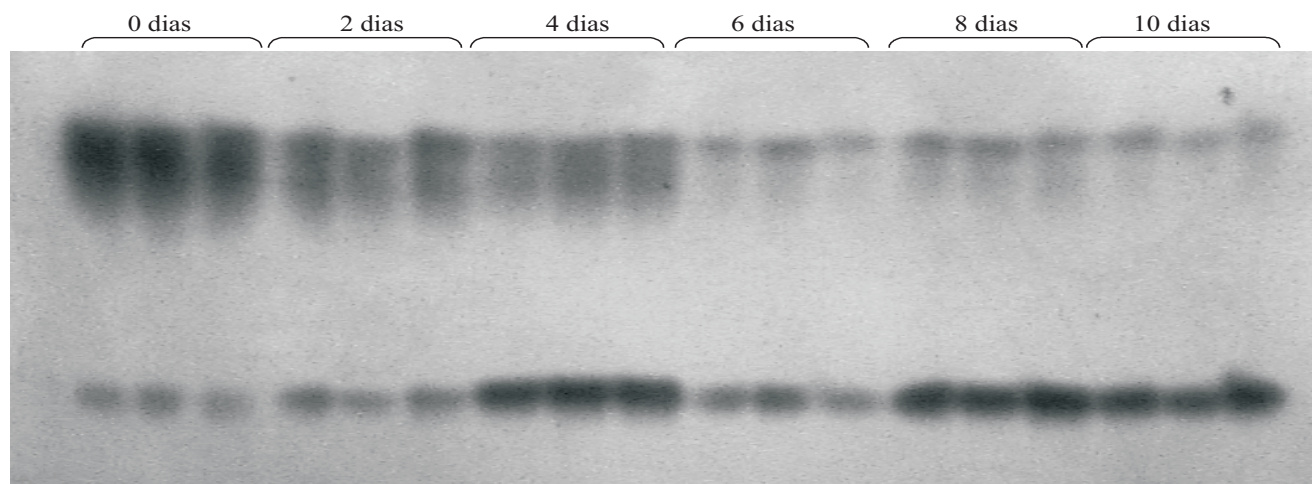


FIGURA 4. Padrão eletroforético da cultivar EEA 406, obtido com o sistema enzimático Glutamato Oxalacetato Transaminase. Bio Sementes/UFPEl – Pelotas, 2005.

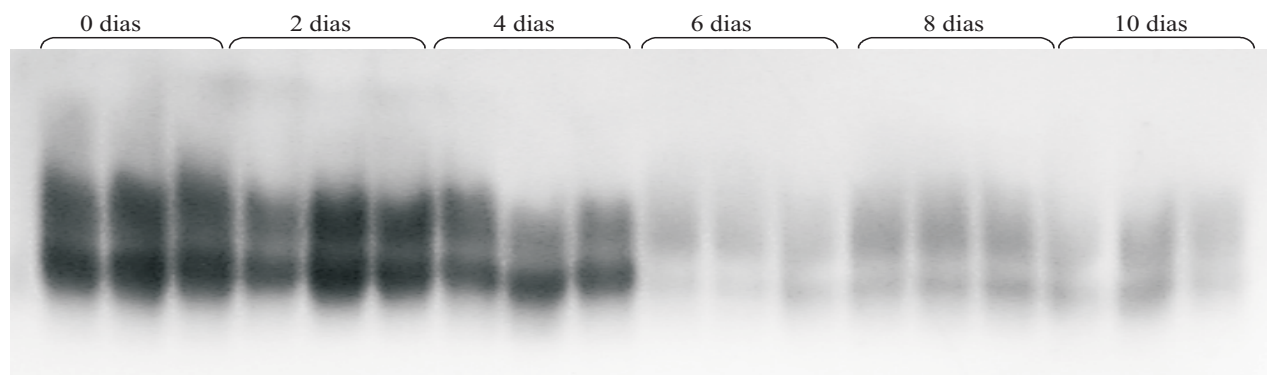


FIGURA 5. Padrão eletroforético da cultivar EEA 406, obtido com o sistema enzimático Malato Desidrogenase. Bio Sementes/UFPel – Pelotas, 2005.

plantas (Weeden e Wendel, 1990).

De uma forma geral, os cinco sistemas isoenzimáticos analisados não evidenciaram expressões fenotípicas diferenciais entre lotes de alta e baixa qualidade fisiológica. Apenas nos lotes de alta e de baixa qualidade fisiológica da cultivar EEA 406 foi possível identificar diferenças na expressão fenotípica nos sistemas Esterase e Glutamato Oxalacetato Transaminase. Em ambos os sistemas enzimáticos, a intensidade da expressão fenotípica, no lote de baixa qualidade fisiológica, diminuiu em plântulas a partir dos seis dias de germinação. No caso do sistema Esterase, a diminuição foi significativa em ambos os alelos analisados, quando comparado com o lote de alta qualidade fisiológica.

Já no sistema Glutamato Oxalacetato Transaminase, a diminuição na intensidade de expressão foi em apenas um dos alelos analisados (Figura 6).

Os resultados obtidos no presente trabalho revelam que, dependendo do sistema enzimático utilizado, existe um momento adequado para a extração de proteínas, que garante a expressão fenotípica de todos os alelos envolvidos. Em função disso, a análise conjunta de vários sistemas isoenzimáticos, realizando a extração das proteínas em um único estágio de desenvolvimento, não é recomendável, pois variação no estágio de desenvolvimento, imposta por diferenças no vigor, poderá mascarar os resultados. Na tabela 2 pode ser visualizado o momento adequado para extração de

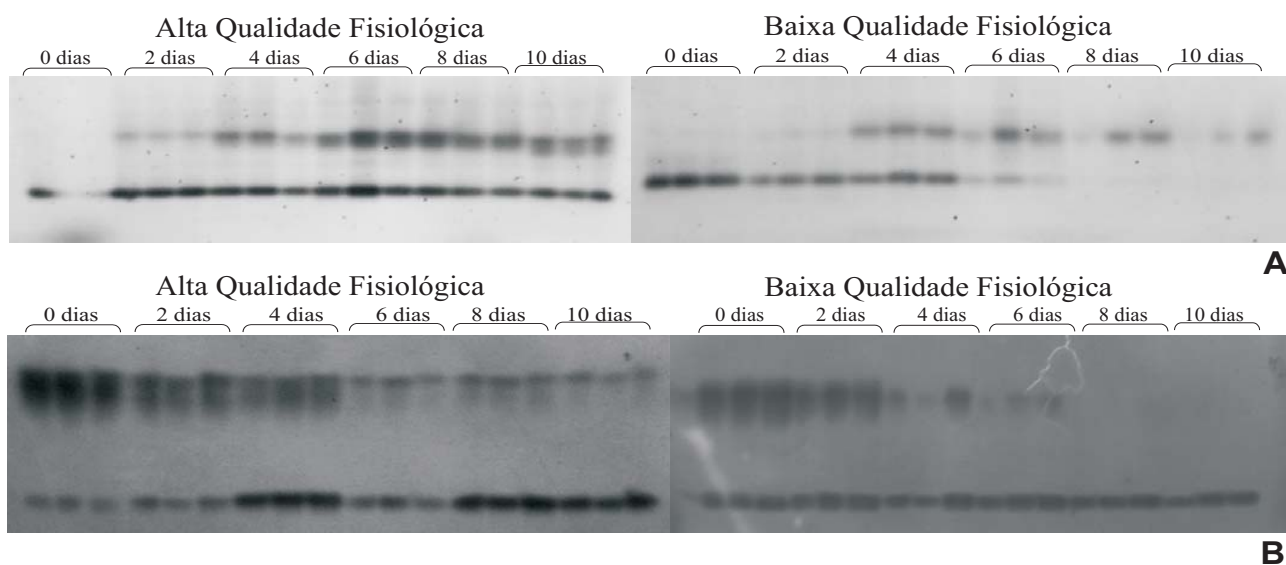


FIGURA 6. Padrões eletroforéticos obtidos com os sistemas enzimáticos Esterase (A) e Glutamato Oxalacetato Transaminase (B) em lotes de alta e baixa qualidade fisiológica da cultivar de arroz EEA-406. Bio Sementes/UFPel – Pelotas, 2005.

proteínas para os cinco sistemas enzimáticos analisados neste trabalho.

TABELA 2. Momento adequado para extração das proteínas para cada um dos cinco sistemas enzimáticos analisados. (Zero o momento em que as sementes foram colocadas para germinar). Bio Sementes/UFPEL - Pelotas, 2005.

Sistema enzimático	Momento adequado para extração de material
EST	Entre 4 e 10 dias
ACP	Aos 10 dias
GDH	Entre 0 e 4 dias
GOT	Entre 0 e 10 dias
MDH	Entre 0 e 4 dias

CONCLUSÕES

Cada sistema enzimático analisado apresenta um momento adequado para extração de proteínas, não sendo recomendada uma única extração para a análise simultânea de vários sistemas enzimáticos.

O estágio mais indicado para a extração de proteínas é de 4 a 10 dias, para a enzima Esterase, 10 dias para a enzima Fosfatase Ácida, de 0 a 4 dias para as enzimas Glutamato desidrogenase e Malato Desidrogenase e de 0 a 10 dias para a enzima Glutamato Oxalacetato Transaminase.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C. **Eletroforeses de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- ANTI, A.B. Caracterização de germoplasma de soja e de feijão através de eletroforese de isoenzimas da semente. **Bragantia**, Campinas, v.59, n.2, p.139-142, 2000.
- BONOW, S.; AUGUSTIN, E.; FRANCO, D.F.; PETERS, J.A.; TERRES, A.L.S. Caracterização isoenzimática de genótipos de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.2, p.291-300, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes.** Brasília: SMDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- CARMO PINTO, S.I.; SOUZA, A.M.; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia forestalis**, Piracicaba, n.65, p.40-48, 2004.
- ENDO, T.; MORISHIMA, H. Rice. In: TANKSLEY, S. D.; ORTTON, T.J. (Ed). **Isozymes in plant genetics and breeding.** Amsterdam: Elsevier, 1983. part B, p.129-146.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de**

marcadores moleculares em análise genética. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

GILLESPIE, J.H., LANGLEY, C.H. A general model to account for enzyme variation in natural populations. **Genetics**, Pittsburgh, v.76, n.4, p.837-887, 1974.

GUIDOLIN, A.F. **Caracterização de genótipos de arroz irrigado por técnicas eletroforéticas.** 1993. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1993.

GOMES ROCHA, B.H; AUGUSTIN, E.; SILVA, J.B. da; VIÉGAS, J. Isoenzymatic variability in wild potatoes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 781-791, 2001.

KANAMORI, T.; KONISHI, S.; TANAKA, E. Inducible formation of glutamate dehydrogenase in rice plant roots by the addition of ammonia to the media. **Physiology of Plant**, Berne, v. 26, p. 1-6. 1972.

LANGEVIN, S.; CLAY, K.; GRACE, J. The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed rice (*Oryza sativa* L.). **Evolution**, Tempe, v.44, n.4, p.1000-1008, 1990.

LIZHI, G.; SONG, G.; DEYUAN, H.; RUSHUN, L.; GUODA, T.; ZAIFU, X. Allozyme variation and conservation genetics of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in Yunnan, China. **Euphytica**, Netherlands, v. 124, n.3, p. 273-281, 2002.

MALONE, G; ZIMMER, P.D.; BRANCO, J.S.C.; MATTOS, L.A.T.; KOPP, M.M.; CERVIERI FILHO, E.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. Identificação de contaminação genética em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) por meio de AFLP. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.9, n.1, p.105-110, 2004.

MARKET, C.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.45, p.753-763. 1959.

MISHARIN, S.E.; MOZGOVA, E.A.; MONASTYREVA, L.E.; SUKHORZHEVSKAIA, T. B.; KHAVKIN, E. E. Protein polymorphism in maize and its nearest relatives. **Maize Genetic Cooperation News Letter**, Washington, v.53, n.52, p.44-46, 1979.

PINTO, L. R., SADER, R., LEMOS, E. G. M. Variações nos perfis eletroforéticos de isoenzimas: aplicação na identificação de cultivares de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.17, n.1, p.52-56, 1995.

RAMIREZ, H.; CALDERON, A.; ROCCA, W. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. In: ROCCA, W.; MROGINSKI, L. (Ed.) **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones.** Cali. 1991. p. 825-856.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v.3, n.1, p.37-39, 1969.

SCHMIDT, A.; FUENMAYOR, F.; FUCHS, M. Caracterización de clones de yuca (*Manihot esculenta*) mediante marcadores protéicos e isoenzimáticos. **Interciencia**, Carácas, v. 28, n.12, p.690-698, 2003.

SCHUSTER, I.; QUEIROZ, V. T.; TEIXEIRA, A. I.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com o auxílio de marcadores moleculares microssatélites.

Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.39, n.3, p.247-253, 2004.

SUKHORZHEVSKAIA, T.B. Investigation of genetic control over glutamate dehydrogenase in maize (*Zea mays* L.). **Genetika**, Moscou, v. 16, n.5, p.914-917, 1980.

SUKHORZHEVSKAIA, T.B. Organ specific spectra of the glutamate dehydrogenase of corn, *Zea mays* L. **Ontogenez**, Moscou, v.9, n.4, p. 390-396, 1978.

TANKSLEY, S.D. **Isozymes. Part B**. Amsterdam: Elsevier, 1983. 472p.

ULISSES, C.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C.C.; MARTINS, L.S.S.; FREITAS, N.S.A. Caracterização isoenzimática de clones de bananeira nanicaõ submetidos à salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.6, n.2, p.358-361, 2002.

WEEDEN, N. F.; WENDEL, J. F. Genetics of plant isozymes. In: SOLTIS D.E., SOLTIS P.S. (Ed). **Isozymes in plant biology**. London: Chapman and Hall, 1990. p.46-72.

WU, X.M.; CHEN, C.B.; LI, D.Y. Esterase isozymes in the wild rices of Guangxi. **National Agriculture Library**. Disponível em: <http://www.gramene.org/newsletters/rice_genetics/rgn3/v3I10.html>. Acesso em: 7 mar. 2005.

