

# ASSOCIAÇÃO ENTRE ISOENZIMAS E MATÉRIA SECA EM BATATA SILVESTRE<sup>1</sup>

BEATRIZ HELENA GOMES ROCHA<sup>2</sup>, ELIANE AUGUSTIN<sup>3</sup>,  
JOÃO BAPTISTA DA SILVA<sup>4</sup> e ARIONE DA SILVA PEREIRA<sup>5</sup>

RESUMO - Clones de batata silvestre (*Solanum* spp.) foram analisados quanto aos teores de matéria seca em tubérculos e isoenzimas de aspartato transaminase e isocitrato desidrogenase em folhas, com o objetivo de identificar associação entre estas características. Os resultados obtidos em uma amostra de 50 clones indicam grande variabilidade do teor de matéria seca. Clones de *S. commersonii malmeanum* apresentaram maior teor que os de *S. commersonii commersonii*, *S. chacoense muelleri* e de outros cuja espécie não foi identificada. Os padrões isoenzimáticos de folhas de 38 clones da amostra mostraram 15 variantes eletroforéticas de aspartato transaminase e sete de isocitrato desidrogenase. Comparações efetuadas através de tabelas de contingência 2 x 2, usando o teste de  $\chi^2$ , com correção para continuidade, permitiram concluir que existe associação significativa entre o teor de matéria seca e as bandas de mobilidade relativa 1,00 de aspartato transaminase e de isocitrato desidrogenase.

Termos para indexação: *Solanum*, aspartato transaminase, isocitrato desidrogenase, melhoramento de plantas.

## ISOENZYMES AND DRY MATTER CONTENT IN WILD POTATO

ABSTRACT - Wild potato clones (*Solanum* spp.) were analysed for tuber dry matter content, leaf aspartate transaminase and leaf isocitrate dehydrogenase isoenzymes in order to identify association between these characteristics. The results indicate that there is great variability for dry matter content among 50 clones analysed. *S. commersonii malmeanum* clones had higher dry matter levels than *S. commersonii commersonii*, *S. chacoense muelleri* and the clones whose species were not identified. Fifteen aspartate transaminase and seven isocitrate dehydrogenase bands were observed in the gels of 38 clones. Tests of  $\chi^2$ , using 2 x 2 contingency table, revealed a significant association between dry matter content and the bands of relative mobility 1.00 of both aspartate transaminase and isocitrate dehydrogenase isoenzymes.

Index terms: *Solanum*, aspartate transaminase, isocitrate dehydrogenase, plant breeding.

## INTRODUÇÃO

Não existem cultivares nacionais de batata apropriadas ao processamento industrial, nem tampouco cultivares estrangeiras adaptadas às condições de cultivo do Sul do Brasil (Costa & Pereira, 1996). Cultivares para processamento na forma de palitos devem conter teores de sólidos totais acima de 20%, pois ao absorver pouca quantidade de óleo durante a fritura, são mais econômicas e resultam em produtos processados de melhor qualidade (Almeida et al., 1983). Dessa forma, no melhoramento para o processamento industrial visando atingir teores mais

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 9 de fevereiro de 2000.

<sup>2</sup> Eng. Agrôn., M.Sc., doutorando, Dep. de Fitotecnia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Caixa Postal 354, CEP 96001-970 Pelotas, RS. Bolsista do CNPq. E-mail: biagr@terra.com.br

<sup>3</sup> Eng. Agrôn., Dr., Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT), Caixa Postal 403, CEP 96001-970 Pelotas, RS. E-mail: augustin@cpact.embrapa.br

<sup>4</sup> Eng. Agrôn., Dr., Prof. Titular, Dep. de Matemática, Estatística e Computação, UFPEL. Bolsista do CNPq. E-mail: jbsilva@ufpel.tche.br

<sup>5</sup> Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa-CPACT. Bolsista do CNPq. E-mail: arione@cpact.embrapa.br

elevados de matéria seca tem-se tentado utilizar espécies diplóides silvestres e primitivas (Mendoza, 1990). Espécies da série Commersoniana, originárias da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai, juntamente com espécies das séries Demissa e Longipedicellata do México, são de especial interesse ao melhoramento, graças à superioridade dos teores de matéria seca com conteúdo de amido acima de 33,40% em *Solanum chacoense* e 27,7% em *S. commersonii* (Hawkes & Hjerting, 1969).

No melhoramento genético vegetal, as isoenzimas têm sido utilizadas com diferentes finalidades, como para avaliação de germoplasma, detecção de ligação gênica com caracteres mono e poligênicos, e seleção indireta de caracteres agrônômicos (Soller & Plotkin-Hazan, 1977; Tanksley et al., 1981, 1982; Medina-Filho, 1983). Vários autores referem-se a polimorfismos enzimáticos em diferentes espécies de *Solanum* (Oliver & Martínez-Zapater, 1985; Douches et al., 1989; Douches & Ludlam, 1991).

O objetivo deste trabalho foi identificar a associação existente entre teores de matéria seca e as isoenzimas de aspartato transaminase e de isocitrato desidrogenase em folhas de tubérculos de batata silvestre.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados, em 1996, nos laboratórios de Fisiologia Vegetal e de Eletroforese da Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, teores de matéria seca e padrões isoenzimáticos de aspartato transaminase e isocitrato desidrogenase de, respectivamente, 50 e 38 clones de batata silvestre das subespécies *S. commersonii malmeanum*, *S. commersonii commersonii*, *S. chacoense muelleri* e *Solanum* spp. não identificadas, coletadas de 1986 a 1990, no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Tabela 1), e mantidos no banco de germoplasma de hortaliças dessa unidade.

A análise da matéria seca foi realizada com amostras de 2 a 5 g de tubérculos. Estes foram colocados em estufa, com circulação de ar à temperatura de, aproximadamente, 60°C, onde permaneceram 13 a 14 dias, quando atingiram peso constante. O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Após a análise da variância, utilizou-se o teste de Duncan para comparação das médias.

Na análise de isoenzimas foi utilizada eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida nas concentrações de 6% e 5%. Para aspartato transaminase, utilizou-se a solução-tampão de Scandalios (1969) e o sistema de coloração de Ayala et al. (1972). Para a isocitrato desidrogenase, utilizaram-se os tampões de Nichols & Ruddle (1973) modificado (pH 6,5) e de Shields et al. (1983), e o sistema de coloração de Vallejos (1983).

Nas análises de aspartato transaminase, foram maceradas amostras de 10 mg, coletadas na terceira ou quarta folha, antes da floração das plantas. Nas análises de isocitrato desidrogenase, 10 mg de amostras, coletadas na quinta ou sexta folha de plantas em plena floração, foram maceradas em 0,01 mL de tampão citrato-histidina pH 6,5, acrescido de 0,15% de 2-mercaptoetanol.

Amostras do clone 186 foram usadas como controle. A mobilidade relativa de cada banda foi calculada em relação a uma banda de referência deste clone, à qual foi atribuído valor relativo igual a 1.

As associações entre clones com maiores ou menores teores de matéria seca e isoenzimas foram avaliadas a partir de tabelas de contingência 2 x 2, por meio do teste de  $\chi^2$ , com correção para continuidade (Yates), para os níveis de probabilidade de 5% e 1%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da variância do conteúdo de matéria seca dos 50 clones silvestres mostrou que as diferenças entre os genótipos foram altamente significativas (Tabela 1). Os teores médios obtidos, com variação entre 40,08% e 24,05% (Tabela 2), são considerados altos, quando comparados com outros citados na literatura. Akeley et al. (1968) verificaram que o teor de sólidos totais da cultivar Lenape, em diferentes locais, foi de, aproximadamente, 22,9%, enquanto

**TABELA 1. Análise da variância do conteúdo de matéria seca dos 50 clones silvestres de *Solanum* spp.**

Causa da variação	G. L.	S.Q.	Q.M	Valor F
Clones	49	953,67	19,46	16,30**
Resíduo	150	179,13	1,19	
Total	199	1132,80		
C. V. (%)		3,17		
Média geral		34,42		

\*\* Significativo a 1% de probabilidade.

**TABELA 2. Procedência, ano de coleta e porcentagens médias de matéria seca de clones de *Solanum commersonii commersonii* (SCC), *S. commersonii malmeanum* (SCM), *S. chacoense muelleri* (SChM) e de subespécie não-identificada (NI)<sup>1</sup>.**

Clone	Grupo	Procedência	Ano	Porcentagem de matéria seca
113	SCC	Santo Ângelo, RS	1988	40,08a
60	SCM <sup>2</sup>	Porto Lucena, RS	1987	37,41b
118	SCC	Torres, RS	1988	36,55bc
08	SCM	Augusto Pestano, RS	1986	36,09bcd
57	SCM <sup>2</sup>	Santo Ângelo, RS	1987	35,74bcde
69	SCM	Tenente Portela, RS	1987	35,32bcdef
176	SCC	São Borja, RS	1989	35,29bcdef
108	SCM	Sarandi, RS	1988	35,28bcdef
56	SCM	Santo Ângelo, RS	1987	35,21bcdef
62	SCM	Porto Xavier, RS	1987	35,06bcdefg
09	SCC <sup>2</sup>	Ijuí, RS	1986	34,98bcdefg
67	SCM	Crissiumal, RS	1987	34,77bcdefg
63	SCM <sup>2</sup>	Santo Cristo, RS	1987	34,68bcdefg
07	SCC	Uruguai	1986	34,55bcdefgh
55	SCM	Augusto Pestano, RS	1987	34,48bcdefgh
65	SCM	Horizontina, RS	1987	34,39bcdefgh
53	SCC	Pelotas, RS	1987	34,39bcdefgh
120	SCC	Morro dos Conventos, SC	1988	34,26cdefghi
02	SCM	São Miguel das Missões, RS	1986	33,51cdefghij
230	SCC <sup>2</sup>	Santiago, RS	1990	33,48cdefghij
201	NI <sup>2</sup>	Alegrete, RS	1990	33,16defghijk
168	SCC	São José do Norte, RS	1989	32,95efghijkl
100	SCC <sup>2</sup>	Santa Vitória do Palmar, RS	1988	32,69efghijkl
64	SCM	Tuparendi, RS	1987	32,51fghijkl
224	NI <sup>2</sup>	São Borja, RS	1990	32,51fghijkl
196	SCC	Quarai, RS	1990	32,43fghijkl
208	NI <sup>2</sup>	São Borja, RS	1990	32,01ghijklm
222	NI	Itaqui, RS	1990	32,00ghijklm
142	SCC	Santa Cruz do Sul, RS	1988	31,99ghijklm
119	SCC	Morro dos Conventos, SC	1988	31,56hijklm
199	NI	Uruguaiana, RS	1990	31,33ijklmn
25	SCC	Pelotas, RS	1986	31,27ijklmno
139	SCC	Candelária, RS	1988	31,26ijklmno
143	SCC	São Francisco de Paula, RS	1988	30,67jklmnop
117	SCC	Torres, RS	1988	30,61jklmnop
141	SCC	Vera Cruz, RS	1988	30,55jklmnop
192	SCC <sup>2</sup>	Santana do Livramento, RS	1990	30,49jklmnop
109	SCM	Iraí, RS	1988	30,26klmnopq
36	SCC	Rio Grande, RS	1986	30,06lmnopq
131	SCC	Soledade, RS	1988	29,27mnopqr
71	SCC	Santa Maria, RS	1987	28,50nopqr
166	SCC	Rio Grande, RS	1989	28,41opqr
78	SCC	São Lourenço do Sul, RS	1987	27,97pqrs
54	SCC	Lajeado, RS	1987	27,94pqrs
250	NI <sup>2</sup>	Erechim, RS	1991	27,48qrs
200	NI	Alegrete, RS	1990	26,60rst
158	SCC	Camaquã, RS	1989	25,65st
150	SCC	Lagoa Vermelha, RS	1988	24,15t
68	SChM	Três Passos, RS	1987	24,12t
164	SCC <sup>2</sup>	Rio Grande, RS	1989	24,05t

<sup>1</sup> As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).<sup>2</sup> Clones não submetidos à análise isoenzimática.

os de Katahdin e Kennebec foram de 17,7% e 18,4%, respectivamente. Dois híbridos de *S. tuberosum* x *S. stoloniferum*, contendo altos teores de sólidos (23% e 26,9%) foram comparados, por Pope et al. (1971), com as cultivares comerciais Russet Burbank (22,9%), usadas como controle para flocos de batata e fritas à francesa, e Kennebec (20,1%), como padrão para “chips”. Os produtos destes materiais geralmente apresentaram melhor cor e rendimento do que as cultivadas. Em cinco cultivares de batatas americanas, foram encontrados valores que oscilaram entre 18% e 21,5% (Gould, 1988). Alto teor de matéria seca (22,9%) foi observado na cultivar nacional Catucha (Silva et al., 1996), que possui uma espécie silvestre em sua genealogia.

A análise da variância e comparações entre as médias da porcentagem de matéria seca, por espécies, indicaram diferenças significativas (Tabelas 3

**TABELA 3. Análise da variação do conteúdo de matéria seca dos grupos *Solanum commersonii malmeanum*, *S. commersonii commersonii* e espécie não-identificada.**

Causa da variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	Valor F
Clones	2	120,56	60,28	6,39**
Resíduo	46	433,89	9,43	
Total	48	554,45		
C.V. (%)		9,55		
Média geral		32,16		

\*\* Significativo a 1% de probabilidade.

**TABELA 4. Porcentagens médias de matéria seca dos grupos *Solanum commersonii malmeanum* (SCM), *S. commersonii commersonii* (SCC) e de espécie não-identificada (NI)<sup>1</sup>.**

Grupo silvestre	Nº de genótipos analisados	Porcentagem de matéria seca
SCM	14	34,62a
SCC	28	31,29b
NI	7	30,73b

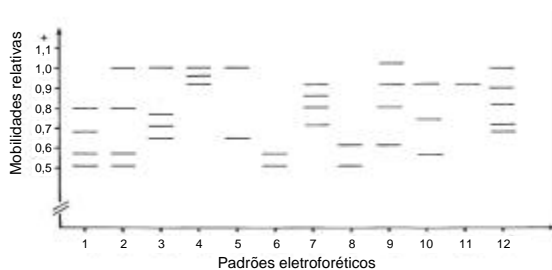
<sup>1</sup> As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

e 4). A maior média foi obtida em clones da subespécie *S. commersonii malmeanum* (34,62%), que diferiu estatisticamente das observadas em *S. commersonii commersonii* (31,29%), e nos clones não-identificados (30,73%), a 5%.

Quinze bandas anódicas, com mobilidades relativas de 1,02, 1,00, 0,96, 0,92, 0,90, 0,86, 0,80, 0,77, 0,74, 0,71, 0,68, 0,65, 0,61, 0,57 e 0,51 permitiram a diferenciação de 12 padrões isoenzimáticos de aspartato transaminase, com variação de uma a cinco bandas por padrão (Fig. 1). Segundo Gottlieb (1982), geralmente, três ou quatro isoenzimas estão associadas a essas bandas anódicas de aspartato transaminase.

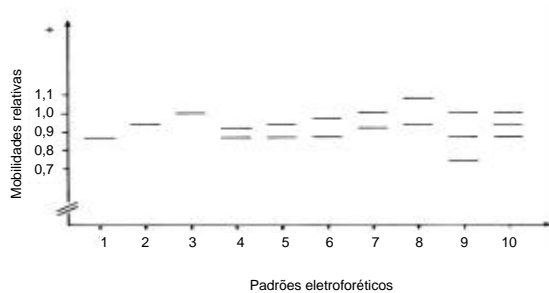
Dez padrões eletroforéticos foram observados para isocitrato desidrogenase, através de sete bandas anódicas e polimórficas, de mobilidades relativas de 1,08, 1,00, 0,97, 0,94, 0,92, 0,87 e 0,74, variando de uma a três por padrão (Fig. 2). Waara et al. (1989), por meio de eletroforese horizontal em gel de amido, detectaram o mesmo número de bandas nas isoenzimas anódicas de isocitrato desidrogenase em folhas de híbridos somáticos e parentais de *S. tuberosum*.

Os clones foram classificados em dois grupos, de acordo com maiores ou menores teores de matéria



**FIG. 1. Padrões eletroforéticos de aspartato transaminase: 1) clones 2, 56, 65, 67, 69; 2) clones 139, 141; 3) clones 131, 142, 143; 4) clones 25, 36, 54, 78; 5) clones 71, 119, 150, 166, 168; 6) clones 7, 8, 55, 62, 113, 176, 196, 199, 200, 222; 7) clone 108; 8) clone 53; 9) clones 117, 118, 120; 10) clones 64, 109; 11) clone 68; 12) clone 158.**

seca, utilizando-se, inicialmente, o critério de separá-los em função da mediana (32,00) dos dados do ex-



**FIG. 2. Padrões eletroforéticos de isocitrato desidrogenase:** 1) clones 55, 56, 64, 67, 69, 108, 109, 113, 176; 2) clones 68, 158; 3) clones 71, 131, 142, 143, 166; 4) clones 2, 25, 62, 199; 5) clones 168, 196, 200, 222; 6) clones 7, 8, 53, 65; 7) clones 36, 54, 117, 118, 119, 120; 8) clone 78; 9) clone 150; 10) clones 139, 141.

perimento. Posteriormente, verificou-se que alguns valores próximos à mediana não diferiam entre si (teste de Duncan,  $\alpha = 0,05$ ). Estabeleceu-se, então, uma faixa de valores mais discriminatória dos dois grupos, ou seja, valores iguais ou maiores de 32,43, em relação aos clones que apresentaram maiores teores, e os iguais ou menores que 31,56, em relação aos que continham menores teores de matéria seca. As médias de 32,43 e 31,56 diferem entre si e se encontram equidistantes da mediana calculada.

A associação dos grupos de clones com a banda de mobilidade relativa 1,00 de aspartato transaminase apresentou um valor de  $\chi^2 = 14,6$ , altamente significativo ( $\chi^2_{0,05;1} = 3,84$ ;  $\chi^2_{0,01;1} = 6,64$ ) (Tabela 5). No caso da associação dos clones com a banda de mobilidade 1,00 de isocitrato desidrogenase, o valor obtido foi  $\chi^2 = 7,7$ , também altamente significativo (Tabela 6).

**TABELA 5. Número de clones de *Solanum* spp. com teores de matéria seca iguais ou superiores a 32,43% ou iguais ou inferiores a 31,56%, na presença ou ausência da banda de mobilidade relativa 1,00 de aspartato transaminase.**

Teor de matéria seca dos clones	Número de clones				Total
	Presença da banda		Ausência da banda		
	Observado	Esperado	Observado	Esperado	
Matéria seca $\geq 32,43$	1	7	17	11	18
Matéria seca $\leq 31,56$	13	7	5	11	18
Total	14	14	22	22	36

**TABELA 6. Número de clones de *Solanum* spp. com teores de matéria seca iguais ou superiores a 32,43% ou iguais ou inferiores a 31,56%, na presença ou ausência da banda de mobilidade relativa 1,00 de isocitrato desidrogenase.**

Teor de matéria seca dos clones	Número de clones				Total
	Presença da banda		Ausência da banda		
	Observado	Esperado	Observado	Esperado	
Matéria seca $\geq 32,43$	2	6,5	16	11,5	18
Matéria seca $\leq 31,56$	11	6,5	7	11,5	18
Total	13	13,0	23	23,0	36

## CONCLUSÃO

Existe associação significativa entre o teor de matéria seca e as bandas de mobilidade relativa 1,00 de aspartato transaminase e de isocitrato desidrogenase; esses resultados possibilitam importantes seleções precoces de clones de batata com alto teor de matéria seca para utilização em futuros trabalhos de melhoramento.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela concessão de bolsas; ao pesquisador Delorge Mota da Costa, responsável pela coleta e manutenção dos clones de batata silvestre, pelo fornecimento de folhas e tubérculos para análise; a Ema Gladis Schultz Corrêa e Claiton Amaral Kuhn, pelo apoio técnico.

## REFERÊNCIAS

- AKELEY, R.V.; MILLS, W.R.; CUNNINGHAM, C.E.; WATTS, J. Lenape: a new potato variety high in solids and chipping quality. **American Potato Journal**, Orono, v.45, n.4, p.142-145, 1968.
- ALMEIDA, L.A.S.B. de; GASPARINO FILHO, J.; PASCHOALINO, J.E.; BENBERNHARDT, L.W.; CANTO, W.L. do. **Batata pré-frita e hortaliças congeladas: economia e industrialização**. São Paulo : Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1983. 90p. (ITAL. Estudos Econômicos. Alimentos Processados, 18).
- AYALA, F.J.; POWELL, J.R.; TRACEY, M.L.; MOURÃO, C.A.; PÉREZ-SALAS, S. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. **Genetics**, Bethesda, v.70, p.113-139, 1972.
- COSTA, D.M.; PEREIRA, A. da S. Criação de cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) para mesa e processamento. In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA COM BATATA EM SANTA CATARINA E NO RIO GRANDE DO SUL, 2., 1995, Araranguá. **Relatórios**. Pelotas : Embrapa-CPACT, 1996. p.8-10.
- DOUCHES, D.S.; LUDLAM, K. Electrophoretic characterization of North American potato cultivars. **American Potato Journal**, Orono, v.68, p.767-780, 1991.
- DOUCHES, D.; SCHROETER, B.; LUDLAM, K.; HICKS, K. Allelic diversity among the *Solanum* species, sect Petota. **American Potato Journal**, Orono, v.66, n.8, p.517, 1989.
- GOTTLIEB, L.D. Conservation and duplication of isozymes in plants. **Science**, Washington, v.216, p.373-380, 1982.
- GOULD, W.A. Quality of potatoes for chip manufacture. In: SYMPOSIUM ON POTATO QUALITY INDUSTRY NEEDS FOR GROWTH, 1988, Fort Collins. **Proceedings**. Fort Collins : The Potato Association of America, 1988. p.10-20.
- HAWKES, J.G.; HJERTING, J.P. **The potatoes of Argentina, Brasil, Paraguai and Uruguay**. Oxford : Claredon, 1969. 525p.
- MEDINA-FILHO, H.P. **Eletroforese em gel de amido: aplicações em genética e melhoramento de plantas**. Campinas : Instituto Agronômico, 1983. 15p. (IAC. Circular, 121).
- MENDOZA, H.A. Mejoramiento poblacional: una estrategia para la utilización del germoplasma de papa cultivada primitiva y especies silvestres. In: HIDALGO, O.A.; RINCÓN, H.R. (Ed.). **Avances en el mejoramiento genético de la papa en los países del cono sur**. Lima : Centro Internacional de la Papa, 1990. p.47-62.
- NICHOLS, E.A.; RUDDLE, F.H. Review of enzyme polymorphism, linkage and electrophoretic conditions for mouse and somatic all hybrids in starch gels. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Seattle, v.21, n.12, p.1066-1081, 1973.
- OLIVER, J.L.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. A genetic classification of potato cultivars based on allozyme patterns. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.69, p.305-311, 1985.
- POPE, L.R.; BEDFORD, C.L.; THOMPSON, N.R. Processing characteristics of *Solanum tuberosum* – *S. stoloniferum* hybrids. **American Potato Journal**, Orono, v.48, p.403-409, 1971.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v.3, p.37-79, 1969.
- SHIELDS, C.R.; ORTON, T.J.; STUBER, C.W. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from

- plant tissue. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam : Elsevier, 1983. part A, p.443-468.
- SILVA, A.C.F. da; SOUZA, Z.S.; MÜLLER, J.V.; VIZZOTTO, V.J.; REBELO, J.A.; ZANINI NETO, J.A.; COSTA, D.M. da; BERTOCINI, O. EPAGRI 361 - Catucha: nova cultivar de batata, especial para fritar. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.14, n.1, p.61-62, 1996.
- SOLLER, M.; PLOTKIN-HAZAN, J. The use of marker alleles for the introgression of linked quantitative alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.51, p.133-137, 1977.
- TANKSLEY, S.D.; MEDINA-FILHO, H.; RICK, C.M. The effect of isozyme selection on metric characters in an interspecific backcross of tomato: basis of an early screening procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.60, p.291-296, 1981.
- TANKSLEY, S.D.; MEDINA-FILHO, H.; RICK, C.M. Use of naturally occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. **Heredity**, Oxford, v.49, n.1, p.11-25, 1982.
- VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam : Elsevier, 1983. Part A, p.469-515.
- WAARA, S.; TEGELSTRÖM, H.; WALLIM, A.; ERICKSSON, T. Somatic hybridization between anther derived dihaploid clones of potato (*Solanum tuberosum* L.) and the identification of hybrid plant by isozyme analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.77, p.49-56, 1989.