

## Caracterização isoenzimática de genótipos de arroz<sup>(1)</sup>

Sandro Bonow<sup>(2)</sup>, Eliane Augustin<sup>(3)</sup>, Daniel Fernandes Franco<sup>(3)</sup>, José Antonio Peters<sup>(4)</sup> e Arlei Laerte da Silva Terres<sup>(3)</sup>

Resumo – Objetivou-se, neste trabalho, caracterizar isoenzimaticamente genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.). A produtividade do arroz irrigado no Rio Grande do Sul é elevada, em virtude da alta tecnologia e sistema de irrigação usados, associados ao potencial alcançado pelas cultivares desenvolvidas através de melhoramento genético. Apenas seis ancestrais contribuem com 86% dos genes das cultivares mais plantadas. Como consequência desta estreita base genética, as cultivares apresentam um alto grau de parentesco e de similaridade de suas características morfológicas e agronômicas, o que dificulta a identificação varietal. A concorrência com genótipos, como arroz-vermelho e arroz-preto, de difícil controle por serem da mesma espécie que os cultivados, é considerada como um dos maiores problemas da cultura. Análises de isoenzimas podem ser usadas para o estudo da variabilidade e para estimar as relações genéticas existentes entre estes genótipos. Eletroforese em gel de poliacrilamida foi empregada, portanto, para caracterizar, através de isoenzimas de esterase, 6-fosfogluconato desidrogenase, fosfoglucoisomerase e isocitrato desidrogenase em sementes e folhas de plântulas, e de fosfatase ácida e aspartato transaminase em folhas de plântulas, as cultivares BR-IRGA 409, BR-IRGA 410, BRS 6 ('Chuí'), BRS 7 ('Taim'), BRS Agrisul, INIA Taquari, El Paso L 144 e IRGA 417, e ecótipos de arroz-vermelho e arroz-preto. A análise de agrupamento, efetuada por meio do coeficiente de Jaccard e pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA), possibilitou a diferenciação de todos os genótipos, à exceção de BRS 6 ('Chuí') e BRS 7 ('Taim'). Três grupos foram identificados, incluindo-se, em um deles, os ecótipos de arroz-vermelho e arroz-preto, que apresentaram 95% de similaridade.

Termos para indexação: *Oryza sativa*, eletroforese, isoenzimas, variação genética.

### Isoenzymatic characterization of rice genotypes

Abstract – The objective of this work was to characterize isoenzymatically rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. Rice yields obtained in Rio Grande do Sul, Brazil, are high, due to the high technology and the irrigation system used, associated to the genetic potential of the bred cultivars. Six ancestors contribute with 86% of the genetic make up of used cultivars. As a consequence of this narrow genetic basis, they are closely related and show very similar morphological and agronomical characteristics, which turns the varietal identification difficult. The competition with wild genotypes (red and black hulled rice) is considered to be the greatest problem, because they belong to the same species as cultivated rice. Isoenzymes analysis can be used to study variability and to estimate genetic relations among genotypes. Therefore, polyacrylamide gel electrophoresis was used to characterize, through seeds and seedling leaf tissue, esterase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, phosphoglucoisomerase and isocitrate dehydrogenase, and seedling leaf tissue acid phosphatase and aspartate transaminase isoenzymes of cultivars BR-IRGA 409, BR-IRGA 410, BRS 6 ('Chuí'), BRS Taim 7 ('Taim'), BRS Agrisul, INIA Taquari, El Paso L 144 e IRGA 417, and ecotypes of red and of black hulled rice. Cluster analysis, using Jaccard coefficient and unweighted pair-group method arithmetic average (UPGM), allowed to differentiate all genotypes, excluding BRS 6 ('Chuí') and BRS 7 ('Taim'). Three groups were identified, including, in one of them, red and black hulled rice ecotypes, with 95% degree similarity.

Index terms: *Oryza sativa*, electrophoresis, isoenzymes, genetic variation.

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 11 de abril de 2000.

Extraído da dissertação de mestrado apresentada pelo primeiro autor à Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

<sup>(2)</sup> UFPEL, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Capão do Leão, RS. Bolsista do CNPq. E-mail: bonow@bol.com.br

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

<sup>(4)</sup> UFPEL, Dep. de Botânica. E-mail: peters@ufpel.tche.br

## Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo, com grande destaque do ponto de vista econômico e social. No Brasil, maior produtor da América Latina e responsável por 88% da produção do Mercosul, o Rio Grande do Sul destaca-se como principal produtor; cultiva anualmente ao redor de 800 mil hectares de arroz irrigado, e tem participado, nas últimas safras, com um percentual em torno de 40% da produção nacional (Rigatto & Kohlz, 1998). Este alto rendimento deve-se à alta tecnologia utilizada pelos agricultores, associado ao sistema de irrigação e ao potencial genético das cultivares obtidas ultimamente (Guidolin, 1993). Entre os fatores limitantes da cultura, ressalta-se a ocorrência de arroz-vermelho e arroz-preto, reduzindo a produtividade, aumentando custos, comprometendo a qualidade do produto colhido, impedindo plantios sucessivos na mesma área e inviabilizando o cultivo em áreas com altas infestações (Andrade & Magalhães Júnior, 1996; Brandi & Clari, 1997).

Quando é lançada uma cultivar pelo melhorista, esta deve ser comparada com as já existentes, a fim de ressaltar características que possam facilitar sua identificação, mais rápida e eficientemente, no campo, na indústria e nos laboratórios (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1983). O interesse pela caracterização de cultivares tem aumentado significativamente no mundo nas últimas décadas, sendo o motivo principal a crescente necessidade de proteção de cultivares comerciais em mercados econômicos cada vez mais competitivos. Com a aprovação da lei de proteção de cultivares no Brasil, abre-se uma nova perspectiva de interesse na proteção e lançamento de genótipos (Milach, 1998), e registro de novas cultivares. A partir das legislações vigentes em alguns países do Mercosul, a caracterização passa a ser de fundamental importância para o Rio Grande do Sul, no que se refere ao arroz irrigado (Galli, 1996), bem como nos demais estados do Brasil, no que tange ao desenvolvimento de atividades similares na orizicultura, sob todos os aspectos. Para tal, o uso de descritores confiáveis e de natureza genética constitui um instrumento valioso na identificação de cultivares de arroz irrigado.

No Rio Grande do Sul, apenas seis ancestrais contribuem com 86% dos genes das cultivares mais plantadas (Rangel et al., 1996). Como consequência desta estreita base genética, as cultivares apresentam um alto grau de parentesco e de similaridade de suas características morfofenológicas e agronômicas que dificultam a identificação varietal (Guidolin, 1993).

A discriminação de cultivares é realizada com mais facilidade quando, além de características morfológicas, são usados métodos eletroforéticos (International Seed Testing Association, 1992). Marcadores isoenzimáticos, além do baixo custo e acessibilidade da técnica, geralmente fornecem ampla informação genética para diversas aplicações (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

As sementes constituem ótimo material para estudo de polimorfismo enzimático. Além disto, são relativamente fáceis de armazenar, normalmente ricas em proteínas e enzimas, e, geralmente, livres de metabólitos secundários (fenóis, taninos e outros) que interferem na resolução e na atividade enzimática (Alfenas et al., 1991; Torggler et al., 1995). Análises eletroforéticas de proteínas de sementes podem ser usadas para estimar as relações genéticas entre cultivares de arroz e para o estudo da variabilidade naquelas que possuem similares antecedentes genéticos (Montalván et al., 1995).

Este trabalho teve por objetivo caracterizar isoenzimaticamente genótipos de *Oryza sativa* L.

## Material e Métodos

Foram analisadas isoenzimas das cultivares de arroz irrigado IRGA 417, El Paso L 144, INIA Taquari – oriundas do Banco de Germoplasma da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão –, BR-IRGA 409 – obtida através do Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA) –, BRS 6 (‘Chuí’), BRS 7 (‘Taim’), BR-IRGA 410 e BRS Agrisul, e dos ecótipos de arroz-preto e arroz-vermelho – fornecidos pelo Programa de Melhoramento de Arroz Irrigado da Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT).

Foi utilizada eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida para análise de esterase, fosfoglucoisomerase, 6-fosfogluconato desidrogenase e isocitrato desidrogenase em sementes e folhas de plântulas, e fosfatase ácida e aspartato transaminase em folhas de plântulas.

Foram analisadas, individualmente, cinco sementes ou plântulas, de cada genótipo. As sementes foram descascadas manualmente e imersas em água 24 horas antes da extração. Amostras em folhas de plântulas foram coletadas 14 dias após as sementes terem sido colocadas em rolo de papel, em germinador a 25°C, segundo as Regras para Análises de Sementes (Brasil, 1992). As amostras consistiram de 24-30 mg de sementes e 10 mg de folhas. Os extratos foram obtidos pela maceração das amostras em tampão usado no gel, na proporção de 1:2, em placas de porcelana mantidas em cubos de gelo. Papel-filtro (Whatman 3MM), de 2 x 4 mm, foi embebido na amostra e aplicado no gel, em orifícios feitos com o auxílio de um "pente" de aço inoxidável.

Nas análises de fosfoglucoisomerase, isocitrato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase, em sementes e folhas, foram empregados o sistema de tampões descrito por Shields et al. (1983) e géis de poliacrilamida a 5%, acrescidos de 2% de amido solúvel. Para análises de esterase em sementes foram usados o sistema de tampões descrito por Nichols & Ruddle (1973), com modificação de pH para 6,5, e géis de poliacrilamida a 5%. Isoenzimas em folhas foram analisadas pelo sistema de tampões, descrito por Scandalios (1969), e géis de poliacrilamida em concentrações de 7%, para esterase; e de 6%, para fosfatase ácida e aspartato transaminase.

Os géis foram colocados em cubas eletroforéticas mantidas em câmara fria com temperatura entre 4°C e 6°C. As migrações eletroforéticas foram feitas com uma diferença de potencial de 10 v/cm, até que o fronte, formado pelo azul de bromofenol, atingisse 9 cm do ponto de aplicação.

Foram usados sistemas de coloração citados por Scandalios (1969), quanto à esterase, Vallejos (1983), quanto à fosfatase ácida, 6-fosfogluconato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e fosfoglucoisomerase, e Ayala et al. (1972), em relação ao aspartato transaminase. A fixação foi feita em solução de água destilada: metanol: ácido acético, na proporção de 5:5:1.

As mobilidades relativas foram calculadas dividindo-se as medidas de todas as bandas encontradas, por uma da cultivar-controle, BRS 6 ('Chuí'), tomada como referência.

Para a estimativa da similaridade entre as cultivares, foi usado o coeficiente de Jaccard, através da similaridade de dados qualitativos (SIMQUAL), e para a análise de agrupamento, o método da média aritmética não ponderada (UPGMA), através do agrupamento seqüencial, aglomerativo, hierárquico e exclusivo (SHAN), conforme Sneath & Sokal, citados por Crisci & Armengol (1983), empregando-se o "numerical taxonomy and multivariate

analysis for personal computers", V. 1.7 (NTSYS) (Rohlf, 1992).

## Resultados e Discussão

Algumas bandas foram desconsideradas em face de sua não-repetibilidade, pois, de acordo com a União Internacional para a Proteção de Obtenções Vegetais (UPOV), somente bandas claramente presentes devem ser utilizadas em testes para diferenciar variedades (International Seed Testing Association, 1992).

Na análise de isoenzimas de esterase em sementes foram consideradas seis bandas (Tabela 1), variando o número de quatro a cinco em cada um dos três padrões eletroforéticos encontrados (Figura 1). Segundo Endo & Morishima (1983), até o início da década de 1980 este sistema enzimático era o mais estudado em arroz. Mais tarde, Wu et al. (1997), analisando isoenzimas de esterase em 848 acessos de arroz, concluíram que a maioria deles apresentava de duas a quatro bandas eletroforéticas.

Os zimogramas de fosfoglucoisomerase em sementes mostraram oito bandas anódicas (Tabela 1), com quatro padrões nos dez genótipos analisados (Figura 1). Augustin et al. (1997), analisando isoenzimas de fosfoglucoisomerase em arroz irrigado, encontraram padrões similares nas cultivares BRS 6 ('Chuí'), BRS 7 ('Taim'), BRS Agrisul, BR-IRGA 409 e em arroz-vermelho.

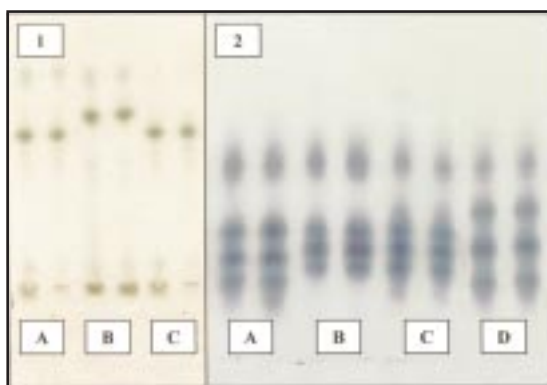
Nos zimogramas de isocitrato desidrogenase em sementes, foram observadas quatro distintas bandas (Tabela 1), em dois padrões (Figura 2), e, nos de 6-fosfogluconato desidrogenase, três bandas (Tabela 1), em dois padrões (Figura 2) – resultados similares aos encontrados por Augustin et al. (1997).

Em folhas de plântulas (Tabela 2) foram observados três padrões (Figura 3) e cinco bandas de esterase – número inferior ao observado em sementes. Hen et al. (1994) analisaram isoenzimas de esterase em seis partes de plantas de 2.489 acessos de arroz e concluíram que algumas podem ser utilizadas para identificação e classificação de cultivares.

Apenas um padrão eletroforético, comum em todos os genótipos, foi observado nas análises de aspartato

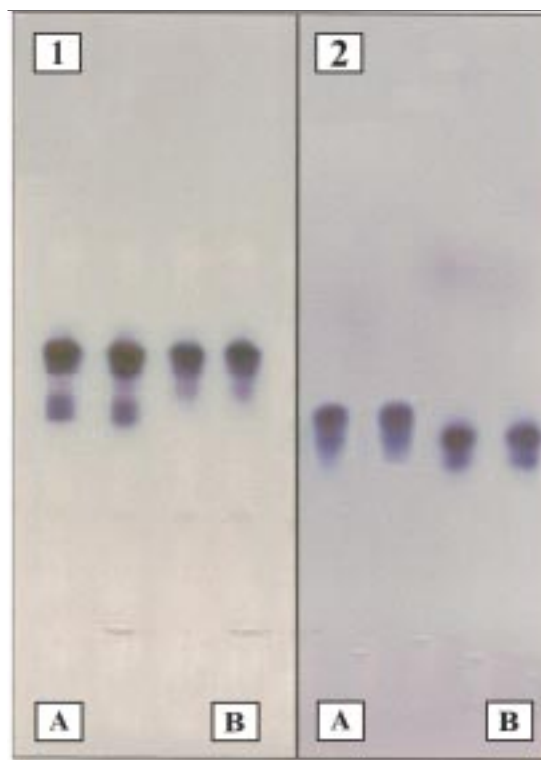
**Tabela 1.** Padrões isoenzimáticos de esterase (EST), fosfoglucoisomerase (PGI), isocitrato desidrogenase (IDH) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6-PGD) observados em sementes de oito cultivares de arroz irrigado e de arroz-preto e arroz-vermelho.

Enzima/padrão	Mobilidades relativas	Genótipos
EST/A	-0,03; 0,59; 0,71; 0,91; 1,23	BR-IRGA 409, BR-IRGA 410, IRGA 417, El Paso L 144
EST/B	-0,03; 0,59; 0,71; 1,00; 1,23	BRS Agrisul, INIA Taquari, BRS 6 ('Chuf'), BRS 7 ('Taim'), vermelho
EST/C	-0,03; 0,59; 0,71; 0,91	Preto
PGI/A	0,40; 0,51; 0,66; 1,00	IRGA 417, El Paso L 144, BR-IRGA 409
PGI/B	0,40; 0,58; 0,76; 1,00	BRS 6 ('Chuf'), BRS 7 ('Taim'), preto, vermelho, BRS Agrisul
PGI/C	0,35; 0,47; 0,58; 0,66; 0,76; 1,00	INIA Taquari
PGI/D	0,47; 0,58; 0,76; 1,00	BR-IRGA 410
IDH/A	0,85; 0,99; 1,03	BR-IRGA 409, BR-IRGA 410, BRS 6 ('Chuf'), BRS 7 ('Taim'), BRS Agrisul, IRGA 417, El Paso L 144, preto, vermelho
IDH/B	0,75; 0,85	INIA Taquari
6-PGD/A	0,75; 0,93; 1,00	BRS Agrisul, BR-IRGA 409, BR IRGA 410, El Paso L 144, BRS 6 ('Chuf'), BRS 7 ('Taim'), preto, vermelho, INIA Taquari
6-PGD/B	0,93; 1,00	IRGA 417



**Figura 1.** Padrões eletroforéticos de sementes de dez genótipos de arroz: 1) esterase; 2) fosfoglucoisomerase.

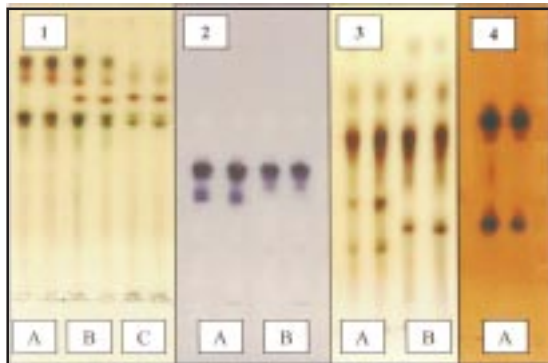
transaminase (Figura 3), com três bandas, e dois padrões nas de isocitrato desidrogenase (Figura 4), 6-fosfogluconato desidrogenase (Figura 3), com quatro e cinco bandas, respectivamente. Segundo Gottlieb (1982), nas análises de aspartato transaminase são, geralmente, verificadas três ou quatro isoenzimas. Maior polimorfismo foi verificado em fosfoglucoisomerase (Figura 4) e fosfatase ácida (Figura 3) em folhas, com oito e sete bandas, respectivamente. Guidolin (1993) encontrou o mes-



**Figura 2.** Padrões eletroforéticos de sementes de genótipos de arroz: 1) 6-fosfogluconato desidrogenase; 2) isocitrato desidrogenase.

**Tabela 2.** Padrões isoenzimáticos de esterase (EST), aspartato transaminase (AT), 6-fosfogluconato desidrogenase (6-PGD), isocitrato desidrogenase (IDH), fosfoglucoisomerase (PGI) e fosfatase ácida (FAC) observados em folhas de plântulas de dez genótipos de *Oryza sativa* L.

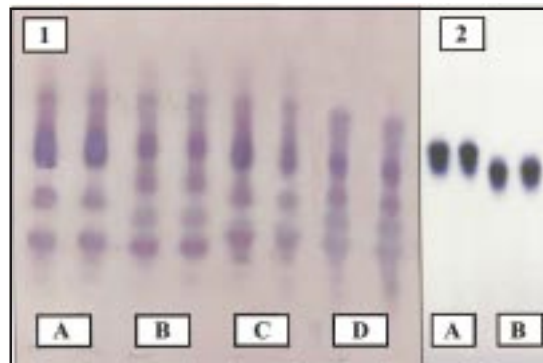
Enzima/padrão	Mobilidades relativas	Genótipos
EST/A	0,73; 0,77; 0,92; 0,99	BRS Agrisul, INIA Taquari, BRS 6 ('Chuí'), BRS 7 ('Taim')
EST/B	0,73; 0,77; 0,83; 0,92; 0,99	BR-IRGA 409, BR-IRGA 410, IRGA 417, El Paso L 144, vermelho
EST/C	0,73; 0,77; 0,83; 0,92	Preto
AT	0,50; 0,91; 0,98	El Paso L 144, BRS Agrisul, BR-IRGA 409, BRS 6 ('Chuí'), BR-IRGA 410, BRS 7 ('Taim'), IRGA 417, preto, vermelho, INIA Taquari
6-PGD/A	0,78; 0,82; 0,95; 1,00	El Paso L 144, BRS Agrisul, BR-IRGA 409, BRS 6 ('Chuí'), BRS 7 ('Taim'), preto, BR-IRGA 410, vermelho, INIA Taquari
6-PGD/B	0,85; 0,95; 1,00	IRGA 417
IDH/A	1,08; 1,2	BRS Agrisul, BR-IRGA 409, BR-IRGA 410, El Paso L 144, IRGA 417, BRS 6 ('Chuí'), BRS 7 ('Taim'), preto, vermelho
IDH/B	0,95; 1,04	INIA Taquari
PGI/A	0,40; 0,59; 0,78; 1,00	BRS 6 ('Chuí'), BRS 7 ('Taim')
PGI/B	0,48; 0,63; 0,78; 1,00	BRS Agrisul, preto, vermelho
PGI/C	0,40; 0,53; 0,68; 0,78; 1,00	El Paso L 144, IRGA 417
PGI/D	0,48; 0,59; 0,68; 0,78; 1,00	INIA Taquari, BR-IRGA 409, BR-IRGA 410
FAC/A	0,35; 0,40; 0,58; 0,88; 1,01; 1,03	El Paso L 144, BRS Agrisul, BR-IRGA 409, BRS 6 ('Chuí'), BRS 7 ('Taim'), IRGA 417, BR-IRGA 410, preto, vermelho
FAC/B	0,35; 0,40; 0,44; 0,88; 1,01; 1,03	INIA Taquari



**Figura 3.** Padrões eletroforéticos de folhas de plântulas de genótipos de arroz: 1) esterase; 2) 6-fosfogluconato desidrogenase; 3) fosfatase ácida; 4) aspartato transaminase.

no número de bandas de fosfatase ácida em plântulas de arroz.

A análise de similaridade, com base nos dados obtidos em sementes, indicaram coeficientes máximos e mínimos de 1,00 e 0,33 (Tabela 3). Os genótipos foram classificados em dois grupos (Figura 5). A cultivar INIA Taquari apresentou maior dissimi-



**Figura 4.** Padrões eletroforéticos de folhas de plântulas de genótipos de arroz: 1) fosfoglucoisomerase; 2) isocitrato desidrogenase.

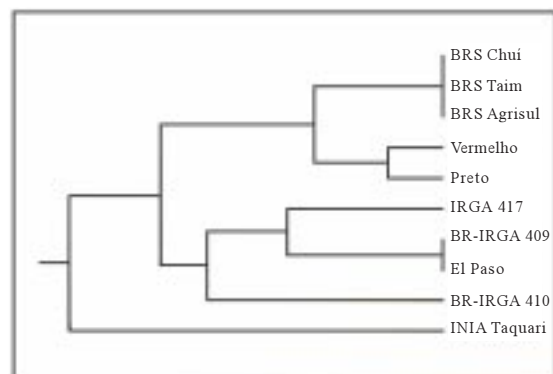
laridade em relação às demais, que constituíram o primeiro grupo, com dois subgrupos: a) BRS 6 ('Chuí'), BRS 7 ('Taim'), BRS Agrisul, arroz-vermelho e arroz-preto; b) IRGA 417, BR-IRGA 409, El Paso L 144 e BR-IRGA 410. Os resultados obtidos não possibilitaram a diferenciação das cultivares BRS 6 ('Chuí'), BRS 7 ('Taim') e BRS Agrisul, desenvolvidas na Embrapa-CPACT.

**Tabela 3.** Similaridade genética entre oito cultivares de arroz irrigado e de ecótipos de arroz-vermelho e arroz-preto, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise de isoenzimas em sementes.

Genótipo	BRS 6 ('Chuí')	BRS 7 ('Taim')	IRGA 417	BR-IRGA 409	BR-IRGA 410	BRS Agrisul	INIA Taquari	El Paso L 144	Vermelho	Preto
BRS 6 ('Chuí')	1,00									
BRS 7 ('Taim')	1,00	1,00								
IRGA 417	0,50	0,50	1,00							
BR-IRGA 409	0,65	0,65	0,80	1,00						
BR-IRGA 410	0,65	0,65	0,59	0,75	1,00					
BRS Agrisul	1,00	1,00	0,50	0,65	0,65	1,00				
INIA Taquari	0,61	0,61	0,33	0,45	0,61	0,61	1,00			
El Paso L 144	0,65	0,65	0,80	1,00	0,75	0,65	0,45	1,00		
Vermelho	0,87	0,87	0,59	0,75	0,75	0,87	0,53	0,75	1,00	
Preto	0,80	0,80	0,53	0,69	0,69	0,80	0,47	0,69	0,93	1,00

Os coeficientes de similaridade, obtidos a partir de variantes isoenzimáticas observadas em folhas de plântulas, variaram entre 1,00 e 0,56 (Tabela 4). Similarmente ao verificado na análise de isoenzimas de sementes, os genótipos foram classificados em dois grupos (Figura 6): um, constituído por INIA Taquari, e o outro, por dois subgrupos: a) BRS 6 ('Chuí'), BRS 7 ('Taim'), BR-IRGA 409, BR-IRGA 410, BRS Agrisul, arroz-vermelho e arroz-preto; b) IRGA 417 e El Paso L 144. Foi possível diferenciar a cultivar BRS Agrisul de BRS 6 ('Chuí') e BRS 7 ('Taim'), o que não foi observado na análise de isoenzimas de sementes.

Quando dados de plântulas e sementes foram analisados em conjunto, a menor similaridade (0,47) foi verificada entre as cultivares INIA Taquari e IRGA 417 (Tabela 5). O maior coeficiente obtido foi 1,00, nas comparações entre BRS 6 ('Chuí') e BRS 7 ('Taim'), seguido de 0,95, entre ecótipos de arroz-vermelho e arroz-preto. Portanto, apesar da estreita base genética dos genótipos cultivados no Rio Grande do Sul, evidenciou-se a eficiência da técnica utilizada, pois Ko et al. (1994), mesmo utilizando 22 primers e 144 marcadores para avaliar relações genéticas entre 37 cultivares de arroz de diferentes centros geográficos, através de RAPD, obtiveram índices de similaridade variando entre 72% e 96%.

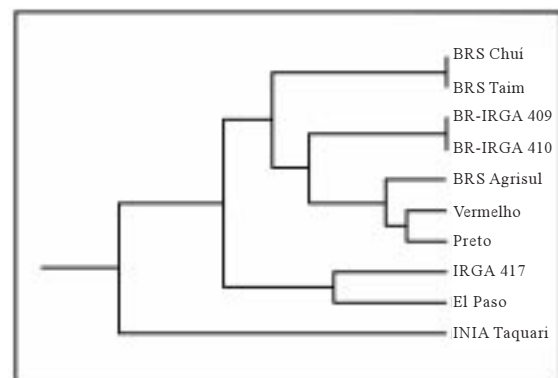


**Figura 5.** Dendrograma de oito cultivares de arroz irrigado e de ecótipos de arroz-preto e arroz-vermelho, baseado na análise de isoenzimas em sementes.

**Tabela 4.** Similaridade genética entre oito cultivares de arroz irrigado e ecótipos de arroz-preto e arroz-vermelho, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise de isoenzimas em folhas de plântulas.

Genótipo	BRS 6 ('Chuí')	BRS 7 ('Taim')	IRGA 417	BR-IRGA 409	BR-IRGA 410	BRS Agrisul	INIA Taquari	El Paso L 144	Vermelho	Preto
BRS 6 ('Chuí')	1,00									
BRS 7 ('Taim')	1,00	1,00								
IRGA 417	0,75	0,75	1,00							
BR-IRGA 409	0,85	0,85	0,76	1,00						
BR-IRGA 410	0,85	0,85	0,76	1,00	1,00					
BRS Agrisul	0,85	0,85	0,69	0,85	0,85	1,00				
INIA Taquari	0,69	0,69	0,56	0,76	0,76	0,69	1,00			
El Paso L 144	0,85	0,85	0,88	0,86	0,86	0,79	0,65	1,00		
Vermelho	0,81	0,81	0,72	0,89	0,89	0,96	0,67	0,82	1,00	
Preto	0,77	0,77	0,69	0,85	0,85	0,92	0,63	0,79	0,96	1,00

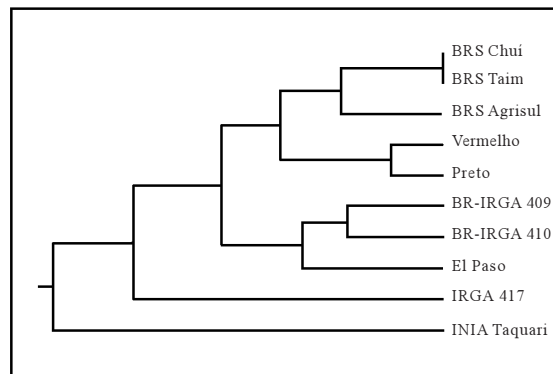
Os genótipos foram classificados em três grupos (Figura 7): um, constituído por INIA Taquari; outro, por IRGA 417; e o terceiro, pelos demais genótipos, divididos em dois subgrupos: a) BRS 6 ('Chuí'), BRS 7 ('Taim'), BRS Agrisul, arroz-vermelho e arroz-preto; b) BR-IRGA 409, BR-IRGA 410, El Paso L 144. Somente as cultivares BRS 6 ('Chuí') e BRS 7 ('Taim') não foram diferenciadas. Esses resultados indicam que eletroforese pode ser útil para discriminação de cultivares de arroz, desde que sejam usados sistemas enzimáticos em diferentes partes da planta, o que contraria a afirmativa de Maeda et al. (1995), que analisou apenas a mobilidade de proteínas. O mesmo foi verificado por Tuan et al. (1997), que, analisando cerca de 1.000 cultivares de arroz por meio de eletroforese em gel de poli-acrilamida, separaram estes genótipos em quatro grupos, a saber: três de índica, de diferentes regiões geográficas, e um de japônica. A utilização da técnica RAPD em 134 cultivares de arroz por MacKill (1995) e a posterior análise de agrupamento pelo método UPGMA permitiu a separação dos materiais em dois grandes grupos (índica e japônica). Yu & Nguyen (1994) verificaram que a classificação de 13 cultivares de arroz, com base em resultados obtidos na análise de RAPD, foi idêntica à classificação em análise de isoenzimas, o que comprova também a eficiência desta técnica.



**Figura 6.** Dendrograma de oito cultivares de arroz irrigado e de arroz-vermelho e arroz-preto, baseado na análise de isoenzimas de folhas de plântulas.

**Tabela 5.** Similaridade genética entre oito cultivares e dois ecótipos de arroz, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise de isoenzimas em sementes e folhas de plântulas.

Genótipo	BRS 6 ('Chuí')	BRS 7 ('Taim')	IRGA 417	BR-IRGA 409	BR-IRGA 410	BRS Agrisul	INIA Taquari	El Paso L 144	Vermelho	Preto
BRS 6 ('Chuí')	1,00									
BRS 7 ('Taim')	1,00	1,00								
IRGA 417	0,65	0,65	1,00							
BR-IRGA 409	0,77	0,77	0,77	1,00						
BR-IRGA 410	0,77	0,77	0,70	0,90	1,00					
BRS Agrisul	0,90	0,90	0,62	0,77	0,77	1,00				
INIA Taquari	0,66	0,66	0,47	0,63	0,70	0,66	1,00			
El Paso L 144	0,77	0,77	0,86	0,90	0,82	0,73	0,57	1,00		
Vermelho	0,83	0,83	0,67	0,84	0,84	0,93	0,61	0,80	1,00	
Preto	0,79	0,79	0,63	0,79	0,79	0,88	0,57	0,75	0,95	1,00



**Figura 7.** Dendrograma de oito cultivares de arroz irrigado e arroz-preto e arroz-vermelho, baseado na análise de isoenzimas de sementes e folhas de plântulas.

### Conclusões

1. A análise de isoenzimas em sementes e folhas de plântulas permite a diferenciação dos genótipos estudados de *Oryza sativa* L., à exceção de BRS 6 ('Chuí') e BRS 7 ('Taim').

2. Existe elevada similaridade entre ecótipos de arroz-vermelho e arroz-preto e alguns genótipos cultivados no Rio Grande do Sul.

3. Há maior eficiência na diferenciação de genótipos de *Oryza sativa* L. quando a comparação entre eles é baseada em isoenzimas de diferentes partes da planta.

4. O estabelecimento de descritores confiáveis, com base em isoenzimas de diferentes partes da planta de arroz, constitui instrumento de inestimável valor na identificação de cultivares de arroz irrigado e com respaldo na legislação de proteção vigente no Brasil e no exterior.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida aos dois primeiros autores; à Emma Gladis Schultz Corrêa, pelo apoio técnico.

### Referências

ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletoforese de proteínas e**



- isoenzimas de fungos e essências florestais.** Viçosa : UFV, 1991. 242 p.
- ANDRADE, V. A.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de. Plantas invasoras da lavoura de arroz irrigado. In: MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de; FAGUNDES, P. R. R. (Ed.). **Agricultura real: arroz irrigado.** Pelotas : Embrapa-CPACT, 1996. 75 p. (Embrapa-CPACT. Documentos, 20).
- AUGUSTIN, E.; FRANCO, D. F.; TERRES, A. L. S. Detecção de mistura varietal e caracterização de cultivares de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) através de padrões isoenzimáticos. In: REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 22., 1997, Camboriú. **Anais...** Itajaí : EPAGRI, 1997. p. 84-86.
- 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**, Bethesda, v. 70, p. 113-139, 1972.
- BRANDI, F.; CLARI, A. I. Uso de hidrazida maléica no controle do arroz-vermelho. In: REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 22., 1997, Camboriú. **Anais...** Itajaí : EPAGRI, 1997. p. 404-407.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Divisão de Laboratório Vegetal. **Regras para análise de sementes.** Brasília, 1992. 365 p.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (Calí, Colômbia). **Metodología para obtener semillas de calidad:** arroz, fríjol, maíz e sorgo. Calí, 1983. 200 p.
- CRISCI, J. V.; ARMENGOL, M. F. L. **Introducción a la teoría y practica de la taxonomía numérica.** Washington : Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1983. 132 p.
- ENDO, T.; MORISHIMA, H. Rice. In: TANKSLEY, S. D.; ORTTON, T. J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding.** Amsterdam : Elsevier, 1983. part B, p. 129-146.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília : Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.
- GALLI, J. **Sobre a inadequação da lei de proteção de cultivares em arroz (*Oryza sativa* L.).** Pelotas : UFPel, 1996. 41 p. Tese de Doutorado.
- GOTTLIEB, L. D. Conservation and duplication of isozymes in plants. **Science**, Washington, v. 216, p. 373-380, 1982.
- GUIDOLIN, A. F. **Caracterização de genótipos de arroz irrigado por técnicas eletroforéticas.** Pelotas : UFPel, 1993. 92 p. Dissertação de Mestrado.
- HEN, F.; WANG, J. Y.; JIANG, C. Analysis of the bands and zymograms of esterase isozymes in different organs of rice. **Fujian Agricultural University Journal**, Fuzhou, v. 23, n. 3, p. 262-265, 1994.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (Zurich, Suíça). **Handbook of variety testing.** Zurich, 1992. 44 p.
- KO, H. L.; COWAN, D. C.; HENRY, R. J.; GRAHAM, G. C.; BLAKENEY, A. B.; LEWIN, L. G. Random amplified polymorphic DNA analysis of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties. **Euphytica**, Dordrecht, v. 80, n. 3, p. 179-189, 1994.
- MacKILL, D. J. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 889-894, 1995.
- MAEDA, J. A.; ALMEIDA, L. D'A. de; IADEROZA, M.; CAMARGO, C. E. de O. Discriminação de cultivares de arroz pelas características físicas, fisiológicas ou químicas das sementes e plântulas. **Bragantia**, Campinas, v. 54, n. 1, p. 17-32, 1995.
- MILACH, S. C. K. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: BORÉM, A.; DEL GIUDICE, M. P.; SAKIYAMA, N. S.; SEDIYAMA, T.; MOREIRA, M. A.; PORTUGAL, R. S. (Ed.). **Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária.** Viçosa : UFV, 1998. 182 p.
- MONTALVÁN, R.; ANDO, A.; ECHEVERRIGARAY, S. Phenetic distance of geographical distribution of Brazilian rice varieties (*Oryza sativa* L.) using seed protein polymorphism. **Breeding Science**, Tokyo, v. 45, n. 3, p. 275-280, 1995.
- NICHOLS, E. A.; RUDDLE, F. H. Review of enzyme polymorphism, linkage and electrophoretic conditions for mouse and somatic all hybrids in starch gels. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Seattle, v. 21, n. 12, p. 1066-1081, 1973.
- RANGEL, P. H. N.; GUIMARÃES, E. P.; NEVES, P. C. F. Base genética das cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 349-357, maio 1996.
- RIGATTO, P.; KOHLZ, V. K. Economia da produção. In: PESKE, S. T.; NEDEL, J. L.; BARROS, A. C. S. A. (Ed.). **Produção de arroz.** Pelotas : UFPel, 1998. p. 555-641.

- ROHLF, F. J. **NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system**: version 1.7. New York : Exeter Software, 1992. 236 p.
- SCANDALIOS, J. G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v. 3, p. 37-39, 1969.
- SHIELDS, C. R.; ORTON, T. J.; STUBBER, C. W. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam : Elsevier, 1983. part A, p. 443-468.
- TORGGLER, M. G.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas**: variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto : Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 186 p. (Monografias, 1).
- TUAN, D. T.; TRINH, L. N.; DUNG, L. T. C. Genetic diversity of cultivated rice in South East Asia. **Agriculture et Developpement**, Hanoi, v. 15, p. 213-216, 1997.
- VALLEJOS, C. E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozyme in plant genetics and breeding**. Amsterdam : Elsevier, 1983. part A, p. 469-515.
- WU, X. M.; CHEN, C. B.; LI, D. Y. **Esterase isozymes in the wild rices of Guangxi**. Disponível: National Agriculture Library site. URL: <http://probe.nalusda.gov:8000/otherdocs/rgn/rgn3/v3110.html>. Consultado em 21 fev. 1997.
- YU, L. X.; NGUYEN, H. T. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 87, n. 6, p. 668-672, 1994.