

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

QUALIDADE DE PROCESSAMENTO E
MARCADORES ISOENZIMÁTICOS EM
GENÓTIPOS DIPLÓIDES E TETRAPLÓIDES DE
BATATA (*Solanum tuberosum* L.)

TIAGO FAZOLO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, março de 2008

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

QUALIDADE DE PROCESSAMENTO E
MARCADORES ISOENZIMÁTICOS EM
GENÓTIPOS DIPLÓIDES E TETRAPLÓIDES DE
BATATA (*Solanum tuberosum* L.)

TIAGOFAZOLO

Orientador: Prof. Dra. Maria Irene Baggio

Co-orientador: Dr. Sandro Bonow

Colaboração: Prof. Dra. Lizete Augustin

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, março de 2008

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Passo Fundo, por ter oportunizado e oferecido as condições necessárias para realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o curso.

À professora Dra. Maria Irene Baggio, pela orientação, amizade, confiança, carinho, dedicação e apoio, através do CNPq para a realização dos trabalhos de pesquisa.

À Embrapa Clima Temperado que, através do Dr. Sérgio Delmar dos Anjos e Silva e da técnica de laboratório Ema Gladis Schultz Corrêa propiciaram o treinamento inicial na técnica da eletroforese.

Ao Dr. Sandro Bonow, pela co-orientação, e cordialidade com que sempre me atendeu.

À professora Dra. Lizete Augustin, pela colaboração e apoio constante e pelo fornecimento dos clones utilizados na pesquisa.

Aos professores do curso, pela amizade e acima de tudo pela contribuição de cada um na construção do conhecimento.

Aos estagiários, Larissa Giroto, Marlise Valiati e Marcus Vinícius de Oliveira Freitas, que sempre estiveram disponíveis para colaborar em diferentes etapas do trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal MSc. Marilei Suzin pela ajuda na estatística e Clarício Machado dos Santos pela ajuda.

À minha mãe Lydia Fazolo, meu pai Alberto Fazolo e minha irmã Verena Fazolo que sem dúvida acreditaram e me deram

todo auxílio que precisei durante mais essa etapa vencida da minha vida.

Aos meus amigos que souberam compreender e respeitar a minha ausência e nunca deixaram que isso abalasse de forma alguma a nossa amizade.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho.

À Deus, pela oportunidade de estar no mundo e neste momento realizando mais um dos meus sonhos. Agradeço por ter uma família maravilhosa, saúde e proteção constante durante este caminho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO	1
ABSTRACT.....	3
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Classificação botânica e origem da batata.....	7
2.2 Importância econômica.....	10
2.3 Importância para a alimentação humana.....	11
2.4 Histórico do processamento.....	11
2.5 Importância econômica do processamento.....	11
2.6 Características para o processamento.....	13
2.7 Estratégias para o melhoramento através de cruzamentos e de marcadores bioquímicos.....	15
2.7.1 Marcadores isoenzimáticos.....	16
2.7.1.1 Peroxidase (PRX).....	19
2.7.1.2 Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT)	20
2.7.2 Cruzamentos interespecíficos.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Avaliação das características de qualidade no processamento.....	23
3.1.1 Teores de massa seca.....	24
3.1.2 Coloração dos chips.....	24
3.1.3 Teores de açúcares redutores.....	25
3.2 Análise de isoenzimas.....	26
3.2.1 Cultivo do material.....	27
3.2.2 Obtenção das amostras.....	28
3.2.3 Preparo dos tampões e géis.....	28
3.2.4 Preparo das amostras.....	29
3.2.5 Aplicação das amostras.....	30
3.2.6 Eletroforese.....	31
3.2.7 Revelação do gel e armazenamento da imagem.....	32
3.2.7.1 Peroxidase (PRX).....	32
3.2.7.2 Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT)....	33
3.2.8 Avaliação dos géis.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
4.1 Avaliação das características de qualidade de processamento.....	34

4.2 Análise de isoenzimas.....	39
5 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Médias de teor de massa seca, coloração dos chips (L) em 36 genótipos selecionados de batata.	36
2	Teores de açúcares redutores de 36 genótipos selecionados de batata.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Evolução das plantas de batata cultivadas e seus níveis de ploidia.....	8
2	Etapas da preparação dos géis.....	29
3	Estádio da coleta das amostras.....	30
4	Etapas para o preparo e aplicação das amostras.....	31
5	Comparação da coloração dos chips em relação ao valor de L.....	36
6	Zimograma representando diferentes padrões de bandas de PRX em diferentes genótipos de batata que obtiveram teores altos e baixos de massa seca, antes da floração e em plena floração, com suas respectivas mobilidades relativa.....	40
7	Zimograma representando diferentes padrões de bandas de PRX em diferentes genótipos de batata que obtiveram maiores e menores valores de L, antes da floração e em plena floração, com sua respectivas mobilidades relativa.....	42
8	Zimograma representando diferentes padrões de banda de PRX em diferentes genótipos de batata que obtiveram altos e baixos teores de açúcares redutores, antes da floração e em plena floração, com sua respectiva mobilidade relativa.....	44
9	Zimograma representando diferentes padrões de bandas de GOT em diferentes genótipos de batata que obtiveram teores altos e baixos de massa seca, antes da floração e em plena floração, com suas respectivas mobilidades relativa.....	46
10	Zimograma representando diferentes padrões de bandas de GOT em diferentes genótipos de batata que obtiveram maiores e menores valores de L, antes da floração e em plena floração, com suas respectivas mobilidades relativa.....	47
11	Zimograma representando diferentes padrões de bandas de GOT em diferentes genótipos de batata que obtiveram altos e baixos teores de açúcares redutores, antes da floração e em plena floração, com suas respectivas mobilidades relativa.....	48

**QUALIDADE DE PROCESSAMENTO E
MARCADORES ISOENZIMÁTICOS EM
GENÓTIPOS DIPLÓIDES E TETRAPLÓIDES DE
BATATA (*Solanum tuberosum* L.)**

**TIAGO FAZOLO¹, MARIA IRENE BAGGIO², SANDRO
BONOW³, LIZETE AUGUSTIN⁴ E MARLISE VALIATI⁵**

RESUMO - A batata (*Solanum tuberosum* L.) é o quarto alimento mais consumido no mundo, devido ao seu baixo preço e sua versatilidade gastronômica. O aumento do consumo de produtos pré-fritos e chips vêm fazendo com que as indústrias selecionem materiais de genótipos com características mais apropriadas para o processamento, como teores de massa seca (acima de 20%), coloração dos chips (claros) e teores de açúcares redutores (abaixo de 0,3%). A produção, no Brasil, de produtos destinados ao processamento é muito baixa devido a não disponibilidade de matérias-primas adequadas para essa finalidade. Os marcadores isoenzimáticos são ferramentas para predição rápida das características relacionadas à qualidade, apresentando um grande potencial que tem sido pouco explorado, e que poderia resultar em menor tempo para a seleção de genótipos

¹ Biólogo, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Produção Vegetal.

² Orientadora, Dra. Em Ciências: Genética, Professora do PPGAgro/UPF - mirenebaggio@upf.br

³ Co-orientador, Eng.-Agr., Dr. Pesquisador da Embrapa Trigo

⁴ Colaboradora, Eng.-Agr., Dra. Professora da FAMV/UPF

⁵ Colaboradora, Acadêmica da Faculdade de Agronomia da FAMV/UPF, Bolsista PIBIC/UPF

superiores. Os objetivos deste trabalho foram determinar a qualidade de processamento em clones diplóides de batata visando futuros cruzamentos interespecíficos, identificar o estágio mais adequado para a análise isoenzimática e observar a existência de associação das isoenzimas peroxidase (PRX) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) com características de qualidade industrial para o processamento. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e no Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) da Universidade de Passo Fundo em 36 genótipos selecionados. Para a qualidade das características foram avaliados os teores de massa seca, coloração dos chips e açúcares redutores, e na associação das isoenzimas com as características de qualidade, foram avaliados dois sistemas enzimáticos (PRX e GOT). Os clones diplóides apresentaram boas características para o processamento; o estágio mais adequado para análise isoenzimática foi o de plena floração, e para as características de qualidade tanto a PRX quanto a GOT não apresentaram indicação de associação com a massa seca, coloração dos chips e açúcares redutores.

Palavras-chaves: massa seca, coloração dos chips, açúcares redutores, peroxidase, glutamato oxaloacetato transaminase.

**PROCESSING QUALITY AND ISOZYMES
MARKERS IN DIPLOIDS AND TETRAPLOIDS
POTATO (*Solanum tuberosum* L.) GENOTYPES**

ABSTRACT – Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth consumed food worldwide because of its lower price and gastronomic versatility. The increasing use of pre-fried and chips made the industry select materials from better genotypes for processing quality like dry mass levels (above 20%), chip color and reducing sugars (below 0,3%). In Brazil, the potato production for industrial processing is very low because there is no availability of raw material. Isozymes makers may be used as tools for rapid prediction of processing quality characteristic and could be explored for selection of better genotypes. The objective of this study were to determine the quality of processing in potato diploid clones for future interspecific crosses, identify the better developmental stage for isozymes observation and investigate if there is association between peroxidase isozymes (PRX) and glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and better processing quality for industry. The research was done in the Laboratory for Plant Biotechnology and in the Center for Food Research (CEPA) of University of Passo Fundo in 36 selected genotypes for low and high processing quality. The dry mass levels, chips coloration and reducing sugars were determined and two enzymatic systems (PRX e GOT) were analysed. Diploid clones presented good characters for processing quality justifying future interspecific crosses. The flowering stage was the more indicated for isoenzyme analysis. PRX

and GOT systems did not presented statistic association with dry mass, chips color and reducing sugars.

Key words: dry mass, chips color, reducing sugars , peroxidase, glutamate oxaloacetate transaminase.

1 INTRODUÇÃO

A industrialização da batata vem crescendo em todo mundo, principalmente para produtos que podem ser consumidos diretamente, como chips e batata palha, ou prontos para serem preparados como a batata pré-frita (ZORZELLA et al., 2003b). Com o aumento do consumo de batata na forma processada, as indústrias têm demandado novas cultivares, que proporcionem um produto final de boa qualidade, como altos teores de massa seca e baixos teores de açúcares redutores. No Brasil, o tipo industrializado predominante é o *chips* (SILVA, 1991). A análise isoenzimática é uma das técnicas de marcadores bioquímicos que vêm sendo utilizada desde a década de 60 e visa investigar as diferentes formas moleculares (alelos) que uma determinada enzima pode apresentar (MARKET & MOLLER, 1959). O uso das isoenzimas para a predição rápida das características relacionadas à qualidade em batatas tetraplóides, apresenta um potencial ainda inexplorado na sua totalidade e que poderia resultar num aumento da eficiência da seleção, no melhoramento varietal, diminuindo o tempo para desenvolver genótipos superiores (ANDREU & PEREIRA, 2004). Estudos com marcadores isoenzimáticos, associados com caracteres quantitativos em batata, foram realizados por Rocha et al. (2000), que observaram uma associação significativa entre o teor de massa seca e as bandas de aspartato transaminase e de isocitrato desidrogenase, em batatas diplóides. Os marcadores isoenzimáticos podem ser uma ferramenta valiosa para incrementar os valores de herdabilidade, em um programa de melhoramento, facilitando a eliminação de genótipos indesejados,

pelo uso de altas intensidades de seleção nas primeiras gerações (ANDREAU & PEREIRA, 2004). Andreau & Pereira (2004), encontraram associação significativa, em batatas tetraplóides entre a cor dos chips e a banda de mobilidade relativa 1,00 da enzima glutamato oxaloacetato transaminase, indicando a possibilidade de seleção precoce para este caráter. Por outro lado, não foi encontrada associação significativa com o conteúdo de massa seca. Os objetivos deste trabalho foram: 1) determinar a qualidade de processamento em clones diplóides de batata visando cruzamentos interespecíficos; 2) identificar o estágio mais adequado para a análise isoenzimática; 3) observar a existência de associação das isoenzimas peroxidase (PRX) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) com características de qualidade industrial para o processamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação botânica e origem da batata

A batata é uma planta dicotiledônea, pertencente à família *Solanaceae*, gênero *Solanum*, que contém mais de 2.000 espécies, das quais pouco mais de 150 são produtoras de tubérculos. Aproximadamente 200 espécies silvestres e 20 cultivadas são conhecidas. A espécie *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* é a mais importante economicamente, cultivada em, pelo menos, 140 países. As espécies diplóides tem um papel importante nos programas de melhoramento por possuírem grande variabilidade genética, sendo geralmente utilizadas para introduzir genes de interesse agrônômico (FORTES & PEREIRA, 2003).

Taxonomicamente são classificadas como diplóides, triplóides, tetraplóides, pentaplóides e hexaplóides, em relação ao seu grau de ploidia. Correspondem ao grupo das diplóides ($2n=2x=24$), triplóides ($2n=3x=36$), tetraplóides ($2n=4x=48$), pentaplóide ($2n=5x=60$) e hexaplóides ($2n=6x=72$) (BISOGNIN, 2003).

Essas espécies, sete delas cultivadas, formam uma série poliplóide com um número básico de $x=12$, variando de diplóide a hexaplóide. Muitas são semelhantes entre si e, por esta razão, foram classificadas por Dodds (1962) apud CHOER (2003), como grupos de *S. tuberosum*. Sua evolução mais provável é mostrada na figura 1.

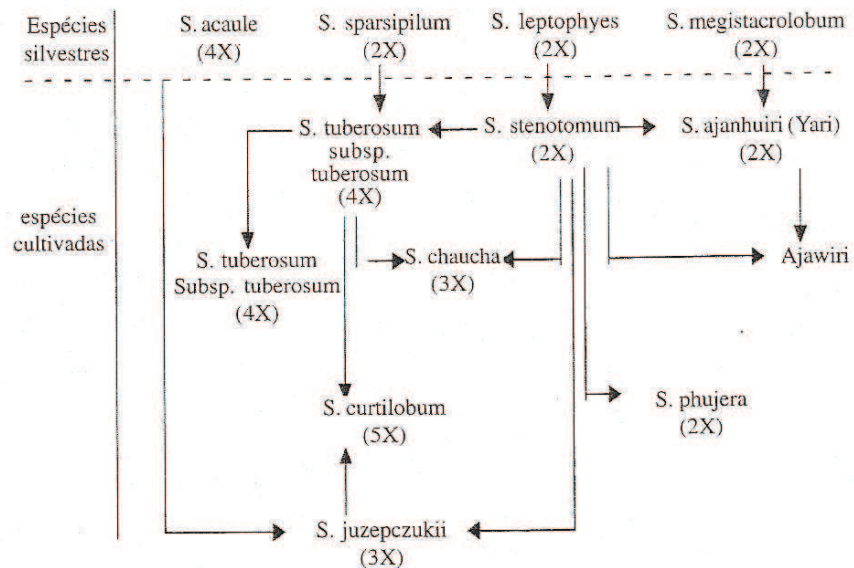


Figura 1 - Evolução das plantas de batata cultivada e seus níveis de ploidia (Fonte: Hawkes, 1993 apud CHOER, 2003).

A batata é uma planta perene, embora seja cultivada como bianual na Região Sul do Brasil. De acordo com a cultivar, o ciclo vegetativo pode ser considerado precoce (< 90 dias), médio (90-110 dias) ou longo (> 110 dias) (FORTES E PEREIRA, 2003).

A batata provavelmente teve como centro de origem os Andes, do sul do Peru ao norte da Bolívia, onde parentais silvestres ainda existem. Restos arqueológicos de batata e de outra cultura de tubérculos foram datados, por meio de carbono radioativo, como estando presentes há mais de 7.000 anos (HAWKES, 1994).

Vavilov (1951) apud CHOER (2003), considera que a batata cultivada teve dois centros de origem: Chiloé (arquipélago ao sul do Chile), onde, junto com a batata cultivada (*Solanum tuberosum*), estão a manga (*Bromus mango*) e o morango (*Fragaria chiloensis*); e

Equador, Peru e Bolívia, onde estão a batata cultivada andina (*Solanum tuberosum andigenum*) e espécies produtoras de tubérculos tais como, *Oxalis tuberosa*, *Tropaeolum tuberosum*, *Ullucus tuberosus*, *Polymnia sonchifolia*, *Xanthosoma sagittifolium*, *Canna edulis*, *Arracacia xanthorrhizal* e outras plantas úteis. Para Vavilov, o centro de origem de uma espécie cultivada seria onde se encontra maior variação das formas cultivadas e as espécies silvestres correspondentes, assim como marcado endemismo fitogeográfico.

Ao final do século XVI conquistadores espanhóis invadiram o Império Inca em busca de riquezas. No entanto, jamais poderiam imaginar, que levariam para a Europa e os demais continentes um bem muito mais precioso: a batata andina. Esta foi disseminada pelos navegadores espanhóis e ingleses para as colônias – origem da denominação de “batata inglesa”. Entretanto, foram os incas e outros povos indígenas que, durante oito milênios, desenvolveram a bataticultura, utilizando espécies andinas. Técnicas eficientes de produção tornaram a batata o principal produto agrícola, bem como a base da alimentação na civilização Inca. Assim, foram selecionados tipos variados para os diversos usos na alimentação, alguns ainda hoje encontrados em países andinos (FILGUEIRA, 2005).

Atualmente a espécie que é cultivada em maior escala é a *Solanum tuberosum ssp. Tuberosum*. As demais, normalmente, têm seu cultivo limitado às próprias regiões de origem, em geral regiões andinas, não sendo adaptadas às condições brasileiras, embora muitas delas, assim como as silvestres, sejam importantes fontes de

resistência, podendo ser usadas no melhoramento genético (FORTES & PEREIRA 2003).

2.2 Importância econômica

Em 2005 a produção da batata ultrapassou os 323 milhões de toneladas (FAO, 2008). O Brasil produziu, no ano de 2006, aproximadamente 3,1 milhões de toneladas enquanto que em 2007 a expectativa era de aproximadamente 3,4 milhões de toneladas, ou seja um superávit de 300 mil quilos. A área produzida em 2006 foi de aproximadamente 141 mil hectares enquanto que em 2007 a expectativa era de aproximadamente 143 mil hectares, ou seja, também houve um superávit de 2 mil hectares (IBGE, 2008). O contínuo aumento da produção é uma resposta frente à forte demanda de batata para consumo “*in natura*” e processada (ANDREAU, 2003).

No Rio Grande do Sul a produção anual foi de 332,581 toneladas em 2006 em uma área aproximada de 24 mil hectares. Estes resultados revelam que o Rio Grande do Sul possui 10,72% da produção nacional e 17% da área cultivada. Esta diferença é provocada devido ao alto custo por hectare desta cultura. Contudo o Rio Grande do Sul está ainda em quarto lugar em produção, estando atrás apenas de Minas Gerais, São Paulo e Paraná (BISOGNIN, 2006a).

2.3 Importância para a alimentação humana

A batata é o quarto alimento mais importante cultivado mundialmente depois do trigo, milho e arroz e produz uma maior quantidade de alimento por hectare do que cada um dos três cereais referidos acima (FAO, 2008). É um dos alimentos mais nutritivos para o homem, possuindo proteína de boa qualidade e índice de valor biológico alto. A relação entre proteínas e calorias disponíveis indica que ela poderá ser uma das melhores alternativas alimentares para os povos dos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Apresenta, em média, 2,1% de proteína total, que significa cerca de 10,4% do peso seco do tubérculo. Isto pode ser considerado excelente se levarmos em conta que o trigo e o arroz apresentam valores na ordem de 13 e 7,5%, respectivamente (ABBA, 2008c).

A batata apresenta uma boa qualidade de proteína e uma rica fonte de energia, sendo também uma importante fonte de vitaminas para a nutrição humana, principalmente ácido ascórbico (vitamina C). As principais vitaminas do complexo B presentes são: tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina e ácido fólico (ABBA, 2008c).

2.4 Histórico do processamento

O processamento da batata é tão antigo como o seu consumo *in natura*. Estudos arqueológicos demonstraram que a maior parte dos povos nativos das montanhas do Peru já processavam o tubérculo desde o século II d.C. Este tipo de preparação facilitava o

transporte e a conservação dos tubérculos, alimento básico e principal fonte de sobrevivência dos povos indígenas. Após a sua introdução na Europa, o processamento da batata foi “redescoberto”, em especial, na forma de fritura, modalidade que se expandiu para o mundo todo, principalmente para a América do Norte, onde adquiriu grande importância. Já na segunda metade do século XX, os EUA destinavam cerca de 46% de sua produção total de batata para o processamento, sendo que grande parte da batata comercializada *in natura* também era consumida na forma de fritura (ANDREU, 2006).

2.5 Importância econômica do processamento

Nos últimos 30 a 40 anos, a industrialização da batata vem aumentando em todas as partes do mundo, principalmente com os produtos chips (consumo imediato) e batata pré-frita congelada devido a sua facilidade e rapidez no preparo final (ANDREAU, 2006).

A tendência mundial é a de aumentar a média anual da porcentagem de consumo de produtos pré-fritos congelados, o que significa um crescimento importante no mercado industrial nos últimos anos e uma previsão de aumento ainda maior para o futuro. A demanda mundial tem demonstrado um crescimento de 13% nos últimos anos, sendo que entre os países do Mercosul, a Argentina é responsável por 63% da demanda. Esta demanda poderia ser explicada pela modernização e a incorporação cada vez maior das mulheres ao mercado de trabalho, adotando novos padrões alimentícios com a tendência ao uso da comida preparada ou de fácil preparação (ANDREAU, 2003).

Na Colômbia, cerca de 170 a 250 mil toneladas de batatas por ano são destinadas à indústria. Segundo um estudo realizado pela federação Colombiana de produtores de batata (FEDEPAPA), as indústrias de grande porte, processam cerca de 250 toneladas de batatas diariamente, as de médio porte entre 60 e 150 toneladas e as de pequeno porte, cerca de 15 toneladas (MORENO, 2000).

Nos Estados Unidos e Holanda, 60% da produção de batata é destinada ao processamento industrial, enquanto no Brasil é, apenas, de 1,5 a 2,0%. O crescimento do consumo de produtos industrializados de batata no Brasil tem sido limitado quase que exclusivamente pela não disponibilidade de matérias-primas adequadas à industrialização, sendo que o aumento de demanda está sendo suprido pelas importações crescentes (VENDRUSCOLO, 1998)

2.6 Características para o processamento

O Brasil possui um mercado consumidor potencial para a batata processada industrialmente na forma de fritura, mas para atender a essa demanda, são necessários cultivares que satisfaçam alguns padrões de qualidade. Essas cultivares devem possuir componentes de qualidade interna muito importantes que fazem a boa culinária, como altos teores de matéria seca e baixas concentrações de açúcares redutores (ANDREU, 2006).

A massa seca está diretamente relacionada com o rendimento, pois quanto menor for o teor de água nos tubérculos menor será a absorção de óleo durante a fritura, conseqüentemente, maiores teores de massa seca representarão produtos mais econômicos

e de melhor qualidade. (Pereira, 1987; Lewis, Lancaster, Meredith *et al.*, 1994 apud ANDREU e PEREIRA, 2004). O teor ideal de matéria seca para a industrialização é de 20%. As indústrias preferem variedades com um alto teor de amido, pois sua relação é direta com o conteúdo de matéria seca (60% - 80% da matéria seca é amido) (MORENO, 2000).

A determinação de açúcares redutores é devida aos açúcares com carbonos anoméricos que não formaram glicosídeos. Os açúcares redutores rapidamente reduzem agentes oxidantes moderados (VOET *et al.*, 2000).

Os teores de açúcares redutores podem variar desde quantidades muito pequenas até mais de 10% de massa seca do tubérculo. Os açúcares redutores tem uma influência significativa nos *chips*, pois influenciam diretamente a cor e o sabor. Açúcares redutores com altos teores produzem *chips* com cor escura e de sabor amargo, por isso a indústria necessita de variedades que contenham baixos teores de açúcares redutores (ANDRADE, 1997; MORENO, 2000).

O escurecimento enzimático é um sério problema no processamento, causado pela ação catalítica da polifenoloxidase (PFO). Em células intactas de tubérculos, a PFO e substratos fenólicos estão espacialmente separados, mas assim que as células são rompidas a PFO e estes substratos entram em contato. Na presença de oxigênio molecular, a PFO catalisa a oxidação de compostos fenólicos e, eventualmente, estes levam a formação de produtos coloridos indesejáveis. O escurecimento resulta não somente numa indesejável formação de cor, mas também pode resultar na perda da qualidade

nutricional e proporcionar modificações no sabor (ZORZELLA et al., 2003a).

2.7 Estratégias para o melhoramento através de cruzamentos e de marcadores bioquímicos

O melhoramento da batata visa minimizar a grande dependência de cultivares estrangeiras, que resulta nos baixos rendimentos obtidos na região sul do Brasil. As cultivares estrangeiras que possuem melhores características de qualidade de tubérculo são pouco adaptadas às diferentes regiões de cultivo. Por isto o agricultor necessita de um grande investimento para a produção, pois são suscetíveis às principais doenças como a requeima (*Phytophthora infestans*) e pinta-preta (*Alternaria solani*). Grande parte das cultivares nacionais são adaptadas as condições ecológicas da região, mas apresentam características que limitam a aceitação no mercado, como a baixa qualidade de tubérculo para a indústria de processamento (BISOGNIN, 2006b).

As dificuldades enfrentadas pela cultura, no sul do Brasil, são principalmente devidas a alguns fatores ambientais, que limitam a expressão do seu potencial produtivo. Entre esses fatores estão a temperatura acima do ideal em determinadas épocas e regiões de cultivo, a alta pressão de inóculo, causando sérios problemas fitossanitários ao longo de todo o ano e a falta de cultivares nacionais mais resistentes com qualidade industrial desejável (PINTO, 1999).

2.7.1 Marcadores isoenzimáticos

Marcadores isoenzimáticos são produtos da expressão de genes, sendo identificados através de enzimas específicas visando uma reação específica que permita distinguir definidas enzimas de demais componentes do gel, em especial diante de quaisquer outras proteínas. Estes marcadores proporcionam ao pesquisador grande facilidade, pois a obtenção de produtos é evidenciado pela simples observação a olho nu (BRUNE et al., 1998).

Eletroforese é uma técnica que visa a separação de moléculas em função de suas cargas elétricas, de seus pesos moleculares e de suas conformações, em suportes porosos e tampões adequados, sob influência de um campo elétrico. Moléculas com cargas negativas migram, no campo elétrico, para o pólo positivo (ânodo), e moléculas com cargas positivas migram para o pólo negativo (cátodo) (BRUNE & ALFENAS, 2006). O pH do tampão é decisivo na apresentação da carga da substância. Se uma substância é de origem protéica e apresenta um ponto isoelétrico (pI), a migração só ocorrerá se o pH for diferente do pI. Em uma curva de mobilidade de um anfólito tipo proteína em função do pH do meio da corrida eletroforética é percebido valores de $\text{pH} > \text{pI}$ fazem a proteína se comportar como um anionte, migrando para o ânodo, enquanto que valores de $\text{pH} < \text{pI}$ fazem a proteína se comportar como um cationte e migrar para o cátodo. Porém, se o pH é igual ao pI ou apresentar valores próximos a este, não haverá migração eletroforética (SILVA, 2001).

A eletroforese de proteínas é geralmente realizada em géis feitos de polímeros entrecruzados de poliacrilamida. O gel de poliacrilamida funciona como uma peneira molecular, reduzindo a velocidade de migração das proteínas de acordo com o peso molecular, de cada uma delas. As proteínas podem ser visualizadas depois da eletroforese pelo tratamento do gel, de acordo com o sistema enzimático utilizado (LEHNINGER, 2000).

Eletroforese de proteínas tem comprovado que não é útil somente na discriminação entre espécies e de híbridos interespecíficos, mas também entre grupos. Tanto o sistema enzimático das esterases e das peroxidases tem sido utilizado na caracterização de cultivares (DESBOROUGH & PELOQUIN, 1968, 1971).

Sýkorová e Matejová (2006) constataram, através de um trabalho realizado com 25 variedades de batatas selecionadas que métodos de caracterização de variedades de batata por meio de eletroforese podem ser adequadamente aplicadas, tanto no melhoramento, como no controle de variedades.

Isoenzima é um termo geral que se refere às diferentes formas bioquímicas de uma enzima, as quais podem ser identificadas por migração e coloração em gel (PINTO et al., 2001).

As isoenzimas são diferentes formas moleculares de uma enzima catalisando a mesma reação na célula. Quando as isoenzimas são controladas por alelos de um único loco, elas são chamadas de aloenzimas. Estas representam a consequência bioquímica da substituição, deleção ou adição de um ou mais aminoácidos no polipeptídeo, afetando a sua carga elétrica e, conseqüentemente, a sua

mobilidade durante a eletroforese. A mobilidade da molécula através do gel depende também do seu peso molecular e da sua conformação. Após a separação das isoenzimas por eletroforese, elas são identificadas por meio de reações químicas baseadas em suas atividades catalíticas específicas. Nesse processo são fornecidos os substratos e os co-fatores necessários à reação da enzima *in vitro*, além de compostos que, por meio de uma reação secundária, formam produtos coloridos e insolúveis que permitem identificar exatamente a sua posição no gel. O conjunto de bandas coloridas que as isoenzimas formam no gel é denominado zimograma (ROBINSON, 2006).

A eletroforese de isoenzimas surgiu como uma nova fonte de marcadores genéticos capazes de identificar indivíduos homozigotos e heterozigotos. Até então, a genética se valia em suas investigações de um número limitado de caracteres morfológicos de herança mendeliana, como, por exemplo, a cor das flores, como marcadores. Sem dúvida, as isoenzimas contribuíram para avanços expressivos na genética, principalmente na área da genética de populações, revelando uma quantidade significativa de variação nos mais diferentes organismos (PINTO et al., 2001).

A técnica de isoenzimas consiste de três etapas: extração das enzimas do tecido vegetal, separação por eletroforese e coloração por métodos histoquímicos. Para a extração, as amostras são homogeneizadas, de preferência no gelo, em soluções tampões contendo antioxidantes, estabilizadores osmóticos e agentes que atuam sobre fenóis, com vistas a preservar a atividade das enzimas. A escolha de um único tecido (coleóptilo, folha ou raiz), em um mesmo

estádio de desenvolvimento, é essencial para se compararem diferentes indivíduos (PINTO et al., 2001).

A eletroforese horizontal tem sido usado para análise genética para confirmar a herança de vários loci de isoenzimas e informar sobre a incorporação de loci de espécies diplóides de batata em clones tetraplóides cultivados (DOUCHES et al., 1988).

Isoenzimas são marcadores de tipo co-dominante, o que possibilita a identificação de todos os alelos (variantes) para um mesmo gene (MALONE et al., 2007).

Seu uso tem contribuído muito para caracterização de cultivares na soja (ANTI, 2000), arroz (BONOW et al., 2001), batata-doce (OLIVEIRA et al., 2002), batata (ROCHA et al., 2001), bananeira (ULISSES et al., 2002), mandioca (SCHIMIDT et al., 2003).

2.7.1.1 Peroxidase (PRX)

O papel da peroxidase (PRX) está associado na lignificação da parede celular, oxidação do ácido indol acético, do etileno e participação no processo de dormência das sementes, sendo que em alguns casos o seu efeito pode ser acentuado quando associado a fatores bióticos e abióticos (Bewley & Black, 1994, apud MENEZES et al., 2004).

A atividade desta enzima, que utiliza H_2O_2 para oxidar grande número de doadores de hidrogênio é controlada por um gene dominante. A alta atividade resulta de pelo menos um alelo dominante, enquanto que a baixa atividade significa a presença do par

recessivo. Esta atividade varia entre as cultivares de soja e é utilizada como técnica alternativa ou complementar na identificação de cultivares (MENEZES et al., 2004).

2.7.1.2 Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT)

A enzima glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) tem uma importante participação em reações de transaminação, durante a eliminação do nitrogênio (N) dos aminoácidos e na formação de grupos “ceto” para o Ciclo de Krebs e gluconeogênese (Tanksley, 1983 apud, MALONE et al., 2007). Em função de esta enzima estar diretamente envolvida no metabolismo do N, é possível que variações ocorram à medida que acontece a síntese e degradação de aminoácidos durante o processo de germinação. Sem dúvida, a enzima GOT tem uma participação fundamental no metabolismo protéico, não somente durante a germinação, mas, durante todo o ciclo de vida da planta (MALONE et al., 2007).

2.7.2 Cruzamentos interespecíficos

A reprodução da batata é assexuada, ou seja, as plantas originam-se de tubérculos, que são chamados clones. Plantas do mesmo clone são teoricamente idênticas entre si e à planta que lhes deu origem. A reprodução assexuada pode facilitar o trabalho do melhorista, pois, identificado um tipo superior, ele pode ser perpetuado, mantendo sua identidade genética. A batata, por ser autopoliplóide, apresenta segregação complexa, mesmo para

caracteres pouco influenciados pelo ambiente (BORÉM & MIRANDA, 2005).

A estreita base genética da batata cultivada é uma das causas dos baixos ganhos em produtividade observados em programas de melhoramento em todo o mundo (SILVA et al., 2003). Estudos baseados em pedigrees, marcadores morfológicos e moleculares confirmam que a batata é caracterizada por restrita variabilidade genética (BISOGNIN, 2003). No entanto, a grande diversidade do germoplasma disponível para a cultura tem possibilitado ampliar esta base genética e, ainda, explorar a heterose, evitando a vulnerabilidade da cultura frente às adversidades ambientais (SILVA et al., 2003).

Vavilov, um dos pioneiros da genética na Rússia, chamou a atenção sobre o potencial que representavam os parentes silvestres das espécies cultivadas, uma vez que as primeiras possuem grande rusticidade e são fontes valiosas de resistência às doenças e pragas, assim como de tolerância às condições adversas de cultivo, porque estas evoluíram naturalmente, diferente das plantas cultivadas que eram e são protegidas pelo homem em ambientes favoráveis e condições de cultivo modificado (LIGARRETO, 2001).

As espécies silvestres que tem estreita relação com as cultivadas são relativamente mais fáceis de cruzar, como regra geral, se considera mais fácil obter híbridos entre espécies do mesmo gênero, embora também dependa da forma como essas espécies evoluíram. Um dos problemas mais comuns dos cruzamentos, ocorre quando estes envolvem espécies com diferentes níveis de ploidia, que na batata vão de diplóide a hexaplóide ($2n=2x=24$ a $2n=6x=72$ cromossomos). Esta barreira pode ser superada de várias maneiras.

Uma delas é através do cruzamento de batatas comerciais tetraplóides com diplóides que produzem gametas não reduzidos ($2n$). Esta estratégia, utilizada no melhoramento para a transferência de genes de um genótipo diplóide para outro tetraplóide, se baseia na ocorrência da poliploidização unilateral que resulta da união de um gameta normal com um não reduzido (RAMSEY & SCHEMSKE, 1998), originando plantas híbridas tetraplóides (LIGARRETO, 2001). A não redução na meiose, por diferentes mecanismos (SALAZAR, 2007) resulta em gametas $2n$ em vez de n , os quais, fertilizando um gameta feminino $2n$, resultante da meiose normal na cultivar tetraplóide, dará uma planta híbrida tetraplóide, portadora do gene desejado.

A poliploidia é caracterizada pela existência de indivíduos ou espécies com números cromossômicos múltiplos do comum na espécie ou no gênero, sendo um fenômeno de extrema importância na evolução das plantas e no melhoramento genético (SCHIFINO-WITTMANN & DALL'AGNOL, 2001).

Bisognin et al. (2005) utilizaram o genótipo diplóide DLB1-150, resistente à requeima, através da poliploidização unilateral, para introduzir genes de resistência na batata cultivada. Os autores relatam que o cruzamento foi viável, havendo formação de sementes, provando desta forma que o genótipo DLB1-150 é produtor e foi doador de pólen $2n$. Os genótipos, DLB1-140 e DLB1-150 têm a mesma genealogia, e SALAZAR (2007) verificou que ambos apresentaram pólenes com $22,5\mu$, classificados como não reduzidos, os quais ocorreram em maior frequência em plantas cultivadas em câmara de crescimento, a 15°C .

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os genótipos diplóides DLB1-140, DLB1-150 oriundos dos cruzamentos dos clones MSA133-57 x PI595511-5 (BISOGNIN et al., 2005) e 34 genótipos tetraplóides da espécie *Solanum tuberosum* subespécie *tuberosum*. Os 34 genótipos tetraplóides foram selecionados de cruzamentos do programa de melhoramento de batata, conduzido pela equipe coordenada pela professora Dra. Lizete Augustin, na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF). O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e no Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) da UPF e foi composto pelas seguintes etapas:

3.1 Avaliação das características de qualidade no processamento

Essa etapa do trabalho foi realizada no Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA), onde foram procedidas análises de qualidade de batata para fritura, em função dos teores de massa seca, coloração dos chips e teores de açúcares redutores.

As informações referentes a qualidade de processamento foram obtidas das avaliações de 170 genótipos tetraplóides obtidos de cruzamentos realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF. Os cruzamentos envolveram nove combinações diferentes entre genitores com características com qualidade de processamento e de genitores adaptados às condições de cultivo da região sul do Brasil. Os genótipos tetraplóides analisados foram selecionados de material

que fez parte, também da tese de doutorado da professora Lizete Augustin (AUGUSTIN, 2007).

3.1.1 Teor de massa seca

Para a análise da massa seca foram utilizados dois tubérculos de cada repetição colhida no campo, totalizando seis tubérculos por clone, os quais foram cortados em pequenos cubos e colocados em cadinhos de alumínio para determinar a massa fresca. Foram, após a pesagem, secos em estufa, à temperatura de 60°C, até atingirem a massa seca constante. Cada amostra foi trabalhada com duplicatas. O percentual de massa seca foi calculado através da seguinte fórmula: $\%MS = (\text{massa da amostra seca} / \text{massa da amostra}) \times 100$.

3.1.2 Coloração dos chips

Cinco tubérculos de cada clone e cultivares testemunhas (Atlantic, Catucha, Macaca, Lady Roseta, Vivaldi, Hertha, Monalisa, Baronesa), colhidos em dezembro de 2006 no campo experimental da Universidade de Passo Fundo, foram processados em forma de chips através da utilização de um fatiador de legumes da marca Skywsem. Para a fritura foi utilizada uma fritadeira elétrica da marca Walita, com capacidade de 1000g, sendo os chips imersos em gordura vegetal hidrogenada a 185 °C, até cessar a borbulha.

A cor dos chips foi determinada pelo Espectrofotômetro de Reflectância Difusa (Hunter Lab), modelo ColorQuest II, com sensor

ótico geométrico de esfera. O aparelho foi calibrado com cerâmica, realizando-se a leitura por reflexão e utilizando-se o ângulo de observação de 2°, iluminante principal D75 e iluminante secundário D65. No sistema Hunter de cor, corrigido pela CIE, os valores L* (luminosidade) flutuam entre zero (preto) e 100 (branco), -a* (verde) até +a* (vermelho), e -b* (azul) até +b* (amarelo). As amostras foram submetidas à análise, colocadas sobre o sensor ótico de 1", realizando-se duas repetições para cada amostra e leitura em duas posições diferentes: centro e borda dos chips.

3.1.3 Teores de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método 2,4 - dinitro-fenol. Para isso os tubérculos foram fatiados, secos em estufa, e moídos. Para a extração, 2g de amostra moída foi diluída em 10 mL de água destilada e deionizada, em tubo de ensaio, a qual foi homogeneizada em vortex por 1 minuto e centrifugada a 4000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi reservado. Para a reação de coloração foram coletados 2,0 mL do extrato, adicionando-se 0,5 mL de solução de 2,4 - dinitro-fenol. Após a homogeneização em vortex por 10 segundos, foi aquecido em banho maria fervente por seis minutos e, a seguir, refrigerados em banho de água fria (6°C). A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda para 600nm.

3.2 Análise de isoenzimas

A análise de isoenzimas foi realizada no setor de Biologia Molecular do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF.

Dos 36 genótipos selecionados em relação às características de massa seca, coloração dos chips e açúcares redutores, foram utilizados, para as análises isoenzimáticas, 22 genótipos que apresentaram valores contrastantes para cada uma das características relacionadas à qualidade de processamento.

Para o teor de massa seca foram selecionados 11 genótipos tetraplóides (SMIJ461-1, Atlantic, Catucha, Lady Roseta, X6.1, X7.6, X10.11, X10.30, X11.10, X11.36, X11.37) que apresentaram altos teores variando de 26,55% no genótipo X10.11 até 20,27% na cultivar Atlantic. Os diplóides DLB1-140 e DLB1-150 foram incluídos pois apresentaram teores altos de massa seca, 26,15% e 22,87%, respectivamente (Tabela 2). Para baixos teores foram selecionados nove genótipos tetraplóides (Baronesa, X1.3, X1.8, X2.3, X3.1, X3.10, X3.26, X4.10, X4.11) que variaram de 17,75% no genótipo X2.3 até 15,6% no genótipo X3.1 (Tabela 1).

Em relação a coloração dos chips (L) foram selecionados 12 genótipos tetraplóides (Atlantic, Baronesa, SMIJ, Vivaldi, X1.3, X1.8, X2.10, X2.17, X5.2, X10.30, X11.32, X11.36) variando de 68,83 no genótipo X10.30 até 52,65 no genótipo X5.2. Incluiu-se, também, os diplóides DLB1-140 e DLB1-150 que apresentaram os maiores valores de L, 73,21 e 72,01 respectivamente (Tabela 1). Os genótipos que apresentaram menores valores de L (Catucha, X2.3,

X3.1, X4.11, X7.6, X10.14, X11.11 e X11.37) variaram de 49,12 no genótipo X11.37 até 41,69 no genótipo X11.11 (Tabela 1).

Para baixos teores de açúcares redutores foram selecionados dez genótipos tetraplóides (Atlantic, Lady Roseta, X2.10, X2.17, X6.1, X10.11, X10.13, X11.10, X11.36 e X11.37) variando de 0,27% no genótipo X11.10 até 0,17% no X10.11. Os diplóides DLB1-140 e DLB1-150 apresentaram baixos teores de açúcares redutores, 0,26% e 0,23% respectivamente (Tabela 2). Os genótipos Catucha, Monalisa, X1.8, X1.12, X2.3, X3.10, X3.26, X4.10, X4.11 e X5.2 apresentaram altos teores de açúcares redutores variando de 0,97% no genótipo X3.26 até 0,44 na cultivar Monalisa (Tabela 2).

Os diplóides DLB1-140 e DLB1-150 foram avaliados para comparação com os tetraplóides. Os sistemas enzimáticos usados na análise dos genótipos foram o da peroxidase (PRX) e da glutamato oxaloacetato transaminase (GOT). Foram avaliadas apenas as bandas consideradas nítidas, sendo as duvidosas excluídas da análise.

3.2.1 Cultivo do material

As plantas selecionadas foram cultivadas em câmara de crescimento com temperatura de 21°C e fotoperíodo de 15 horas luz. As plantas foram cultivadas em floreiras (capacidade cinco litros) que continham dois tubérculos.

3.2.2 Obtenção das amostras

As amostras das folhas para a análise isoenzimática foram coletadas em dois estádios de desenvolvimentos (antes da floração e em plena floração). O tecido foliar coletado foi a 3º rama do ápice para a base.

3.2.3 Preparo dos tampões e géis

Para a obtenção dos zimogramas dos dois sistemas enzimáticos foi adotada a técnica de eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida, na concentração 6%, utilizando-se o sistema de tampão descontínuo descrito por SCANDALIOS (1969), na proporção de 1A:9B.

Tampão do eletrodo: Borato de lítio (pH 8,3)

(A) - Hidróxido de lítio hidratado----- 2,1g
 - Ácido Bórico----- 11,89g
 - Água destilada----- 1000mL

Tampão do gel: Tris-citrato (pH 8,3)

(B) - Tris----- 6,2g
 - Ácido cítrico hidratado----- 1,749g
 - Água destilada----- 1000mL

Gel de poliacrilamida (6%):

- Acrilamida----- 57,0g

- Bis----- 3,0g
- TEMED----- 1mL
- Tampão 1A:9B-----1000mL

Cada gel foi constituído de 80mL da solução descrita acima e 0,8mL de persulfato de amônio a 10%. Essa solução foi colocada em canaleta de vidro de 20 x 20 x 0,2cm e coberta com uma placa de vidro, permanecendo à uma temperatura aproximada de 25°C por cerca de 20 minutos, a fim de permitir a polimerização (Figura 2), sendo posteriormente transferido para estufa incubadora B.O.D., modelo CT-708, a 4°C até o momento da aplicação das amostras.

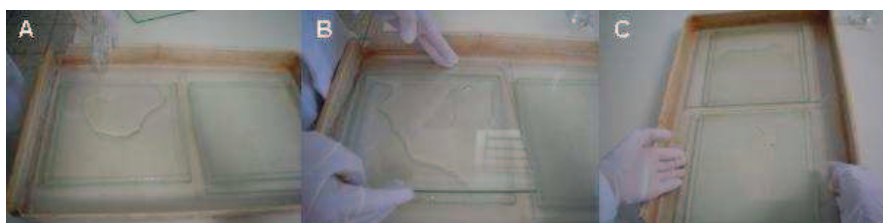


Figura 2 – Etapas da preparação dos géis: (A) 80mL de gel em cada canaleta; (B) Cobertura da solução com vidro; (C) Após a polimerização a retirada do vidro. Passo Fundo, Laboratório de Biotecnologia Vegetal/UPF, 2007.

3.2.4 Preparo das amostras

Foram coletadas folhas das plantas em dois estádios de desenvolvimento, antes da floração e em plena floração (Figura 3). As folhas coletadas foram colocadas em sacos plásticos, sobre gelo, dentro de um isopor para evitar com que as enzimas se degradassem. As amostras comparadas quanto à coloração, massa seca e açúcares

redutores estavam no mesmo estágio de desenvolvimento. No laboratório, as amostras foram maceradas com auxílio de um bastão de vidro, em placas de vidro, com sulcos arredondados, sobre uma cuba de gelo. Para embebição dos extratos utilizou-se papel WHATMANN 3MM de 4x1,5mm (Figura 4).

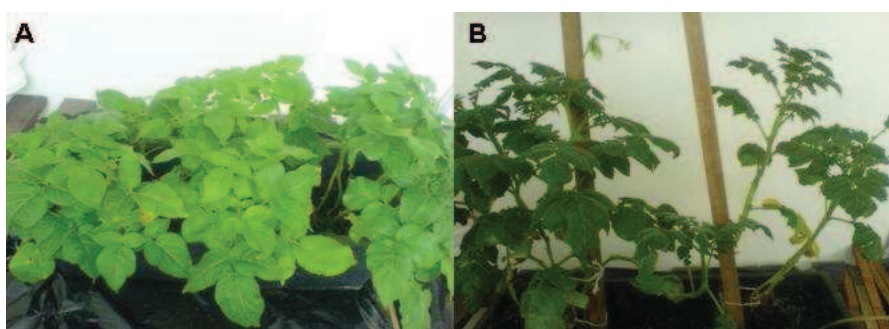


Figura 3 – Estádio da coleta das amostras: (A) Antes da floração; (B) Plena floração. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

3.2.5 Aplicação das amostras

A aplicação das amostras (Figura 4) foi realizada após a retirada da placa de vidro que cobria o gel. Com auxílio de um pente de aço inoxidável, contendo 24 dentes de 0,4cm de largura, foram marcados, no gel, os orifícios destinados a receber as amostras. Essas foram aplicadas no gel, com auxílio de uma pinça.

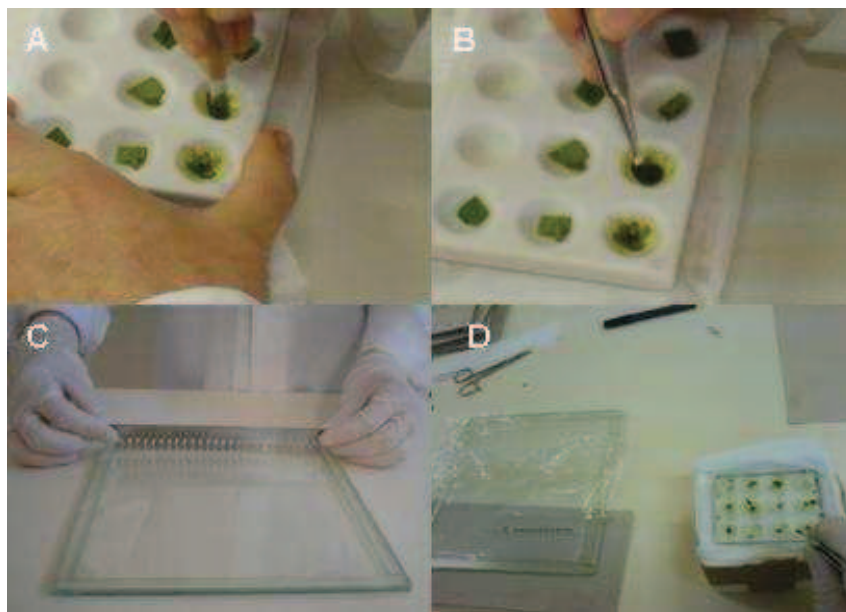


Figura 4 – Etapas para o preparo e aplicação das amostras: (A) maceração das amostras; (B) aplicação do papel WHATMANN 3MM para absorver a amostra; (C) abertura dos orifícios no gel; (D) aplicação da amostra no gel. Passo Fundo, Laboratório de biotecnologia vegetal/UPF, 2007.

3.2.6 Eletroforese

O gel com as amostras aplicadas foi transferido para as cubas eletrolíticas, mantidas na estufa incubadora B.O.D., modelo CT-708, a 4°C. Os géis, durante o período de manipulação e migração, permaneceram cobertos com filme de PVC, para evitar a desidratação e/ou possível contaminação.

Cada uma das cubas foi preenchida com 300mL de tampão, o qual era trocado após a migração de, no máximo, três géis. As pontes entre a solução tampão e o gel eram 100% de fibra de

viscose (*perfex*) com alta capacidade de absorção a fim de permitir uma boa condutividade. Em uma extremidade o *perfex* era colocado a 1cm das amostras e, na outra extremidade, era colocado a 12cm (*perfex a perfex*). As migrações foram feitas aplicando uma diferença de potencial de aproximadamente 7,5 à 10 volts/cm linear, deixando migrar até que a linha de frente (azul de bromofenol), atingisse 9cm do ponto de aplicação.

3.2.7 Revelação do gel e armazenamento da imagem

3.2.7.1 Peroxidase (PRX)

Para a revelação das isoenzimas de PRX, foi usado o método descrito por SCANDALIOS (1969).

Os géis foram imersos, até o aparecimento da zona de atividade (aparecimento das bandas), numa mistura de 1:1 das soluções 1 e 2 (segue abaixo), à temperatura ambiente.

Solução 1: benzidina

- benzidina----- 250mg
- Ácido acético----- 4,5mL
- Água destilada----- 18mL

Obs.: 250mg de benzidina em 4,5mL de ácido acético, aquecer a 50°C para dissolver, acrescentar 18mL de água destilada.

Solução 2: H₂O₂ a 0,075%

- Água oxigenada (H₂O₂)-----0,055mL
- Água destilada-----19,0mL

Após o aparecimento das bandas, os géis foram lavados em água corrente até a retirada total do corante. Logo em seguida, os géis foram colocados sobre uma superfície de vidro, que continha uma folha milimetrada abaixo para facilitar a leitura após o armazenamento da imagem com câmera digital (Câmera Digital 7.2MP S650 Sony com Zoom Óptico de 3x e LCD 2").

3.2.7.2 Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT)

Para a revelação deste sistema enzimático foi utilizado o sistema descrito por AYALA et al. (1972).

Os géis foram imersos na solução de revelação e mantidos em estufa a 37°C, sendo agitado a cada 10 minutos. O gel foi retirado da solução corante após a revelação das bandas (cerca de 60 minutos).

A solução de revelação foi composta por:

- 0,05M Tris-HCL pH 8,0----- 50mL
- Fast Blue BB----- 75mg
- Piridoxal 5' fosfato----- 5mg
- L-ácido aspártico*----- 100mg
- Ácido alfa-cetoglutárico----- 50mg
- * Dissolvidos em 2,5mL de NaOH a 6%

Após o aparecimento das bandas, os géis foram lavados em água corrente até retirar totalmente o corante. Em seguida, os géis foram colocados sobre um vidro que continha uma folha milimetrada abaixo para facilitar a leitura após o armazenamento da imagem com a câmera digital acima mencionada.

3.2.8 Avaliação dos géis

Foi calculada a mobilidade relativa (MR) de cada banda em relação a uma banda de referência (uma banda nítida da cultivar Atlantic, escolhida como controle), que recebeu o valor relativo igual a 1,00, para a isoenzima GOT. Para as PRX, a mobilidade relativa foi avaliada dividindo a medida da mobilidade das bandas pela mobilidade da linha de frente.

A MR indica a relação entre a distância migrada pela banda em questão e a distância migrada pela banda de referência ou pela linha de frente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Avaliação das características de qualidade de processamento:

Os clones e cultivares tiveram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre massa seca e coloração (L) (Tabela 1). A média geral da massa seca foi de 20,88%, tendo um coeficiente de variação de 2,18%, sendo que os clones X2.10, X7.6, X10.11, X11.10, X11.36, X11.37 tiveram os melhores resultados (igual ou acima de 24,9%). A cultivar Lady Roseta e o diplóide DLB1-140 também não diferiram dos demais, cujo resultados foram iguais ou superiores a 25,63%. Já os genótipos X1.3, X1.8, X1.12, X2.3, X3.26, X3.10, X3.1, X4.10 e X4.11 e as cultivares Monalisa e Baronesa tiveram resultados inferiores a 20%. Segundo Melo (1999) e Love (2000), para a obtenção de produtos fritos de boa qualidade para o processamento, a

indústria prefere tubérculos que possuam uma massa seca acima de 20,0 – 20,5%.

Para análise da coloração dos chips a CIE (International Commission on Illumination) definiu um sistema para identificação de cor através de uma escala de cor, utilizando um parâmetro luminoso (L) que determina a cor branca a preta (COLEMAN, 2004).

Em relação a coloração dos chips, observa-se na tabela 1, que a média geral de L destes materiais selecionados foi de 54,89, com coeficiente de variação de 8,45. Diferenças significativas foram obtidas em dez genótipos (Macaca, X2.10, X11.10, X11.36, X10.30, X11.32, X2.17, X1.3, DLB1-140 e DLB1-150). Todos apresentaram valor acima da média, tendo se destacado os diplóides que apresentaram valores de L acima de 72,0 (Tabela 1). Os menores valores de L foram encontrados nos genótipos Lady Roseta, Catucha, X1.12, X2.3, X3.1, X3.10, X4.11, X7.6, X10.7, X10.14, X11.6, X11.11 e X11.37, que diferiram significativamente dos dez genótipos selecionados com valor de L superior à média (Tabela 1).

Coleman (2004) verificou que a coloração dos chips está ligada diretamente ao valor de L, sugerindo que, quanto maior este valor, mais alta será a qualidade da coloração.

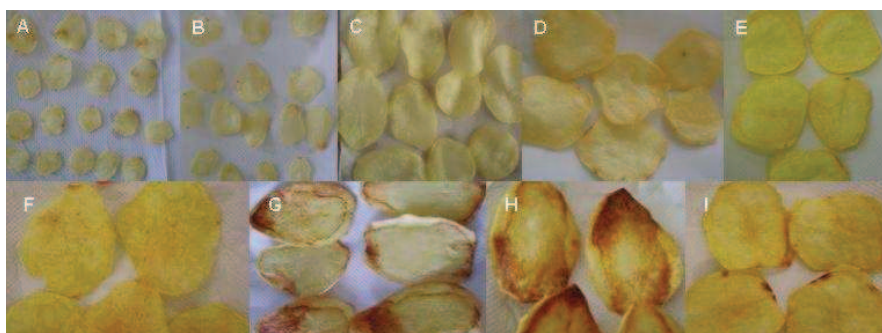


Figura 5 – Comparação da coloração dos chips em relação ao valor de L: (A) DLB1-140; (B) DLB1-150; (C) X2.10; (D) X10.30; (E) X11.32; (F) Catucha; (G) X2.3; (H) X4.11; (I) X10.14. Passo Fundo, CEPA/UPF, 2007.

Na figura 5 os diplóides DLB1-140 e DLB1-150 (Letras A e B) obtiveram índices superiores a 72 e os clones tetraplóides (letra C, D e E) obtiveram coloração superior a 65 enquanto que os tetraplóides (Letra F, G, H e I) obtiveram coloração inferior a 48. Dados obtidos vão de encontro com a afirmação feita por Coleman.

Tabela 1 – Médias de teor de massa seca, coloração dos Chips (L) em 36 genótipos selecionados de batata. Passo Fundo, CEPA/UPF, 2007

Genótipos	Massa Seca (%)	Coloração L
X10.11	26,55 a	56,59 cdefgh
X2.10	26,20 a	66,37 abcd
DLB1-140	26,15 a	73,21 a
X11-10	26,07 a	61,94 abcdef
X11.36	25,80 a	58,74 abcdefg
Lady Roseta	25,63 a	49,20 fgh
X11.37	25,44 ab	49,12 fgh
X7.6	24,90 abc	47,64 fgh
X10.30	23,64 bcd	68,83 abc
X11.32	23,02 cde	65,87 abcde
DLB1-150	22,87 de	72,01 ab
X11.11	22,86 de	41,69 h
X2.17	22,45 de	66,15 abcd

X10.14	22,31	def	44,44	gh
X10.13	21,93	defg	56,62	cdefgh
SMIJ461-1	21,90	defg	56,28	cdefgh
X6.1	21,83	defg	57,66	bcdefg
X11.6	21,54	efg	49,05	fgh
Macaca	20,47	fgh	58,83	abcdefg
Catucha	20,28	ghi	44,09	gh
Atlantic	20,27	ghi	52,92	defgh
X10.7	19,47	hij	46,88	fgh
Vivaldi	18,47	ijk	57,01	bcdefg
Hertha	18,47	jk	50,94	efgh
X5.2	18,35	jkl	52,65	defgh
X2.3	17,75	klmn	46,77	fgh
Monalisa	17,47	klmn	52,72	defgh
Baronesa	17,35	klmn	55,68	cdefgh
X1.12	17,15	klmn	49,63	fgh
X1.3	16,86	klmn	66,03	abcde
X4.10	16,43	lmn	51,35	defgh
X1.8	16,30	lmn	53,02	defgh
X4.11	16,09	mn	47,18	fgh
X3.26	15,91	mn	55,08	cdefgh
X3.10	15,65	n	49,86	fgh
X3.1	15,60	n	47,26	fgh
Média	20,88		54,89	
CV %	2,18		8,45	

* L - escala que varia da coloração escura a clara, sendo que os maiores valores de L indicam coloração mais clara.

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em relação aos açúcares redutores, ocorreram diferenças significativas (Tabela 2) entre os genótipos avaliados, embora não tenha sido possível fazer o teste de Tukey, porque não havia repetições.

A média geral de açúcares redutores nos genótipos diplóides e tetraplóides selecionados foi de 0,43 e o desvio padrão foi

de 0,25. As plantas com baixos teores de açúcares redutores, foram as que apresentaram resultados inferiores a 0,26, valor observado para a cultivar Atlantic, utilizada como referência, pois é considerada um padrão de qualidade para o processamento. Dentre os clones e as cultivares que apresentaram bons resultados para níveis de açúcares redutores estão o X2.10, X2.17, X6.1, X10.11, X10.13, X11.36, X11.37, X11.6, Lady Roseta e Atlantic. Os diplóides DLB1-140 e DLB1-150 apresentaram níveis de açúcares redutores respectivamente de, 0,26 e 0,23.

Tabela 2 – Teores de açúcares redutores de 36 genótipos selecionadas de batata. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007

Teores de açúcares redutores			
Genótipos	Baixos teores (%)	Genótipos	Altos teores (%)
DLB1-140	0,26	Baronesa	0,37
DLB1-150	0,23	Catucha	0,54
Atlantic	0,26	Hertha	0,34
Lady Roseta	0,26	Macaca	0,59
X2.10	0,19	Monalisa	0,44
X2.17	0,26	SMIJ461-1	0,35
X6.1	0,20	Vivaldi	0,32
X10.11	0,17	X1.3	0,31
X10.13	0,19	X1.8	0,47
X11.6	0,15	X1.12	0,88
X11-10	0,27	X2.3	0,58
X11.36	0,26	X3.1	0,46
X11.37	0,21	X3.10	0,83
		X3.26	0,97
		X4.10	0,47
		X4.11	0,83
		X5.2	0,86
		X7.6	0,45
		X10.7	0,31

X10.14	0,38
X10.30	0,30
X11.11	0,40
X11.32	0,42
<hr/>	
Média Geral 0,43	
<hr/>	
DP 0,25	
<hr/>	

4.2 Análise de isoenzimas:

Para os teores de massa seca (Figura 6), foram selecionados, para comparação das bandas, 13 genótipos que apresentaram valores de 20,27% a 26,15% e nove genótipos com 17,75% a 15,60%.

As bandas identificadas no sistema enzimático da peroxidase foram polimórficas.

Na figura 6A, onde são apresentados os resultados obtidos antes da floração, observa-se que os genótipos identificados com os números 1, 2, 5 e 7, com teores de massa seca superiores, apresentaram as mesmas bandas, enquanto os demais genótipos superiores mostraram bandas diferentes. Nos genótipos com teores baixos de massa seca, (14 e 20), (15, 16 e 17), e (16 e 22) foram observadas as mesmas bandas e suas MR foram de respectivamente: (0,69), (0,69, 0,74, 0,78 e 0,84), e (0,69, 0,78, 0,84), enquanto o genótipo 19 e 21 obtiveram bandas diferentes.

Na figura 6B, que apresenta os resultados obtidos na floração plena, os genótipos (1 e 9), (3 e 11), (6 e 7), (8 e 10), (12 e 13) apresentaram, respectivamente, as mesmas bandas, enquanto os genótipos 2, 4 e 5 mostraram bandas diferentes. Em relação aos baixos teores de massa seca, os genótipos (15, 16, 18 e 20) e (17 e 19)

mostraram as mesmas bandas, enquanto os demais apresentaram bandas diferentes. Observou-se, também, que no estágio de plena floração, dos 13 genótipos, 7 não apresentaram uma das bandas (MR=0,91), o que poderia ser um indicação de alta teor de massa seca.

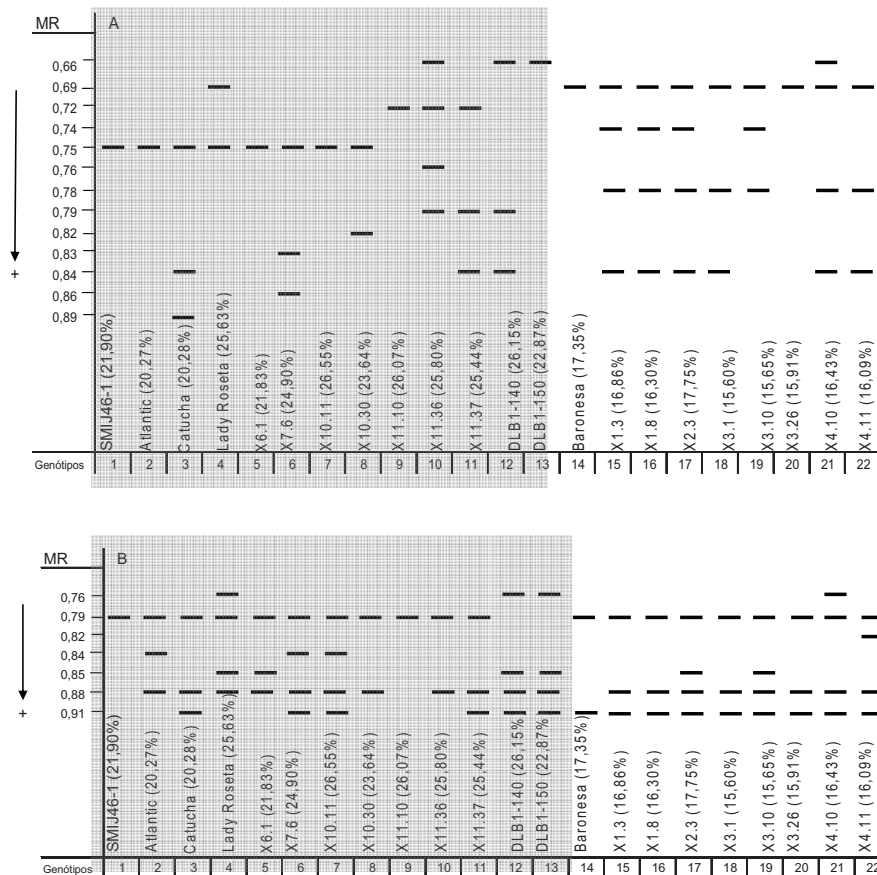


Figura 6 – Zimograma representando diferentes padrões de bandas de PRX em diferentes genótipos de batata que obtiveram teores altos e baixos de massa seca, antes da floração (A) e em plena floração (B), com sua respectiva mobilidade relativa (MR). O cinza representa resultados superiores.

Na maioria dos genótipos analisados, no estágio de floração, aumentou o número de bandas por genótipo, sendo também

observado que, neste estágio, as bandas possuem uma melhor precisão para análise. O aumento do número de bandas por genótipo em plena floração indica maior atividade enzimática realizada pela planta, neste estágio. Resultados similares foram encontrados por Rocha (2001) que, analisando 113 clones silvestres, observou melhores resoluções de bandas em materiais com maturidade mais avançada. Conklin & Smith (1971), avaliaram, através da eletroforese, utilizando o sistema enzimático das peroxidases, dez espécies herbáceas do gênero *Datura* e observaram que o número de bandas aumentava de acordo com o aumento da idade das folhas utilizadas para análise.

Quanto a coloração dos chips (Figura 7), foram selecionados 14 genótipos que apresentaram um valor de L entre 52,65 a 73,21 e 8 genótipos cujo valor de L variou de 41,69 a 47,64 para a comparação das bandas. Na figura 7A observou-se que os genótipos 1, 2, 4, 5 e 7 mostraram a presença da mesma e única banda (MR=0,75). Nos genótipos diplóides, os identificados pelos números 11 e 12 também apresentaram uma mesma e única banda (MR=0,70). Estes genótipos também mostraram melhores índices para coloração dos chips o que indica bom potencial para uso em cruzamentos. Nos genótipos que mostraram valores de L mais baixos não ocorreu a presença destas bandas. Dos 8 genótipos acima mencionados, 3 deles mostraram a presença das mesmas bandas (MR= 0,72, 0,82, 0,85).

A figura 7B, mostra os resultados obtidos na floração plena. Os genótipos (2 e 3) e (8 e 9) apresentaram bandas idênticas, com mobilidade relativa, respectivamente, de (0,72 e 0,81) e (0,72, 0,78 e 0,80). Nos diplóides, o genótipo DLB1-140 mostrou quatro bandas, três delas idênticas ao DLB1-150, que apresentou somente

três bandas. Isto poderia ser explicado pela ocorrência de maior atividade enzimática no estágio da floração plena. Também observou-se que, dos 14 genótipos, seis apresentaram banda com MR=0,78. Dos 8 genótipos que obtiveram valores inferiores, 4 deles apresentaram bandas idênticas (genótipos 19, 20, 21 e 22). Estas bandas estavam presentes em todos os genótipos que tiveram características de coloração indesejáveis, com exceção do X4.11.

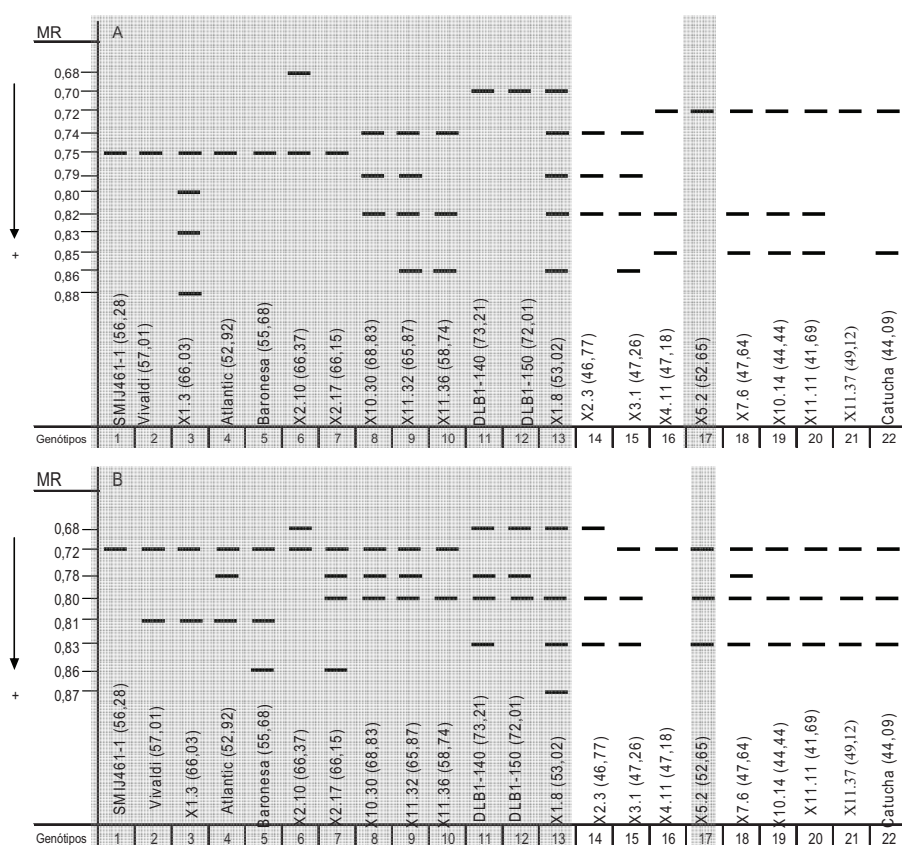


Figura 7 – Zimograma representando diferentes padrões de bandas de PRX em diferentes genótipos de batata que obtiveram maiores e menores valores de L, antes da floração (A) e em plena floração (B), com sua respectiva mobilidade relativa (MR). O cinza representa resultados superiores.

Na figura 8A, observou-se que dos 12 genótipos que apresentavam teores baixos de açúcares redutores, 4 deles (genótipos 15, 17, 18 e 19) apresentaram duas bandas (MR=0,69 e 0,79) e os diplóides tiveram presentes uma única banda de MR=0,64, enquanto o restante dos genótipos superiores apresentaram bandas diferentes. Os genótipos com altos teores de açúcares redutores apresentaram polimorfismos, embora os genótipos (2 e 3), (5 e 6) e (7 e 8) tenham apresentado, respectivamente, bandas com mobilidade relativa igual (0,67 e 0,77), (0,68 e 0,77) e (0,68). Na figura 8B, 12 genótipos apresentaram baixos teores de açúcares redutores, os diplóides e os genótipos 13, 14, 15 e 16. Os diplóides apresentaram bandas com MR=0,68, 0,80 e 0,83, os genótipos 13 e 14 apresentaram MR=0,68, 0,70 e 0,80) e os genótipos 15 e 16 apresentaram MR= 0,73 e 0,80. As bandas com MR=0,68, 0,73 e 0,75 não estavam presentes nos genótipos com baixos teores de açúcares redutores enquanto que alguns genótipos superiores apresentavam estas bandas. Nos genótipos que apresentaram altos teores de açúcares redutores houve poucos polimorfismos. A maioria destes materiais apresentaram 3 bandas com MR= 0,70, 0,80 e 0,83.

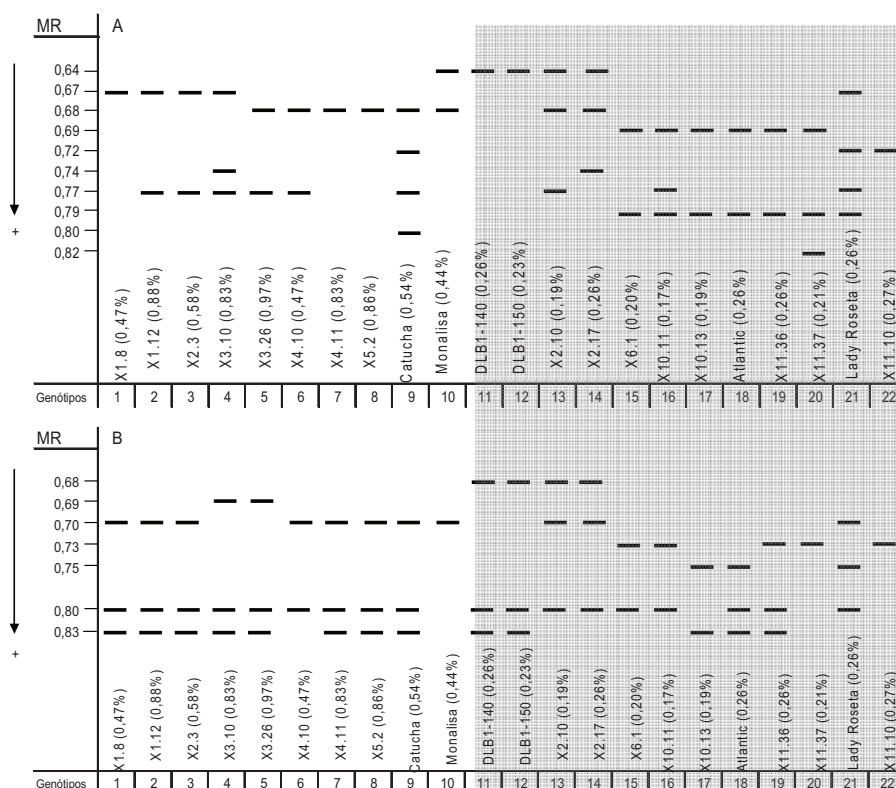


Figura 8 – Zimograma representando diferentes padrões de banda de PRX em diferentes genótipos de batata que obtiveram altos e baixos teores de açúcares redutores, antes da floração (A) e em plena floração (B), com sua respectiva mobilidade relativa (MR). O cinza representa resultados superiores.

Para o sistema enzimático GOT, como foi observado no sistema das peroxidases, as bandas apareceram com maior intensidade de cor nas amostras retiradas das plantas em plena floração. As atividades das enzimas desse sistema estavam mais evidentes em comparação com o estágio anterior, possivelmente em função do metabolismo mais acelerado, neste estágio.

Para a comparação das bandas em relação ao teor de massa seca (Figura 9), foram selecionados 13 genótipos que tiveram um teor

igual ou superior a 20,27% de massa seca e nove genótipos que tinham teores inferiores a 20,27%.

Na figura 9 tanto antes da floração quanto em plena floração as bandas foram polimórficas. Dos 13 genótipos superiores da figura 9A, 5 apresentaram a banda (MR=1,00) e 7, incluindo os diplóides, apresentaram a banda (MR=0,96). Dos 9 genótipos inferiores, 4 apresentaram a banda (MR=1,00) enquanto os demais apresentaram diversas mobilidades relativas. Na figura 9B, dos 13 genótipos superiores, 4 apresentaram a banda com MR=1,00 e 6 apresentaram a banda com MR=1,01. Já nos 9 genótipos com baixos teores de massa seca, 5 apresentaram a banda com MR=1,00 e 4 apresentaram banda com MR=0,95.

Em relação à coloração dos chips (Figura 10), nos genótipos superiores analisados antes da floração (Figura 10A), 5 apresentaram bandas de MR 0,96, 4 apresentaram bandas de MR 1,00 e 5 apresentaram bandas de MR 1,02. Nos genótipos com baixos valores de L, 3 apresentaram bandas de MR 0,93, 5 apresentaram bandas de MR 0,96. A maioria dos genótipos avaliados em plena floração (Figura 10B) tiveram MR variadas, no entanto apenas 4 genótipos apresentaram bandas de MR 1,00, sendo que 2 tiveram um baixo valor de L.

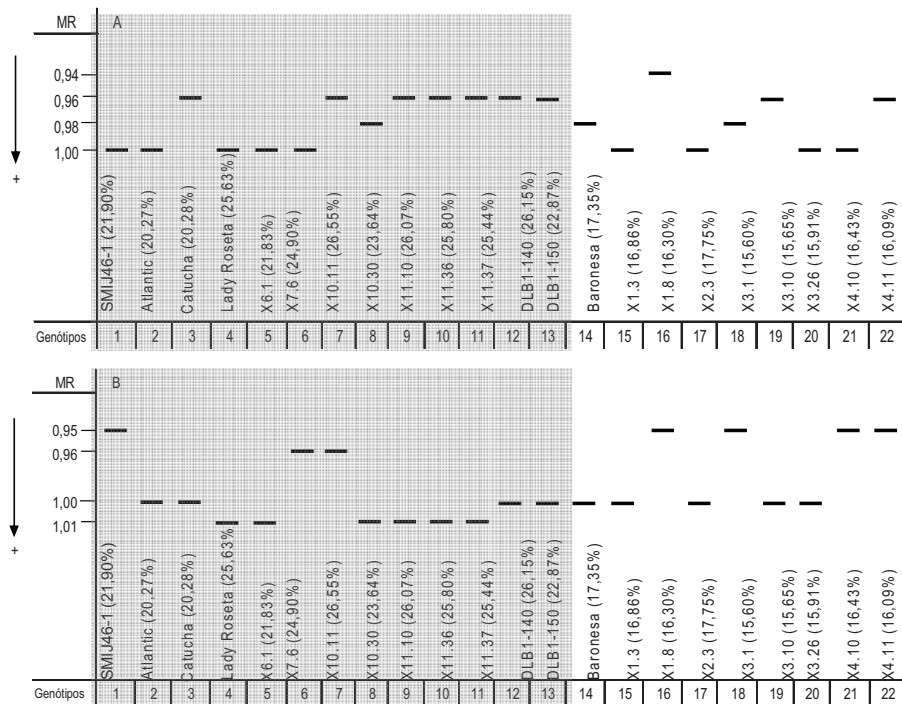


Figura 9 – Zimograma representando diferentes padrões de bandas de GOT em diferentes genótipos de batata que obtiveram teores altos e baixos de massa seca, antes da floração (A) e em plena floração (B), com sua respectiva mobilidade relativa (MR). O cinza representa resultados superiores.

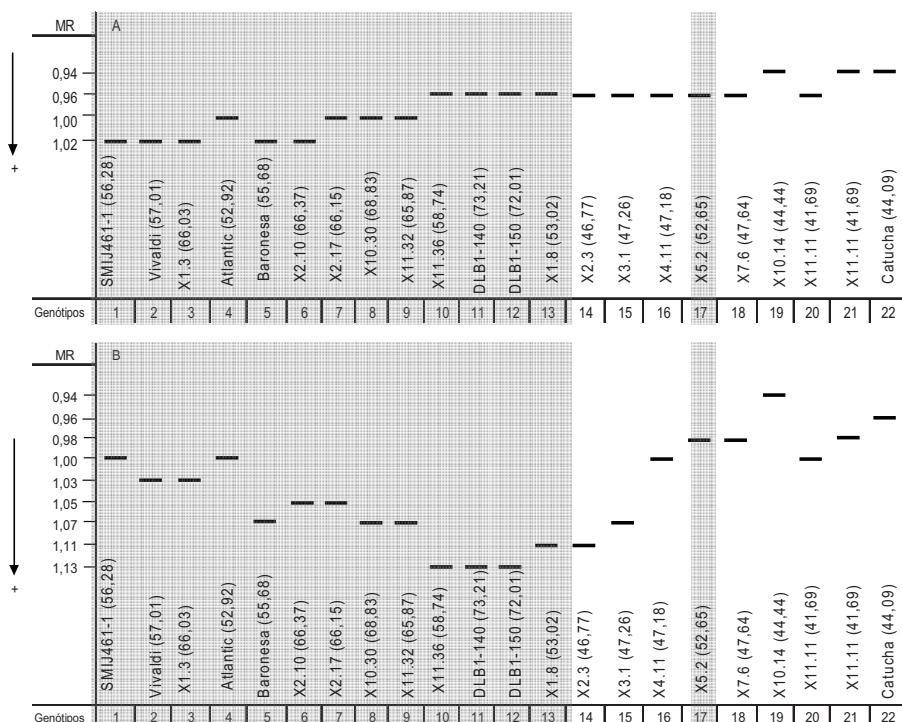


Figura 10 – Zimograma representando diferentes padrões de bandas de GOT em diferentes genótipos de batata que obtiveram maiores e menores valores de L, antes da floração (A) e em plena floração (B), com sua respectiva mobilidade relativa (MR). O cinza representa resultados superiores.

Na figura 11A, foram comparadas as bandas quanto ao teor de açúcares redutores, sendo selecionados 11 genótipos com os melhores resultados (abaixo de 0,27%) e 11 genótipos com resultados inferiores (acima de 0,36%). Observa-se que a banda de MR 1,00, esteve presente em 2 genótipos superiores e 2 genótipos inferiores. Na figura 11B, a banda com MR 1,00 esteve presente apenas em três genótipos superiores. Essa isoenzima está relacionada com o ciclo de Krebs, ou seja, provavelmente seja expressa e utilizada pelo sistema bioquímico mais no estágio de floração plena, já que é neste estágio

que a planta necessita de mais energia, tornando o processo respiratório, nessa fase, mais intenso.

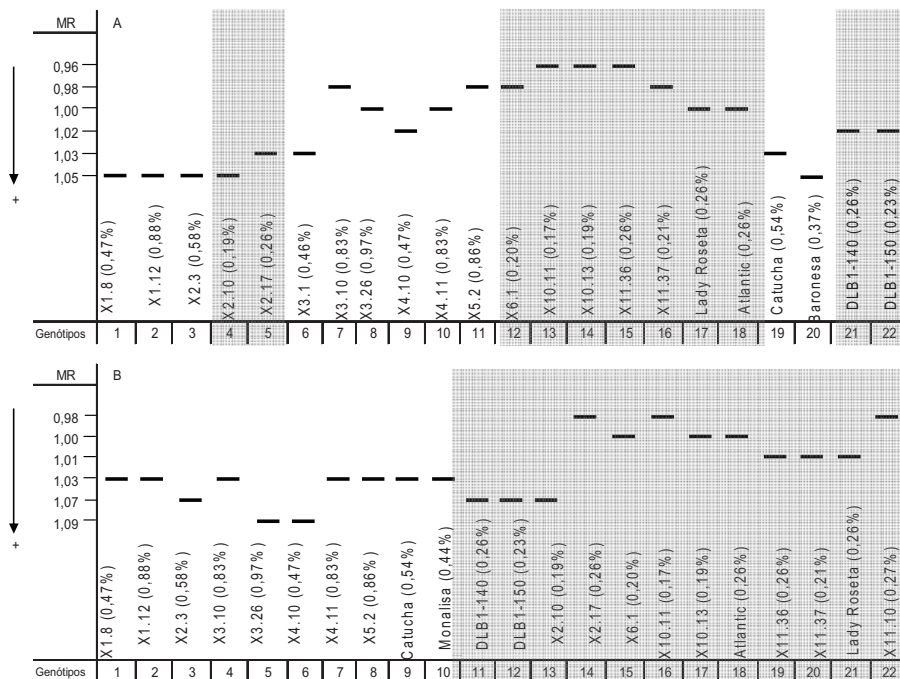


Figura 11 – Zimograma representando diferentes padrões de bandas de GOT em diferentes genótipos de batata que obtiveram altos e baixos teores de açúcares redutores, antes da floração (A) e em plena floração (B), com sua respectiva mobilidade relativa (MR). O cinza representa resultados superiores.

As análises de isoenzimas tanto para o sistema da peroxidase quanto para o da GOT, não apresentaram as relações esperadas entre bandas e qualidade.

Como foram observadas mudanças quanto ao número de bandas em relação aos estádios de coleta das amostras foliares, é necessário, nos próximos estudos, definir qual o estágio mais

apropriado para as comparações. Considerando ter ocorrido maior número de bandas na floração plena sugere-se que novos estudos sejam efetuados neste estágio.

Deve-se, também ressaltar que, no sistema enzimático da GOT apareceram bandas de pouca intensidade, sugerindo a necessidade de análises adicionais para interpretações conclusivas dos resultados.

Oliveira et al. (2002), em batata-doce, também observaram que o sistema GOT apresentou atividade baixa, evidenciada por bandas de baixa intensidade observadas no gel de amostras de raízes. Os autores também observaram a mesma situação para o sistema das peroxidases, em amostras de folhas. Apesar disso, foi possível a detecção de polimorfismo intraclones em todos os sistemas enzimáticos selecionados, possibilitando o emprego da técnica de análise isoenzimática na discriminação e no estudo da variabilidade genética entre os clones. Não foi observada ocorrência de polimorfismo intraclonal, o que facilitou a adoção dessa técnica na discriminação genotípica dos clones.

5 CONCLUSÕES

Os clones diplóides apresentaram características superiores aos tetraplóides, para o processamento, sendo recomendada sua utilização em cruzamentos interespecíficos.

O estágio mais adequado para análise isoenzimática foi o de plena floração, que apresentou, na maioria dos casos, bandas em maior número e com maior atividade.

Na comparação com as características de massa seca, coloração e açúcares redutores, tanto a PRX quanto a GOT não apresentaram indícios de associação suficientes para caracterizar e selecionar, com segurança, os diferentes clones.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBA. Batata Brasil/ área, produção e produtividade. Disponível em: <<http://www.abbabatatabrasileira.com.br>>. Acesso em: 15 jan 2008a.

_____. Batata Mundo/ área, produção e produtividade. Disponível em: <<http://www.abbabatatabrasileira.com.br>>. Acesso em: 15 jan 2008b.

_____. A batata como alimento. Disponível em: <<http://www.abbabatatabrasileira.com.br>>. Acesso em: 15 jan 2008c.

ANDRADE, B. H. Requerimientos cualitativos para la industrialización de la papa. *Instituto nacional autónomo de investigaciones agropecuarias*, Ecuador, n.9, p.21-23, 1997.

ANDREAU, M.A. Industrialização e melhoramento genético da batata: Desafios para um futuro próximo. *Batata Show*, n.8, p.22, 2003.

ANDREU, M.A.; PEREIRA, A. da S. Estimación da qualidade industrial da batata (*Solanum tuberosum* L.) através do uso da isoenzima glutamato oxaloacetato transaminase, *INTA*, Argentina, v.33, n.1, p.5-14, Abr. 2004.

ANDREU, M.A. Avanços no melhoramento genético para qualidade de processamento da batata. *Batata Show*, v.6, n.14, p.16, 2006.

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.

AUGUSTIN, L. *Interação genótipo x ambiente e variabilidade genética de caracteres agronômicos e qualidade de processamento em batata*. 2007. Tese (Doutorado em Agronomia/ Produção vegetal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2007.

AYALA, F. J.; POWELL, J. R.; TRACEY, M. L.; MOURÃO, A. C.; PÉREZ-SALAS, S. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group - IV: genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, Baltimore, v. 70, p. 113-139, 1972.

BISOGNIN, D. A. Melhoramento da batata para resistência às doenças. In: PEREIRA, A. da S.; DANIELS, J. *O cultivo da batata na região sul do Brasil*. Embrapa Clima Temperado. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.57-67.

BISOGNIN, D.A.; DOUCHES, D.S.; BUSZKA, L.; BRYAN, G.; WANG, D. Mapping Late Blight Resistance in *Solanum microdontum* Bitter. *Crop Science*, v.45, p.340-345, 2005.

BISOGNIN, D. A. Pesquisas científicas e tecnológicas desenvolvidas em batata na Universidade Federal de Santa Maria. In: IX Reunião Técnica de Pesquisa e Extensão da cultura da batata da região sul. Santa Maria, RS, 25 e 26 de julho de 2006a. 159p.

BISOGNIN, D. A. *Simpósio de melhoramento genético e previsão de epifitias em batata*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2006b. 101p.

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.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. *Melhoramento de plantas*. Viçosa: UFV, 4ªEd., 2005.

BRUNE, W.; ALFENAS, A. C.; JUNGHANS, T. G. Identificações específicas de enzimas em géis. In: ALFENAS, A. C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Universidade Federal de Viçosa: UFV, 1998. p.201-328.

BRUNE, W.; ALFENAS, A. C. Modalidades da eletroforese. In: ALFENAS, A. C. *Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos*. Universidade Federal de Viçosa: UFV, 2006. p.25-83.

CHOER, E. Origem e Evolução. In: PEREIRA, A. da S.; DANIELS, J. *O cultivo da batata na região sul do Brasil*. Embrapa Clima Temperado. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.57-67.

COLEMAN, W.K. comparative performance of the L* a* b* colour space and North American colours charts for determining chipping quality in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Canadian Journal of Plant Science*. v.84, p. 291–298, 2004.

CONKLIN, M. E.; SMITH, H. H. Peroxidase isozymes: A measure of molecular variation in ten herbaceous species of *Datura*. *American Journal of Botany*, v.58, n.7, p.688-696, 1971.

DALE, M.F.B. ; MACKAY, G.R. Inheritance of table and processing quality. In: BRADSHAW, J.E.; MACKAY, G.R. (ed.) *Potato Genetics*. Wallingford: CAB International. 1994. p.285-315.

DESBOROUGH, S.L, PELOQUIN, S.J. Potato variety identification by use of electrophoretic patterns of tuber proteins and enzymes. *American potato journal*, v.45, p.220-229, 1968.

DESBOROUGH, S.L, PELOQUIN, S.J. Acid phosphatase isozymes in haploides and selfs of group *Tuberosum* potato cultivars. *Phytochemistry*, v.10 p.571-572, 1971.

DOUCHES, D.S.; QUIROS, C.F. Additional isoenzyme loci in tuber-bearing *Solanums*: inheritance and linkage relationships. *The journal of heredity*, v.79 n.5, p.377-384, 1988.

FAO. Agricultura/ producción vegetal/ producción de cultivos alimenticios. Disponível em: <<http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/papa.htm>>. Acesso em: 20 jan 2008.

FILGUEIRA, F.A.R. Batata Inglesa Ou Andina? *Batata Show*, v.5, n.13, 2005.

FORTES, G. R. de L.; PEREIRA, J. E. S. Classificação e descrição botânica. In: PEREIRA, A. da S.; DANIELS, J. *O cultivo da batata na região sul do Brasil*. Embrapa Clima Temperado. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.69-104.

HAWKES, J. G. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: BRADSHAW, J.E; MACKAY, G.R. *Potato Genetics*. CAB INTERNACIONAL. 1994. p.3-42.

IBGE. *Confronto das Safras de 2006 e das Estimativas para 2007 – Brasil*. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtm>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. 2ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

LIGARRETO, G. A. M. LOS RECURSOS GENÉTICOS: Un Acervo Importante para el Mejoramiento de la Producción de Papa. *Corpoica: Innovación y Cambio Tecnológico*, v.2, n.1, p.12-17, mayo, 2001.

LOVE, S.L. Important quality characteristics in breeding processing potatoes. In: *World Potato Congress*, 4. proceeding...Amsterdam: Wageningen Press, p.261-266, 2000.

MALONE, G.; ZIMMER P. D.; MENEGHELLO G. E.; CASTRO M. A. da S. de; PESKE, S. T. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. *Revista Brasileira de Sementes*, v.29, n. 1, p.61-67, 2007.

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

MELO, P.E.. Cultivares de Batata potencialmente úteis para processamento na forma de fritura no Brasil e manejo para obtenção de tubérculos adequados. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte 20 (147), p.112–119, 1999.

MENEZES, S. M. de; TILLMANN, M. A. A.; BICCADODE, L.; VILELLA, F. A. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. *Revista Brasileira de Sementes*, v.26, n.2, p.150-155. 2004.

MORENO M. J. D. *Calidad de la papa para usos industriales*, 2000. Disponível em: <<http://www.redepapa.or/calidadpapa.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2007

OLIVEIRA, A. C. B de; SEDIYAMA, M. A. N.; SEDIYAMA, T; FINGER, F. L.; CRUZ, C. D. Variabilidade genética em batata-doce com base em marcadores isoenzimáticas. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.20, n.4, p.576-582, dezembro, 2002.

PINTO, C. A. B. P. Hibridação em batata. In: BORÉM, A. *Hibridação artificial de plantas*. Viçosa: UFV, 1999. p.139-152.

PINTO, L.R; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P. de; SOUZA JUNIOR, C.L. de. Isoenzimas e microssatélites em plantas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n.20, p.16-19, maio-junho, 2001.

RAMSEY, J., SCHEMSKE, D.W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.29, p.467-501, 1998.

ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. *Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos*. Universidade Federal de Viçosa:UFV, p.329-380, 2006.

ROCHA, B.H.G.; AUGUSTIN, E.; da SILVA, J.B.; PEREIRA. A. da S. Associação entre isoenzimas e matéria seca em batata silvestre. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.12, p.2415-2421, dezembro, 2000.

ROCHA, B.H.G.; 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.

SALAZAR, S. da R. *Influência da temperatura na ocorrência de pólenes não reduzidos em batata diplóide*. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo. 2007.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochemical Genetics*, New York, v.3, n.1, p.37-79, 1969.

SCHIFINO-WITTMAN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Gametas não reduzidos nomelhoramento de plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.1, p.169-175, 2001.

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.

SILVA, A.C.F. da. Batata: alguns aspectos importantes. *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, v.4, p.38-41, 1991.

SILVA, J. G. J. da. *Eletroforese de proteínas: guia teórico e prático*. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 125p.

SILVA, R. V. da; SIMON, G. A.; PINTO, C. A. B. P. *Seleção de híbridos interespecíficos de batata em programa de retrocruzamento*. Porto Seguro, Bahia: Ed. Multimídia, 2003. 1 CD-ROM.

SÝKOROVÁ, S.; MATEJOVÁ, E. Characterisation of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Varieties by Electrophoresis of Tuber Proteins. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 42, (4): p.142–146, 2006

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.

VENDRUSCOLO, J.L. Avaliação e melhoria das qualidades tecnológicas e sensoriais de genótipos de batata (*Solanum tuberosum* L.) para a industrialização e consumo de mesa, Pelotas, CPACT/EMBRAPA, 1998. (Subprojeto de Pesquisa no 0.5.0.99.080.05. Sistema Embrapa de Planejamento). 6p.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentos de bioquímica*. Porto Alegre: Artmed, 2000. 931p.

ZORZELLA, C.A.; VENDRUSCOLO, J.L.; TREPTOW, R.O. Qualidade sensorial de “chips” de diferentes genótipos de batatas (*solanum tuberosum* l.), cultivos de primavera e outono no rio grande do sul. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.9, n.1, p.57-63, janeiro-março, 2003a.

ZORZELLA, C.A.; VENDRUSCOLO, J.L.; TREPTOW, R.O.; ALMEIDA, T.L. de. Caracterização física, química e sensorial de genótipos de batata processados na forma de chips. *Brazilian Journal of Food technology*, v.6, n.1, p.15-24, janeiro-junho, 2003b.