

IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE MILHO POR MEIO DE PROTEÍNAS RESISTENTES AO CALOR

SOLANGE CARVALHO BARRIOS ROVERI JOSÉ¹, ÉDILA VILELA DE RESENDE VON PINHO²,
KALINKA CARLA DE CARVALHO SALGADO³, RENZO GARCIA VON PINHO²

¹Eng. Agrônoma, DSc., Setor Sementes, Universidade Federal de Lavras - UFLA. Caixa Postal 37, CEP. 37200-000 Lavras, MG. E-mail: marsol@ufla.br (autor para correspondência)

²Eng. Agrônomo, DSc., Professor do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA. Caixa Postal 37, CEP. 37200-000 Lavras, MG

³Eng. Agrônoma, doutoranda em Fitotecnia da Universidade Federal de Lavras.

Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.3, n.1, p.1-9, 2004

RESUMO - Para a identificação e registro de cultivares, a utilização de marcadores estáveis e polimórficos torna-se necessária. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o polimorfismo e a estabilidade das proteínas resistentes ao calor de sementes de linhagens de milho produzidas em diferentes safras e submetidas à secagem natural e artificial, visando a utilização dessas proteínas como descritores para a identificação e registro de cultivares. As sementes apresentaram diferentes níveis de qualidade fisiológica quando avaliadas pelo teste de germinação e as proteínas resistentes ao calor foram extraídas de eixos embrionários das sementes de cada linhagem, em tampão Tris-HCl 0,05 M. Os padrões eletroforéticos dessas proteínas em SDS-PAGE revelaram padrões de bandas estáveis para cada genótipo mesmo naqueles com grandes variações nos valores de germinação. As linhagens mais semelhantes foram diferenciadas por, pelo menos, duas bandas, mostrando o alto grau de polimorfismo gerado por essas proteínas. A estabilidade das proteínas resistentes ao calor, aliada ao elevado polimorfismo das mesmas, tornam-nas marcadores potenciais nos programas de identificação e registro de cultivares de milho.

Palavras-chave: sementes, proteínas, marcador molecular, identificação de cultivares.

CORN CULTIVAR IDENTIFICATION THROUGH HEAT RESISTANT PROTEINS

ABSTRACT - Stable and polymorphic markers are required for the identification and registration of the cultivars. The purpose of this research was to evaluate the heat resistant proteins polymorphism and stability of seeds from corn lines harvested in different years and dried under natural and artificial conditions, in order to employ such proteins in the identification and registration of the cultivars. The seeds showed different physiological quality when evaluated by germination test and the heat resistant proteins were extracted from embryonic axis from seeds of each line, in Tris-HCl 0,05 M buffer. The electrophoretic patterns of these proteins in SDS-PAGE showed stable bands for each genotype even for the lines with higher variation in the germination test. The most similar corn inbred lines were distinguished, at least by two bands, showing that these proteins were highly polymorphic. The stability and the high level of polymorphism of the heat resistant proteins, make them potential markers in corn cultivars registration and identification programs.

Key words: seeds, proteins, molecular marker, cultivars identification.

O desenvolvimento de cultivares de milho mais produtivas tem aumentado significativamente nos últimos anos. A certificação da pureza genética e a identificação de cultivares são indispensáveis para assegurar aos agricultores um produto com as características genéticas desenvolvidas pelo melhorista, além de garantir a proteção da propriedade intelectual, especialmente face à Lei de Proteção de Cultivares, que permite a proteção de variedades vegetais desenvolvidas nos programas de melhoramento genético, tanto pelas instituições públicas quanto privadas (Grattapaglia & Ferreira, 1996). Atualmente, existem 426 cultivares protegidas, envolvendo 56 empresas titulares de proteção. Dentre as cultivares protegidas, 21 são de milho, existindo ainda 555 cultivares de milho registradas no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. Para que uma cultivar seja registrada e protegida, a mesma deve atender aos critérios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade. Para atender a esses critérios, a cultivar é submetida à análise de descritores que deverá permitir a sua identificação de maneira precisa.

No Brasil, a identificação de cultivares e certificação da pureza genética para o controle de qualidade das sementes têm sido realizadas, principalmente, por meio de marcadores morfológicos em sementes, plântulas e plantas nas fases de florescimento e maturação (Silva, 1997). Porém, o emprego desses marcadores apresenta limitações como o tempo, espaço e mão-de-obra requeridos para as avaliações (Smith & Register III, 1998), podendo ainda apresentar baixa precisão devido à influência dos fatores ambientais (Cooke, 1984).

Apesar dos marcadores moleculares não estarem sendo utilizados como descritores na Lei de Proteção de Cultivares (LPC) no Brasil, eles têm sido empregados principalmente quando os marcadores morfológicos se apresentam deficientes para definir os critérios de distinguibilidade, estabilidade e homogeneidade (Mann, 2002). Nesse

sentido, a International (International Seed Testing Association, 1996) e a Association (Association of Seed Analysis, 1991) têm indicado vários tipos de proteínas de armazenamento para a caracterização de cultivares, dentre elas as hordeínas em cevada, as secalinas em centeio, glutelinas em trigo, aveninas em aveia, zeínas em milho, lectinas e vicilinas em *Phaseolus*, legumininas em *Pisum sativum*, glicinina em soja (Kigel & Galili, 1995).

Sendo um produto direto da expressão de genes, as proteínas exibem um considerável polimorfismo, que se baseia no fato de que esses produtos apresentam diferenças na mobilidade por serem codificados por diferentes seqüências de nucleotídeos no DNA. Assim, os perfis eletroforéticos das proteínas possuem uma base genética e são herdáveis (Murphy *et al.*, 1990).

Padrões eletroforéticos de zeínas têm sido utilizados em milho, uma vez que estas sofrem uma menor influência do ambiente. Imolesi *et al.* (2001) constataram que os padrões das proteínas totais e da fração zeína em sementes de milho não foram alterados por diferentes doses de nitrogênio no solo, o que não ocorreu para os padrões da fração não-zeína. Porém, os padrões eletroforéticos de zeínas não geraram polimorfismo suficiente para a distinção entre as linhagens de milho e os seus respectivos híbridos.

Além da utilização dos padrões de proteínas de armazenamento para a identificação de cultivares e a certificação da pureza genética em milho, a Association (1991) recomenda vários sistemas isoenzimáticos, entre eles o da álcool desidrogenase, malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida e glutamato-oxalacetato transaminase. Desses sistemas, Salgado (2001) observou que apenas a esterase e a malato desidrogenase apresentaram atividade tanto nas sementes como nos tecidos dos coleóptilos e das folhas de milho.

Apesar das isoenzimas proporcionarem uma discriminação mais rápida, a estabilidade das mesmas varia com as condições de temperatura, fotoperíodo, nutrição mineral, injúria mecânica e associações com microrganismos durante o processo de produção de sementes, as quais podem influenciar na expressão isoenzimática, comprometendo o resultado (Pevise & Brewbaker, 1973). Silva (1997) verificou que a infecção das sementes de milho por fungos provoca alterações nos padrões eletroforéticos de isoenzimas, sendo mais ou menos intensa, dependendo do tipo de fungo e do tecido vegetal utilizado. Em sementes de algodão, variações eletroforéticas associadas ao processo deteriorativo foram observadas para as isoenzimas e proteínas solúveis, ao passo que as proteínas de armazenamento não foram alteradas (Vieira, 1996).

Dessa forma, é necessário avaliar marcadores que sejam polimórficos, estáveis e de baixo custo para a identificação e registro de cultivares, assim como na certificação da pureza genética.

Um grupo particular de proteínas, as proteínas LEA ("Late Embryogeneses Accumulated"), tem despertado interesse como marcador na identificação de cultivares (Mann, 2002). Tais proteínas aparecem na fase de dessecação das sementes, durante o seu desenvolvimento e são extraídas em condições de alta temperatura, não apresentando nenhuma atividade catalítica aparente. Estas proteínas resistentes ao calor, por sua natureza conservada, por suas propriedades físicas e abundância, têm sido associadas com a tolerância à dessecação das sementes (Blackman *et al.* 1991; Kigel & Galili, 1995).

Proteínas resistentes ao calor foram utilizadas como marcador bioquímico em sementes de algodão, produzidas sob as mesmas condições de cultivo, para o estudo de diversidade genética (Mann, 2002). O polimorfismo nos perfis eletroforéticos

dessas proteínas permitiu o agrupamento das variedades em três grupos, de acordo com o tamanho, número e intensidade de bandas. Essas proteínas apresentaram-se como marcadores promissores para agrupar e diferenciar materiais geneticamente próximos de algodoeiro.

No entanto, essas proteínas têm sido pouco estudadas como descritores de cultivares de outras espécies. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o polimorfismo e a estabilidade das proteínas resistentes ao calor, sob diferentes condições de produção e de secagem de sementes de linhagens de milho, visando sua utilização como descritores para a identificação e registro de cultivares.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido na área experimental do Departamento de Agricultura e no Laboratório de Biotecnologia do Setor de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizadas sementes de linhagens de milho provenientes do programa de melhoramento de milho da UFLA. As sementes foram produzidas nas safras 99/00 e 00/01 por meio de autofecundações, sendo parte dessas sementes colhida manualmente em espiga, quando o conteúdo de água atingiu aproximadamente 35%. Essas sementes foram submetidas à secagem artificial a 45°C até teor de água de 11%. Para a secagem das espigas, foram utilizados secadores experimentais de pequena escala, construídos de acordo com Navratil & Burris (1982). O secador constou de uma câmara de secagem (61 x 61 x 61 cm) e gavetas empilháveis (61 x 61 x 15,2 cm). O sistema de aquecimento foi realizado por meio de um conjunto de resistências (5000 Watts) e a temperatura no leito de secagem foi verificada com o auxílio de um termo-cabo contendo um sensor. A base de cada secador foi dotada de um ventilador centrífugo, com uma portinhola deslizável para

regular a vazão de ar, gerado por um motor elétrico de 0,25 Kw e 115 V. O fluxo de ar utilizado foi de 32 m³/min/ton.

A outra parte das sementes permaneceu no campo de produção até que o teor de água atingisse 18%, quando as espigas foram colhidas manualmente e secadas à sombra até o teor de água de 11%. As sementes, classificadas na peneira de 16", foram tratadas com os fungicidas Tecto 6000 (40 g/100 Kg de sementes) e Captan (120 g/100 Kg de sementes) e armazenadas em câmara fria e seca (10°C e 60% de UR) até a realização das análises.

Procurou-se trabalhar com sementes de diferentes níveis de qualidade fisiológica para testar a estabilidade das proteínas resistentes ao calor, uma vez que essa característica é importante para um descritor.

A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada pelo teste de germinação, utilizando-se quatro repetições de 50 sementes. As sementes foram semeadas entre papel toalha tipo Germitest umedecido com água destilada na proporção de 2,5 mL:1 g de papel. As sementes permaneceram no germinador regulado para 25°C, e as avaliações das plântulas normais foi efetuada aos 7 dias após a instalação do teste, segundo recomendações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais das quatro repetições.

Para a extração das proteínas resistentes ao calor, sementes de cada linhagem, colhidas nas duas safras e submetidas à secagem artificial e natural, foram embebidas durante 5 horas para extração do eixo embrionário, os quais foram colocados em microtubos e armazenados a -86°C. No momento da extração, 11 eixos embrionários foram moídos em mortar sobre gelo, na presença de solução tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume tampão extração), e

transferidos para microtubos de capacidade de 1500 mL. O homogeneizado foi centrifugado por 45 minutos a 4°C a 16000 xg e o sobrenadante incubado em banho-maria a 85°C por 15 minutos, sendo novamente centrifugado como citado acima, por 30 minutos. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o pellet descartado. Antes da aplicação no gel, os tubos de amostras contendo 70 mL de extrato + 40 mL de solução tampão da amostra (2,5 mL de glicerol; 0,46 g de SDS; 20 mg de azul de Bromofenol e completado o volume para 20 mL com o tampão de extração Tris pH 7,5) foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos. Foram aplicados 50 mL dessa solução em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% no gel separador e 6%, no concentrador. A corrida eletroforética foi realizada a 150 V e os géis corados em Coomassie Blue a 0,05%, conforme Alfenas *et al.* (1991), durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10%.

Os padrões eletroforéticos de cada genótipo foram avaliados, utilizando como referência o padrão de proteína da INVITROGEN Cat. Nº 10747-012, contendo 15 padrões de peso molecular entre 10 e 220 kDa. Após a análise dos zimogramas, foi construída uma tabela com a presença e ausência de bandas para cada linhagem, sendo que cada banda foi identificada por meio dos respectivos pesos moleculares. Foram consideradas apenas as frações protéicas presentes nas diferentes safras e condições de secagens, em cada linhagem. No estudo de diversidade genética, utilizou-se o complemento aritmético do coeficiente de Jaccard entre pares de linhagens. O agrupamento foi obtido pelo método UPGMA (Duarte & Santos, 1999), empregando-se o programa NTSYS-pc versão 2.1 (Rohlf, 2000).

Resultados e Discussão

Na tabela 1, estão apresentados os valores de germinação das sementes das linhagens colhidas

nas safras 99/00 e 00/01, submetidas à secagem artificial e à sombra. Para a linhagem 7, houve baixa produção de sementes, o que comprometeu a avaliação da qualidade fisiológica das sementes. Grandes variações nos valores de germinação foram observadas quando as sementes foram submetidas aos diferentes métodos de secagem, principalmente para as linhagens 6, 9 e 10, em ambas as safras. Diferenças nos valores de germinação de 93% e 83% foram observadas para as sementes da linhagem 10 nas safras 99/00 e 00/01, respectivamente. Houve maior redução nos valores de germinação das sementes das linhagens 1, 2, 3, 4 e 5, produzidas na safra 00/01 após secagem artificial em relação à safra 99/00, demonstrando influência do ambiente para essa característica. Desse modo, foi possível obter sementes das linhagens com variações nos valores de germinação a partir da produção em diferentes safras e sob diferentes métodos de secagem.

A partir dos padrões protéicos obtidos, avaliou-se primeiramente a estabilidade das proteínas resistentes ao calor nas sementes de cada genótipo, submetidas às diferentes condições de produção e secagem. Considerando os materiais utilizados, foram analisadas em torno de 20 bandas protéicas. Nessa avaliação, foram consideradas as bandas robustas, uma vez que é um requisito necessário para fins de proteção de cultivares e certificação da pureza genética. Para cada genótipo foi observada estabilidade nos padrões das bandas protéicas analisadas, mesmo nas sementes que apresentaram grandes variações nos valores de germinação, a exemplo da linhagem 10 e 6 (Figura 1). Por meio desse marcador, foi possível certificar a pureza genética de sementes de milho de diferentes cultivares em lotes com diferentes níveis de qualidade fisiológica.

A estabilidade do descritor é uma condição para que o mesmo possa ser utilizado para a proteção,

TABELA 1. Valores médios de germinação (%) de sementes de milho, produzidas nas safras 99/00 e 00/01 e submetidas à secagem artificial e secagem à sombra.

Linhagens	Safr 99/00		Safr 00/01	
	Artificial	Sombra	Artificial	Sombra ¹
1	95	76	8	92
2	100	96	12	83
3	99	98	63	83
4	99	99	49	91
5	99	100	30	96
6	66	92	16	91
7	55	97	-	-
8	57	99	78	86
9	56	100	60	90
10	11	97	3	96

¹Germinação realizada após 16 meses de armazenamento.

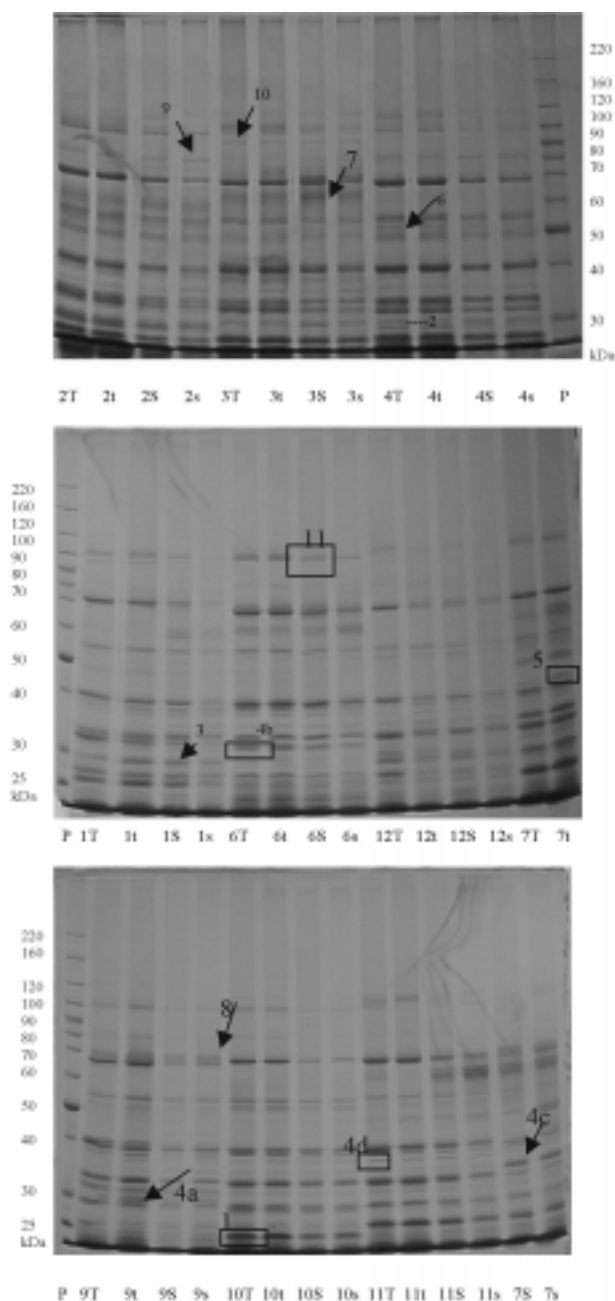


FIGURA 1. Padrões eletroforéticos de proteínas resistentes ao calor de sementes de milho. Os números referem-se às linhagens e as letras indicam as diferentes safras e métodos de secagem. T: testemunha (secagem à sombra), safra 99/00; t: testemunha (secagem à sombra), safra 00/01; S: secagem artificial, safra 99/00; s: secagem artificial, safra 00/01; P: padrão de massa molecular em kDa.

registro e certificação da pureza genética (Brasil, 1997). Padrões eletroforéticos de outras proteínas, como as zeínas, têm sido consideradas estáveis em sementes de milho infectadas com os fungos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Silva, 1997) e em sementes de milho produzidas sob diferentes doses de nitrogênio (Imolesi *et al.* 2001). No entanto, este último autor abordou que o polimorfismo observado para as zeínas em SDS-PAGE foi baixo, entre as cultivares analisadas.

Com relação às proteínas resistentes ao calor, nenhuma pesquisa parece ter sido desenvolvida para verificar a estabilidade das mesmas. Assim, a elevada estabilidade das proteínas resistentes ao calor as tornam promissoras para utilização nos programas de registro, proteção e certificação da pureza genética, em detrimento das enzimas às quais parecem ser mais afetadas em função do nível de qualidade das sementes.

As bandas polimórficas foram avaliadas em função dos pesos moleculares, sendo observadas variações tanto no número quanto na intensidade das bandas entre os genótipos (Figura 1). Na tabela 2, estão apresentados os dados relativos à presença e ausência de bandas observadas para cada genótipo. Foram observados padrões eletroforéticos diferentes entre todas as linhagens analisadas.

A banda 3, com peso molecular de 30 kDa, estava presente apenas na linhagem 1 e a banda 10, com peso molecular de 90 kDa, presente apenas na linhagem 3 (Tabela 2). Assim, uma única banda foi capaz de diferenciar as linhagens 1 e 3 com relação às demais. A linhagem 2 pôde ser separada das linhagens 3, 6, 7, 8 e 9 devido à presença da banda 2; da linhagem 10, pelas bandas 4b e 9; das linhagens 1 e 4 pela banda 4c e da linhagem 5, pela banda 9. Todas as linhagens avaliadas puderam ser diferenciadas por, pelo menos, duas bandas (Tabela 2).

As linhagens 6 e 9, 3 e 5, 2 com a 4 e 5 foram as mais similares (Tabela 3 e Figura 2). As linhagens mais divergentes foram as 1 com a 10, cujo

TABELA 2. Presença (P) e ausência (A) de bandas das proteínas extraídas pelo calor, observadas em diferentes linhagens (L) de milho.

L	Bandas ¹													
	1	2	3	4a	4b	4c	4d	5	6	7	8	9	10	11
1	A	P	P	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	P
2	P	P	A	A	P	P	P	A	A	A	A	P	A	P
3	P	A	A	A	P	P	P	A	A	P	A	A	P	P
4	P	P	A	A	P	A	P	A	P	A	A	P	A	P
5	P	P	A	A	P	P	P	A	A	P	A	A	A	P
6	A	A	A	A	P	P	A	P	P	P	P	A	A	A
7	A	A	A	P	P	P	P	P	P	A	P	A	A	P
8	P	A	A	A	A	P	P	P	P	A	A	A	A	P
9	A	A	A	A	P	P	P	P	P	P	A	A	A	A
10	P	P	A	P	A	P	P	P	P	A	A	A	A	A

¹Massas moleculares das bandas: 1: <25 kDa; 2: 25-30 kDa; 3: 30 kDa; 4a: 30-40 kDa; 4b: 30-40 kDa; 4c: 30-40 kDa; 4d: 30-40 kDa; 5: 40-50 kDa; 6: 50-60 kDa; 7: 60-70 kDa; 8: 70 kDa; 9: 80 kDa; 10: 90 kDa e banda 11: 100 kDa.

TABELA 3. Matriz de distância genética entre as linhagens, calculada pelo complemento aritmético do índice de Jaccard (abaixo da diagonal). Os números acima da diagonal indicam o mínimo de bandas diferenciadoras.

Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.00	5	7	5	5	8	8	8	8	9
2	0.63	0.00	4	2	2	9	7	5	7	6
3	0.78	0.45	0.00	6	2	7	7	5	5	8
4	0.63	0.25	0.60	0.00	4	9	7	5	7	6
5	0.63	0.25	0.25	0.45	0.00	7	7	5	5	6
6	0.89	0.82	0.70	0.82	0.70	0.00	4	6	2	7
7	0.80	0.64	0.64	0.64	0.64	0.45	0.00	4	4	5
8	0.89	0.56	0.56	0.56	0.56	0.67	0.45	0.00	4	3
9	0.89	0.70	0.56	0.70	0.56	0.29	0.45	0.50	0.00	5
10	0.90	0.60	0.73	0.60	0.60	0.70	0.50	0.38	0.56	0.00

índice de diversidade foi de 90%, sendo diferenciadas por 9 bandas (Tabela 3 e Figura 2).

Por meio desses resultados, foi observado um alto nível de polimorfismo das proteínas resistentes ao calor nos diferentes genótipos de milho utilizados. Polimorfismo para essas proteínas também foi observado por Mann (2002) em algodoeiro.

Assim, comparadas às zeínas já prescritas pela International para a identificação de cultivares, as proteínas resistentes ao calor parecem apresentar um maior nível de polimorfismo que, aliado à estabilidade das mesmas, apresentam-se com grande potencial para serem utilizadas como descritores para o registro e proteção de cultivares.

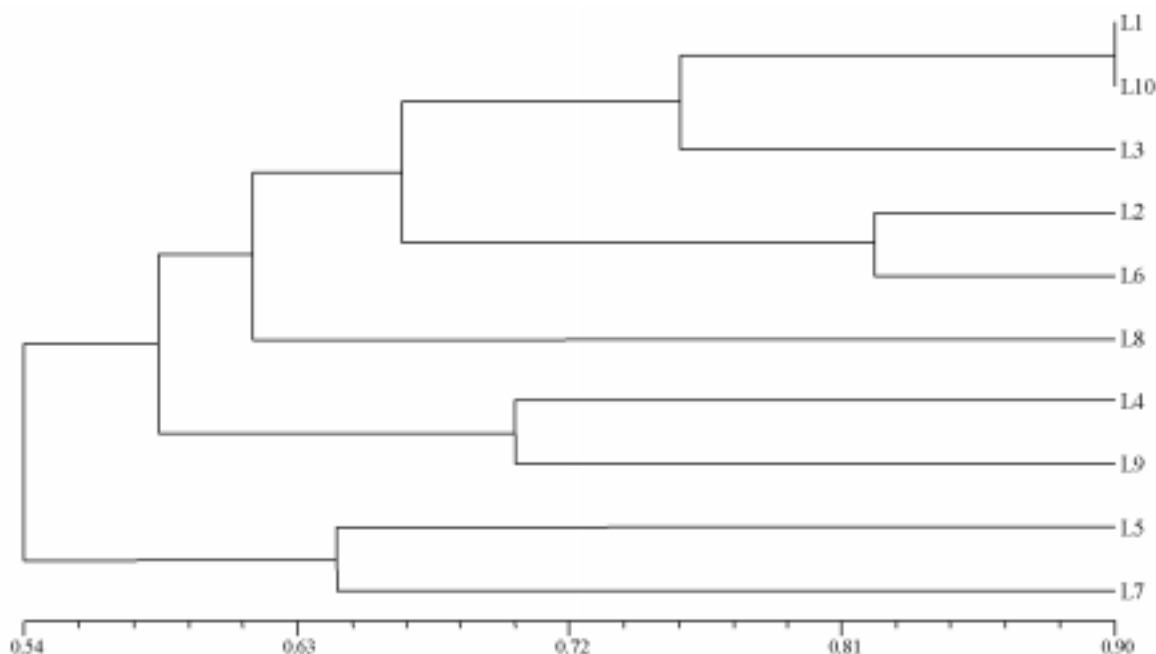


FIGURA 2. Dendrograma de diversidade genética entre as linhagens de milho, com base nos padrões eletroforéticos das proteínas resistentes ao calor. L: linhagem.

Conclusões

As proteínas resistentes ao calor apresentaram uma boa estabilidade e um elevado nível de polimorfismo quando avaliadas em diferentes safras e métodos de secagem, oferecendo grande potencial de utilização em processos de identificação e registro de cultivares de milho.

Literatura Citada

ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUCE, W.; PASADOS, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS. **Cultivar purity testing**. Lansing, 1991. 371 p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Rules for seed testing**. Zürich, 1996. 44 p.

BLACKMAN, S. A.; WETTLAUER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 96, p. 868-874, 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

BRASIL. Decreto-lei 9456 de 28 de abril de 1997. Lei de proteção de cultivares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 79, p. 8241-8246, 28 de abr. 1997. Seção 1.

COOKE, R. J. The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 5, p. 59-72, 1984.

DUARTE, J. M.; SANTOS, J. B.; MELLO, L. C. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. **Genetics and**

- Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 427-432, 1999.
- GRATTAPAGLIA, D.; FERRERA, M. E. Proteção de cultivares por análise de DNA. **Anuário ABRASEM**, Brasília, p. 44-50, 1996.
- IMOLESI, A. S.; PINHO, E. V. R. von; PINHO, R. G. von; VIEIRA, M. G. G. C.; CORRÊA, R. S. B. Efeito da adubação nitrogenada em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 17-24, 2001.
- KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. 853 p.
- MANN, R. S. **Diversidade do complexo *Colletotrichum* e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares**. 2002. 146 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MURPHY, R. W.; SITES JR., J. W.; BUTH, D. G. *et al.* Proteins I: isozyme electrophoresis. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C. **Molecular Systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p. 45-126.
- NAVRATIL, R. J.; BURRIS, J. S. Small-scale dryer designer. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, p. 159-161, 1982.
- PEREIRA, P. A. A. A.; SOUZA, C. R. B. Tipos de faseolina em raças “criolulas” de feijão no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 8, p. 1219-1221, 1992.
- PEVICE, L. C.; BREWBAKER, J. L. Applications of isozyme analysis in horticultural science. **Hortscience**, Alexandria, v. 8, n. 1, p. 17-22, 1973.
- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system** – version 2,10. New York: Applied Biostatistics, 2000. Não paginado.
- SALGADO, K. C. de C. **Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. 2001. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SILVA, E. A. A. **Padrões eletroforéticos de isoenzimas e proteínas de sementes e coleóptilos de milho em associação com microrganismos**. 1997. 87 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SMITH, J. S. C.; REGISTER III, J. C. Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, p. 285-293, 1998.
- VIEIRA, E. S. N.; PINHO, E. V. de R. von; VIEIRA, M. das G. G. C. V; MANN, R. S. Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores moleculares de proteínas e enzimas visando a certificação da pureza genética. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n.2, p. 35-42, 2001.
- VIEIRA, M. G. G. C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 1996. 118 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.