

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA,
ISOENZIMÁTICA E MOLECULAR DE
CULTIVARES DE ARROZ**

SANDRO BONOW

2004

SANDRO BONOW

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, ISOENZIMÁTICA E
MOLECULAR DE CULTIVARES DE ARROZ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora

Profa. Dra. Édila V. R. Von Pinho

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

2004

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Bonow, Sandro

Caracterização morfológica, isoenzimática e molecular de cultivares de arroz /
Sandro Bonow. -- Lavras : UFLA, 2004.
125p. : il.

Orientadora: Édila Villela R. Von Pinho
Tese (Doutorado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Arroz. 2. Marcador morfológico. 3. Pureza genética. 4. Marcador
molecular. 5. Caracterização isoenzimática. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-633.1823

SANDRO BONOW

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, ISOENZIMÁTICA E
MOLECULAR DE CULTIVARES DE ARROZ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 22 de março de 2004.

Pesq. Dra. Lilian Padilha – EMBRAPA

Pesq. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral

Profª. Dra. Maria das Graças G. C. Vieira – UFLA

Prof. Dr. João Bosco dos Santos - UFLA

Profª. Dra. Édila Vilela R. Von Pinho
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

À minha família e a, acima de tudo,
amiga, Daniela, pelo incentivo,
compreensão, amor e carinho,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras – UFLA, pela oportunidade de realização do curso.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - CPACT, ao Plant Research International – Wageningen University Research Centre e à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais –EPAMIG , os quais participaram com a infra-estrutura no desenvolvimento científico da presente pesquisa

À Professora Dra. Édila V. R. Von Pinho, pela orientação, amizade e incentivo durante o desenvolvimento do curso.

Aos co-orientadores Profª. Dra. Maria das Graças G. C. Vieira, Dra. Eva Choer, Dr. Ben Vosman, Dr. Antonio Alves Soares e Dr. Antonio R. Vieira, pela amizade, orientação e apoio.

Aos Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães e Dr. João Almir de Oliveira, Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho e Dr. Samuel P. de Carvalho, pela amizade e atenção sempre concedida.

Aos colegas de curso de pós-graduação, Tida, Kalinka, Luciana, Elisa, Silvia, Ana, Dinara, Solange, Wagner, Palelo e Maria de Lourdes, pela amizade e apoio.

Aos funcionários da UFLA e do Setor de Sementes, Andrea, Neusi, D. Elsa e Dalva, pela amizade e colaboração.

Aos alunos de iniciação científica, Sancho, Fabrício, Maurílio e Cesinha pelos serviços prestados e pela amizade no decorrer do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro.

Aos amigos e laboratoristas da Embrapa-CPACT, Gladis e Denilson e a sempre colega Dra. Beatriz Helena G. Rocha.

Aos funcionários e pesquisadores do Plant Research International, em especial a Iolanda Nordiyk, pela amigável recepção e acompanhamento durante as pesquisas no PRI.

Aos amigos que prestaram todo auxílio durante a estada na Holanda, Wagner, Mário e Ana e Arne, aos colegas do PRI, Reni, Paola, Miqia e Samuel.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	iii
CAPITULO 1.....	1
1 Introdução Geral.....	1
2 Referencial teórico.....	4
2.1 Importância da caracterização de cultivares de arroz	4
2.2 Marcadores morfológicos.....	7
2.3 Marcadores isoenzimáticos.....	12
2.3.1 Estabilidade dos marcadores isoenzimáticos.....	18
2.4 Marcadores microssatélites.....	23
3 Referências bibliográficas.....	29
CAPÍTULO 2: Caracterização morfológica de cultivares de arroz, visando a certificação da pureza genética.....	39
Resumo.....	39
Abstract.....	41
1 Introdução.....	42
2 Material e métodos.....	43
3 Resultados e discussão.....	51
3.1 Experimento safra 2000/2001 – caracterização de cultivares.....	51
3.2 Experimento safra 2001/2002.....	64
4 Conclusões.....	71
5 Referências bibliográficas.....	72

CAPÍTULO 3: Caracterização isoenzimática de cultivares de arroz de sequeiro.....	75
Resumo.....	75
Abstract.....	77
1 Introdução.....	78
2 Material e métodos.....	80
3 Resultados e discussão.....	85
4 Conclusões.....	97
5 Referências bibliográficas.....	98
CAPÍTULO 4: Desenvolvimento de marcadores moleculares em e próximos a genes, visando a caracterização de cultivares de arroz.....	101
Resumo.....	101
Abstract.....	103
1 Introdução.....	104
2 Material e métodos.....	107
3 Resultados e discussão.....	110
4 Conclusões.....	120
5 Referências bibliográficas.....	121
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	124

RESUMO GERAL

BONOW, Sandro. **Caracterização morfológica, isoenzimática e molecular de cultivares de arroz**. 2004. 125 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O interesse e a importância da caracterização de cultivares tem aumentado muito nos últimos anos, sendo os motivos principais, o controle da pureza genética em lotes de sementes e a crescente necessidade do registro e proteção de cultivares. O objetivo deste trabalho foi caracterizar cultivares comerciais de arroz utilizando marcadores morfológicos, isoenzimáticos e moleculares. A caracterização morfológica consistiu de dois experimentos. O primeiro foi conduzido em casa de vegetação, na UFLA, quando foram caracterizadas as cultivares utilizando-se os descritores morfológicos recomendados para o registro e proteção de cultivares. O segundo experimento foi conduzido em campo de produção de sementes da EPAMIG Lavras e consistiu na identificação, por parte de avaliadores, de contaminantes propositalmente distribuídos junto às cultivares. Na caracterização isoenzimática, realizada na EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, foram analisadas isoenzimas de sementes e folhas de plântulas, utilizando para tal eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida. Foram analisadas isoenzimas de esterase, 6-fosfogluconato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e leucina aminopeptidase. Foi realizada a análise de agrupamento das cultivares de acordo com a similaridade apresentada, utilizando o coeficiente de Jaccard. A análise molecular de microssatélites teve como objetivos identificar microssatélites em e próximos a genes, desenvolver *primers* para esses e, com a utilização desses *primers*, caracterizar as principais cultivares de arroz em uso no Brasil. Foram selecionados treze microssatélites na região anterior aos genes Mads Box, além de 37 microssatélites em ESTs (Expressed Sequence Tags). Foram utilizadas, para a busca e seleção de microssatélites, as bases de dados oriundas do sequenciamento do genoma do arroz. As buscas foram realizadas com o auxílio de ferramentas de bioinformática disponibilizadas pelo Plant Research International, Holanda, onde foi realizada a presente pesquisa. Foi utilizado gel de poliacrilamida a 6% sendo os géis corados com prata. A análise de agrupamento foi realizada de modo similar aos dados oriundos da análise de

* Comitê Orientador: Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho (Orientadora), Dra. Maria das Graças G. C. Vieira, – UFLA, Dr. Ben Vosman PRI/WUR e Dra. Eva Choer - EMBRAPA. Dr. Antonio Alves Soares – UFLA, Dr. Antonio V. Rodrigues – EPAMIG.

isoenzimas. Além disso, foi calculado o conteúdo informativo do polimorfismo, tendo sido encontrados valores entre 0,05 a 0,935. Ao final da caracterização dos genótipos, concluiu-se que os descritores morfológicos não foram suficientes para a caracterização e diferenciação das cultivares de arroz estudadas, que as características morfológicas observadas em sementes e plantas após a antese são as mais adequadas para a caracterização e diferenciação de cultivares. A partir dos marcadores isoenzimáticos concluiu-se que a análise de isoenzimas de sementes e folhas de plântulas permite a diferenciação das cultivares, á exceção das cultivares Carisma, IAC 202 e Guarani. Isoenzimas de esterase são influenciadas pela presença de fungos nas sementes e isoenzimas de 6-fosfogluconato desidrogenase podem ser alteradas em função do nível de qualidade fisiológica das sementes. Na análise de microssatélites concluiu-se que é possível localizar microssatélites em ou próximos a genes, que a análise de microssatélites permite a caracterização e a individualização de todas as cultivares estudadas e que a análise dos microssatélites selecionados permite classificar os genótipos quanto à subespécie a que pertencem.

GENERAL ABSTRACT

BONOW, Sandro. **Morphological, isoenzymatic and molecular characterization of rice cultivars**. 2004. 125 p. Thesis (Doctorate in Plant Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Morphological, isoenzymatic and molecular markers were used to characterize commercial rice cultivars. The morphological characterization consisted in two experiments, the first one was done in green house, at Federal University of Lavras, when the cultivars were characterized using the descriptors recommended for the protection cultivar law in Brazil. The second experiment was in a seed production field, in EPAMIG, Lavras. In this experiment, contaminant rice seeds were identified for researchers among studied cultivars. In the isoenzymatic characterization, was analyzed isoenzymes from seeds and tissue of rice plantlets, using horizontal gel electrophoresis. This part of the research was done in Embrapa-cpact, Pelotas, RS. The isoenzymatic systems analyzed were esterase, 6-fosfogluconate dehydrogenase, isocitrate deshydrogenase and leucine aminopeptidase. For the similarity analysis was used the Jaccard coefficient. The molecular analyses of microsatellites had the objective to identify microsatellites in or around rice genes, to develop primers to the microsatellites selected and to characterize the rice cultivars using the primers developed. Thirteen microsatellites were selected in upstream region of Mads Box genes and 37 microsatellites in ESTs (Expressed Sequence Tags). To search and to select microsatellites were used the databases from rice genome sequencing and used bioinformatics tools available at Plant Research International, Holland, where this research was developed. To analyze the microsatellites was used polyacrilamide gel 6% and the gel was submitted to silver staining. The similarity analysis was done the same way of isoenzyme analysis. The PIC (Polymorphic Informative Content) of microsatellites markers was among 0,05 and 0,955. The conclusions were that the morphological descriptors were useful, but not enough to characterization and discrimination of rice cultivars, the morphological characteristics observed after the reproductive phase are the more suitable to characterization and discrimination of rice cultivars. Isoenzymatic markers allow to characterize rice cultivars and are

* Guidance Committee: Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho (Major Professor), Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira, – UFLA, Dr. Ben Vosman PRI/WUR, Dra. Eva Choer – EMBRAPA, Dr. Antonio Alves Soares – UFLA, Dr. Antonio V. Rodrigues – EPAMIG.

capable to differentiate all upland rice cultivars studied, excluded Carisma, IAC 202 and Guarani. The esterase isoenzymes are influenced for the presence of fungus in the seeds and the isoenzymes of 6- fosfogluconate dehydrogenase can be altered according to physiological quality of the seeds. The microsatellites analyzed allows conclude that is possible to find microsatellites in or around rice genes. The analysis of the microsatellites studied allows separate the cultivars according the subspecies, indica or japonica.

CAPITULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O arroz é um dos principais cereais cultivados no Brasil, desempenhando um papel social e econômico de grande importância para as mais diversas regiões do país. Esse cereal pode ser conduzido sob dois diferentes sistemas de cultivo, o irrigado, tipicamente utilizado nos estados da região Sul do país e o de sequeiro, tradicional em regiões tropicais. Para cada sistema de cultivo são utilizados grupos de cultivares adaptados a determinadas condições, principalmente quanto ao fornecimento de água.

Vários programas de melhoramento genético são conduzidos no país, gerando a cada ano novas cultivares, melhor adaptadas a cada situação e mais produtivas. Nesses programas, conhecidamente, são utilizadas cultivares com bases genéticas estreitas, fazendo com que os genótipos lançados no mercado sejam morfológicamente muito similares, embora possuam características de interesse comercial distintas entre si.

A similaridade morfológica entre a maioria das cultivares acarreta alguns problemas, os quais vêm tornando-se mais preocupantes a cada ano. As empresas produtoras de sementes, em função da concorrência comercial, procuram oferecer produtos com alta qualidade. Para alcançar esse objetivo é fundamental que as cultivares sejam claramente distinguidas entre si, sendo necessárias para isso características diferenciadoras nem sempre obtidas pelos marcadores morfológicos. Outro aspecto que acrescentou importância à referida área foi a aprovação da Lei de Proteção de Cultivares no Brasil. Essa lei exige que, para o registro e proteção de uma nova cultivar, a mesma precisa ser distinta das demais cultivares em uso no país, homogênea quanto às principais características entre seus indivíduos, além dessas características serem estáveis ao longo das gerações. Para esse objetivo, as características morfológicas nem

sempre são adequadas surgindo por vezes, dúvidas e problemas no momento do registro e proteção das novas cultivares. Outro aspecto em que a caracterização de cultivares se faz necessária é nos Programas de Melhoramento Genético, em que o conhecimento da variabilidade é fundamental para o sucesso.

A caracterização de cultivares tradicionalmente é baseada em marcadores morfológicos, os quais são os recomendados na Lei de Proteção de cultivares e ainda utilizados na maioria das empresas produtoras de sementes. Esses marcadores são conhecidamente úteis, porém, por vezes apresentam algumas desvantagens, principalmente pelo tempo que demandam, além da subjetividade na determinação de algumas características. Com a evolução da genética e biotecnologia ocorreu o surgimento de novas classes de marcadores.

Entre as classes de marcadores hoje disponíveis, destacam-se as isoenzimas, as quais são produtos diretos dos genes e fornecem uma medida de polimorfismo mais apurada que os morfológicos. Esses marcadores têm sido utilizados por muitos anos, mas suas aplicações diretamente na caracterização de cultivares têm sido reforçadas ultimamente. Esses marcadores apresentam, na maioria dos casos, polimorfismo, permitindo distinguir, em várias espécies, um grande número de cultivares, sendo rápidos e de fácil execução. Apesar dessas vantagens, existem críticas a esses marcadores, principalmente quanto à estabilidade dos padrões isoenzimáticos na presença de fungos em sementes e em sementes com diferentes níveis de qualidade, além da parte e o estágio de desenvolvimento da planta analisada. Já os marcadores moleculares, por meio dos quais é analisado diretamente o DNA, são considerados os mais precisos. Esses não sofrem influência do ambiente e podem ser analisados em qualquer parte da planta e em qualquer fase de desenvolvimento. Entre os marcadores moleculares, os microssatélites são considerados os mais polimórficos e estáveis. Esses, têm se mostrado promissores em arroz, principalmente pela possibilidade da seleção e análise em regiões do genoma as quais são expressas,

revelando polimorfismo e conseqüente diversidade genética mais aproximada do fenótipo dos indivíduos a serem analisados.

A partir do exposto, verifica-se a necessidade de avaliar os marcadores morfológicos, isoenzimáticos e moleculares para a caracterização e conseqüente distinção e identificação de cultivares de arroz. Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram verificar a eficiência dos marcadores morfológicos, isoenzimáticos e moleculares na caracterização de cultivares de arroz.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da caracterização de cultivares de arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo com grande destaque do ponto de vista econômico e social, sendo superado em volume produzido somente pelo trigo. Porém, se considerarmos que 85% da produção total de arroz são destinados ao consumo humano, contra 61% do trigo e 18% do milho, o arroz pode ser considerado o produto agrícola mais importante do mundo. No Brasil, o arroz é responsável por 24% das calorias e por 18% das proteínas consumidas pelos brasileiros (Soares, 1997). Além disso, economicamente apresenta-se como cultura de destaque. O Brasil, maior produtor de arroz da América Latina, produziu, na safra 2002/2003, em área superior a três milhões de hectares, mais de dez milhões de toneladas (Agrianual, 2003). A elevada produção de arroz no Brasil e no mundo deve-se à alta tecnologia empregada pelos agricultores, associada ao alto potencial genético das cultivares utilizadas, o qual foi alcançado pelo sucesso nos programas de melhoramento genético de arroz (Guidolin, 1993).

Dentre os programas de melhoramento genético, destaca-se o trabalho realizado com as cultivares de arroz de sequeiro, principalmente as lançadas no mercado nos últimos anos. Em Minas Gerais, o programa de melhoramento genético de arroz desenvolvido, de 1974 a 1995, alcançou ganhos genéticos médios anuais de 1,26% para o grupo de cultivares precoces e 3,37% para as cultivares de ciclo médio (Soares et al., 1999). As cultivares melhoradas, altamente produtivas e com qualidade de grãos competitivos no mercado, entraves por muitos anos no arroz de sequeiro, têm dado a essa modalidade de cultivo uma grande importância para regiões menos favorecidas por chuvas. Além disso, vêm se tornando importantes na rotação em áreas irrigadas por meio

de pivôs centrais (Breseghello & Stone, 1998). Assim como nas cultivares de arroz de sequeiro, os programas de melhoramento genético contribuíram de forma fundamental para o sucesso das cultivares irrigadas (terras baixas), as quais são altamente produtivas. As cultivares irrigadas ocupam cerca de 1 milhão de hectares na região subtropical (RS e SC), sendo a cultura manejada sob alto nível tecnológico (CNPAP, 2002).

Para que todo o esforço realizado pelos melhoristas em incorporar as novas características às cultivares seja desfrutada pelos agricultores, depreende-se que as sementes, sejam repassadas aos agricultores com alta qualidade, garantindo todo o potencial presente originalmente nas cultivares. Esse fato tem levado as empresas produtoras de sementes a monitorarem todas as etapas do processo produtivo, visando um produto com alta pureza genética, física, fisiológica e sanitária. A garantia da pureza genética é de suma importância, pois este atributo fará com que as características da cultivar melhorada possam ser repassadas aos agricultores, ocorrendo um efetivo aumento da produção agrícola.

McDonald (1998) afirma que quando novas variedades são desenvolvidas pelos melhoristas, uma quantidade inicialmente limitada de sementes é multiplicada até serem alcançadas quantidades suficientes para suprir grande áreas a serem cultivadas. No momento da multiplicação dessas sementes, é fundamental o monitoramento do processo produtivo para assegurar que a pureza genética das sementes desenvolvidas pelos melhoristas não seja comprometida. Sendo assim, a principal preocupação está em que, após várias gerações de multiplicação da semente fornecida pelo melhorista, a pureza genética seja mantida.

A seleção de sementes com alta pureza genética é o primeiro passo em direção à obtenção da semente de alta qualidade (Peske & Barros, 1998). Para isso é necessária a correta identificação das cultivares por meio de suas

características particulares. A identificação de cultivares é um procedimento utilizado nos sistemas de produção de sementes com a finalidade de checar e garantir ao produtor de sementes e ao agricultor, lotes com elevada pureza genética.

Segundo Vieira (1981), a perda das características genéticas ocasionada por misturas e contaminações das cultivares de arroz em uso no país sugere a necessidade de trabalhos de identificação e purificação varietal para a formação de estoques de sementes com alta qualidade. Rosta (1975) chamou a atenção para o fato de que existiam mais de 10.000 variedades de arroz no ano de 1975, sendo a identificação e a determinação das diferenças entre elas extremamente difíceis. Atualmente esse problema persiste, pois, entre as cultivares modernas de arroz existe uma grande similaridade genética (Guidolin et al. 1994), tornando cada vez mais difícil determinar morfologicamente a pureza varietal de um lote de sementes. Esse fato ocorre devido às semelhanças visuais provocadas pelo uso de uma estreita base genética no processo de melhoramento (Menezes & Romero, 1996).

Além do aspecto relacionado ao controle de qualidade de sementes, o interesse pela caracterização de cultivares tem aumentado significativamente nas últimas décadas, sendo o motivo principal, a crescente necessidade de proteção de cultivares comerciais em mercados econômicos cada vez mais competitivos (Milach, 1998). Segundo Douglas & Bailey (1983), as exigências da lei de proteção de cultivares aumentaram a importância do conceito de distinção varietal.

No Brasil, a Lei de Proteção de Cultivares número 9.456, sancionada em 25 de abril de 1997, abriu uma nova perspectiva e interesse na proteção e lançamento de materiais genéticos. A lei, no entanto, é clara e pontual quando se refere aos requisitos necessários para que uma cultivar possa ser protegida. A cultivar deve ser comprovadamente distinta, com descritores homogêneos e

estáveis. Por distinta, a lei define que a cultivar deve ser distinguida claramente de qualquer outra cuja existência na data do pedido de proteção seja reconhecida”. Homogênea, significa que todas as plantas desse genótipo precisam apresentar homogeneidade em suas principais características. Como estável, o genótipo precisa manter a estabilidade de suas características ao longo das gerações. Sendo esses requisitos, fundamentais para o registro e proteção de cultivares. Assim, para que sejam corretamente avaliadas tais exigências, o uso de descritores confiáveis é indispensável (Milach, 1998).

Além dos aspectos acima citados, a caracterização de cultivares permite a determinação da diversidade genética entre as cultivares e, conseqüentemente, o conhecimento da variabilidade existente. Esse aspecto é de fundamental importância para o melhoramento genético, no qual segundo Federizzi (1998), a variabilidade é a base de todo o processo.

A caracterização de cultivares pode ser realizada com base em marcadores morfológicos, isoenzimáticos ou moleculares.

2.2 Marcadores morfológicos

Os descritores oficiais prescritos na Lei de Proteção de Cultivares no Brasil são baseados em marcadores morfológicos. Assim, a caracterização de cultivares, procedimento fundamental quando do lançamento de uma nova cultivar, baseia-se na apreciação detalhada de sua morfologia e de seu comportamento agrônomo e envolve o maior número possível de descritores. Diante disso, sabe-se que a busca de marcadores morfológicos com maior estabilidade em diferentes condições ambientais é de fundamental importância para que os mesmos possam ser considerados como descritores na Lei de Proteção de Cultivares. Além desse aspecto, a determinação da pureza genética

em sementes de arroz ainda é quase que na totalidade realizada com base nos descritores morfológicos das sementes, plântulas e plantas. Segundo as regras para análise de pureza da “Association of Official Seed Analysts” (AOSA, 1983), diante da impossibilidade de identificação da cultivar por meio de características das sementes, devem ser consideradas características das plântulas ou das plantas em crescimento.

Várias características, tanto qualitativas como quantitativas, têm sido recomendadas, em arroz, como descritores na Lei de Proteção de Cultivares, assim como na distinção de variedades, visando a certificação de pureza varietal. É importante ressaltar que, segundo Fonseca et al. (2002), as características morfológicas do arroz agrupam-se em características constantes (qualitativas) e variáveis (quantitativas); as primeiras são aquelas que definem a espécie ou a variedade e, geralmente, são controladas por poucos genes; apresentam alta herdabilidade e não se alteram ou não são influenciadas pelo ambiente. As características variáveis, controladas por vários genes, apresentam baixa herdabilidade e são influenciadas pelas condições ambientais, podendo ser consideradas como resultante da ação do meio ambiente sobre o genótipo.

Alguns trabalhos na área de caracterização de cultivares têm sido conduzidos em arroz, nos quais são avaliadas as principais características recomendadas. As características morfológicas das sementes, por exemplo, são consideradas muito úteis para a discriminação de cultivares. Jennings et al. (1981) afirmam que as dimensões dos grãos são altamente herdáveis na maioria dos ambientes, embora a temperatura baixa após a floração possa reduzir ligeiramente o comprimento dos grãos. Apesar da aparente complexidade de sua herança, o comprimento e a forma dos grãos se fixam nas primeiras gerações segregantes. Se a expressão não é encontrada na geração F_2 , a probabilidade de se encontrar outros tipos na F_3 é quase nula. Por outro lado, quando selecionam-

se grãos excelentes na F_2 , raramente esta característica segrega significativamente nas gerações seguintes.

As características de sementes têm sido utilizadas na caracterização com a finalidade de proteção de cultivares, assim como na avaliação da pureza varietal. Na caracterização são seguidos os descritores para sementes recomendados na Lei de Proteção de Cultivares. Por outro lado, a avaliação da pureza genética é feita pela observação de determinadas características físicas das sementes, comparando as amostras de sementes a serem testadas com uma amostra padrão da variedade em questão. Essas análises possuem certas vantagens, como a utilização de poucos equipamentos, rapidez e baixo custo para a condução dos testes (Payne, 1986). Segundo o autor, a reprodutibilidade dos resultados entre laboratórios tem sido alta com este tipo de análise. Porém, a maioria das novas cultivares possui sementes com as características físicas muito semelhantes, o que faz com que a utilização dessas seja limitada para a discriminação e controle da pureza varietal.

Maeda et al. (1995) consideraram os fatores comprimento, largura e massa fresca de sementes como excelentes para a diferenciação de cultivares. Porém, Chandraratna (1964) indica que o peso dos grãos é controlado por aproximadamente 10 genes. Fonseca et al. (2002) afirmam que o peso de mil sementes se modifica com o ambiente, principalmente com o emprego de altas dosagens de nitrogênio.

Menezes & Romero (1996) estudaram as características de 22 cultivares de arroz irrigado visando à diferenciação dessas. Pelos resultados obtidos, observou-se que a espessura das sementes, peso de mil sementes, pilosidade dos grãos e presença de arista não mostraram diferenças significativas entre as cultivares. Porém, formato e largura das sementes, coloração das glumelas e cor do ápulo foram características úteis na identificação varietal. A conclusão obtida pelos referidos autores foi de que existia a necessidade de buscar um

maior número de características e testes, a fim de tornar mais eficiente a separação de cultivares.

O comportamento de muitas dessas características é explicado pelo controle genético aliado ao efeito do ambiente, tornando-as instáveis e valorizando ou desvalorizando-as como um descritor. Pode-se destacar o controle da glabrescência e da pubescência das folhas. A glabrescência da folha e da casca do grão é controlada por alelos recessivos duplicados, ou seja, o *gl-1* e *gl-2* e o meio ambiente não afeta a sua expressão (Soares, 1997). Por outro lado, a presença de arista nas sementes, segundo Jennings et al. (1981), é controlada por dois ou três genes dominantes. Sabe-se que fatores ambientais influenciam na presença e quantidade de aristas no ápice da panícula. Outro exemplo é a pigmentação por antocianina que, embora não esteja relacionada com caracteres econômicos e de qualidade de grãos, tem recebido muita atenção para a caracterização de cultivares (Jennings, 1981). A herança da pigmentação por antocianina é bastante complexa devido à existência de *locos* duplicados, série alélica múltipla para um mesmo *loco*, fatores inibidores, diferenças sutis na tonalidade e intensidade de cor entre genótipos, variação nos estádios de crescimento e o efeito acentuado dos fatores ambientais, como, por exemplo, a luz, sobre o desenvolvimento da cor.

Fonseca et al. (2002) avaliaram as características morfológicas em um grupo de cultivares e constataram que as menos influenciadas pelo ambiente foram a pubescência das folhas e as colorações da aurícula, da lígula, do internódio, do apículo e das glumelas estéreis, bem como a presença de antocianina nos nós do colmo, da pubescência das glumelas, comprimento, cor e forma da cariopse, ângulo da folha bandeira e dos perfilhos. As características influenciadas pelo ambiente foram: a arista, comprimento e espessura do colmo, comprimento da panícula, massa de 100 grãos, altura da planta, cor da folha, ciclo cultural, exerceção da panícula e degrane da panícula.

A forte influência do ambiente em muitas características, aliada à grande similaridade genética entre as cultivares de arroz recomendadas atualmente, torna cada vez mais difícil determinar morfologicamente a pureza varietal de um lote de sementes. Tal situação foi comprovada por Camargo (1982) em um estudo agrobotânico de cultivares de arroz, em diferentes épocas de semeadura. O autor analisou 35 parâmetros em cada época de semeadura, concluindo que as cultivares IAC-164 e IAC-165, por possuírem as mesmas características morfológicas e ciclo, além de outros atributos em comum, deveriam ser classificadas como uma única cultivar comercial. Porém, Silva (1999), trabalhando com acessos de arroz, concluiu que marcadores morfológicos foram eficientes no estudo da divergência genética e varietal.

Silva (1997), trabalhando com 36 acessos de arroz, verificou que os caracteres largura do limbo, peso de 100 grãos e comprimento dos grãos com casca não variaram estatisticamente entre os acessos, porém, dias para o florescimento, altura da planta e comprimento da panícula variaram entre os acessos estudados, podendo ser úteis na diferenciação de cultivares.

Outras desvantagens observadas na utilização de características morfológicas têm sido o tempo necessário para realizar a completa caracterização, além de muitas características não possuírem a estabilidade necessária para distinguir cultivares em diferentes ambientes e condições de cultivo (Sengupta & Chattopadhyay, 2000). Imolesi (1999) testou a estabilidade de características morfo-agronômicas em sementes híbridas de milho submetidas a diferentes dosagens de nitrogênio durante o ciclo de desenvolvimento. Esse autor concluiu que o número de folíolos expostos das plântulas, a data de florescimento, a altura das plantas e da inserção da primeira espiga foram influenciados pelas diferentes dosagens de nitrogênio. Assim, muitos dos descritores recomendados não preenchem os requisitos básicos recomendados. Bailey (1983) afirma que os três critérios básicos para avaliar um potencial

descriptor para a descrição varietal ou identificação de cultivares são: a) estabilidade ambiental, b) variação intervarietal e c) mínima variação intravarietal.

Smith & Register III (1998) salientam que, devido ao fato de a base genética das características morfológicas ser normalmente desconhecida, essas, são no máximo, uma medida indireta da pureza genética e que comparações morfológicas fornecem uma pobre ou incorreta medida de identidade genética e relação entre as variedades. Esses autores também afirmaram que métodos bioquímicos e moleculares são muito úteis na identificação de variedades e no auxílio para determinar se as novas variedades são essencialmente derivadas, como previsto em lei.

2.3 Marcadores Isoenzimáticos

Embora a caracterização de cultivares feita com base em caracteres morfológicos continue sendo predominante e importante, as limitações deste tipo de descritor têm gerado a necessidade da busca de outras alternativas. Surgiram então os descritores baseados na análise de isoenzimas, os quais têm sido utilizados em várias espécies com êxito (Milach, 1998).

O termo isozima foi criado por Markert & Muller para descrever as diferentes formas moleculares nas quais as proteínas podem existir, com a mesma especificidade enzimática, em um único organismo. O “Standing Committe on Enzymes of the International Union of Biochemistry” recomenda o uso alternativo do termo isoenzimas (Webb, 1965).

Isoenzimas são encontradas em células de todos os organismos e podem exercer seus efeitos em muitos níveis da organização biológica. Não são apenas interessantes do ponto de vista estrutural ou funcional, mas também provas

potentes de mecanismos fundamentais, tais como regulação, transmissão e evolução dos genes. Além disso, pode fornecer subsídios aos mecanismos moleculares de processos patológicos. O estudo das isoenzimas em vegetais teve início com os trabalhos de Schwartz (1960), em milho. Foi inicialmente conduzido em poucas instituições, tornando-se mais difundido quando botânicos, fitopatologistas e melhoristas, entre outros, passaram a perceber suas múltiplas aplicações (Oliveira, 1983).

As enzimas podem ser separadas em diferentes formas moleculares por meio de vários métodos bioquímicos, tais como cromatografia, sedimentação, eletroforese e sorologia. Entre esses, o da eletroforese em gel é o mais versátil e facilmente aplicável ao estudo de variações individuais em vegetais. A premissa básica adotada ao se utilizar a técnica de eletroforese é a de que diferenças na mobilidade de proteínas sob um campo elétrico são resultantes de diferenças nas seqüências de nucleotídeos do DNA que codificam tais proteínas. Assim, assume-se que diferenças nos padrões eletroforéticos das proteínas possuem uma base genética e são herdáveis (Murphy et al., 1990).

Dentre as vantagens da análise de isoenzimas citam-se os vários tipos de materiais em diferentes fases de desenvolvimento que podem ser escolhidos para análise eletroforética, tais como semente, plântula, raiz, folha, pólen ou outros tecidos vegetais (Marcon, 1986). As sementes constituem um excelente material para análise de polimorfismo enzimático, por serem relativamente fáceis de armazenar, normalmente ricas em proteínas e enzimas com elevada atividade e são, geralmente, livres de metabólitos secundários (fenóis, taninos, etc.) os quais podem interferir na resolução e na atividade enzimática (Cheliak e Pitel, 1984, citados por Alfenas, 1991).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), marcadores isoenzimáticos geralmente fornecem ampla informação genética para diversas aplicações, além

da técnica ser relativamente de baixo custo e tecnicamente acessível, fator este que é limitante para várias outras.

O uso de técnicas eletroforéticas de proteínas tem sido sugerido na identificação de cultivares e certificação da pureza genética, por se tratar de um teste rápido, seguro e demandar pouco espaço físico. Profissionais de companhias produtoras de sementes têm adotado tais técnicas para realizar pesquisas e auxiliar nos testes de qualidade de seus produtos desde o campo até a embalagem final (Martinez, 1990). Também de acordo com Kiang & Gorman (1983), as isoenzimas se constituem em valiosos marcadores na identificação de cultivares, em programas de certificação e testes de pureza em lotes de sementes. Da mesma forma, Orman et al. (1991) referem-se a análise de isoenzimas como uma ferramenta de alta utilidade na determinação da pureza genética de uma planta alógama. Isoenzimas tem sido utilizada na análise de híbridos.

Muitas isoenzimas têm sido úteis para a separação de genótipos de várias espécies (Tanksley e Orton, 1983; Salgado, 2001). Análises isoenzimáticas em arroz, assim como em outras espécies de plantas, têm fornecido resultados relevantes em várias linhas de pesquisa, incluindo mapeamento genético, regulação gênica, genética do desenvolvimento e evolução (Endo e Morishima, 1983). Segundo estes autores, os sistemas enzimáticos das esterases e fosfatases ácidas têm sido os mais estudados em arroz, sendo as esterases apontadas por Nakagahra et al (1975) como vantajosos marcadores genéticos nessa cultura por serem de fácil detecção e com atividade enzimática estável.

Isoenzimas de esterase foram analisadas por Chuan (1987) em sementes de arroz com a finalidade de identificar linhagens puras de híbridos. Este autor conseguiu êxito nos seus resultados afirmando que as análises foram sensíveis, apresentaram repetibilidade e foram fáceis de serem realizadas. As isoenzimas de esterase têm sido destaque na maioria dos estudos nessa área. Hofstee (1959),

citado por Aung & McDonald (1995), afirma que as esterases estão entre as isoenzimas mais importantes envolvidas no processo de germinação em várias espécies. Segundo esses autores, um grande grupo de enzimas hidrolíticas, incluindo esterases atuam liberando ácidos graxos a partir de lipídeos. Os ácidos graxos liberados são utilizados durante a β -oxidação, sendo utilizados como fonte de energia durante o processo de germinação. As esterases possuem atuação nos lipossomos onde alguns ácidos graxos são originados; outros são oriundos da membrana. Como causa, a degradação de lipídeos da membrana por esterases poderia resultar em danos a célula acarretando um aumento na deterioração da semente. Porém, esses autores relatam que os aumentos ou diminuição de esterases durante a degradação de sementes ainda não estão claramente elucidados. Por outro lado, esses autores afirmam que isoenzimas de esterase que não estão presentes em sementes secas poderão ser sintetizadas de novo a partir do início do processo de embebição.

Além de esterases, vários outros sistemas isoenzimáticos têm sido utilizados em estudos com arroz. Augustin (1997), que concluiu que a análise de isoenzimas é uma alternativa vantajosa na determinação de polimorfismo em sementes de arroz, analisou dez genótipos de *Oryza sativa* L., por meio da análise dos sistemas enzimáticos de fosfoglucoisomerase, esterase e 6-fosfogluconato desidrogenase, diferenciando sete genótipos do total analisado. Bonow (1999), avaliando dez genótipos de *Oryza sativa* L. pela análise de isoenzimas de esterase, fosfatase ácida, fosfoglucoisomerase, 6-fosfogluconato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e aspartato transaminase, observou polimorfismo entre todos os materiais estudados. Glaszmann (1987) também recomenda a utilização da análise de isoenzimas para acessar diferenças entre variedades de arroz. Esse autor analisou 1.688 variedades asiáticas de arroz utilizando isoenzimas de catalase, shikimato desidrogenase, aminopeptidase,

álcool desidrogenase, esterase, isocitrato desidrogenase e fosfatase ácida e dividiu as cultivares em seis grupos.

Vários trabalhos encontram-se disponíveis tratando de diferenciação varietal e análise genética em arroz pelo uso de diferentes sistemas isoenzimáticos. Pode-se destacar os realizados por Chen et al. (1994), Pham et al. (1990), Oliveira et al. (1993), Suh et al. (1997) e Guidolin (1994).

Entre os sistemas isoenzimáticos freqüentemente utilizados, além de esterases que constituem um sistema complexo e heterogêneo, são importantes os de 6-fosfogluconato desidrogenase, isocitrato desidrogenase (Goodman e Stuber, 1987), leucina aminopeptidase, fosfatase ácida, peroxidase (Inouye & Hagiwara, 1980), fosfoglucoisomerase, glutamato oxaloacetato transaminase (Bonow et al., 2001), entre outros que podem ser estudados com a finalidade de identificar ou determinar a pureza genética em sementes. É importante ressaltar que, nos estudos utilizando as isoenzimas como descritores para a caracterização e identificação de cultivares ou determinação da pureza genética, as funções bioquímicas passam a ter importância secundária, diferente de estudos envolvendo qualidade fisiológica ou outros. Dessa maneira, qualquer sistema isoenzimático que preencha os requisitos de um marcador, principalmente quanto à estabilidade, é um potencial descritor.

Análises eletroforéticas, não somente de isoenzimas, mas também de proteínas, têm fornecido resultados promissores na identificação de variedades de arroz. Sengupta & Chattopadhyay (2000), analisando proteínas solúveis em sementes de doze cultivares de arroz, distinguiram todas as variedades baseando-se apenas nas diferenças qualitativas proporcionadas pelas bandas. Além disso, esses autores consideraram como principais vantagens a rapidez e facilidade dos procedimentos exigidos pela técnica.

Algumas limitações para o uso de isoenzimas como descritores são: o número de *locos* que são avaliados, o número de alelos por *loco*, a variação dos

padrões em função do tecido a ser avaliado, além da instabilidade com as condições ambientais (Barros, 1998; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Scandalios (1974) elaborou uma revisão sobre isoenzimas em plantas, mostrando alterações em padrões isoenzimáticos durante o desenvolvimento e diferenciação de tecidos. Sobre o assunto, alguns fatos comuns às isoenzimas são encontrados numa grande variedade de organismos; a) ocorrência de isoenzimas distintas em diferentes tecidos de um determinado organismo; b) presença de algumas isoenzimas em um certo estágio de desenvolvimento e ausência em outros; c) presença de isoenzimas geneticamente idênticas em diferentes tecidos, mas em quantidades variáveis. Ainda considera-se que, para se ter confiança estatística mínima quanto à diversidade genética, seriam necessários pelo menos de 10 a 20 locos polimórficos segregando independentemente, cada um tendo, no mínimo, dois alelos. Isso nem sempre é possível para muitas espécies vegetais, dado o limitado nível de polimorfismo, que é condicionado, entre outros fatores, pelo seu modo de reprodução, base genética e tamanho do genoma (Barros, 1998).

Além dessas características, Ferreira & Grattapaglia (1998) ainda ressaltam outras limitações relacionadas às isoenzimas, como a ocorrência das isoenzimas conformacionais, devido às modificações pós-traducionais e a dificuldade de interpretação dos zimogramas quando isoenzimas com mobilidades eletroforéticas semelhantes representam os produtos de dois *locos* distintos do mesmo sistema enzimático

Algumas outras precauções são também importantes em estudos de isoenzimas em vegetais, tais como o ambiente em que a planta se desenvolveu e o estágio de desenvolvimento. Por meio de muitos estudos tem-se observado que o metabolismo está associado à adaptação das plantas às mudanças ambientais (McCown et al., 1969). Peirce e Brewbaker (1973) ressaltam que a estabilidade das isoenzimas dos diversos tecidos vegetais submetidos a condições ambientais distintas é variável e que temperatura, fotoperíodo, nutrição mineral, injúria

mecânica e associações com microrganismos podem influenciar a expressão isoenzimática, comprometendo os resultados.

2.3.1 Estabilidade dos marcadores isoenzimáticos

Presença de microrganismos nas sementes analisadas

Similarmente ao observado em sementes de espécies vegetais, os fungos apresentam enzimas possíveis de serem detectadas por técnicas eletroforéticas. Prova disso é que vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de detectar, caracterizar ou diferenciar fungos por análises de isoenzimas (Vieira, 1996; Alfenas 1998). Dessa maneira, no momento da caracterização de cultivares de espécies vegetais é de fundamental importância o cuidado da realização da análise em tecidos não contaminados por fungos ou a análise de sistemas isoenzimáticos que não sejam influenciados pela presença de microrganismos.

A influência dos fungos pode ocorrer por alterações bioquímicas nas sementes infectadas, mudando assim o padrão isoenzimático original daquele genótipo, ou ainda, poderá influenciar pela presença de isoenzimas oriundas dos fungos presentes na amostra, alterando também o padrão original.

O efeito da presença de fungos no metabolismo geral das plantas envolvendo sistemas enzimáticos tem sido estudado por muitos autores. Burdon e Marshall (1983) citaram estudos em cinco espécies envolvendo ataques fúngicos ocorridos em cevada (Sako & Stahmann et al., 1972), feijão (Staples & Stahmann, 1964), milho (Jeannings et al., 1969), amendoim (Cherry et al., 1974) e ervilha (Reddy & Stahmann, 1975), sendo estudados um total de 19 sistemas isoenzimáticos. Nesses estudos, isoenzimas de malato desidrogenase foram

examinadas em quatro espécies e fosfatase ácida, glucose 6-fosfodesidrogenase, peroxidase e glucodesidrogenase em três espécies. Os demais sistemas isoenzimáticos foram estudados em uma ou duas espécies. Os resultados obtidos nessas análises foram distintos. Bandas de malato desidrogenase aumentaram em complexidade; glucose 6-fosfodesidrogenase e glucodesidrogenase não sofreram influência; peroxidases por vezes aumentaram em número e em intensidade e por vezes não foram afetadas; isoenzimas de fosfatase ácida por vezes aumentaram e por vezes diminuíram a atividade, dependendo do sistema hospedeiro-parasita. Pode-se, a partir desses resultados, concluir que existe a necessidade de estudos específicos para cada sistema isoenzimático utilizado.

Em algumas pesquisas foi observado que perfis eletroforéticos de proteínas extraídas de sementes podem ser modificados pela infecção de microrganismos nas amostras. Cherry et al. (1974, 1975, e 1976), citados por Burdon e Marshall (1983), observaram, em estudo da interação entre sementes de amendoim viáveis e *Aspergillus* sp., que isoenzimas de liase aminopeptidase, esterase, peroxidase, oxidases, catalase, entre outras, sofreram alterações. Ainda segundo esses autores, enzimas extraídas de sementes de amendoim permaneceram ativas durante a infecção por *Aspergillus*, sendo que, em algumas circunstâncias, a intensificação de atividade foi correlacionada com enzimas extraídas do micélio do fungo coletado da superfície de sementes infectadas.

Vieira (1996) concluiu que isoenzimas de fosfatase ácida, catecol oxidase, hexoquinase, enzima málica e esterase tiveram os perfis de bandas influenciados pela presença de fungos em sementes de algodão. Porém, isoenzimas de glutamato desidrogenase e glutamato oxaloacetato transaminase não sofreram alterações.

Brandão Junior (1996) relatou que o uso de marcadores bioquímicos permitiu avaliar sensíveis diferenças relacionadas à ação de microrganismos associados ao processo de deterioração em sementes de milho. O referido autor

encontrou variações nos perfis eletroforéticos de proteínas e isoenzimas em função do processo deteriorativo em sementes de milho, provocado pela presença de microrganismos, confirmando a possível interferência dos fungos nesse tipo de análise. Outro exemplo foi os resultados encontrados por Silva (1997), quando observaram a interferência de microrganismos nos padrões isoenzimáticos de sementes de milho infectados por *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp. Esses promoveram alterações nos padrões isoenzimáticos de malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato oxaloacetato transaminase e *Aspergillus flavus*, que promoveu alteração nos padrões de isoenzimas de álcool desidrogenase

Burdon & Marshall (1983) fizeram uma revisão de vários estudos realizados sobre modificações em sistemas enzimáticos causados pela presença de fungos em tecidos vegetais. Esses autores concluíram que tais alterações poderiam ser resultantes de um mecanismo de defesa das células ou, ainda, por outro lado, poderia ser uma consequência da infecção de microrganismos. Estes autores questionaram o poder discriminatório em estudos de enzimas quando estes são baseados somente em sistemas enzimáticos, como esterase, peroxidase ou fosfatases.

Em função da estabilidade de alguns sistemas em sementes ser influenciada pela presença de fungos, existe a necessidade de estudos nesse aspecto, para garantir precisão e confiabilidade ao uso de marcadores isoenzimáticos como descritores.

Isoenzimas em sementes armazenadas

Em algumas pesquisas tem sido mostrado que sementes envelhecidas podem sofrer alterações no seu metabolismo bioquímico quando comparadas

com sementes recém-colhidas. As alterações podem ocorrer pelo aumento ou redução da atividade das enzimas nas sementes. Zhou et al. (2002) comprovam essa afirmativa quando descreveram que a atividade de alfa amilase, beta amilase, peroxidase e catalase, assim como proteínas solúveis em arroz, diminuem significativamente durante o armazenamento, ao contrário da atividade de proteases, lipases e lipoxigenases que aumentam durante o armazenamento.

Priestley (1986) reforça a hipótese da ocorrência de alterações bioquímicas durante o envelhecimento. Esse autor associou a perda de algumas formas de isoenzimas, tais como peroxidase, fosfatase ácida, esterase e aminopeptidase, com o envelhecimento severo de um grupo de espécie de sementes.

Tsuzuki et al. (1994) trabalhando com sementes de dez cultivares de arroz sugeriram que, fatores como à temperatura e à umidade relativa do ar durante o armazenamento, afetam a atividade de várias enzimas, principalmente das que participam da hidrólise de lipídeos como as esterases.

Na análise de isoenzimas de sementes envelhecidas é necessário destacar que o envelhecimento artificial não acarreta as mesmas alterações no sistema bioquímico das sementes do que o causado pelo envelhecimento natural (Gelmond et al., 1978). Isso ocorre devido ao envelhecimento artificial causado por tratamento a alta temperatura e umidade causar efeitos diferentes do que o envelhecimento natural à baixa temperatura (Rajagopal & Sem-Mandi, 1992).

Trabalhando com sementes de arroz envelhecidas artificialmente, Rajagopal & Sem-Mandi (1992) encontraram alterações no número de bandas de fosfatase ácida em sementes envelhecidas. Estes resultados são reforçados pelos encontrados por Brandão Junior (1996), que concluiu que o envelhecimento acelerado durante 72 horas acarreta alta atividade de fosfatase ácida. Porém, Spinola et al. (2000), correlacionaram negativamente a atividade de fosfatase

ácida com os prováveis efeitos deteriorativos provocados pelo envelhecimento artificial de sementes de milho. Estes autores observaram ainda que isoenzimas de peroxidase também diminuíram sua atividade com o envelhecimento, porém isoenzimas de malato desidrogenase não sofreram alterações com o envelhecimento.

Pela análise das variações eletroforéticas em proteínas e isoenzimas de esterase, fosfatase ácida e glutamato oxaloacetato transaminase em sementes secas e germinadas de soja e cevada submetidas ao envelhecimento acelerado, foi observado que os perfis eletroforéticos são específicos para cada espécie e que isoenzimas são úteis como marcadores no acesso à qualidade de sementes. Nessa pesquisa, nas duas espécies estudadas ocorreu um aumento do número de bandas em isoenzimas de esterase e glutamato oxaloacetato transaminase para sementes secas envelhecidas. Esses resultados foram citados por Aung e McDonald (1995), que encontraram resultados distintos a esses quando avaliaram isoenzimas de esterases em sementes de amendoim de baixa, média e alta qualidade e concluíram que ocorre perda da atividade de esterases durante o armazenamento de sementes. Porém, se as sementes forem embebidas, isoenzimas de esterases são novamente sintetizadas.

Vieira (1996), trabalhando com sementes de algodoeiro, analisou isoenzimas de sementes envelhecidas artificialmente por 0, 96, 120 e 168 horas. Concluiu que isoenzimas de fosfatase ácida, malato desidrogenase e esterase apresentaram aumento de atividade com o aumento do tempo de envelhecimento artificial. Porém, 6-fosfogluconato desidrogenase, hexoquinase, peroxidase e fosfoglucoose isomerase apresentaram redução de atividade, enquanto que as enzimas álcool desidrogenase, glutamato desidrogenase, glutamato desidrogenase e glutamato oxaloacetato transaminase não tiveram seus padrões alterados.

Em função do exposto, verifica-se que a qualidade fisiológica das sementes pode alterar os padrões isoenzimáticos em sementes, o que deve ser considerado quando marcadores bioquímicos são utilizados na caracterização de cultivares.

2.4 Marcadores microssatélites

Marcadores moleculares baseados na análise do DNA têm sido considerados extremamente úteis para a caracterização de genótipos. A caracterização pode ser utilizada na discriminação de cultivares, na determinação da pureza genética em lotes de sementes e na associação dos marcadores a características de interesse para uso em programas de melhoramento genético (Ni et al., 2002).

Dentre as vantagens desse tipo de marcador, destacam-se a não influência do ambiente e do estágio fisiológico da planta, a não apresentação do efeito pleiotrópico e o fornecimento de um número ilimitado de polimorfismo distribuído aleatoriamente ao longo de todo o genoma (Vasconcelos, 1995; Lanza et al., 2000). Como cada indivíduo possui uma composição única de seqüências de DNA em seu genoma, os marcadores moleculares podem gerar um padrão único ou uma impressão digital genética (“genetic fingerprint”) que pode ser utilizada na identificação e discriminação dos indivíduos (Grattapaglia e Ferreira, 1996).

Vários tipos de marcadores moleculares estão disponíveis para a avaliação genética de cultivares. Estes incluem RFLP (Botstein et al., 1980), RAPD (Welsh e McClelland, 1990; Williams et al., 1990), AFLP (Vos et al., 1995) e microssatélites (Tautz, 1989). Entre estes marcadores, os de segunda geração, microssatélites e AFLPs têm sido mais eficientes do que os de primeira

geração, RFLP e RAPD. Quanto ao polimorfismo gerado, os microssatélites são considerados os mais eficientes (Gupta et al., 2003).

Microssatélites são seqüências com 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem ao longo da molécula de DNA. Estes *locos*, altamente polimórficos, são flanqueados por seqüências geralmente conservadas e foram denominados SSR (sequência simples repetida). Eles são abundantes e dispersos aleatoriamente pelo genoma. Regiões contendo SSR são amplificadas individualmente pela técnica de PCR, utilizando-se um par de *primers* específicos. Cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico, possuindo o mais elevado conteúdo informativo de polimorfismo entre os marcadores atualmente disponíveis (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Holton, 2001).

Os microssatélites são especialmente adequados para avaliação da diversidade genética entre cultivares com estreita base genética, como o arroz (Akagi et al., 1997). Zhou e Gustafson (1995) determinaram a variação genética entre 57 cultivares de arroz pela análise de microssatélites, encontrando alto nível de polimorfismo, concluindo que esta técnica, quando comparada a outros tipos de marcadores, é mais simples e sensível na detecção da variação genética. Também Garland et al. (1999) utilizaram dez microssatélites para analisar 43 cultivares de arroz, tendo todas as cultivares sido individualizadas ao menos por um microssatélite. O conteúdo informativo por marcador (PIC) variou de 0,62 a 0,92.

Ni et al. (2002) avaliaram 111 microssatélites em 38 cultivares de arroz. Esses autores encontraram 753 alelos, variando de 1 a 17 alelos por microssatélite, com média de 6,8. Entretanto, para a análise de agrupamento foram utilizados apenas 30 marcadores, os quais eram polimórficos. Foi possível a individualização de todos os genótipos avaliados, sendo esses separados em

dois grupos, um com as cultivares da subespécie índica e outro da subespécie japônica, objetivo principal do referido estudo.

Ravi et al. (2003), analisaram 45 genótipos de arroz, utilizando 38 pares de *primers* microssatélites e 36 *primers* RAPD. Foi observado um alto nível de eficiência no agrupamento de cultivares de conhecido grau de parentesco, quando da análise dos microssatélites. Além disso, em vários outros trabalhos foi demonstrado o poder discriminatório dos marcadores baseados na análise de microssatélites. Podem-se citar os realizados por Zhou et al. (2003), Davierwala et al. (2000), Chen et al. (2002) e Davierwala et al. (2000b).

Nos trabalhos acima citados foram utilizados marcadores microssatélites os quais poderiam ser encontrados em regiões codificadoras e não codificadoras do genoma e são denominados SSR genômicos. Entretanto, segundo Gupta et al. (2003), recentemente, a ênfase na área dos marcadores moleculares tem sido no uso de EST-SSR, os quais são obtidos pela utilização de ferramentas de bioinformática, sendo derivados de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) ou genomas completos sequenciados. Esses marcadores são utilizados para análise de regiões expressas do genoma. EST-SSR oferecem as seguintes vantagens sobre os marcadores genômicos: a) detectam variação na porção expressa do genoma, assim podem ter uma perfeita associação com genes de interesse; b) podem ser desenvolvidos sem custo a partir de bases de dados de ESTs e c) uma vez desenvolvidos, esses marcadores, diferentemente dos genômicos, podem ser usados com sucesso em espécies relacionadas.

Segundo Federizzi (1998), para a eficiente utilização de marcadores moleculares, esses devem preencher alguns pré-requisitos: o marcador de DNA deve co-segregar ou estar proximamente ligado ao gene de interesse; a técnica deve ser reproduzível entre os diferentes laboratórios; deve ser eficiente para avaliar um grande número de genótipos como rotina; ser de custo acessível para uso rotineiro nos programas e ainda de fácil execução. Dentre os requisitos

citados, os microssatélites genômicos utilizados nos trabalhos anteriormente mencionados, preenchem a todos, com exceção ao primeiro, ao menos em altas percentagens, em que o marcador deve co-segregar ou estar proximamente ligado ao gene/característica de interesse. Os microssatélites genômicos são determinados aleatoriamente no genoma, independente de marcarem regiões expressas ou não, com pequena probabilidade de estarem próximos a genes de interesse. Ao contrário disso, marcadores EST-SSR são situados em regiões expressas do genoma.

Em arroz, vários projetos de sequenciamento do genoma estão sendo desenvolvidos ou já finalizados, como os conduzidos pelo IRGSP (“International Rice Genome Sequencing Project”), pela Monsanto e pela “Beijing Genomics Institute”. As seqüências dos genomas de arroz encontram-se disponíveis em bancos públicos de dados (Yu et al., 2002).

O avançado estágio em que se encontram esses projetos permitiu que, por meio da utilização da bioinformática, fossem determinadas inúmeras regiões expressas no genoma do arroz, sendo essas denominadas EST, as quais são seqüências em que se encontram genes e também microssatélites (Goff et al., 2002). Atualmente, mais de 104.000 ESTs já estão disponíveis nos bancos de dados. Além disso, mais de 32.000 genes já foram localizados pelo IRGSP no genoma do arroz (Goff et al., 2002; Yuan, 2001). A utilização da bioinformática também permite, nestas regiões sequenciadas do genoma, a identificação de microssatélites e as seqüências que os flanqueiam. Segundo estudos realizados pela Syd (Syngenta draft sequence), citado por Goff et al. (2002) já foram identificadas mais de 48.000 regiões de DNA repetitivo potencialmente utilizáveis como microssatélites no genoma do arroz.

McCouch et al. (2002) a partir de bases de dados de clones de BAC e PAC utilizados no seqüenciamento genético do arroz e desenvolveram 2.240 marcadores microssatélites distribuídos aleatoriamente no genoma do arroz.

Gupta et al, (2003) estudaram ESTs no genoma do trigo, encontrando próximo de 900 microssatélites, sendo desenhados *primers* para 72 deles. Esses foram empregados na caracterização de 52 genótipos de trigo. No estudo desses autores foi concluído que EST-SSR foram superiores a outros marcadores, principalmente por fornecer estimativas mais aproximadas entre diversidade fenotípica e diversidade genética, além de possuírem alto nível de transferabilidade, pois situam-se em regiões conservadas do genoma. Essa característica, por vezes, leva esses marcadores a apresentarem menor polimorfismo quando comparados a marcadores microssatélites genômicos e AFLPs (Varshney et al., 2002). Esses autores ainda destacaram que uma das grandes vantagens dos EST-SSR é a facilidade de desenvolvimento dos *primers*, pois, um dos maiores problemas enfrentados para a utilização de microssatélites genômicos é a necessidade da construção de uma biblioteca genômica. Esse processo é de alto custo, laborioso e nem sempre fornece resultados esperados, gerando microssatélites com baixa ou nenhuma amplificação, além de locos monomórficos.

Para a cultura do arroz, a localização de microssatélites e o desenvolvimento de *primers* em regiões codificadas de interesse são muito úteis para os programas de melhoramento genético. Podem-se destacar, como regiões de interesse no genoma, as ligadas aos genes “mads box”. Os “mads box” são um grupo de genes os quais estão envolvidos em vários aspectos do desenvolvimento das plantas, incluindo aqueles relacionados ao desenvolvimento de meristema, época de florescimento, identidade floral, desenvolvimento de órgãos florais, fertilidade do pólen, desenvolvimento do óvulo e várias outras características relacionadas a estruturas florais (Causier et al., 2002), sendo assim muito úteis na determinação da variabilidade genética entre as cultivares.

Dessa maneira, pode-se destacar que os EST-SSR permitem a caracterização de cultivares com a finalidade de identificação de cultivares, determinação da pureza genética em lotes de sementes, além de medir a diversidade genética para utilização em programas de melhoramento (Ni et al., 2002).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 2003. São Paulo: FNP. Consultoria e Comércio, 2003. p. 219-227.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

ALFENAS, A. C.; et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: SIF, 1991.

AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite *loci*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, n. 1, p. 61-67, Jan. 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS – AOSA. **Seed vigor testing handbook**. Lansing, 1983. 88 p. (Contribution, 32).

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.

AUNG, U. T.; MCDONALD, M. B. Changes in esterase activity associated peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed deterioration. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, n. 1, p. 101-111, 1995.

BONOW, S. **Caracterização e Análise de Pureza Varietal em Genótipos de *Oryza sativa* L. através de isoenzimas**. 1999. 44 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade federal de Pelotas, Pelotas..

BONOW, S.; AUGUSTIN, E.; FRANCO, D. F.; TERRES, A. S. Caracterização isoenzimática de genótipos de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 291-300, 2001.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLMICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

- BRANDÃO JUNIOR, D. E. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas na avaliação da qualidade de sementes de milho**. 1996. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BRESEGHELLO, F.; STONE, L. F. **Tecnologia para arroz de terras altas**. Embrapa arroz e Feijão, 1998. 161 p.
- CAMARGO, O. B. A. **Estudo agrobotânico de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) em diferentes épocas de semeadura**. 1982. 105 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- CAUSIER, B.; KIEFFER, M.; DAVIES, B. MADS-box genes reach maturity. **Science**, Washington, v. 296, n. 5566, p. 275-276, Apr. 2002.
- CHANDRARATNA, M. F. **Genetics and breeding of rice**. London: Longmans, 1964. 389 p.
- CHEN, W. B.; SATO, Y. I.; NAKAMURA, I.; NAKAI, H. Indica-japonica differentiation in Chinese rice landraces. **Euphytica**, Wageningen, v. 74, n. 3, p. 195-201, 1994.
- CHEN, X, CHO, Y. G.; MCCOUCH, S. R. Sequence divergence of rice microsatellites in *Oryza* and other plant species. **Molecular Genetic Genomics**, New York, v. 268, n. 3, p. 331-343, Nov. 2002.
- CHUAN, Y. Q. Identification of the genuineness and the purity of hybrid rice (*Oryza sativa* ss. *Indica*) and its parental lines by electrophoretic analysis of esterases. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 15, n. 3, p. 645-649, 1987.
- BAILEY, D. C. Isozymic variation and plant breeders rights. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Part B. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 129-146.
- BARROS, E. G. **Métodos bioquímicos e moleculares aplicados à identificação e avaliação da pureza genética de plantas**. Sete Lagoas, MG: EMBRAPA/ CNPMS, 1998. (Palestra apresentada no Curso de Qualidade e Análise de Sementes), 1998.

BURDON, J. J.; MARSHALL, D. R. The use of isoenzymes in plant disease research In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. (Part A) Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 401-412.

DAVIERWALA, A. P.; CHOWDARI, K. V.; KUMAR, S.; REDDY, A. P. K.; GUPTA, V. S. Use of three different marker systems to estimate genetic diversity of Indian elite rice varieties. **Genetica**, Dordrecht, v. 103, n. 3, p. 269-284, 2000a.

DAVIERWALA, A. P.; RAMAKRISHNA, W.; RANJEKAR, P. K. Sequence variations at a complex microsatellite locus in rice and its conservation in cereals. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 101, n. 8, p. 1291-1298, Dec. 2000b.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Embrapa. **A cultura do arroz**. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/pesquisa/arroz.htm>>. Acesso em: 01 set. 2002.

ENDO, T.; MORISHIMA, H. Rice. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Part B. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 129-146.

FEDERIZZI, L. C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA- CENARGEN, 1998. 220 p.

FONSECA, J. R.; CUTRIM, V. A.; RANGEL, P. H. N. **Descritores morfo agrônômicos e fenológicos de cultivares comerciais de arroz de várzeas**. Embrapa, 2002. 22p. (EMBRAPA. Documentos, 141).

GARLAND, S. H.; LEWIN, L.; ABEDINIA, M.; HENRY, R.; BLAKENEY, A. The use of microsatellite polymorphisms for the identification of Australian breeding lines of rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 108, n. 1, p. 53-63, 1999.

GELMOND, H.; LURIA, I.; WOODSTOCK, L. W.; PERL, M. The effect of accelerated aging of sorghum seeds on seedling vigour. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 29, n. 109, p. 489-495, 1978.

GOFF, S. A.; RICKE, D.; LAU, T. H.; PRETING, G.; WANG, R. L.; DUNN, M. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. *spp. japonica*) **Science**, Washington, v. 296, n. 5565, p. 92-100, Apr. 2002.

GLASZMANN, J. C. Isozymes and classification of Asian rice varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 74, n. 1, p. 21-30, 1987.

GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Genetic identification of lines and crosses using isoenzyme eletrophoresis. In: ANNUAL CORN AND SORGHUM RESEARCH CONFERENCE, 35., 1980, Washington. **Proceedings...** Washington: American Seed Trade Association, 1980. p. 10-30.

GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Maize. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. (Part B) Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 1-33.

GUIDOLIN, A. F. **Caracterização de genótipos de arroz irrigado por técnicas eletroforéticas**. 1993. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GUIDOLIN, A. I.; OLIVEIRA, A. C.; TERRES, A. L.; COSTA, F. C. Caracterização eletroforética das cultivares de arroz irrigado em uso no RS. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v. 47, n. 414, p. 3-5, maio/jun. 1994.

GUPTA, P. K. RUSTGI, S.; SHARMA, S.; SINGH, R.; KUMAR, N.; BALYAN, H. S. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversty in bread wheat. **Molecular Genetics and Genomics**, New York, v. 270, n. 4, p. 315-323, Dec. 2003.

HOLTON, T. A. Plant Gonotyping by analysis of microsatellites. In: HENRY, R. J. **Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants**. Orlando: CAB, 2001. 344 p.

IMOLESI, A. S. **Efeito da adubação nitrogenada na qualidade fisiológica, em características morfo-agronômicas e nos padrões eleroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho**. 1999. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

INOUE, J.; HAGIWARA, T. Classification of floating rice varieties by acid phosphatase and peroxidase zymograms. **Japan Journal Tropical Agriculture**, Tsukuba, v. 24, n. 4, p. 159-164, 1980.

JENNINGS, P. R.; COFFMAN, W. R.; KAUFMAN, H. E. **Manejo del arroz**. Cali: CIAT, 1981. 233 p.

KIANG, Y. T.; GORMAN, M. B. Soybean. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding**, Part B. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 295-328.

LANZA, M. B.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.

MAEDA, J. A.; ALMEIDA, L. D. A.; JADEROSA, M.; CAMARGO, C. E. 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.

MARCON, G. **Eletroforese no estudo genético das plantas**: revisão. Piracicaba: ESALQ, 1986. 45 p.

MARTINEZ, C. Using electrophoresis to test purity during the cleaning process may save money and time. **Seed World**, Illinois, v. 128, n. 12, p. 8-10, Dec. 1990.

MCCOUCH, S. R.; TEYTELMAN, L.; XU, Y. B.; LOBOS, K. B.; CLARE, K.; WALTON, M.; FU, B. Y.; ZHANG, Q. F.; STEIN, L. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). **DNA Research**, v. 9, n. 6, p. 199-207, Dec. 2002.

MCCOWN, B. B. H.; HALL, T. C.; BECK, G. E. Plant leaf and stem proteins. Isozymes and environmental change. **Plant Physiology**, Rockville, v. 44, n. 2, p. 210-216, 1969.

MCDONALD, M. B. Seed quality assessment. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 2, p. 265-275, June 1998.

MENEZES, N. L.; ROMERO, C. M. Determinação varietal em arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 139-146, fev. 1996.

MILACH, S. C. K. , Uso de Marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: BOREM, A. et al. (Ed.). **Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária**. Viçosa: UFV, 1998. 182 p.

MURPHY, R. W.; et al. Proteins I: isozyme electrophoresis. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C. **Molecular systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p. 45-126.

NAKAGAHARA, M.; AKIHAMA, T.; HAYASHI, K. I. Genetic variation and geographic line of esterase isozymes in native rice varieties. **Japan Journal Genetics**, Mishima, v. 50, n. 5, p. 373-382, 1975.

NI, J.; COLOWIT, P. M.; MACKILL, D. J. Evaluation of Genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 2, p. 601-607, Mar./Apr. 2002.

OLIVEIRA, A. C.; DERBYSHIRE, E.; CARVALHO, M. T. V.; ANDO, A. Perfis protéicos de variedades parentais e híbridos de arroz e sua correlação com heterose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 313-322, mar. 1993.

OLIVEIRA, E. A. Análise de isoenzimas em vegetais. **SOB Informa**, Brasília, v. 4, n. 2, 1983.

ORMAN, B. A.; LAWRENCE, G. D.; DOWNES, P. M.; PHILLIPS, D.S. Assessment of maize inbred genetic purity by isozyme electrophoresis. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 19, n. 3, p. 527-535, 1991.

PAYNE, R. C. Variety testing by official AOSA seed laboratories. **Journal of Seed Thecnology**, Lansing, v. 10, n. 1, p. 24-36, 1986.

PEIRCE, L. C.; BREWBAKER, J. L. Applications of isozyme analysis in horticultural science. **Hortscience**, Alexandria, v. 8, n. 1, p. 17-22, Feb. 1973.

PESKE, S. T.; BARROS, A. C. S. A. , Produção de Sementes. In: PESKE, S. T.; NEDEL, J. L.; BARROS, A. C. S. A. (Ed.). **Produção de arroz**. Pelotas: UFPEL, 1996. p. 357-422.

PHAM, J. L.; SANO, R.; BARBIER, P.; GHESQUIERE, A.; SECOND, G. Isozyme markers in rice: genetic analysis and linkage relationships. **Genome**, Ottawa, v. 33, n. 3, p. 348-359, June 1990.

PRIESTLEY, D. A. **Seed ageing**. New York: Comstock Publication Association, 1986.

RAJAGOPAL, A. S. M.; SEM-MANDI, S. Studies on acid and alkaline phosphatases in aged rice embryos. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 20, n. 2, p. 215-222, 1992.

RAVI, M.; GEETHANJALIS, S.; SAMEEYAFARHEEN, F.; MAHESWARAN, M. Molecular marker based genetic diversity analysis in rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD and SSR markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 133, n. 2, p. 243-252, 2003.

ROSTA, K. Variety determination in rice (*Oryza sativa* L.). **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 3, n. 1, p. 161-169, 1975.

SALGADO, K. C. C. **Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. 2001. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG..

SCANDALIOS, J. G. Isozymes in development and differentiation. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p. 255-258, 1974.

SCHWARTZ, D. Genetic studies on mutant enzymes in maize: synthesis of hybrid enzymes by heterozygotes. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of American**, Washington, v. 46, n. 9, p. 1210-1215, 1960.

SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, N. C. Rice varietal identification by SDS-PAGE. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 28, n. 3, p. 871-873, 2000.

SILVA, E. A. A. **Padrões eletroforéticos de isoenzimas e proteínas de sementes e coleótilos de milho em associação com microrganismos**. 1997. 87 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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, n. 2, p. 285-293, June 1998.

SILVA, T. S. **Estudo da divergência genética em acessos de arroz através de marcadores morfológicos e moleculares**. 1999. 185 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOARES, A. A. **Genética do arroz**. Lavras: UFLA, 1977. 73 p. Apostila.

SOARES, A. A.; ROMERO, C. M. Progresso genético obtido pelo melhoramento do arroz de sequeiro em 21 anos de pesquisa em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, V. 34, n. 3, p. 415-424, mar. 1999.

SPINOLA, M. C. M.; CÍCERO, S. M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 263-270, abr./jun. 2000.

SUH, H. S.; SATO, Y. I.; MORISHIMA, H. Genetic characterization of weedy rice (*Oryza sativa* L.) based on morpho-physiology, isozymes and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, n. 3/4, p. 316-321, Mar. 1997.

TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozyme in plant genetics and breeding**. Part A. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 469-515.

TAUTZ, D. Hipervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, Aug. 1989.

TSUZUKI, W.; KASUMIMOTO, H.; KOBAYASHI, S.; SUZUKI, T. Esterase activity and fatty acid accumulation in the bran of selected rice cultivars. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 71, n. 2, p. 162-165, Mar./Apr. 1994.

VARSHNEY, R. K.; THIEL, T.; STEIN, N.; LAUGRIDGE, P.; GRANER, A. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. **Cereal & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 7, n. 2, p. 537-546, 2002.

VASCONCELOS, M. J. V. **Avaliação da variabilidade genética de cultivares de feijão pelo uso de marcadores moleculares**. 1995. 54 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

VIEIRA, M. G. G. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro**

(*Gossypium Hirsutum* L.). 1996. 114 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIEIRA, N. R. A. Pesquisa em sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 3, n. 3, p. 53-57, 1981.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEELER, M.; REIJANS, M.; VANDELEE, T.; HORNES, M.; POT, J.; PELEMAN, J.; ZABEAN, M. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, Nov. 1995.

WEBB, E. C. The nomenclature of multiple enzyme forms. **Ezymology Biology Clinics**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 124-125, Dec. 1965.

WELSH, J.; Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, Dec. 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** Oxford, v. 18, n. 23, p. 6531-6535, Dec. 1990.

YU, J.; HU, S. N.; WANG, N.; WONG, G. K. S.; LI, S. G.; LIN, B.; DENG, Y. J.; DAÍ, L.; ZHOU, X. Q.; TAO, M.; WANG, J.; ZHU, L. H.; YUAN, L. P. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. *ssp. indica*) **Science**, Washington, v. 296, n. 5565, p. 79-92, Apr. 2002.

YUAN, Q.; QUACKENBUSH, J.; SULTANA, R.; PERTEA, M.; BUELL, R. Rice bioinformatics. analysis of rice sequence data and leveraging the data to other plant species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 3, p. 1166-1174, Mar. 2001.

ZHOU, Z.; GUSTAFSON, J. P. Genetic variation detected by DNA fingerprinting with a rice minisatellite probe in *Oryza sativa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, NewYork, v. 91, n. 3, p. 481-488, Aug. 1995.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Ageing of stored rice: changes in chemical and physical attributes. **Journal of Cereal Science**, v. 35, n. 1, p. 65-78, Jan. 2002.

ZHOU, H.; XIE, Z.; GE, S. Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of a wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in China

Theoretical and Applied Genetics, NewYork, v. 91, n. 3, p. 481-488, Aug. 1995.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE CULTIVARES DE ARROZ VISANDO A CERTIFICAÇÃO DA PUREZA GENÉTICA

RESUMO

BONOW, Sandro. **Caracterização morfológica de cultivares de arroz visando a certificação da pureza genética**. 2004. Cap. 2, 36 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O interesse pela caracterização de cultivares tem aumentado significativamente nos últimos anos. O motivo principal tem sido a crescente necessidade de proteção de cultivares comerciais em mercados econômicos cada vez mais competitivos, além da preocupação por parte das empresas do setor sementeiro em distribuir lotes de sementes com alta pureza genética. Para isso são fundamentais a correta distinção e identificação de cultivares. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência dos descritores morfológicos, na caracterização de cultivares comerciais de arroz, servindo como suporte às empresas produtoras na identificação de cultivares, assim como às exigências da Lei de Proteção de Cultivares. Foram caracterizadas as cultivares de arroz Carisma, IAC 202, Confiança, Douradão, Guarani, Primavera, Canastra e Caiapó. O presente estudo consistiu de dois experimentos, o primeiro conduzido em casa de vegetação no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, quando os genótipos foram caracterizados utilizando-se dos descritores morfológicos recomendados para o registro e proteção de cultivares. O segundo experimento foi conduzido em uma área de produção de sementes da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais e consistiu na identificação, por parte de avaliadores, de sementes de arroz contaminantes propositalmente distribuídos junto às cultivares em estudo. Concluiu-se que os descritores

* Comitê Orientador: Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho (Orientadora), Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira, – UFLA, Dr. Ben Vosman PRI/WUR e Dra. Eva Choer - EMBRAPA. Dr. Antonio Alves Soares – UFLA, Dr. Antonio V. Rodrigues – EPAMIG.

morfológicos são úteis, porém, não suficientes para a caracterização e diferenciação de cultivares de arroz. As características morfológicas observadas em sementes e plantas após a antese são as mais adequadas para a caracterização e diferenciação de cultivares. Os genótipos de arroz de sequeiro apresentam grande similaridade morfológica.

ABSTRACT

BONOW, Sandro. **Morphological characterization of rice cultivars; application to genetic purity certification**. 2004. Cap. 2, 36 p. Thesis (Doctorate in Plant Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The interest of cultivar characterization has increased in the last years. The main reason, has been the necessity of protection of varieties in competitive market, further the crescent preoccupation of the seed companies that want to produce and to sell seeds with higher quality, it includes the higher genetic purity. For it the correct cultivar identification is fundamental. This study had the objective to evaluate the efficiency of morphological markers as descriptors, in commercial rice cultivars, to be useful in cultivar identification for the seed companies, as well as, to fulfill the requirements for the cultivar protection Law. The cultivars characterized were Confiança, IAC 202, Carisma, Primavera, Guarani, Douradão, Canastra and Caiapó. This study consisted of two experiments. One of them was conducted in green house, when the varieties were characterized based on morphological descriptors recommended for the protection cultivar law. The other experiment was done in a seed production field and consisted in the identification of rice contaminants seeds distributed among the cultivars studied. The identification was done for three evaluators. The results allowed the following conclusions; the morphological descriptors are useful, but not enough to the characterization and discrimination of upland rice cultivars, the morphological characteristics in seeds and plants after the anthesis are the more suitable to the characterization and discrimination and also the upland rice genotypes have high morphological similarity.

* Guidance Committee: Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho (Major Professor), Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira, – UFLA, Dr. Ben Vosman PRI/WUR, Dra. Eva Choer – EMBRAPA, Dr. Antonio Alves Soares – UFLA, Dr. Antonio V. Rodrigues – EPAMIG.

1 INTRODUÇÃO

O arroz é um dos cereais mais cultivados no mundo, juntamente com o milho e o trigo, representando mais de 50% da produção agrícola. Aproximadamente um terço da população mundial depende do arroz como fonte de mais de 50% das calorias que consomem (Goff et al., 2002). Na América Latina, o Brasil é o maior produtor, sendo responsável por aproximadamente 88% da produção de arroz do Mercosul (Riggato & Kolz, 1998). A elevada produção de arroz no Brasil e no mundo deve-se à alta tecnologia empregada pelos agricultores, associado ao alto potencial genético das cultivares utilizadas, o qual foi alcançado nos programas de melhoramento genético de arroz (Guidolin, 1993).

Para que todo esforço realizado pelos melhoristas em incorporar as novas características diferenciais às cultivares possa ser desfrutado pelos agricultores, é necessário que as sementes, que são a “ponte” entre os melhoristas e os agricultores, sejam repassadas com alta qualidade aos produtores. Esse fato tem levado as instituições de pesquisa à busca cada vez maior de sementes de arroz com alta qualidade para atender à crescente demanda dos agricultores por cultivares melhores adaptadas, mais produtivas e com menor custo de produção. Do mesmo modo, as empresas produtoras de sementes procuram monitorar todas as etapas do processo produtivo visando um produto com alta pureza genética, física, fisiológica e sanitária.

A seleção de sementes com alta pureza varietal é o primeiro passo em direção à obtenção da semente de alta qualidade (Peske e Barros, 1998), sendo para isso necessária a correta identificação das cultivares por meio de suas características particulares. No Brasil, a identificação de cultivares é realizada, na maioria das vezes, pelo uso de descritores morfológicos.

Além do aspecto relacionado ao controle de qualidade de sementes, o interesse pela caracterização de cultivares tem aumentado significativamente nas últimas décadas. O motivo principal é a crescente necessidade de proteção de cultivares comerciais em mercados econômicos cada vez mais competitivos (Milach, 1998). Segundo Bailey (1983), as exigências da lei de proteção de cultivares adicionaram uma considerável importância ao conceito de distinção varietal.

No Brasil, a Lei de Proteção de Cultivares nº. 9.456, sancionada em 25 de abril de 1997, abriu uma nova perspectiva e interesse na proteção e lançamento de materiais genéticos (Milach, 1998). Os descritores oficiais prescritos nessa lei são baseados em características morfológicas. Assim, a caracterização de cultivares, procedimento fundamental quando do lançamento de uma nova cultivar, baseia-se no detalhamento de sua morfologia e envolve o maior número possível de descritores. Apesar de seu grande uso, algumas limitações têm colocado em dúvida a eficiência desses marcadores.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência dos descritores morfológicos em cultivares comerciais de arroz, visando a identificação de cultivares e a certificação da pureza varietal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos experimentos durante as safras 2000/2001 e 2001/2002. Nesses experimentos foram analisadas as cultivares de arroz de sequeiro Carisma, IAC 202, Confiança, Douradão, Guarani, Primavera, Canastra e Caiapó, cuja genealogia encontra-se na Tabela 1. Foram utilizadas sementes genéticas do Programa de Melhoramento de Arroz da EPAMIG/UFLA

(Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais e Universidade Federal de Lavras).

TABELA 1. Genealogia das oito cultivares comerciais de arroz de sequeiro utilizadas na pesquisa. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Cultivar	Genealogia
Carisma	CT7244-9-1-5-3/CT6196-33-11-1-3 x CT6946-2-5-3-3-2-M
IAC 202	Lemont x IAC 25
Confiança	IAC 164 x Rio Verde (IRAT 216)
Primavera	IRAT 10 x LS 85 - 158
Guarani	IAC 25 x 63-68
Douradão	IAC 25 x 63-83
Canastra	Tox939-107-2-101-1B/(Colômbia 1 x M 312 A)// Tox1780-2-1-1P-4
Caiapo	IRAT13/Beira Campo/CNA x 104-B-18Py-2B/Pérola

O experimento realizado na safra 2000/2001 foi conduzido em casa de vegetação, no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras por meio do qual objetivou-se a caracterização das cultivares de arroz.

Para tanto, a semeadura foi realizada em vasos plásticos com capacidade para 4,5 kg de solo. Como substrato foi utilizada a mistura solo:areia, no qual foram semeadas seis sementes por vaso, sendo realizado posteriormente um desbaste, deixando-se duas plantas por vaso. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada cultivar. Cada repetição constava de um vaso com duas plantas. Foi realizada irrigação sempre que necessário e adubação com micro e macronutrientes, segundo recomendação de Soares et al. (1994).

Os descritores morfológicos avaliados foram os para o registro e proteção de cultivares, as quais estão listadas a seguir, além de outros julgados aptos, os quais foram selecionados durante as avaliações, nos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas.

Descritores avaliados

1) Folha

1.1) Cor da folha – a coloração do limbo e bainha foi observada no início do aparecimento das panículas. As folhas foram classificadas como verde-claro, verde, verde-escuro, púrpura na ponta, púrpura na margem, púrpura ou púrpura somente na bainha.

1.2) Comprimento do limbo – foi tomada a distância, em cm, entre o colar e a extremidade da penúltima folha, no início da floração.

1.3) Largura do limbo – foi tomada a maior largura da penúltima folha, no início da floração.

1.4) Pubescência do limbo – foi observada entre o emborrachamento e a emissão da panícula e classificada como ausente, escassa, média ou forte.

1.5) Cor da aurícula - foi observada na penúltima folha, entre o emborrachamento e a antese completa e classificada como verde-claro ou púrpura.

1.6) Cor da lígula – foi observada na penúltima folha, na fase entre o emborrachamento e a antese completa e classificada como incolor a verde ou púrpura.

1.7) Ângulo da folha bandeira – foi observado o ângulo formado em relação ao colmo, na antese: ereto < 30°; intermediário, entre 31 e 60°; horizontal, entre 61° e 90°; descendente > 90°.

2) Colmo

2.1) Comprimento – foi tomada a medida, em cm, do colmo principal, do nível do solo ao nó ciliar da panícula. Foi realizada a partir do enchimento dos grãos.

2.2) Espessura – foi medido, em mm, o diâmetro da parte mediana do colmo principal, realizada durante a antese.

2.3) Ângulo dos afilhos – foi observado durante o enchimento dos grãos. Classificado em ereto, $< 30^\circ$; intermediário – 30 a 60° , aberto $> 60^\circ$.

2.4) Cor do internódio – observado no início da floração. Classificado como verde claro, dourado claro, estrias púrpuras ou púrpuras.

2.5) Coloração de antocianina (púrpura) nos nós - observada entre o início do enchimento e o final da fase leitosa dos grãos. Classificada como ausente ou muito fraca, fraca, média, forte ou muito forte.

3) Número de dias para emissão da panícula – contabilizados da semeadura a 50% das panículas emergidas.

4) Panícula

4.1) Comprimento – medida a distância, em cm, do nó ciliar à última espiguetta da panícula, a partir do enchimento dos grãos.

4.2) Tipo – as panículas foram classificadas de acordo com o ângulo das ramificações primárias durante a maturação. Classificadas em compacta, intermediária ou aberta.

4.3) Exserção – foi avaliada a distância entre o colar da folha bandeira e o nó ciliar. Realizada durante o enchimento dos grãos.

Completa – nó ciliar distante 5 cm ou mais do colar da folha bandeira;

Média – nó ciliar entre 1 e 5 cm do colar da folha bandeira;

Justa – nó ciliar situado no mesmo nível do colar da folha bandeira.

4.4 – Degrane - foi determinada a percentagem de grãos debulhados após pressionar levemente a panícula com a mão. O degrane foi considerado difícil quando menos de 25% dos grãos da panícula foram removidos; intermediário com 25% a 50% dos grãos removidos; fácil quando mais de 50% dos grãos foram removidos.

4.5 – Presença e distribuição das aristas – a presença de aristas foi observada após o enchimento dos grãos. As sementes foram classificadas por apresentarem aristas “somente na ponta”, “1/4 superior” , “1/2 superior”, “2/3 superior” e “toda extensão”.

4.6 – Comprimento das aristas – essa característica foi observada após o enchimento dos grãos e classificada como ausente ou muito curta, curta, média, longa ou muito longa.

5 – Espiguetas

5.1 – Cor do estigma – foi observada na antese e classificada como branca, verde-claro, amarelo, púrpura-claro ou púrpura.

5.2 – Pubescência das glumelas – observada durante a maturação e classificada como ausente ou muito fraca, fraca, média ou forte.

5.3 – Cor do apículo

5.3.1 – Na floração: observada durante a antese. Foi classificada como branca, verde, amarela, marrom, vermelha, púrpura ou preta.

5.3.2 – Na maturação: observada durante a maturação dos grãos, foi classificada como branca, amarela, marrom, vermelha, púrpura ou preta.

5.4 – Cor das glumelas – observada no final da maturação. Foi classificada como palha, dourada, ponto ou manchas marrons, estrias marrons, marrom, avermelhada a púrpura clara, manchas púrpuras, estrias púrpuras, púrpura ou preta.

5.5 – Cor das glumas estéreis – observada no final da maturação. Foi classificada como palha, dourada, vermelha ou púrpura.

6 – Ciclo cultural – foi contabilizado o período entre a semeadura e maturação completa. As cultivares foram enquadradas como com ciclo muito curto, curto, médio, longo ou muito longo.

7 – Grãos

7.1 – Peso de 100 sementes – foram pesadas 10 amostras de grãos e ajustadas as umidades para 13%. Foi medido em gramas.

7.2 – Comprimento do grão – determinado em sementes inteiras descascadas, não polidas, tomadas ao acaso. Foi medido em mm.

7.3 – Forma do grão descascado – foi classificada com base na relação comprimento/largura dos grãos descascados, não polidos em: arredondado (C/L menor que 1,50), semi-arredondada (C/L entre 1,50 e 2,00), meio alongada (C/L entre 2,01 e 2,75), alongada (C/L entre 2,76 e 3,50), muito alongada (C/L maior que 3,50).

7.4 – Cor do grão descascado – foi observado após o descascamento das sementes e antes do polimento. Os grãos foram classificados em uma das seguintes classes: branca, pardo-claro, parda, vermelha, púrpura.

7.5 – Comprimento dos grãos com casca – após a colheita foi medido em mm.

7.6 – Largura do grão com casca - após a colheita, foi medido em mm.

7.7 – Espessura do grão com casca - após a colheita, foi medido em mm.

7.8 – Relação comprimento/largura com casca - após a colheita, foi medido em mm.

Para a análise estatística dos dados quantitativos foi utilizado o teste de Scott Knott 1%, pelo “software” Sisvar, Versão 4.0 (Ferreira, 1999).

O experimento na safra 2001/2002 foi instalado na área experimental da EPAMIG, Lavras, utilizaram-se os descritores recomendados para o registro e proteção de cultivares, para fins de certificação da pureza varietal.

Foi utilizado o delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada parcela constituída por uma linha de cada cultivar e cada linha possuía 100 plantas com valores entre 0% e 20% de contaminação de uma segunda cultivar (Tabela 2). O espaçamento entre plantas foi de 0,20 m e entre linhas 0,50 m. A seleção das cultivares contaminantes ocorreu conforme recomendação dos melhoristas do Programa de Melhoramento Genético de arroz UFLA/EPAMIG.

Durante a semeadura, a localização das sementes das cultivares contaminantes foi marcada com estacas. Após o desbaste, as estacas foram retiradas e o controle da posição das plantas contaminantes foi feito por meio de um croqui.

TABELA 2. Cultivares contaminantes utilizadas na certificação da pureza genética das diferentes cultivares. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Cultivar	Contaminante
Carisma	IAC 202
IAC 202	Canastra
Confiança	Canastra
Primavera	Carisma
Guarani	Douradão
Douradão	Primavera
Canastra	Carisma
Caiapo	Canastra

Ao final de cada parcela a ser avaliada, foi instalada uma linha com quinze plantas da cultivar predominante na linha, com o objetivo de facilitar a identificação das contaminantes.

As avaliações foram realizadas por três avaliadores que desconheciam a percentagem de contaminação, apenas sabendo da percentagem máxima possível presente em cada linha.

As plantas foram avaliadas individualmente e o avaliador apontava aquelas julgadas contaminantes. As plantas foram avaliadas aos 40, 80, 100 e 120 dias após a semeadura. A cada avaliação, foram expostas aos avaliadores as características previstas como descritores. Os avaliadores também consideraram outras características que julgaram importantes para diferenciar as cultivares.

Além das avaliações no campo, as sementes foram avaliadas em laboratório. Para esta avaliação, as sementes foram dispostas lado a lado em folhas de papel, numeradas e foi utilizado o mesmo delineamento, número de repetições e percentual de contaminantes utilizado no campo.

Foram calculadas as percentagens de acerto e erro com base nos resultados obtidos das avaliações. A percentagem de acerto foi calculada pelo quociente entre a frequência observada e a frequência esperada, multiplicado por cem. No cálculo da percentagem de erro foram consideradas as plantas

contaminantes que não foram identificadas pelos avaliadores e as não contaminantes que foram identificadas como contaminantes. O somatório dessas plantas foi dividido pelo número total de plantas na parcela e multiplicado por cem.

Foi calculado o desvio padrão da média dos resultados nas quatro repetições obtidas pelos três avaliadores, conforme Gomes (1987).

Para verificar a significância dos desvios ocorridos entre os resultados obtidos pelos avaliadores foi utilizado o teste qui-quadrado (χ^2). Neste teste, os desvios foram transformados em um único valor de χ^2 , representando a medida padronizada da magnitude dos desvios (Ramalho et al., 2000).

O valor de λ^2 foi estimado pela seguinte expressão:

$$\chi^2 = \sum (F_o - F_e)^2 / F_e$$

sendo:

- F_o : frequência observada de contaminantes
- F_e : frequência esperada de contaminantes

Os dados de frequência esperada e observada foram obtidos da média de quatro repetições para cada avaliador.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento safra 2000/2001 – caracterização de cultivares

Pelos resultados obtidos na caracterização dos genótipos em casa de vegetação, baseados nos descritores recomendados para o registro e proteção de cultivares, Tabelas 3 e 4, observou-se que pela característica cor da folha não foi possível verificar diferenças entre os genótipos estudados. Pois a cor verde foi presente em todas as cultivares. Quando realizada a diferenciação das cultivares

TABELA 3. Caracterização morfológica de oito cultivares de arroz de sequeiro. UFPA, Lavras-MG, 2004.

	Canastra	Primavera	Carisma	Guarani	Caiapó	Douradão	Confiança	IAC 202
Cor folha	Verde							
Pubescência do limbo	Ausente	Ausente	Ausente	Forte	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Cor aurícula	Verde-claro							
Cor lígula	Incolor a verde							
Ângulo da folha bandeira	Ereto	Intermediário						
Ângulo dos afilhos	Ereto							
Cor do internódio	Verde-Claro							
Antocianina nos nós	Ausente							
Dias emissão da panícula	55	40	50	43	54	40	43	38
Tipo de panícula	Intermediária	Aberta	Intermediária	Intermediária	Intermediária	Compacta	Intermediária	Intermediária
Exserção da panículas	Média	Justa						
Degrane	Intermediário	Intermediário	Intermediário	Intermediário	Intermediário	Fácil	Intermediário	Intermediário
Presença das aristas	Microaristas	Ausente	Ausente	Microaristas	Ausente	Ausente	Ausente	½ superior
Comprimento das aristas	Curta	Ausente	Ausente	Curta	Ausente	Ausente	Ausente	Média
Cor estigma (espiguetas)	Branca	Branca	Amarela	Branca	Branca	Amarela	Branca	Branca
Pubescência glumelas	Ausente	Ausente	Ausente	Forte	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Cor apículo na floração	Verde	Marrom	Púrpura	Verde	Púrpura	Branca	Verde	Verde
Cor apículo maturação	Verde	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Amarelo	Marrom	Marrom
Cor glumas estéreis	Palha							
Cor do grão descascado	Branca							
Forma do grão descascado	Alongado							
Ciclo cultural	Médio	Curto	Curto	Curto	Médio	Curto	Médio	Curto

TABELA 4. Características morfológicas quantitativas de oito cultivares de arroz de sequeiro. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Cultivar	Comprimento do limbo (cm)	Largura do limbo (cm)	Comprimento do colmo (cm)	Comprimento da panícula (cm)	Espessura do colmo (cm)	Peso 100 sementes (gr)
Guarani	42,0 B	1,28 C	61,0 B	18,88 A	0,63 C	18,88 B
Primavera	39,0 B	1,14 B	68,3 B	22,13 B	0,48 B	22,13 C
Douradão	48,0 B	1,26 C	62,0 B	20,60 B	0,45 B	20,60 C
Canastra	24,0 A	1,13 B	52,0 A	16,93 A	0,38 A	16,93 A
Caiapó	39,0 B	1,35 C	61,5 B	18,00 A	0,45 B	18,00 B
IAC 202	32,0 A	1,28 C	46,0 A	16,37 A	0,38 A	16,38 A
Carisma	25,0 A	0,93 A	54,0 A	16,28 A	0,40 A	16,28 A
Confiança	32,0 A	1,30 C	48,0 A	17,88 A	0,40 A	17,88 B
F (Tratamento)	7,27	9,63	7,75	12,61	20,7	12,61
CV (%)	18,06	7,35	9,86	6,36	8,17	6,36

Letras não comuns na coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott a nível de 1%

por essa característica alguns cuidados devem ser tomados, pois ocorre variação da cor da folha de acordo com o nível de nitrogênio disponível no solo. A tonalidade da cor da folha é alterada, principalmente nas folhas mais jovens. Em solos férteis em nitrogênio, as folhas adquirem tonalidade verde-escuro, ao contrário dos solos mais pobres, onde apresentam tonalidade verde-claro (Fonseca et al., 2002).

O comprimento do limbo variou entre as cultivares, de 48 cm na cultivar Douradão a 24 cm na cultivar Canastra. As cultivares foram separadas em dois grupos. Porém, apesar dessas diferenças, essa característica é pouco estável, pois ocorreu considerável variação entre as plantas da mesma cultivar. Em relação à largura do limbo, as medidas foram relativamente similares entre as cultivares, com exceção da 'Carisma' e 'IAC 202', porém, em todas as cultivares ocorreu variação entre folhas dentro de uma mesma cultivar. As características do limbo, comprimento e largura das folhas dificilmente poderão servir para identificar plantas atípicas em uma lavoura, devido à variação observada entre plantas da mesma cultivar.

Por outro lado, a pubescência no limbo foi considerada um excelente descritor, pois, aos quinze dias após a semeadura, foi possível diferenciar a cultivar Guarani das demais, por essa ser a única cultivar a apresentar pubescência no limbo. A glabrescência da folha e da casca do grão é controlada por um gene recessivo duplicado, ou seja, o *gl-1* e *gl-2* e o meio ambiente não afeta sua expressão. Assim, essa é uma característica estável, podendo a seleção para essa característica ser realizada nas gerações iniciais, a partir de F₂. A pubescência da folha é dominante sobre a condição glabra (Soares, 1997).

Por meio da cor da aurícula, assim como da lígula, não foi possível separar as cultivares analisadas. A cor da aurícula foi verde-claro e da lígula incolor a verde em todos os genótipos.

O ângulo da folha bandeira foi classificado como ereto, menor que 30° em relação ao colmo, em todas as cultivares estudadas, com exceção da 'IAC 202', que apresentou ângulo intermediário. Essa característica é determinada pelo mesmo gene do nanismo, observando-se assim um efeito pleiotrópico para essas características. O caráter folha ereta é controlado por um gene recessivo simples, sendo altamente hereditário (Soares, 1997), porém Grist (1983) afirma que a herança do ângulo das folhas é uma característica poligênica. O ângulo dos afilhos foi classificado como ereto menor que 30°, em todas as cultivares. Segundo Fonseca et al. (2002), os ângulos da folha bandeira e dos afilhos são características inerentes à cultivar e raramente são modificados pelo ambiente.

O comprimento do colmo, característica que separou as cultivares em dois grupos (Tabela 4), está relacionada com o porte da planta. Assim, cultivares de porte alto, médio ou baixo diferem no comprimento do colmo. Por exemplo, a cultivar IAC 202, de porte baixo, com colmo medindo em torno de 46 cm, por outro lado a cultivar Caiapó, de porte alto, com colmo medindo em torno de 64 cm. Essa é outra característica muito influenciada pelo ambiente, principalmente pelas altas dosagens de nitrogênio (Fonseca et al., 2002). Essa influência também ocorre na espessura do colmo, o que, por vezes, pode comprometer o seu uso como descritor, embora o porte da planta possa ser utilizado na comparação de cultivares em mesmo ambiente.

Fonseca et al. (2002) afirmaram que as características morfológicas do arroz agrupam-se em características constantes (qualitativas) e variáveis (quantitativas); as primeiras são aquelas que definem a espécie ou a variedade e, geralmente, são controladas por poucos genes, apresentam alta herdabilidade e não se alteram por influência do ambiente. As características variáveis, controladas por vários genes, apresentam baixa herdabilidade e são influenciadas pelas condições ambientais, podendo ser consideradas como resultante da ação do meio ambiente sobre o genótipo.

A cor do internódio foi similar, verde-claro, em todas as cultivares estudadas. Segundo Soares (1997), na ausência de antocianina, o internódio apresenta coloração verde ou amarela. Nos cruzamentos envolvendo ambas as colorações, verifica-se que o caráter tem controle monogênico, sendo a cor amarela recessiva. Fonseca et al. (2002) afirmam que esta característica é pouco influenciável pelo ambiente.

Não foi observada a presença de antocianina nos nós do colmo em todas as cultivares. A coloração dos nós do colmo por antocianina é determinada pela ação conjunta dos genes básicos nos *locos* *C* e *A* com alelo *Pn* (Soares, 1997).

A característica, dias para emissão da panícula, variou de cultivar para cultivar, sendo esta característica muito importante na definição do ciclo. As cultivares precoces, médias e tardias diferenciam-se pela duração da fase germinativa até a floração, ou seja, durante o estágio vegetativo (Soares, 2001). Essa característica é influenciada pela temperatura e fotoperíodo. Acredita-se que, durante a condução do experimento, o ciclo das cultivares foi acelerado, devido à alta temperatura na casa de vegetação.

O comprimento da panícula separou as cultivares em dois grupos. Essa característica pode ser influenciada pelo ambiente e dificilmente, em um campo de produção, seria decisiva para diferenciação de cultivares. Segundo Chandraratna (1964), no arroz, há uma alta correlação positiva entre comprimento da panícula e altura da planta e há a suposição de que os poligenes que governam a altura exerçam um efeito pleiotrópico sobre o comprimento da panícula. Investigações sobre herança do comprimento da panícula revelam o mesmo tipo de ação gênica aditiva, como ocorre para altura de planta. Resultados similares foram encontrados por Oliveira et al. (1993), trabalhando com cultivares brasileiras e japonesas. Esses autores concluíram que caracteres como altura de planta, comprimento e largura da folha bandeira e comprimento da panícula não permitiram a diferenciação dos dois grupos de cultivares.

Pelo tipo de panícula foi possível separar as cultivares em três grupos, ‘Caiapó’, ‘Canastra’, ‘Confiança’, ‘Guarani’ e ‘Carisma’ com panícula intermediária; ‘Douradão’ apresentou panícula compacta e ‘Primavera’, aberta. Embora essa característica tenha permitido a discriminação de algumas cultivares, a ocorrência de estiagens na época da emissão e na floração causam mudanças fisiológicas à planta de arroz, influenciando o comportamento dessa característica (Fonseca et al., 2002).

A exerceção das panículas foi classificada como justa na cultivar IAC 202 e média em todas as outras. Esses resultados discordam dos publicados por Bastos (2000) para a cultivar IAC 202, que detectou exerceção intermediária e dos publicados por EPAMIG (199-) que afirmam que a cultivar Carisma possui exerceção completa. Essa discordância pode ser explicada pela influência do ambiente sobre essa característica, principalmente nas fases de emissão da panícula e floração (Fonseca et al., 2002).

O degrane foi classificado como fácil na cultivar Douradão e intermediário nas demais, ou seja, nessas, quando a panícula era pressionada levemente com as mãos, 25% a 50% dos grãos eram degranados. Esses resultados discordam dos encontrados por EPAMIG (1997) para a cultivar Canastra, que foi classificada como apresentando degrane fácil. O degrane ou debulha depende do grau de aderência da espiguetas a seu pedicelo (Soares, 1997). Jeannings et al. (1981) acreditam que o degrane seja controlado por um só gene e, geralmente, considerado como dominante, embora, em alguns casos, tenha ocorrido o inverso. Além disso, seja qual for o modo de herança, o estágio de maturação e o meio ambiente influem acentuadamente no grau de degrane. Os diversos graus de degrane são geneticamente independentes das demais características importantes e podem combinar-se com qualquer uma delas. Fonseca et al. (2002) afirmam que o degrane da panícula é afetado pela intensidade da brusone no pedúnculo e nas ramificações no período de floração.

O degrane é também influenciado pela época de colheita; plantas de arroz que permanecem no campo por muitos dias após a maturidade fisiológica apresentam maiores perdas e, conseqüentemente, maior degrane.

É importante ressaltar que a avaliação de alguns descritores é dificultada pela ausência de um padrão de classificação dentro de cada descritor.

A presença das aristas foi observada nas cultivares Canastra, Guarani e IAC 202, sendo na 'Canastra' classificada quanto ao comprimento como curta e na cv. IAC 202 como média. O comprimento das aristas nessas cultivares não foi estável apresentando sementes aristadas e não aristadas. Soares (1997) afirma que, freqüentemente, é observada variação acentuada no desenvolvimento da arista, não só dentro da mesma planta, mas também dentro da panícula. Jennings et al. (1981) citam que dois ou três genes dominantes controlam a presença das aristas e que os cruzamentos de cultivares parcialmente aristadas com não aristadas diferem em apenas um gene. Além disso, esses autores também afirmam que fatores ambientais influenciam com freqüência na presença e quantidade de aristas no ápice da panícula. Estes resultados são confirmados por Menezes & Romero (1996), que afirmam que a arista é uma característica de difícil uso na identificação varietal em laboratório, pois de acordo com os descritores, as cultivares aristadas podem também apresentar sementes semi-aristadas ou microaristadas. Essa dificuldade torna-se maior na avaliação em laboratório devido à quebra parcial ou total das aristas durante o beneficiamento.

A cor do estigma nas cultivares Douradão e Carisma foi amarela, enquanto que em todas as outras cultivares foi branca. Destaca-se nessa característica a dificuldade em diferenciar estigmas brancos de verde-claro e amarelo, devido a proximidade das cores, além da influência da luminosidade na definição da cor no momento da avaliação.

A pubescência das glumelas estava presente apenas na cultivar Guarani. Essa observação reforça a afirmativa de Jennings et al. (1981) de que plantas

que possuem limbos pubescentes também possuem as glumelas pubescentes, sendo estas características controladas por um gene recessivo duplicado. Menezes & Romero (1996), trabalhando com 22 cultivares de arroz irrigado, as distinguiram pela pilosidade nas glumelas em dois grupos. Esses autores consideraram que, pela falta de estabilidade, é comum aparecerem misturas físicas entre os grupos, fato que levou os órgãos responsáveis pelo sistema de produção de sementes fiscalizadas no Rio Grande do Sul a admitirem determinado nível de mistura, sem considerar contaminação varietal. Isso dificulta o uso da pilosidade das glumelas como característica para a identificação varietal, o que pode ser confirmado pela descrição da cultivar Douradão quando é prevista a presença de até 0,5% de grãos pilosos (EPAMIG, 1987).

A cor do ápulo foi um descritor importante para diferenciação das cultivares. Quando observada na floração, a cultivar Primavera apresentou ápulo marrom, tendo essa cor sido mantida na maturação das sementes. A cultivar Douradão apresentou cor do ápulo branco na floração e amarelo na maturação; ‘Guarani’, ‘Confiança’ e ‘IAC 202’ apresentaram ápulo verde na floração e marrom na maturação; ‘Carisma’ e ‘Caiapó’ apresentaram ápulo de cor púrpura na floração e marrom na maturação. Trata-se de uma característica muito útil na diferenciação de cultivares, pois, com base nesse descritor, os genótipos estudados puderam ser divididos em cinco grupos de acordo com a combinação de cores do ápulo na floração e maturação. Segundo Soares (1997), a manifestação do caráter ápulo colorido é conferida pela interação de alelos nos locos *C* e *A*. Quando o genótipo é homozigoto para *c*, não há formação de qualquer pigmento, entretanto, se for homozigoto para *a*, não há formação de antocianina, mas em combinação com os alelos C_B e C^{Bp} , uma coloração amarelo-tostado pode se desenvolver na maturação. Menezes & Romero (1996) consideraram essa característica útil e de fácil identificação,

embora salientassem que, para as cultivares de arroz recomendadas para o estado do Rio Grande do Sul, esta característica é pouco usada nos laboratórios de análises de sementes, devido à ausência de pigmentação no apículo por ocasião da maturação.

As cultivares Caiapó e Carisma apresentaram antocianina na base dos colmos, característica essa verificada durante o perfilhamento. Porém, essa pigmentação não foi observada quando da instalação do experimento em campo, provavelmente devido à influência do ambiente. A pigmentação por antocianina, embora não esteja relacionada com caracteres econômicos e de qualidade de grãos, tem recebido muita atenção para a descrição de cultivares (Jennings et al., 1981). A herança da pigmentação de antocianina é bastante complexa devido à existência de *locos* duplicados, série alélica múltipla para um mesmo *loco*, fatores inibidores, diferenças sutis na tonalidade e intensidade de cor entre genótipos, variação nos estádios de crescimento e o efeito acentuado de fatores ambientais, como, por exemplo, a luz, sobre o desenvolvimento da cor.

A cor do grão descascado foi classificada como branco em todas as cultivares. O ciclo cultural permitiu diferenciar as cultivares em dois grupos distintos, com ciclo médio e curto. Porém, variações no ciclo podem ocorrer devido à época de semeadura e condições climáticas (Fonseca et al., 2000).

Quanto à análise morfológica de sementes, foram observadas diferenças significativas, no mínimo, em três cultivares por característica.

O comprimento dos grãos com glumelas diferenciou a cultivar Confiança, com o menor comprimento entre todas as demais; já o comprimento sem glumelas permitiu a separação das cultivares em três grupos, um com as cultivares Guarani, Primavera e Douradão, o segundo com as demais cultivares com exceção da cv. Confiança que constituiu o terceiro grupo.

A diferenciação pela característica de largura das sementes permitiu o agrupamento das cultivares em quatro grupos (Tabela 4), sendo considerada uma

característica de fácil determinação. Estes resultados confirmam os encontrados por Menezes & Romero (1996), segundo os quais as sementes de algumas cultivares de arroz foram identificadas visualmente com facilidade. Assim, concluíram que a dimensão largura é uma característica útil na identificação varietal, quando se tratar de mistura entre as sementes com variações neste componente.

A característica espessura dos grãos permitiu a separação das cultivares em dois grupos (Tabela 5). Essa característica, devido às pequenas diferenças de medida, na prática é de difícil utilização para a determinação da diferenciação de cultivares e para certificação da pureza varietal de um lote de sementes. Conclusão similar foi encontrada por Menezes & Romero (1996) quando trabalharam com essa característica na separação varietal de arroz, afirmando que a espessura não mostrou diferenças significativas entre as cultivares que a credenciassem como característica útil na distinção varietal.

A característica peso de grãos foi a que melhor separou os materiais, sendo formados cinco grupos. Maeda et al. (1995) consideraram os fatores comprimento, largura e massa fresca de sementes como excelentes descritores para a diferenciação de cultivares. Porém, Chandraratna (1964) indica que o peso dos grãos é controlado por aproximadamente 10 genes. Menezes & Romero (1996) concluíram que, apesar das diferenças encontradas no peso de mil sementes entre as cultivares, não foi possível identificar as cultivares por meio dessa característica, uma vez que a mesma, além da determinação genética, pode ser influenciada pelas condições climáticas e/ou manejo, variando consideravelmente entre lotes. Assim alguns cuidados devem ser tomados quando esta característica for utilizada.

TABELA 5. Características morfológicas das sementes de oito cultivares de arroz de sequeiro. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Cultivar	Com glumelas					Sem glumelas		
	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Espessura	Comp/larg	Peso 100	Comprimento	Largura	Comp/larg
Guarani	0,98 A	0,29 D	0,22 A	3,41 B	3,39 D	0,76 C	0,27 D	2,80 A
Primavera	0,97 A	0,23 A	0,20 B	4,15 D	2,72 C	0,75 C	0,21 A	3,57 D
Douradão	0,97 A	0,30 D	0,22 A	3,24 A	3,52 E	0,75 C	0,26 D	2,83 A
Canastra	0,94 B	0,27 C	0,21 B	3,50 B	2,73 C	0,72 B	0,23 B	3,08 B
Caiapó	0,92 B	0,28 D	0,23 A	3,23 A	2,78 C	0,68 B	0,25 C	2,72 A
IAC 202	0,92 B	0,23 A	0,20 B	3,90 C	2,36 B	0,70 B	0,22 A	3,20 C
Carisma	0,92 B	0,22 A	0,20 B	4,07 D	2,44 B	0,72 B	0,22 A	3,29 C
Confiança	0,81 C	0,25 B	0,21 B	3,16 A	2,15 A	0,63 A	0,22 A	2,88 A
F (Tratamento)	44,55	75,04	8,37	68,80	488,25	60,13	51,97	53,69
CV (%)	1,76	2,45	2,62	2,69	1,57	1,60	2,84	2,62

Letras não comuns na coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott a nível de 1%

Quanto à forma dos grãos, característica recomendada como descritor de cultivares na Lei de Proteção de Cultivares, a maioria das cultivares foi enquadrada como alongada. Somente a cultivar Primavera foi classificada como muito alongada e a Caiapó como meio alongada (Tabela 6).

TABELA 6. Classificação da forma e cor de sementes de arroz. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Cultivar	Forma do grão	Cor das glumelas
Canastra	Alongada	Palha
Primavera	Muito alongada	Palha
Carisma	Alongada	Palha
Guarani	Alongada	Palha
Caiapó	Meio alongada	Palha
Douradão	Alongada	Dourada
Confiança	Alongada	Dourada
IAC 202	Alongada	Palha

Em relação a cor das glumelas foi observada a cor dourada para as cultivares Douradão e Confiança; as demais cultivares foram classificadas como palha (Tabela 5), sendo essa característica de fácil observação visual, fato este também mencionado por Menezes & Romero (1996).

A caracterização morfológica realizada até o estágio de antese foi pouco eficiente, sendo o número de marcadores polimórficos encontrado considerado baixo. Os marcadores mais valorosos observados nessa pesquisa ocorrem após esse período.

Destacamos, a partir dos resultados obtidos, que as características de pubescência do limbo, dias para emissão da panícula, tipo de panícula, exerceção das panículas, presença de aristas, pubescência nas glumelas, cor do ápulo e

características das sementes são as que fornecem as melhores características diferenciais entre as cultivares. Porém, é importante salientar que a diferenciação ocorre com a análise, não de apenas uma, mas de um conjunto de características. Além disso, a comparação deve ocorrer entre cultivares desenvolvidas sob o mesmo ambiente.

3.2 Experimento safra 2001/2002

Os resultados médios de acertos e erros obtidos durante a certificação da pureza varietal no experimento na safra 2001/2002 estão apresentados na Tabela 6.

Na avaliação realizada aos 40 dias após a semeadura, a maior percentagem de acertos, 86% e a menor percentagem de erros, 3,8%, foram observadas para a cultivar Guarani. Essa alta percentagem de acerto foi obtida pela presença de acentuada pubescência no limbo desde os estádios iniciais de desenvolvimento das plantas da cultivar Guarani. Para as demais cultivares foi observado baixa percentagem de acerto, devido à grande similaridade morfológica existente entre as plantas das cultivares avaliadas. Assim, com exceção da cultivar Guarani, nenhuma outra apresentou característica que a distinguisse da contaminante. O mais baixo percentual de acertos, 3,6%, ocorreu para a cultivar Canastra, para a qual a contaminante foi a cultivar Carisma.

Aos 80 dias após a semeadura, a percentagem de acerto das plantas contaminantes na cultivar Guarani foi a menor, 6,6%, assim como a maior percentagem de erro, 17,3%. Esse resultado não foi esperado, pois a pilosidade do limbo das folhas da cultivar Guarani é característica inerente à cultivar. Nessa fase, a maior percentagem de acerto, 60,7% e a menor de erro, 8,2%, foram observadas para a cultivar Carisma. Segundo os avaliadores, as características

que melhor propiciaram a diferenciação das cultivares nessa fase foram altura das plantas, cor de folha, ângulo da folha bandeira, porte da planta e estágio de desenvolvimento.

Observa-se na Tabela 7, que, com exceção da cultivar Guarani, em todas as outras cultivares ocorreu aumento da percentagem de acertos com o desenvolvimento das plantas, porém, a similaridade morfológica e a conseqüente dificuldade de distinção das contaminantes são evidenciadas nesses resultados.

Na avaliação aos 100 dias após a semeadura, com exceção das cultivares Caiapó e Carisma (Tabela 7), todas as contaminantes das outras cultivares foram diferenciadas com maior percentagem de acerto do que na avaliação anterior. Nessa fase, a maioria das cultivares encontrava-se na fase de floração, facilitando a diferenciação, pois o número de caracteres a serem observados era bem maior que em fases anteriores. Os avaliadores consideraram, nessa fase, as características da época de floração, ciclo e nas cultivares precoces, cor do ápulo, forma do grão, cor da panícula, além das características observadas nas fases anteriores. Também foi observado que, em dias com alta luminosidade, a característica de cor da folha tornava-se de difícil avaliação, o que dificultava a diferenciação das cultivares.

Para a cultivar Canastra, foi observada a maior percentagem de acerto, 64,1%, contrastando com os resultados observados na fase anterior em que a percentagem de acertos foi de 7,7%. A explicação para essa diferença está no estágio de desenvolvimento em que a cultivar se encontrava durante as avaliações. Aos 80 dias, encontravam-se no final da fase vegetativa e aos 100 dias na fase de floração, sendo diferenciada mais facilmente da sua contaminante, a cultivar Carisma. A menor percentagem de acerto ocorreu para a cultivar Caiapó, com apenas 23,1%. Atribuem-se esses resultados ao ciclo da cultivar Caiapó, que é mais tardio, estando, aos 100 dias, no estágio vegetativo,

TABELA 7. Resultados, acerto e erro, de plantas contaminantes, determinado por três avaliadores, com base em características morfológicas em diferentes épocas de avaliação. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Cultivar		Época de avaliação				
		Sementes	Dias após semeadura			
			40	80	100	120
Canastra	% acerto	94,9 ± 1,5	3,6 ± 3,6	7,7 ± 2,6	64,1 ± 19,9	86,5 ± 7,9
	% erro	1,0 ± 0,3	12,8 ± 1,7	16,3 ± 1,7	10,5 ± 4,9	3,9 ± 0,9
Primavera	% acerto	63,7 ± 39,2	5,1 ± 1,9	18,0 ± 15,8	25,7 ± 19,5	12,7 ± 10,9
	% erro	6,6 ± 5,2	15,0 ± 4,3	16,1 ± 4,6	17,2 ± 4,6	18,9 ± 7,3
Carisma	% acerto	77,7 ± 9,1*	8,0 ± 3,7	60,7 ± 13,9	48,4 ± 7,4	80,2 ± 12,8
	% erro	2,0 ± 0,4	17,3 ± 3,1	8,2 ± 2,1	11,6 ± 1,9	6,1 ± 2,0
Guarani	% acerto	86,9 ± 16,8	86,0 ± 12,8	6,6 ± 7,6	53,8 ± 24,7	78,8 ± 3,0
	% erro	1,9 ± 2,5	3,8 ± 1,6	17,3 ± 2,4	9,4 ± 6,9	7,0 ± 5,2
Caiapó	% acerto	94,3 ± 5,3	8,8 ± 3,7	54,2 ± 8,1	23,1 ± 14,9	75,3 ± 14,3
	% erro	1,5 ± 0,9	13,6 ± 2,4	8,9 ± 2,6	15,9 ± 1,5	3,3 ± 2,3
Douradão	% acerto	88,2 ± 4,6	14,4 ± 8,6	39,6 ± 12,8	47,4 ± 25,4	45,2 ± 18,2
	% erro	1,6 ± 0,4	9,6 ± 1,7	8,9 ± 3,2	7,7 ± 6,4	5,8 ± 1,0
Confiança	% acerto	81,3 ± 1,9	9,8 ± 4,0	21,8 ± 3,5	43,4 ± 6,6	66,0 ± 17,3
	% erro	3,3 ± 1,2	17,8 ± 1,3	14,7 ± 3,0	14,9 ± 3,1	5,3 ± 2,9
IAC 202	% acerto	90,5 ± 3,1	13,6 ± 6,5	26,3 ± 10,7	26,3 ± 9,4	74,8 ± 12,1
	% erro	5,1 ± 2,6	11,8 ± 1,9	12,8 ± 0,1	16,0 ± 0,9	3,4 ± 0,9

* Desvio padrão da média

assim como a contaminante, cultivar Canastra, com ciclo semelhante, o que provavelmente dificultou a diferenciação.

Aos 120 dias após a semeadura foram observadas, para a maioria das cultivares, as maiores percentagens de acerto desde a fase de germinação. A contaminante da cultivar Canastra foi a melhor identificada, com 86,5% de acerto. Estes resultados foram próximos aos encontrados em 'Carisma', 'IAC 202', 'Guarani' e 'Caiapó'. A menor percentagem de acerto foi verificada na cultivar Primavera, ocorrendo diminuição na percentagem de acerto quando comparada à avaliação aos 80 dias. Acredita-se que isso possa ser explicado pelo fato da cultivar Primavera apresentar ciclo curto, assim como a Carisma, sua contaminante. Essas cultivares, nesta fase, encontravam-se em final de ciclo, dificultando a diferenciação. Essa afirmativa foi comprovada com a análise de sementes, persistindo a mais baixa percentagem de acerto.

Os maiores níveis de acertos de contaminantes foram observados com os descritores analisados em sementes, com percentuais superiores aos detectados durante o ciclo vegetativo. Exceção foi observada para a cultivar Carismana qual, aos 120 dias foram observados 80,2% de acerto e, por ocasião da análise de sementes, foram observados 77,7% de acerto.

A maior percentagem de acerto na identificação de contaminantes em sementes ocorreu na cultivar Canastra, quando 94,9% das contaminantes foram identificadas. A menor percentagem de acertos em sementes foi observada na cultivar Primavera, quando 63,7% das contaminantes foram indicadas corretamente.

Quando analisados os dados de acerto e erro comparando todas as fases de avaliação, pode-se afirmar que os contaminantes foram melhor identificados quando analisados em sementes maduras. Nas avaliações em campo, a cultivar Guarani foi a que obteve a melhor diferenciação da sua contaminante, cv. Douradão, nas primeiras fases de desenvolvimento vegetativo. A cultivar

Primavera, em todas as fases de avaliação, pareceu ser a de mais difícil diferenciação em relação a sua contaminante, cultivar Carisma, apresentando as menores percentagens de acerto.

Com base nos resultados da Tabela 7, pode-se afirmar que para a identificação de contaminantes, com exceção da cultivar Guarani, quanto mais avançado estiver o estágio de desenvolvimento das plantas, maiores são as possibilidades de identificação de contaminantes. Até o início da antese, as cultivares são muito similares morfológicamente, o que torna a identificação de contaminantes muito difícil, sendo necessário o auxílio de testes de natureza bioquímica ou molecular. Os estádios tardios em que são observadas as características diferenciais são uma das principais desvantagens dessa classe de marcadores, pois, para a obtenção dos resultados, demandam muito tempo comparado à outros marcadores.

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados do qui-quadrado aplicado aos dados encontrados pelos avaliadores. Na análise de sementes maduras, assim como nos demais estádios de desenvolvimento, os resultados do qui-quadrado foram significativos para a cultivar Primavera.

Na avaliação realizada aos 40 dias, a exceção da cultivar Guarani, e aos 80 dias à exceção da Cultivar Carisma, para todas as outras, os resultados do qui-quadrado foram significativos. Aos 100 dias, apenas para a cultivar Canastra os resultados não mostraram significância. Aos 120 dias, ‘Douradão’, ‘Confiança’ e ‘Primavera’ apresentaram significância; para todas as outras, os desvios foram aceitos como sendo ao acaso.

É importante esclarecer que, quando ocorreu a significância dos desvios na avaliação, significou que os erros não foram ao acaso e, sim, a outras causas como, por exemplo, a ausência de características morfológicas diferenciais.

O grande número de desvios significativos observados na Tabela 8, indica que, nesses períodos, os marcadores morfológicos não foram adequados para a diferenciação das cultivares, dentro dos níveis de significância propostos.

TABELA 8. Resultados do teste qui-quadrado (χ^2) aplicados aos dados de identificação de contaminantes, em várias épocas de avaliação, obtidos por três avaliadores. UFLA, Lavras, MG, 2004.

		Época de avaliação				
Cultivar		Sementes	Dias após semeadura			
Avaliador			40	80	100	120
Canastra	1	0,03	7,5	6,59	3,33	0,49
	2	0,06	6,59	6,15	0,23	0,03
	3	0,07	7,02	6,12	0,74	0,35
	χ^2	0,16NS	21,11**	18,86**	4,30NS	0,87NS
Primavera	1	0,21	7,07	5,38	7,08	8,00
	2	0,33	7,56	7,52	2,08	2,23
	3	7,17	7,53	2,56	5,06	6,16
	χ^2	7,71*	22,16**	15,46**	14,22**	16,39**
Carisma	1	0,36	9,28	3,85	4,01	0,02
	2	0,78	8,47	1,10	2,22	0,95
	3	0,24	8,34	0,96	2,20	0,83
	χ^2	1,38NS	26,09**	5,91NS	8,43*	1,80NS
Guarani	1	0,00	0,03	9,75	6,36	0,58
	2	0,03	0,12	0,75	1,08	0,43
	3	1,82	1,22	7,52	0,99	1,17
	χ^2	1,85NS	1,37NS	18,02**	8,43*	2,18NS
Caiapó	1	0,02	6,97	3,75	5,84	0,20
	2	0,02	6,48	1,73	3,00	0,60
	3	0,52	8,29	1,51	7,83	1,86
	χ^2	0,56NS	21,74**	6,99*	16,67**	2,66NS
Douradão	1	0,11	4,39	4,30	5,77	3,40
	2	0,30	2,51	6,15	0,94	1,75
	3	0,50	4,39	2,80	0,61	1,45
	χ^2	0,91NS	11,29**	13,25**	7,32*	6,60*
Confiança	1	0,47	9,94	8,09	3,99	1,39
	2	0,74	8,54	5,50	2,39	1,80
	3	0,33	9,82	8,28	4,01	2,80
	χ^2	1,54NS	28,3**	21,87**	10,39**	5,99*
IAC 202	1	0,05	5,62	4,01	3,34	0,93
	2	0,27	3,70	3,97	5,03	0,36
	3	0,15	5,21	4,32	4,73	2,31
	χ^2	0,47NS	14,53**	12,30**	13,10**	3,60NS

** - Significativo a 1% de probabilidade; * - Significativo a 5% de probabilidade
NS - Não significativo

4 CONCLUSÕES

Os descritores morfológicos não são suficientes para a caracterização e diferenciação de cultivares de arroz de sequeiro.

As características morfológicas observadas em sementes e plantas após a antese são as mais adequadas para a caracterização e diferenciação de cultivares.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, D. C. Isozymic variation and plant breeders rights. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Part B. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 129-146.
- BRESEGHELLO, F.; STONE, L. F. **Tecnologia para arroz de terras altas**. Embrapa arroz e Feijão, 1998. 161 p.
- CHANDRARATNA, M. F. **Genetics and breeding of rice**. London: Longmans, 1964. 389 p.
- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS. **Canastra e confiaça Arroz Agulhinha para plantio em condições de sequeiro e sob pivô central**. EPAMIG-UFLA-EMBRAPA/CNPAF-UFV, 1997. Folder.
- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS - EPAMIG. **Carisma, arroz agulhinha**. [199-]. Folder.
- FERREIRA, D.F. Sisvar, Versão 4.0. Dex-UFLA,1999.
- FONSECA, J. R.; CUTRIM, V. A.; RANGEL, P. H. N. **Descritores morfo agronômicos e fenológicos de cultivares comerciais de arroz de várzeas**. Embrapa, 2002. 22p. (EMBRAPA. Documentos, 141).
- GOFF, S. A.; RICKE, D.; LAU, T. H.; PRETING, G.; WANG, R. L.; DUNN, M. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. *spp. japonica*) **Science**, Washington, v. 296, n. 5565, p. 92-100, Apr. 2002.
- GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 12. ed. Piracicaba: ESALQ/USP, 1987. 466 p.
- GRIST, D. H. **Rice** 6. ed. New York : Longman, 1986. 599 p.
- GUIDOLIN, A. F. **Caracterização de genótipos de arroz irrigado por técnicas eletroforéticas**. 1993. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GUIDOLIN, A. I.; OLIVEIRA, A. C.; TERRES, A. L.; COSTA, F. C.
Caracterização eletroforética das cultivares de arroz irrigado em uso no RS.
Lavoura Arrozeira, Porto Alegre, v. 47, n. 414, p. 3-5, maio/jun. 1994.

JENNINGS, P. R.; COFFMAN, W. R.; KAUFMAN, H. E. **Manejo del arroz**.
Cali: CIAT, 1981. 233 p.

MAEDA, J. A.; ALMEIDA, L. D. A.; JADEROSA, M.; CAMARGO, C. E. 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.

MENEZES, N. L.; ROMERO, C. M. Determinação varietal em arroz. **Pesquisa
Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 139-146, fev. 1996.

MILACH, S. C. K. , Uso de Marcadores moleculares na caracterização de
cultivares. In: BORÉM, A. et al. (Ed.). **Biossegurança, proteção de cultivares,
acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária**.
Viçosa: UFV, 1998. 182 p.

OLIVEIRA, A. C.; DERBYSHIRE, E.; CARVALHO, M. T. V.; ANDO, A.
Perfis proteômicos de variedades parentais e híbridos de arroz e sua correlação com
heterose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 313-322,
mar. 1993.

PESKE, S. T.; BARROS, A. C. S. A. , Produção de Sementes. In: PESKE, S. T.;
NEDEL, J. L.; BARROS, A. C. S. A. (Ed.). **Produção de arroz**. Pelotas:
UFPEL, 1996. p. 357-422.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na
agropecuária**. Lavras: UFLA, 2000. 472 p.

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.

ROSTA, K. Variety determination in rice (*Oryza sativa* L.). **Seed Science and
Technology**, Zurich, v. 3, n. 1, p. 161-169, 1975.

SOARES, A. A. **Cultura do arroz**. Lavras: UFLA, 2001. 111 p. (Texto
Acadêmico).

SOARES, A. A. **Genética do arroz**. Lavras: UFLA, 1997. 73 p. Apostila.

SOARES, A. A.; CARVALHO, J. G.; CARVALHO, G. J.; FONSECA, J. R.; OLIVEIRA, P. S. R. Diferenças varietais na absorção, translocação e exportação de nitrogênio em arroz (*Oryza sativa* L.) de sequeiro. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 18, n. 3, p. 248-257, jul./set. 1994.

SOARES, A. A.; ROMERO, C. M. Progresso genético obtido pelo melhoramento do arroz de sequeiro em 21 anos de pesquisa em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, V. 34, n. 3, p. 415-424, mar. 1999.

VIEIRA, N. R. A. Pesquisa em sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 3, n. 3, p. 53-57, 1981.

CAPITULO 3

CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA DE CULTIVARES DE ARROZ DE SEQUEIRO

RESUMO

BONOW, Sandro. **Caracterização isoenzimática de cultivares de arroz de sequeiro**. 2004. Cap. 3, 26 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A caracterização e a discriminação de cultivares são realizadas com mais facilidade quando, além de caracteres morfológicos, são usados marcadores isoenzimáticos que fornecem ampla informação genética para diversas aplicações. O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura e no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras e no Laboratório de Eletroforese da Embrapa Clima Temperado. O objetivo foi caracterizar por meio de isoenzimas, as seguintes cultivares de arroz de sequeiro: ‘Confiança’, ‘IAC 202’, ‘Carisma’, ‘Primavera’, ‘Guarani’, ‘Douradão’, ‘Canastra’ e ‘Caiapó’. Além disso, foi objetivo verificar a estabilidade dos sistemas isoenzimáticos na presença de fungos e em sementes com diferentes níveis de qualidade. Foram analisadas isoenzimas de sementes e folhas de plântulas, por meio da eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida. Foi realizado um “screening” a partir de vinte sistemas isoenzimáticos, sendo que os de esterase, 6-fosfogluconato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e leucina aminopeptidase foram polimórficos sendo utilizados na caracterização dos genótipos. A análise de agrupamento das cultivares foi realizada utilizando o coeficiente de Jaccard e o método da média aritmética não ponderada

* Comitê Orientador: Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho(Orientadora), Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira,– UFLA, Dr. Ben Vosman PRI/WUR e Dra.. Eva Choer - EMBRAPA Dr. Antonio Alves Soares – UFLA, Dr. Antonio V. Rodrigues – EPAMIG.

(UPGMA). Os genótipos foram separados em três grupos de acordo com a similaridade apresentada. A análise de isoenzimas de sementes e folhas de plântulas permite a caracterização das cultivares, diferenciando todas, com exceção das cultivares Carisma, IAC 202 e Guarani. Existe elevada similaridade entre os genótipos estudados com exceção da cultivar Confiança que mostrou baixa similaridade isoenzimática em relação às demais cultivares. Padrões de isoenzimas de esterase são influenciados pela presença de fungos nas sementes e padrões isoenzimáticos de 6-fosfogluconato desidrogenase podem ser alterados em algumas cultivares após períodos prolongados de armazenamento das sementes.

ABSTRACT

BONOW, Sandro. **Isoenzimatic characterization of upland rice cultivars**. 2004. Cap. 3, 26 p. Thesis (Doctorate in Plant Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The characterization and discrimination of cultivars are done easily when not just morphological markers are used, but also electrophoretic methods. Isoenzimatic markers normally provide genetic informations used in several purposes. This work had the objective to characterize, using isoenzymes, the following rice cultivars: Confiança, IAC 202, Carisma, Primavera, Guarani, Douradão, Canastra and Caiapó. Another objective was study the stability of the isoenzymatic systems when fungus are present in the seeds and in seeds with different physiological quality. The isoenzymes analyzed were from seeds and seedling leaf tissue. Horizontal polyacrilamide gel electrophoresis was used to analyze the isoenzymes. The analysis were done using twenty isoenzymatic systems, but only the polymorphic systems were used in the cultivar characterization. The polymorphic systems were esterase, 6 fosfogluconate dehydrogenase, isocitrato desydrogenase and leucine aminopeptidase. The genetic similarity was estimated using the Jaccard coefficient and the cluster analyses was set up using the unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA), through NTSYS v. 1.7. The isoenzymes analysis allowed characterize the cultivars and differentiate all genotypes, excluding Carisma, IAC 202 and Guarani. There is high similarity among the cultivars exceting the cultivar Confiança, which has high dissimilarity in relation to the others. The patterns of bands of esterase are influenced by the fungus in the seeds and the 6 fosfogluconate dehydrogenase can be altered in some cultivars with diferent physiological quality.

* Guidance Committee: Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho (Major Professor), Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira, – UFLA, Dr. Ben Vosman PRI/WUR, Dra. Eva Choer – EMBRAPA, Dr. Antonio Alves Soares – UFLA, Dr. Antonio V. Rodrigues – EPAMIG.

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos principais produtos agrícolas no mundo, sendo cultivado, anualmente, em mais de 150 milhões de hectares, com grande destaque para o continente asiático, onde encontram-se os maiores produtores. Na América Latina, o Brasil é o maior produtor, sendo que na safra de 2001/2002, produziu cerca de 11 milhões de toneladas, em uma área de mais de três milhões de hectares (Cepea, 2003; Agriannual, 2003).

A alta produtividade observada no Brasil deve-se à alta tecnologia utilizada pelos agricultores. Entre os insumos utilizados, a semente é extremamente importante, pois o potencial máximo da produtividade agrícola é definido pelo genótipo das mesmas, de modo que todos os demais recursos são explorados em função deste. Depreende-se, então, que a semente de alta qualidade propicia um melhor estande no campo, possibilitando melhorar o aproveitamento de fertilizantes e reduzir problemas causados por invasoras. Essas características contribuem para o aumento da produtividade, fator que pode determinar a sustentabilidade da agricultura (IRGA, 1995)

Em busca de sementes de alta qualidade, as empresas produtoras procuram monitorar todas as etapas do processo produtivo visando um produto com alta qualidade genética, física, fisiológica e sanitária. Desses atributos, destaca-se a pureza genética, uma vez que essa característica permite a expressão do potencial produtivo e da adaptação da cultivar. A identificação de cultivares é um procedimento utilizado nos sistemas de produção de sementes com a finalidade de checar e garantir ao produtor e ao agricultor, lotes com elevada pureza genética. Para tanto, é fundamental que as cultivares sejam identificadas pelas suas características particulares (Peske e Barros, 1998).

Além do aspecto relacionado ao controle de qualidade de sementes, o

interesse pela caracterização de cultivares tem aumentado significativamente nas últimas décadas, sendo, o motivo principal a crescente necessidade de proteção de cultivares comerciais em mercados econômicos cada vez mais competitivos (Milach, 1998). Para a proteção de uma determinada cultivar, de acordo com a Lei de Proteção de Cultivares, hoje em vigor no Brasil, é necessário que a mesma seja distinta das demais cultivares em uso e com características homogêneas e estáveis, ou seja, a cultivar deverá passar pelo teste de D.H.E., distinção, homeneidade e estabilidade (Neto, 1997).

Tradicionalmente, a caracterização de cultivares tem sido realizada com base em caracteres morfológicos, embora esses demandem tempo, espaço para a sua avaliação e podem ser influenciados pelo ambiente. Além disso, a grande similaridade entre as cultivares em uso, proporcionada pela estreita base genética existente entre os genótipos restringe ainda mais a utilização de características morfológicas (Guidolin et al., 1994).

A discriminação de variedades é realizada com mais precisão quando, além de caracteres morfológicos, são usados métodos eletroforéticos (ISTA, 1992). Na caracterização de genótipos, a descoberta de múltiplas formas moleculares das enzimas propiciou amplas perspectivas de utilização, tais como a detecção de diferenças inter e intraespecíficas (Alfenas, 1998). Apesar do uso de isoenzimas ser considerado de grande sucesso em várias espécies, algumas precauções precisam ser tomadas, principalmente em relação à presença de fungos e diferenças nos níveis de qualidade das sementes a serem analisadas e comparadas.

Em vista do exposto, objetivou-se nesta pesquisa verificar a eficiência dos marcadores isoenzimáticos, como descritores, visando oferecer suporte à Lei de Proteção de Cultivares e às empresas produtoras de sementes para a certificação da pureza genética. Além disso, foi objetivo verificar a estabilidade

dos sistemas isoenzimáticos em sementes com diferentes níveis de qualidade e na presença de fungos nas sementes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura e no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, e no Laboratório de Eletroforese da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

Foram analisadas isoenzimas de sementes e folhas de plântulas das cultivares de arroz de sequeiro: ‘Confiança’, ‘IAC 202’, ‘Carisma’, ‘Primavera’, ‘Guarani’, ‘Douradão’, ‘Canastra’ e ‘Caiapó’, provenientes do Programa de Melhoramento Genético de Arroz da EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), cujas genealogias estão apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1. Genealogia das oito cultivares de arroz de sequeiro analisadas. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Cultivar	Genealogia
Carisma	CT7244-9-1-5-3/CT6196-33-11-1-3 x CT6946-2-5-3-3-2-M
IAC 202	Lemont x IAC 25
Confiança	IAC 164 x Rio Verde (IRAT 216)
Primavera	IRAT 10 x LS 85 - 158
Guarani	IAC 25 x 63-68
Douradão	IAC 25 x 63-83
Canastra	Tox939-107-2-101-1B/(Colômbia 1 x M 312 A)// Tox1780-2-1-1P-4
Caiapó	IRAT13/Beira Campo/CNA x 104-B-18Py-2B/Pérola

Para a caracterização das cultivares foram analisadas três repetições em “bulk” de cada cultivar para cada um dos sistemas isoenzimáticos. Cada “bulk” foi formado por 50 sementes ou com tecidos do terço médio de folhas de 50 plântulas. As amostras de folhas foram extraídas de plântulas com quatorze dias após a semeadura em rolos de papel, a qual foi realizada de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Esse procedimento foi realizado para sementes tratadas e não tratadas e plântulas oriundas de sementes tratadas e não tratadas com fungicida. Os fungicidas utilizados no tratamento de sementes foram thiram e iprodione, em mistura comercial denominada Rovrin. O fungicida foi utilizado na dosagem de 250g para 100 kg de sementes.

Para a caracterização, inicialmente foi realizada uma pré-avaliação a partir de dezoito sistemas isoenzimáticos além de proteína total, sendo analisadas apenas uma amostra por cultivar. Os sistemas avaliados foram os de esterase (EST), fosfogluco isomerase (PGI), 6-fosfogluconato desidrogenase (PGDH), isocitrato desidrogenase (IDH), xikimato desidrogenase (SKDH), glucose 6-fosfodesidrogenase (G-6-PDH), fosfoglucomutase (PGM), xantina desidrogenase (XDH), fosfatase ácida (ACP), fosfatase alcalina (AKP), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), leucina aminopeptidase (LAP), malato desidrogenase (MDH), álcool desidrogenase (ADH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (PO) e glutamato desidrogenase (GTDH). Para todos os sistemas isoenzimáticos estudados foi empregado eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida, de acordo com Shields et al. (1983) e Vallejos (1983).

Foram selecionados os sistemas isoenzimáticos de esterase, 6-fosfogluconato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e leucina aminopeptidase os quais apresentaram polimorfismo entre as cultivares.

A análise de proteínas, realizada segundo recomendação de Alfenas (1998), apresentou o mesmo padrão de bandas para todas as cultivares.

Nas análises de isocitrato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase foram empregados os sistemas de tampões descritos por Schields et al. (1983) e géis de poliacrilamida a 5%. Para esterase, o sistema de tampões descrito por Nichols & Ruddle (1973), com modificação de pH para 6,5, e géis de poliacrilamida a 5%. Na análise de isoenzimas de leucina aminopeptidase foi utilizado o sistema de tampões descrito por Scandalios (1969) e géis de poliacrilamida na concentração de 6%.

Os extratos foram obtidos pela maceração das amostras em tampão, conforme descrito por Nichols e Ruddle (1973), na proporção de 1:2, acrescidos de 0,15% de 2-mercaptoetanol. A extração foi realizada em cadinhos de porcelana mantidos sobre gelo. Papel filtro (Whatmann 3MM), de 2x4 mm, foi embebido na amostra e aplicado no gel em orifícios feitos com o auxílio de um “pente” de aço inoxidável.

As migrações eletroforéticas foram efetuadas em câmara fria com temperatura aproximada de 4°C. A diferença de potencial foi mantida a 10 V/cm, até que a linha, formado pelo azul de bromofenol, atingisse 9 cm do ponto de aplicação.

Na revelação dos géis foram utilizadas as soluções de coloração descritas por Scandalios (1969) para esterase e leucina aminopeptidase e Vallejos (1983) para 6-fosfogluconato desidrogenase e isocitrato desidrogenase. A fixação das bandas 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 cultivar controle, Carisma, tomada como referência.

Os padrões de bandas obtidos foram avaliados quanto a coerência de polimorfismo sendo preparada uma matriz de dados binários, tendo sido atribuído valor “0” para ausência da banda e “1” presença. Para a estimativa da

similaridade genética entre as cultivares, foi utilizado o coeficiente de Jaccard, pela similaridade de dados qualitativos (SIMQUAL) e para a análise de agrupamento, o método da média aritmética não ponderada (UPGMA), pelo 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”, Versão 2.02 (NTSYSpc), 1998.

Após a caracterização das cultivares, a estabilidade das isoenzimas foi avaliada em sementes com diferentes níveis de qualidade e na presença de fungos. Para a obtenção das sementes com diferentes níveis de qualidade foram empregadas diferentes condições de armazenamento. As sementes foram armazenadas durante 24 meses em sacos de papel, em temperatura ambiente, na cidade de Lavras, MG e em câmara fria sob a temperatura de 8°C e umidade relativa de 55%. Foram realizadas análises de germinação, antes do armazenamento e também após o armazenamento (Tabela 2).

TABELA 2. Percentagem de germinação de sementes armazenadas por 24 meses em câmara fria e sob condições não controladas de temperatura e umidade relativa. UFLA, Lavras, MG, 2004.

	Antes do armazenamento	Armazenada em câmara fria	Armazenamento sob temperatura ambiente
Carisma	96	93	73
IAC 202	90	88	80
Confiança	90	86	83
Primavera	92	90	81
Guarani	91	87	76
Douradão	94	90	90
Canastra	91	86	80
Caiapó	96	94	93

Para esse estudo foram selecionadas sementes das cultivares Carisma e Guarani por terem apresentado a mais baixa qualidade fisiológica.

Nessa avaliação foram avaliadas 100 sementes individuais, de cada cultivar selecionada, para cada um dos sistemas isoenzimáticos, utilizados para caracterização. Além disso, para a cultivar que apresentou uma ou mais sementes com padrão atípico em um determinado sistema isoenzimático, foram analisadas mais 50 sementes individuais, das que foram armazenadas em câmara fria. Essa análise foi realizada para comprovar que os padrões atípicos tiveram origem durante o armazenamento sob temperatura ambiente.

A análise da estabilidade das isoenzimas nas sementes contaminadas com fungos foi realizada a partir de sementes oriundas de um campo de produção estabelecido na área experimental da EPAMIG, em Lavras, MG. Foram selecionadas as cultivares Douradão e Confiança, por apresentarem a maior quantidade visual de sintomas. Sementes dessas cultivares foram submetidas ao teste blotter para que fosse determinada a presença dos fungos segundo recomendações de Machado (1988). Na Tabela 3 estão apresentados os resultados obtidos no teste de sanidade.

Foram utilizadas 100 sementes individuais com sintomas, não tratadas, de cada cultivar selecionada, para cada sistema isoenzimático em estudo. Para a cultivar que apresentasse interferência de fungos nos padrões de bandas, foram analisadas mais 50 sementes individuais da mesma cultivar, produzidas no mesmo campo de produção, sem sintomas, com menor contaminação, comprovada pelo teste de sanidade (Tabela 3).

TABELA 3. Resultados obtidos no teste de sanidade de semente de arroz. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Fungos	Tratada		Não tratada	
	C/ sintomas %	S/ sintomas %	C/ sintomas %	S/ sintomas %
<i>Dreschelera</i>	1	0	12	2
<i>Phoma</i>	30	0	58	18
<i>Alternaria alternata</i>	0	0	3	0
<i>Fusarium</i>	0	0	6	18
<i>Aspergillus</i>	1	0	1	0
<i>Pyricularia</i>	5	0	21	0

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com exceção dos padrões eletroforéticos obtidos nos sistemas isoenzimáticos de esterase, isocitrato desidrogenase, leucina aminopeptidase e 6-fosfogluconato desidrogenase, os demais sistemas enzimáticos não foram utilizados como marcadores para a caracterização das cultivares, pois não proporcionaram polimorfismo entre os genótipos estudados.

Na análise de isoenzimas de IDH em sementes, assim como em folhas de plântulas, os padrões de bandas observados (Figuras 1 e 2) permitiram a separação das cultivares em dois grupos. Um grupo, com as cultivares Carisma, IAC 202, Primavera, Guarani, Douradão e Caiapó, com padrão de bandas A e o outro grupo, padrão B, com as cultivares Confiança e Canastra (Tabelas 4 e 5). Durante a análise do zimograma, foram observadas três bandas, tanto no padrão A quanto no B. Na análise de plântulas foram observadas no padrão A, quatro bandas e duas no padrão B. Esses resultados reforçam os encontrados por

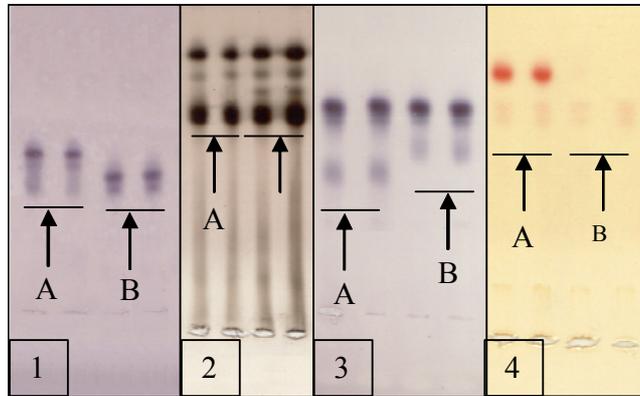


FIGURA 1. Exemplos dos padrões eletroforéticos de isoenzimas de sementes de arroz: 1 – IDH; 2 – EST; 3 – 6-PGD; 4 – LAP. EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 2004.

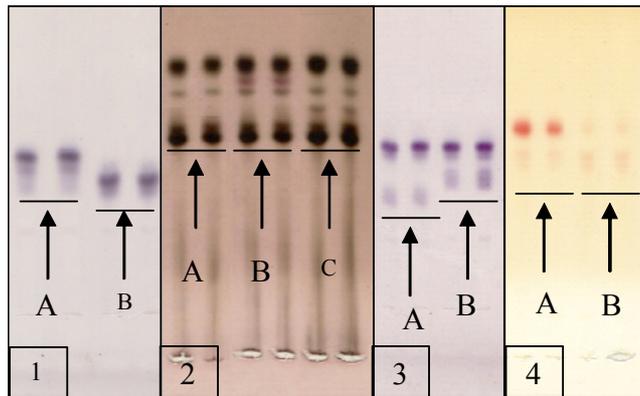


FIGURA 2. Exemplos dos padrões eletroforéticos de isoenzimas de plântulas de arroz: 1 – IDH; 2 – EST; 3 – 6-PGD; 4 – LAP. EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 2004.

TABELA 4. Mobilidades relativas das bandas de isoenzimas avaliadas em sementes de oito cultivares de arroz. EMBRAPA-CPACT, Pelotas-RS, 2004.

Enzima/ padrão	Mobilidades relativas	Cultivares
IDH/A	0,77; 0,91; 1,00	Carisma, IAC 202, Primavera, Guarani, Douradão, Caiapó
IDH/B	0,94; 1,00; 1,14	Confiança, Canastra
EST/A	0,87; 0,96; 1,00	Carisma, IAC 202, Confiança, Primavera, Guarani
EST/B	0,87; 0,93; 0,96; 1,00	Douradão, Canastra, Caiapó
LAP/A	0,94; 1,00; 1,14	Carisma, IAC 202, Confiança, Primavera, Guarani, Douradão, Canastra
LAP/B	0,94; 1,00	Caiapó
6PGD/A	0,76; 0,81; 0,85; 0,94; 1,00	Carisma, IAC 202, Primavera, Guarani, Douradão, Canastra, Caiapó
6PGD/B	0,67; 0,71; 0,76; 0,94; 1,00	Confiança

TABELA 5. Mobilidades relativas das bandas de isoenzimas avaliadas em folhas de plântulas de oito cultivares de arroz. EMBRAPA-CPACT, Pelotas-RS, 2004.

Enzima/ padrão	Mobilidades relativas	Cultivares
IDH/A	0,77; 0,82; 0,93; 1,00	Carisma, IAC 202, Primavera, Guarani, Douradão, Caiapó
IDH/B	0,77; 0,86	Confiança, Canastra
EST/A	0,75; 0,79; 0,91; 1,00	Carisma, IAC 202, Confiança, Guarani
EST/B	0,75; 0,79; 0,91; 0,94; 1,00	Primavera
EST/C	0,75; 0,79; 0,86; 0,91; 1,00	Douradão, Canastra, Caiapó
6PGD/A	0,75; 0,80; 0,84; 0,93; 1,00	Carisma, IAC 202, Primavera, Guarani, Douradão, Canastra, Caiapó
6PGD/B	0,64; 0,68; 0,72; 0,93; 1,00	Confiança
LAP/A	0,94; 1,00; 1,14	Carisma, IAC 202, Confiança, Primavera, Guarani, Douradão, Canastra
LAP/B	0,94; 1,00	Caiapó

Augustin et al. (1997), quando, analisando treze cultivares de arroz utilizando isocitrato desidrogenase, também observaram dois padrões de bandas na análise de sementes. Porém, Glaszmann (1987) na análise de isoenzimas de IDH juntamente com mais sete sistemas isoenzimáticos em 1.688 variedades asiáticas de arroz, observaram seis padrões de bandas. Esse autor recomenda a utilização dessas isoenzimas como uma excelente ferramenta na distinção de cultivares.

Quando foram analisadas isoenzimas de esterase em sementes, foram observados dois padrões de bandas (Figura 1): padrão A com três bandas nas cultivares Carisma, IAC 202, Confiança, Primavera e Guarani e o padrão B, com quatro bandas, nas cultivares Douradão, Canastra e Caiapó (Tabela 4). Na análise de esterases em folhas de plântulas foram observados três padrões (Figura 2); padrão A nas cultivares Carisma, IAC 202, Confiança e Guarani, com quatro bandas; padrão B, com cinco bandas, na cultivar Primavera e o padrão C, com cinco bandas (Tabela 5), nas cultivares Douradão, Canastra e Caiapó. Estes resultados consolidam os encontrados por Wu et al. (1997) que, ao analisarem isoenzimas de esterase em 848 acessos de arroz, concluíram que a maioria deles apresentava de duas a quatro bandas eletroforéticas. Segundo Endo e Morishima (1983), até o início de década de 1980, este sistema isoenzimático era o mais estudado em arroz.

Por meio dos resultados observados para isoenzimas de esterase ressalta-se a importância da análise de várias partes da planta, além de diferentes estádios, como sementes e plântulas. Segundo Aung e McDonald (1995), algumas isoenzimas de esterase que não estão presentes em sementes secas podem ser sintetizadas no início do processo de germinação, durante ou após a embebição. Essa afirmativa pode explicar o aumento do número de bandas de esterase em plântulas quando comparado aos padrões observados em sementes. A importância da análise de várias partes da planta foi ressaltada por Hen et al. (1994) quando analisaram isoenzimas de esterase em seis partes de plantas de 2.489 acessos de arroz e concluíram que as mesmas podem ser utilizadas para identificação e classificação de genótipos de arroz.

Os padrões observados para as isoenzimas de LAP, tanto em sementes como em plântulas, permitiram a separação da cultivar Caiapó apresentando o padrão B, com duas bandas, tendo as demais cultivares apresentado um único padrão, A, com três bandas. A cultivar Caiapó foi diferenciada das demais pela

banda com mobilidade relativa 1,14, padrão B (Tabelas 4 e 5), que apresentou atividade restrita em algumas cultivares, sendo por vezes totalmente ausente, essa banda foi considerada neste estudo.

Quanto à similaridade entre as cultivares, com base na análise de sementes, foram observados coeficientes máximos de 1,00 entre as cultivares Carisma, IAC 202, Primavera e Guarani, e mínimos entre as cultivares Caiapó e Confiança, com coeficiente 0,39 (Tabela 6). A análise de agrupamento baseada na similaridade das cultivares, permitiu classificar os genótipos em três grupos: o primeiro com dois subgrupos: A) ‘Carisma’, ‘IAC 202’, ‘Primavera’ e ‘Guarani’; B) ‘Douradão’ e ‘Caiapó’; o segundo com ‘Canastra’ e o terceiro com ‘Confiança’. (Figura 3).

Quando analisadas as isoenzimas de plântulas, os coeficientes que expressaram maior similaridade foram encontrados entre as cultivares Carisma, IAC 202 e Guarani com coeficiente 1,00, ou seja, 100% das bandas analisadas similares (Tabela 7). A menor similaridade, coeficiente 0,43, foi também observada entre as cultivares Caiapó e Confiança. Na análise de agrupamento foram observados resultados similares aos encontrados em sementes (Figura 4).

Pela análise conjunta dos resultados obtidos em sementes e plântulas foi observado coeficiente 1,00, entre as cultivares Carisma, IAC 202 e Guarani. A menor similaridade encontrada, 0,41, ocorreu entre as cultivares Confiança e Caiapó (Tabela 8). A análise de agrupamento permitiu a mesma classificação obtida em dados obtidos em sementes e plântulas, com três grupos: o primeiro com dois subgrupos: A) ‘Carisma’, ‘IAC 202’, ‘Guarani’ e ‘Primavera’; B) ‘Douradão’ e ‘Caiapó’. A cultivar Canastra foi individualizada no segundo grupo e Confiança no terceiro grupo (Figura 5).

TABELA 6. Similaridade genética entre oito cultivares de arroz de sequeiro, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise de isoenzimas em sementes. EMBRAPA-CPACT, Pelotas-RS, 2004.

	Carisma	IAC 202	Confiança	Primavera	Guarani	Douradão	Canastra	Caiapó
Carisma	1,00							
IAC 202	1,00	1,00						
Confiança	0,47	0,47	1,00					
Primavera	1,00	1,00	0,47	1,00				
Guarani	1,00	1,00	0,47	1,00	1,00			
Douradão	0,93	0,93	0,44	0,93	0,93	1,00		
Canastra	0,73	0,73	0,56	0,73	0,73	0,80	1,00	
Caiapó	0,86	0,86	0,39	0,86	0,86	0,93	0,73	1,00

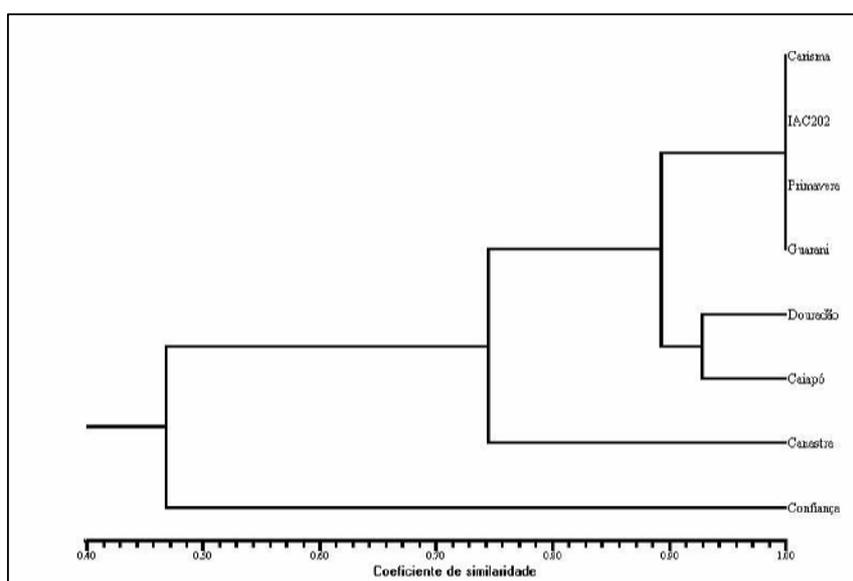


FIGURA 3. Dendrograma de oito cultivares de arroz, baseado na análise de isoenzimas em sementes. EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 2004.

TABELA 7. Similaridade genética entre oito cultivares de arroz de sequeiro, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise de isoenzimas em plântulas. EMBRAPA-CPACT, Pelotas-RS, 2004.

	Carisma	IAC 202	Confiança	Primavera	Guarani	Douradão	Canastra	Caiapó
Carisma	1,00							
IAC 202	1,00	1,00						
Confiança	0,50	0,50	1,00					
Primavera	0,94	0,94	0,48	1,00				
Guarani	1,00	1,00	0,50	0,94	1,00			
Douradão	0,94	0,94	0,48	0,89	0,94	1,00		
Canastra	0,72	0,72	0,61	0,68	0,72	0,78	1,00	
Caiapó	0,88	0,88	0,43	0,83	0,88	0,94	0,72	1,00

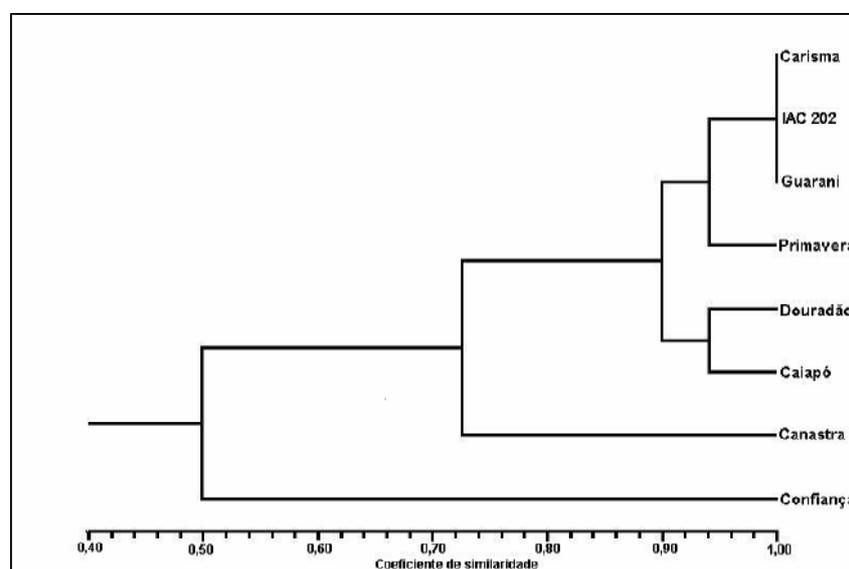


FIGURA 4. Dendrograma de oito cultivares de arroz de sequeiro, baseado na análise de isoenzimas de folhas de plântulas. EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 2004.

TABELA 8. Similaridade genética entre oito cultivares de arroz de sequeiro, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise de isoenzimas em sementes e plântulas. EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 2004.

	Carisma	IAC 202	Confiança	Primavera	Guarani	Douradão	Canastra	Caiapó
Carisma	1,00							
IAC 202	1,00	1,00						
Confiança	0,49	0,49	1,00					
Primavera	0,97	0,97	0,47	1,00				
Guarani	1,00	1,00	0,49	0,97	1,00			
Douradão	0,94	0,94	0,46	0,91	0,94	1,00		
Canastra	0,73	0,73	0,59	0,71	0,73	0,79	1,00	
Caiapó	0,87	0,87	0,41	0,84	0,87	0,94	0,73	1,00

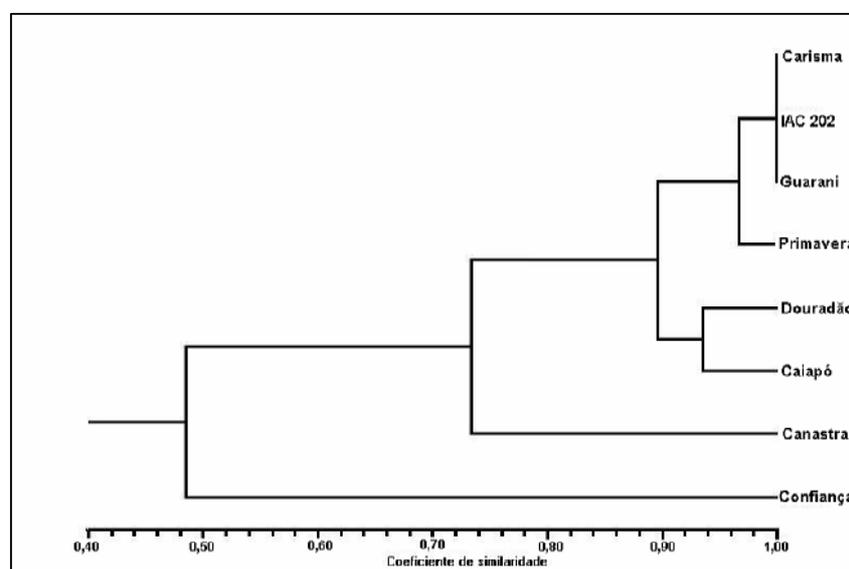


FIGURA 5 Dendrograma de oito cultivares de arroz de sequeiro, baseado na análise de isoenzimas de sementes e folhas de plântulas. EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 2004.

Essa análise conjunta dos dados permitiu a diferenciação da maioria das cultivares avaliadas, com exceção das cultivares Carisma, IAC 202 e Guarani, que não mostraram diferenças entre si quanto aos parâmetros analisados. As cultivares Confiança e Canastra foram as que apresentaram maior dissimilaridade em relação às demais (Figura 5).

Ao analisar a genealogia das cultivares IAC 202, Guarani e Douradão, as quais possuem um parental, IAC 25 em comum, observa-se que essas estão em um mesmo grupo. Quando esse grupo foi dividido em subgrupos, as cultivares IAC 202 e Guarani ficaram em um subgrupo diferente da cultivar Douradão.

Quanto à estabilidade das isoenzimas em relação à presença de fungos nas sementes, foram observadas alterações nos padrões de bandas de esterase para as cultivares Confiança e Douradão. Em isocitrato desidrogenase, 6-fosfogluconato desidrogenase e liase aminopeptidase, os padrões isoenzimáticos não sofreram alteração na presença de fungos (Figura 6).

A influência desses microrganismos manifestou-se nas isoenzimas de esterase de maneira que um grande número de bandas não observadas em sementes livres de patógenos foi observado em sementes contaminadas.

Porém, a presença das referidas bandas não influenciou na interpretação dos géis quanto ao polimorfismo que diferenciou as cultivares. Este fato deve-se as bandas oriundas dos fungos estarem presentes no gel em regiões distintas das bandas que caracterizam as cultivares.

Esses resultados vão ao encontro das afirmações descritas por Vieira (1996), quando destaca que isoenzimas podem ser valiosos marcadores bioquímicos em controle de qualidade de sementes, porém, é importante ter-se cautela na escolha dos sistemas isoenzimáticos, afirmando que, entre outras, isoenzimas de esterase apresentam atividade para os fungos de armazenamento *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Assim, estas isoenzimas podem ter os zimogramas alterados em função da presença de microrganismos.

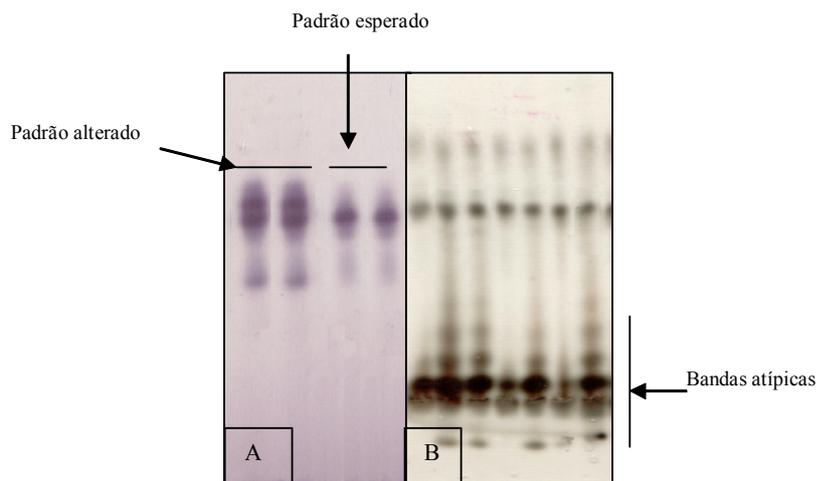


FIGURA 6. Exemplos de padrões alterados e esperados (A) em isoenzimas de 6-PGD submetidas ao armazenamento e de esterase influenciados pela presença de fungos em sementes (B).

Quando analisadas mais 50 sementes individuais oriundas da mesma lavoura e mesmo lote, porém, sem sintomas, estas não apresentaram nenhuma semente com padrão atípico para esterase.

Quando analisados os padrões isoenzimáticos em sementes das cultivares Carisma e Guarani, as quais apresentavam baixa germinação, não foram observadas diferenças nesses quando comparadas aos das sementes não armazenadas. Porém, para a cultivar Guarani foi observado padrão de bandas não esperado de 6-PGD, em duas amostras. Esses padrões não esperados podem ser atribuídos a várias causas, porém, a principal hipótese é de que essa alteração se deve ao nível de qualidade das sementes. A enzima 6-PGD atua na

degradação do amido (Michal, 1992), ou seja no consumo de reservas da semente. Dessa maneira, essa alteração pode ser explicada pelo aumento desse consumo causado pelas condições de armazenamento, sendo que, para isso, ocorreu a síntese dessa nova isoenzima de 6-PGD. Essa afirmativa pode ser justificada pelo fato de que quando analisadas as outras cinquenta sementes individuais da mesma cultivar, porém utilizando sementes armazenadas em câmara fria, elas apresentaram o padrão esperado para a cultivar. Essa hipótese reforça os resultados encontrados por Chauhan et al. (1985) que, trabalhando com sementes de soja, concluíram que o número de bandas aumentou de acordo com o período de envelhecimento em que as sementes foram submetidas. Esses autores também ressaltaram que padrões de bandas de vários sistemas isoenzimáticos são alterados durante o envelhecimento e que esses podem ser utilizados para checar a identidade em lotes de sementes, porém apropriados cuidados devem ser tomados na escolha do sistema enzimático analisado.

Na análise dos padrões observados em sementes tratadas, esses não diferiram dos observados em sementes não tratadas, considerando-se desta maneira, que as isoenzimas analisadas são estáveis na presença dos fungicidas thiram e iprodione. Resultados esses que contrariam os encontrados por Chauhan et al. (1985), quando concluíram em sementes de soja e cevada, que a presença do fungicida thiran interfere no metabolismo das sementes, causando alteração no padrão de bandas de esterase.

A partir dos resultados obtidos, embora a não distinção de todos os genótipos em estudo, pode-se afirmar que a análise de isoenzimas é eficiente, rápida e de fácil execução na caracterização e diferenciação de cultivares de arroz. Porém, como observado, em alguns sistemas isoenzimáticos deve-se tomar alguns cuidados quanto a sua estabilidade desses.

4 CONCLUSÕES

A análise de isoenzimas de sementes e folhas de plântulas permite a caracterização e a diferenciação das cultivares estudadas, com exceção das cultivares Carisma, IAC 202 e Guarani.

Padrões de isoenzimas de esterase são influenciados pela presença de fungos nas sementes.

Isoenzimas de 6-fosfogluconato desidrogenase podem ser alteradas em função do nível de qualidade das sementes.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 2003. São Paulo: FNP. Consultoria e Comércio, 2003. p. 219-227.

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.

AUNG, U. T.; MCDONALD, M. B. Changes in esterase activity associated peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed deterioration. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, n. 1, p. 101-111, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Divisão de Laboratório Vegetal. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 1992. 365 p.

CEPEA. **Cadeia industrial do arroz**. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br>>. Acesso em: 05 jun. 2003.

CHAUHAN, K. P. S.; GOPINATHAN, M. C.; BABU, C. R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**, n. 13, p. 629-641, 1985.

CRISCI, J. V.; ARMENGOL, M. F. L. **Introducción a la teoría y practica de la taxonomia numerica**. Washington: Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1983. 132 p.

ENDO, T.; MORISHIMA, H. Rice. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding: Part B**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 129-146.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

GLASZMANN, J. C. Isozymes and classification of Asian rice varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, NewYork, v. 74, n. 1, p. 21-30, 1987.

GUIDOLIN, A. F.; OLIVEIRA, A. C.; TERRES, A. L.; COSTA, F. C. Caracterização eletroforética das cultivares de arroz irrigado em uso no RS. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v. 47, n. 414, p. 3-5, maio/jun. 1994.

HEN, F.; WANG, J. I.; JIANG, C. Analysis of the bands and zymograms of esterase isozymes in different organs of rice. **Journal of Fujian Agricultural University**, Fujian, v. 23, n. 3, p. 262-265, 1994.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA. **Handbook of variety testing**. Zurich, 1992. 44 p.

IRGA, Estação Experimental do Arroz (Cachoeirinha, RS). In: REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 21., 1995, Porto Alegre. 88 p.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 107 p.

MICHAL, G. Biochemical pathways. **Roche Molecular Biochemicals**, 1992.

MILACH, S. C. K. , Uso de Marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: BORÉM, A. et al. (Ed.). **Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária**. Viçosa: UFV, 1998. 182 p.

NETO, J. A. Z. Proteção de cultivares. Sementes de arroz. **Boletim ACAPSA**, v. 1, n. 1, 1997.

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** , New York, v. 21, n. 12, p. 1066-1081, 1973.

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

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: part A**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 443-468.

VALLEJOS, C. E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozyme in plant genetics and breeding: part A**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 469-515.

WU, X. M.; CHEN, C. B.; LI, D. Y. **Esterase isozymes in the wild rices of Guangxi**. China. Disponivel em:
<<http://www.be.nalusda.gov:8000/otherdocs/rgn/rgn3/V3I10.html>>. Acesso em:
21 fev. 1997.

CAPÍTULO 4

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES EM E PRÓXIMOS A GENES, VISANDO À CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE ARROZ

RESUMO

BONOW, Sandro. **Desenvolvimento de marcadores moleculares em e próximos a genes, visando à caracterização de cultivares de arroz.** 2004. Cap. 4, 23 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O arroz no Brasil é cultivado em dois ecossistemas: várzeas e terras altas, sendo que um grande número de genótipos adaptados às diferentes regiões de cultivo está disponível no mercado. Apesar disso, existe uma estreita base genética entre os genótipos cultivados no Brasil. Esse fato dificulta a caracterização e conseqüente identificação e distinção de genótipos. Entre os marcadores utilizados para a caracterização de cultivares destacam-se os moleculares e, dentro desses, os microssatélites. Esses marcadores se tornam valiosos à medida que fornecem o polimorfismo desejado e, ao mesmo tempo, fornecem relações o mais próximas possível com as características expressas pelos genótipos. O objetivo deste trabalho foi identificar microssatélites em e próximos a genes, desenvolver *primers* para esses microssatélites e, com a utilização desses *primers*, caracterizar as principais cultivares de arroz em uso no Brasil. Foram selecionados treze microssatélites na região anterior aos genes Mads Box, além de selecionados 37 microssatélites em ESTs (Expressed Sequence Tags). Foram utilizadas, para a busca e seleção, as bases de dados oriundas do seqüenciamentos do genoma do arroz. Essas foram realizadas com o

* Comitê Orientador: Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho (Orientadora), Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira, – UFLA, Dr. Ben Vosman PRI/WUR, Dra. Eva Choer - EMBRAPA, Dr. Antonio Alves Soares – UFLA, Dr. Antonio V. Rodrigues – EPAMIG.

auxílio de ferramentas de bioinformática disponibilizadas pelo Plant Research International, Holanda, onde foi realizada a presente pesquisa. Foram desenhados primers complementares às regiões flanqueadoras aos microssatélites selecionados, sendo os primers sintetizados por uma empresa comercial. Para a caracterização foi utilizado gel de poliacrilamida a 6% sendo os géis corados com prata. Foi realizada a análise de similaridade entre as cultivares, utilizado-se o coeficiente de Jaccard e o método da média aritmética não ponderada (UPGMA) com o auxílio do software NTSYS v.1.7. Além disso, foi calculado o conteúdo informativo do polimorfismo, tendo o valor encontrado sido entre 0,05 a 0,935, com a média de 0,464. Dos 50 microssatélites selecionados, onze foram monomórficos, vinte não se mostraram adequados ao estudo e dezenove foram polimórficos e utilizados na caracterização de cultivares. Apenas cinco primers foram suficientes para a distinção de todos os genótipos estudados. Os resultados obtidos permitiram concluir que: é possível localizar microssatélites em ou próximos a genes, assim como desenhar primers para esses; a análise de microssatélites permite a caracterização e a individualização de todas as cultivares estudadas e que a análise dos microssatélites selecionados permite classificar os genótipos quanto à subespécie a que pertencem, indica ou japônica.

ABSTRACT

BONOW, Sandro. **Development of molecular markers, in and around rice genes; application in variety characterization.** Cap. 4, 23 p. Thesis (Doctorate in Plant Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

In Brazil, rice is cultivated in two ecosystems, irrigated and upland. A high number of varieties adapted in different regions are available in the market. However, there is a narrow genetic base among the genotypes in Brazil. It makes difficult the characterization, identification e discrimination of genotypes. Among the molecular markers used to characterize varieties, the microsatellites are the more polymorphic and are capable to show up the genetic relations among the cultivars. The objectives of this work were to identify microsatellites in and around rice genes, to develop primers for these microsatellites and to use them to characterize the main rice cultivars used in Brazil. Thirteen microsatellites were selected from upstream region of the Mads Box genes and 37 microsatellites from ESTs (Expressed Sequence Tags). To search the microsatellites was used the databases of rice sequence genome, and used bioinformatics tools, available in Plant Research International, Holland, where this project was developed. To analyze the microsatellites was used polyacrylamide gel 6%, and the gel submitted to silver staining. The similarity and cluster analysis among the 38 genotypes were made using Jaccard coefficient and unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA), through NTSYS v. 1.7 software. The polymorphic informative content of the microsatellites was between 0,05 and 0,935, the average was 0,464. From 50 microsatellites selected, eleven were monomorphic, twenty were not appropriated for the present study and nineteen where polymorphic. Five primers were sufficient to discriminate all cultivars. The results allowed to conclude that is possible to find microsatellites in or around rice genes, as well as, to develop primers for these microsatellites. This research allows to characterize the varieties studied, as well as, to discriminate them. The analysis of the microsatellites selected allows separate the cultivars according the subspecies, indica or japonica.

* Guidance Committee: Dr^a. Édila Vilela de Resende Von Pinho (Major Professor), Dr^a. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira, – UFLA, Dr. Ben Vosman PRI/WUR, Dr^a. Eva Choer – EMBRAPA, Dr. Antonio Alves Soares – UFLA, Dr. Antonio V. Rodrigues – EPAMIG.

1 INTRODUÇÃO

O arroz, no Brasil, é cultivado em dois ecossistemas: várzeas e terras altas. No ecossistema de várzeas predomina o sistema de cultivo com irrigação controlada, que ocupa cerca de 1 milhão de hectares na região subtropical (RS e SC), onde a cultura é manejada sob alto nível tecnológico com rendimento médio de 5,5 t/ha. No ecossistema de terras altas (sequeiro), predominantemente na região tropical, são cultivados em torno de 2 milhões de hectares, porém, com produtividade menor que a alcançada em terras baixas. Nesta modalidade de cultivo, o arroz vem sendo gradualmente inserido em sistemas agrícolas de alto nível tecnológico, seja em rotação com soja e milho, em associação com pastagens ou mesmo com utilização de pivô central, sob irrigação suplementar (CNPAP, 2002).

Em função da vasta área cultivada com arroz no Brasil, pesquisadores têm desenvolvido, ao longo dos anos, um grande número de cultivares adequadas às mais diversas regiões e sistemas de cultivo. Essas cultivares foram desenvolvidas por instituições de pesquisas públicas e privadas que mantêm programas de melhoramento de arroz no país. Apesar do grande número de cultivares desenvolvido e adaptado a diferentes regiões, o germoplasma desses programas possui uma estreita base genética, o que dificulta a distinção e a seleção para algumas características. Em arroz irrigado, Rangel et al. (1996) verificaram que apenas dez ancestrais contribuem com 68% do conjunto gênico das variedades brasileiras. Em arroz de sequeiro, segundo Guimarães et al. (1996), a tendência da estreita base genética no germoplasma é similar à do arroz irrigado, sendo alvo de preocupação.

Para que seja “quebrado” o platô de produtividade estabelecido, seja aumentada a qualidade de grãos e sementes, além de melhoradas outras características de interesse, é necessário que nos programas de melhoramento

seja utilizada toda a variabilidade dos genótipos de arroz disponíveis no Brasil. Para tanto, a caracterização do germoplasma é de fundamental importância.

Além desse aspecto, a caracterização de cultivares vem apresentando crescente importância no controle de qualidade de sementes. A pureza genética, atributo de grande importância em um lote de sementes, somente é alcançada quando a distinção de cultivares é realizada com sucesso. A necessidade da caracterização, porém, vai além desses aspectos. A partir de 1998, após a promulgação da Lei de Proteção de Cultivares no Brasil, tornou-se necessário, quando se desejasse proteger uma nova cultivar, que ela satisfizesse as exigências do teste DHE, ou seja, a cultivar precisa ser distinta das demais em uso, apresente homogeneidade entre seus indivíduos e seja estável ao longo das gerações.

Muitas técnicas estão disponíveis para a caracterização de cultivares. Essas podem ser baseadas em características morfológicas, bioquímicas e/ou moleculares. A caracterização morfológica, assim como a bioquímica, é muito útil, porém, fornece um número limitado de informações quando trabalha-se com uma espécie como o arroz, em que a base genética dos genótipos é estreita. Além disso, apresentam algumas desvantagens, como o tempo necessário para a obtenção de resultados e a influência do ambiente na manifestação de algumas características (Gupta et al., 2003).

As análises moleculares efetuadas diretamente no nível de DNA são consideradas as mais eficientes, rápidas, versáteis e seguras na caracterização de cultivares (Milach, 1998). Além disso, esses marcadores são abundantes, não são influenciados pelo ambiente e podem ser detectados em qualquer tipo de tecido e fase de desenvolvimento da planta (Barros, 1998).

Entre os marcadores moleculares destacam-se os microssatélites, ou seqüências simples repetidas (SSR), que são seqüências presentes em genomas de eucariotos e foram inicialmente observadas em humanos (Tautz e Renz,

1984). Microsatélites são marcadores genéticos constituídos de pequenas seqüências de um a quatro nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem no genoma. Esses *locos* podem ser amplificados via PCR (“Polimerase Chain Reaction”) utilizando *primers* específicos que flanqueiam os microsatélites. Esses constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis atualmente (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Esses marcadores são estáveis, reproduzíveis, possuem natureza codominante e são multialélicos, além de serem tecnicamente simples. Além disso, devido ao elevado nível de polimorfismo gerado, os microsatélites são especialmente importantes na avaliação de cultivares com estreita base genética (Akagi et al., 1997).

Para a cultura do arroz já foram realizadas várias pesquisas tendo sido desenvolvidos inúmeros *primers* microsatélites. Esses permitiram a caracterização e distinção da maioria dos genótipos analisados por Santhy et al., (2000). Porém, para a maior eficiência dos marcadores moleculares, o marcador deverá co-segregar ou estar proximamente ligado ao gene/característica de interesse (Federizzi, 1998). Os microsatélites até o momento disponíveis são determinados aleatoriamente no genoma, independente de marcarem regiões expressas ou não, com pequena probabilidade de estarem próximos a genes de interesse.

Em arroz, projetos de seqüenciamento do genoma estão sendo desenvolvidos ou já finalizados, como os conduzidos pelo IRGSP (“International rice genome sequencing project”), pela Monsanto e pela “Beijing Genomics Institute”. As seqüências dos genomas de arroz encontram-se disponíveis em bancos públicos de dados (Yu et al., 2002). A utilização de ferramentas de bioinformática permite, que, em regiões sequenciadas do genoma, sejam identificados microsatélites e as seqüências que os flanqueiam. Segundo estudos realizados pela Syd (Syngenta Draft Sequence) citado por Goff et al. (2002), no genoma sequenciado de arroz já foram identificadas mais de

48.000 regiões de DNA repetitivo potencialmente utilizáveis como microssatélites.

Objetivou-se, neste trabalho, detectar microssatélites em e próximos a genes, desenvolver *primers* para esses microssatélites e, com a utilização desses *primers*, caracterizar as principais cultivares de arroz em uso no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram inicialmente detectados e selecionados microssatélites na região anterior, supostamente promotora, dos genes “MADS BOX”. A seleção dos microssatélites foi realizada em bancos públicos de dados disponibilizados a partir dos projetos de seqüenciamento do genoma do arroz. Foram utilizadas bases de dados disponíveis no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov, oriundas do seqüenciamento de um genótipo de arroz da subespécie *indica*. Foi também utilizada a base de dados oriunda do seqüenciamento de um genótipo da subespécie *japonica* disponibilizada pelo “International Rice Genome Sequencing Project” (IRSGP) no endereço eletrônico “www.gramene.org”.

Foi inicialmente identificada uma seqüência de nucleotídeos comum a todos os genes Mads Box, obtida a partir do banco de dados de genes do NCBI. Para a determinação dessa seqüência foram utilizados os “softwares” Megalign 5.0 e Edit Seq, pertencentes ao programa DNASTar (DNASTar, Madison, Wisconsin, USA). Com o auxílio desse “software” foram alinhadas todas as seqüências de bases dos genes Mads Box disponíveis e em seguida selecionada uma região comum a todos os genes. Essa seqüência foi utilizada para a localização desses genes no genoma. Após, com a utilização do “software

Microsatellite Extractor” desenvolvido para esta pesquisa pelo setor de bioinformática do “Plant Research International, Wageningen University and Research Centre”, foram localizados os genes Mads Box que continham microssatélites na sua região anterior, até 3Kb de distância do gene. Na busca desses microssatélites foram selecionados “motifs” com duas repetições do nucleotídeo, sendo o “motif” repetido, no mínimo, oito vezes.

Além disso, foram selecionados microssatélites posicionados em ESTs (Expressed Sequence Tags) disponíveis nos bancos de dados de ESTs no NCBI. Foram selecionados microssatélites com “motifs” contendo três repetições do nucleotídeo, sendo o “motif” repetido, no mínimo, seis vezes. Essa busca foi realizada com a utilização do alinhamento das seqüências de todas as possíveis combinações de bases para a composição do microssatélite com a seqüências dos ESTs disponíveis em arroz. Para este alinhamento foi utilizado o “software” BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível nos “sites” do NCBI e Gramene.

Após identificadas as seqüências repetidas nos ESTs, assim como na região anterior aos genes Mads Box, foram desenhados *primers* complementares às regiões flangeadoras aos microssatélites. Foi utilizado, para tanto, o “software” Primer Select (DNASar, Madison, Wisconsin, USA), sendo desenhados *primers* que amplificassem fragmentos entre 100 e 400 pares de bases e a temperatura de anelamento ideal fosse em torno de 55°C. Os *primers* foram sintetizados por uma empresa comercial.

Após a etapa de localização e seleção dos microssatélites, assim como o desenho e síntese dos *primers*, foram caracterizados os seguintes genótipos de arroz: Carisma, Douradão, IAC 202, Canastra, Confiança, Primavera, Guarani, Araguaia, Bonança, Maravilha, Carajás, Progresso, Rio Parnaíba, Rio Verde, Cabaçu, Caiapó, BRS Soberana, Cas 8812, Cas 8993, IRAT 112, BR-IRGA 409, BR-IRGA 410, BRS 7 “Taim”, El Paso L 144, IRGA 417, IRGA 418, IRGA

420, BRS Pelota, Supremo 1, IR 64, EPAGRI 112, BRS Firmeza, INIA Taquari, IAS 12-9 Formosa, BRS Bujuru, Jasmine, Sasanishiki e Carnarole. As sementes foram obtidas junto aos Programas de Melhoramento Genético de Arroz da EPAMIG, Lavras, MG, Embrapa – CNPAF, Goiânia, GO; Embrapa-CPACT, Pelotas, RS e “Plant Reseach International”, Wageningen, Holanda.

O DNA para amplificação dos microssatélites foi extraído a partir de folhas de plântulas, provenientes de sementes colocadas para germinar em rolos de papel sob condições de umidade e temperatura controladas. Foi utilizado para a extração o protocolo proposto por Fulton et al. (1995). A amplificação do DNA foi realizada em termociclador modelo PTC 200 e consistiu, inicialmente, de 3 minutos a 94°C, após, repetidos 30 ciclos com a seguinte sequência; desnaturação a 94 °C por 30 segundos, o anelamento de 50°C a 58°C, dependendo do *primer*, por 30 segundos e a extensão a 72°C por 30 segundos e, finalizando a reação de amplificação, 10 minutos a 72°C. Nas reações de PCR foram utilizados 16 ng de DNA; 2 µl de 10x PCR buffer; 1,2 µl de MgCl₂ (25mM); 2 µl de cada *primer* (2pmol); 2µl dNTPs (1 mM); 0,4U de Taq DNA polimerase e 2,72 µl de água Mili-Q, em um volume final de 20µl.

Os *primers* sintetizados foram inicialmente testados em gel de agarose 2%, com diferentes temperaturas de anelamento, em apenas uma cultivar e, então, selecionados para serem utilizados na caracterização das demais cultivares. Os *primers* selecionados utilizados para amplificação do DNA, os fragmentos de DNA foram desnaturados e submetidos a separação em gel de poliacrilamida 6% a uma corrente elétrica constante de 110W por 2 a 3 horas, dependendo do tamanho do fragmento submetido à separação. A visualização das bandas ocorreu pela coloração dos géis com prata, segundo protocolo proposto por Promega Silver Sequence DNA Sequencing System (Promega, Leiden, The Netherlands), como descrito por Van de Wiel et al. (1999). Os géis,

após corados, foram desidratados à temperatura ambiente e documentados em filmes de raio X.

Os padrões de bandas obtidos foram avaliados quanto à ocorrência de polimorfismo, sendo preparada uma matriz de dados binários, na qual foi atribuído valor “0” para ausência da banda e “1” para presença. Para a estimativa da similaridade genética entre as cultivares, foi utilizado o coeficiente de Jaccard, pela similaridade de dados qualitativos (SIMQUAL). Na análise de agrupamento, foi utilizado o método da média aritmética não ponderada (UPGMA), pelo 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”, Versão 2.02 (NTSYSpc, 1998).

O conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), que é uma medida da diversidade e freqüência dos alelos de cada microssatélite entre as cultivares (Ravi et al., 2003), foi calculado pela fórmula:

$$PIC = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

em que P_{ij} é a freqüência da j ésimo alelo para i ésimo marcador.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise da presença de microssatélites na região anterior aos genes Mads Box, foram encontrados treze microssatélites. De acordo com Goff et al. (2002), no genoma do arroz existem 71 genes da família dos Mads box. Assim, pode-se concluir que aproximadamente a cada 5 genes Mads box, um contém microssatélite composto por “motifs” com dinucleotídeos na região promotora.

Em ESTs, foram encontradas 446 seqüências que possuíam microssatélites preenchendo os requisitos estabelecidos; destes, foram selecionados 37 microssatélites, totalizando 50 quando somados aos selecionados entre os Mads Box. Para os microssatélites selecionados foram desenhados *primers* complementares às regiões flanqueadoras. Destaca-se o grande número de ESTs que possuíam microssatélites. Porém, é importante salientar que dessas seqüências muitas eram repetidas e apresentavam diferentes identificações nos bancos de dados, essas foram eliminadas do estudo. Segundo Varshney et al. (2002), em arroz, assim como na maioria dos cereais, SSR estão presentes em 7% a 10% dos ESTs, e, em média, apenas 3% fornecem microssatélites não redundantes e que podem ser utilizados nos estudos de diversidade genética. Kantety et al. (2002), afirmam que em apenas 1,7% dos ESTs podem ser encontrados microssatélites, que podem ser utilizados como EST-SSR. Dos 37 microssatélites selecionados em ESTs, oito estavam em regiões do genoma expressas na panícula, oito estavam em genes relacionados à tolerância ao estresse hídrico e 23 relacionados à interação entre planta e o fungo causador da brusone.

Pelos resultados dos testes dos *primers* em agarose, observou-se que, dos 50 *primers* sintetizados, treze não amplificaram produtos após o PCR, sendo, assim, descartados. Os demais *primers* amplificaram produtos a partir do DNA, sendo utilizados para a caracterização das cultivares.

Após a caracterização das cultivares, observou-se que dos 37 *primers* utilizados, doze foram monomórficos, seis não apresentaram um padrão de bandas nítido, com muitas bandas difusas, além de um grande número de bandas não estáveis. Esse fato indicou a pouca especificidade do *primer*, que deveria amplificar apenas um *loco*; estes foram, então, desconsiderados. Do total, dezoito microssatélites foram polimórficos e utilizados na caracterização e distinção dos genótipos, assim como no agrupamento por similaridade.

A descrição dos *primers*, comportamento em relação ao polimorfismo e tamanho do fragmento esperado encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1. Descrição dos primers microssatélites, tamanho dos fragmentos e comportamento do microssatélite quanto ao polimorfismo. PRI/WUR, Wageningen, Holanda, 2004.

Nº Primer	Fragmento	Polimorfismo*	Seqüência dos primers 5' 3's
1	238	P	F: TCCGCGCTTAATTTCTCGACCTGT R: GCTACCCGGCATTGCCATTTC
2	300	NE	F: GGGCGCCGGCGGAGATG R: AGGCGTCCACGGTTTAGGCTTGTC
3	192	P	F: ATGCGGATAATCAAATAGACTACG R: CTGTGCTGGCCGGAGTGCT
4	269	P	F: GG-TGG-CTG-GCG-ATA-TTA-AAT-TCA R: TCACAGCGCGGCACGAC
5	160	NA	F: ATCCCAATCCCAAAGTAGTGTAGG R: GATCCCCGGGTCTCGTGA
6	216	NA	F:GATGAGGACGACATAAAAAGGTGTG R: TGTCCACATGTGCCCAACAATATA
7	208	NA	F: CTTATTCTTCCGTACATCAAACAT R: TTCGTGCGAGCCAATTT
8	253	P	F:TGCCGTTGCCCTAAGTTGTCTTCT R: AGGCCCTAGGGCTTGCTGTTTCT
9	271	NA	F: GCTTTTCAAAGGAAACAGAATTAT R: TTAGGGACAAACTTCATTTTCTTC
10	287	NA	F: CAGGGAAGACAATCGAAAGGTA R: CCTTGTTTTAGCGTGTGATGTA AAA
11	233	P	F: TCCACCCCATGTGGTATAATGTGC R: TGGCCATGGCCATGAGGAGT
12	147	NE	F: ACCGAGCCCTACCCCTACGTCGAT R: GGAGCGCCGAAATGGAAACTG
13	198	P	F: TTATACTCCCTCCATTTTCATATTG R: ATCCGTTTACAATGTAAGAATT
14	143	NE	F: CGGCGGCGGGGATTGGGAGTAGGA R: GAGCGCCTGGTTGATGGCCGTGAA
15	209	M	F: CTCGGCCTGCATAGCGGAGAGGTA R: GTACGCGCCGCCCTGTCAG
16	244	NE	F: GCGCCGAGGCCGAGCAACAGTGAG R: CAGGCGCCGATGCCGAGCTTGGTC
17	320	P	F: ATGTGTTGCCATTCTTTGTTTACA R: TCTTCTTCGGCATCCGATCAT

Continua...

Continuação...

18	179	NE	F: CCGCCGCCACGCTCGACCTTCTC R: CGCGGCGGCGACCTTCTTGTCCTC
19	215	P	F: CGGCGGCGGGAACGCGATGAAC R: CACCACCGCGCTCGTCGTC
20	210	P	F: GACCTGGCTGATCTGGCTTCTTCA R: AACTCCCCCATTCTCGATGAGCT
21	250	NA	F: TGGTGCGCCTCGTGCTGGCACTCG R: CACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAG
22	264	P	F: GACGGCGTCTACCCGGAGAAGGTC R: ATCCCACCATCGATCGATTACACC
23	183	NE	F: CCCGCCGCCACGCTCGACCTTCTC R: CGGCGGCGGCGGCGACCTTCTTGT
24	400	P	F: TCTAGCTCGTCGCCGCCATGAACG R: CTTGCGGCGGAGGTAAGTGCACCAC
25	213	M	F: AAGGGAACCCCTCTTCTTCTC R: AGGCCGACGCGGAGGCCCTGGAG
26	143	M	F: CGGCGGCGGGGATTGGGAGTAGGA R: GACCGCCTGGTTGATGGCCGTGAA
27	160	P	F: CCCGCGCCACGCGCGGAGAG R: CACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAG
28	98	NA	F: CCGCATCACACCCCTTAAAGGAAG R: CCCCGGCCGCCACGCGGAGAGG
29	234	NE	F: GCGCGGCCGCAGCCACTTCTTG R: GTCGCGGCCCTTGGCGAACTTGAG
30	206	NE	F: CTCTCGCAAGCCAAGTCGCAATCC R: TTTGCCGCCCTTTTTGTTAGGT
31	160	P	F: TAGCAATGGCTCCTCTCGGTGACG R: TCCCCGAACGACACCACCAGGTTG
32	201	M	F: AGGGGGTTCTCGGGACGGCAATTC R: CCAAACCTGCGCAGCGGAGCCAATG
33	217	P	F: ACCCCCAGGGGCAATTTTTATTTA R: ATGCGGTGGGTGCAAAGCAAGTAC
34	233	NE	F: GCGCGGCCGCAGCCACTTCTTG R: TCGCGGCCCTTGGCGAACTTGAGC
35	252	M	F: TTGCCGGCAATACCGAACCTC R: CCGCCGCACCGCCACGTC
36	182	P	F: GCCCTCCCTCCCGTTCGGACAGAC R: GGCCGCTCGTGCCCTTCATCAG
37	179	M	F: GGGGGCGGCGAGGGGAAGT R: TTCCTTTGCGCATTCACTACTAG
38	127	NE	F: CGGCGTCGTCGGGTCGTCGGTCTC R: GCCGGTGGCGGCGGAGGAGCAG
39	125	M	F: CGCCGGCGCGGAGGCTGTAGTACA R: GCCGGTGTCCGCCGCAAGAAGT

Continua...

Continuação...

40	128	M	F: GCGCCGGCGCGGAGGCTGTAGTAC R: GCCGGTGTCCGCCAGCCAAGAAGT
41	255	NE	F: CCAAAGGGGATTTCTGCGAAGAA R: ACGGGCTGCAACAGCGACCTC
42	126	M	F: CGGCGTCGTGGGTCGTGGTCTC R: CCGGTGGCGGCGGAGGAGCAG
43	187	NE	F: CGCCGCCGCCAAGTCCGACAC R: CCAGCTGAGGCCGCCTTCGTCCAG
44	242	P	F: TCCTGCGATTGCGTAATCATCCTA R: ATGGCCGGTTAATTTTCGTGGTTA
45	106	P	F: ACAGGCCGAGGAGGAAGAGGAA R: AAGGCGGCAGAGGATGAGGTCT
46	139	P	F: GTGGCGGTGGCTACAACAGAGGT R: CTGCCACCACGGTGGTCATCA
47	249	M	F: AGGTGGCTTTAGCCAGTCAGACTT R: CTCGGCCTCTTTCGCTAGACCTT
48	116	NE	F: CGCGGCGGCGAGGGCAGGAG R: CGCCGAGTGGTCCAACGCCACCTC
49	194	P	F: AGACGGAGGCGTCGTGCAGCAACC R: GGCGGGGCGGGCGATGGAGGTGTA
50	181	P	F: GCCGCCGCCACGCTCGACCTTCTC R: GCGCGGCGGCGACCTTGTCTCT

*P - polimórfico; M – monomórfico; NA- não amplificado; NE – não possível avaliação do padrão de bandas

Analisando-se o comportamento dos microssatélites, verifica-se que aqueles posicionados na região promotora dos Mads Box foram, em geral, mais polimórficos que os oriundos de ESTs. Isso pode ser comprovado ao se comparar a média do conteúdo informativo (PIC) de cada microssatélite. O PIC nos microssatélites na região dos Mads Box foi, em média, de 0,702, enquanto que nos oriundos dos ESTs, essa média foi de 0,350. Isto provavelmente ocorreu devido a diferença no número de repetições do “motif”. Quanto maior o número de repetições do “motif”, maior é o PIC, ou seja, maiores são o polimorfismo e a frequência de alelos observado por *loco*. Por exemplo, o *primer* 13 (Figura 1) amplificou 15 alelos para um dos *locos* do microssatélite, com valor do PIC de 0,935, o qual apresenta 24 repetições do “motif”, maior entre todos os microssatélites. Esse resultado reforça as afirmações de Temnykh et al. (2001),

de que quanto maior o número de repetições do “motif”, maior é a probabilidade de ser encontrado um alto valor de PIC.

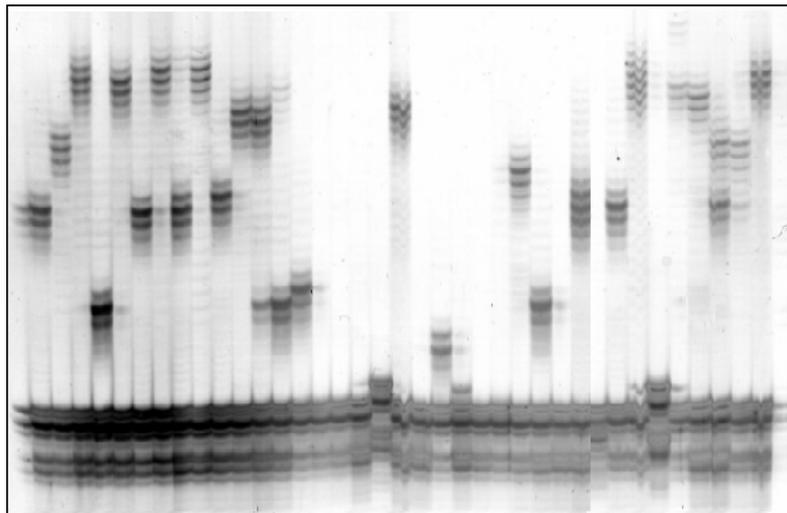


FIGURA 1. Padrões de bandas observados a partir da amplificação do microssatélite treze. PRI/WUR, Wageningen, Holanda, 2004.

Os valores do PIC encontrados nos microssatélites analisados variaram de 0,05 a 0,935, com a média de 0,464 (Tabela 2). Garland et al. (1999), trabalhando com 43 cultivares de arroz e dez microssatélites genômicos encontraram valor de PIC entre 0,62 e 0,92. Isso confirma que, por vezes, marcadores aleatórios no genoma podem apresentar maior polimorfismo do que aqueles localizados em regiões expressas, mais conservadas, embora, na maioria dos casos, marcadores moleculares em regiões expressas forneceram polimorfismo suficiente aos objetivos das pesquisas.

Quando foram comparadas cultivares uma a uma e realizado o agrupamento dessas, a caracterização permitiu individualizar todos os 38 genótipos estudados. Destaca-se que, para a distinção destes genótipos, é

TABELA 2. Descrição dos primers polimórficos, motivo do microsatélite, número de alelos encontrados e valor informativo do microsatélite (PIC). PRI/WUR, Wageningen, Holanda, 2004.

Nº Primer	Primer	Microsatélite (repetições)	Nº alelos	Valor do PIC
1	Mads	AG (11)	3	0.607
3	Mads	GA (13)	8	0.753
4	Mads	TA (15)	9	0.771
8	Mads	CT (19)	2	0.411
11	Mads	CT (21)	6	0.732
13	Mads	AT (24)	15	0.935
17	Brusone	CTG (8)	2	0.287
19	Panicula	CGG (7)	3	0.508
20	Brusone	CTT (12)	6	0.627
22	Brusone	CTT (7)	2	0.386
24	Brusone/ Estresse hidrico	CGT (9)	4	0.454
31	Panicula	CGG (8)	2	0.399
27	Brusone/ estresse	TGC (8)	4	0.116
33	Brusone	CGA (8)	2	0.386
36	Brusone	GGC (7)	2	0.050
43	Estresse	GGC (8)	6	0.831
45	Panicula	GGA (7)	2	0.093
46	Panicula	CGG (7)	2	0.093
50	Panicula	CCG (8)	3	0.370

necessária a análise de somente cinco microsatélites, flanqueados pelos *primers* 3, 4, 13, 20 e 50. A partir desses resultados fica evidenciada a potencialidade dos marcadores microsatélites na distinção e identificação de genótipos de arroz.

O agrupamento por similaridade a partir dos padrões de bandas das cultivares permitiu separar os genótipos em dois grupos (Figura 2). Um dos grupos foi composto por cultivares da subespécie *indica* e o outro com as cultivares da subespécie *japônica*. A diversidade observada entre os grupos foi de 86%, ou seja, os marcadores utilizados refletiram uma grande diversidade

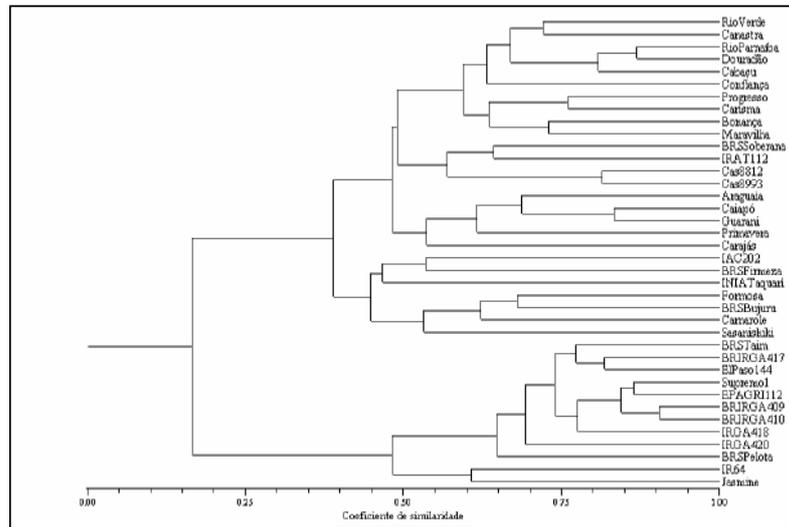


FIGURA 2. Dendrograma de 38 genótipos de arroz, baseado na análise de 19 microssatélites. PRI/WUR, Wageningen, Holanda, 2004.

entre os genótipos pertencentes às diferentes subespécies. Esses resultados confirmam os encontrados por Beló et al. (2002), quando analisaram quatorze das cultivares também utilizadas no presente estudo. Esses últimos autores utilizaram 25 *primers* RAPD e 13 *primers* microssatélites, em estudos independentes, tendo encontrado a mesma classificação mostrada neste estudo.

Por meio dos *primers* 22 e 44 (Figura 3) foi possível separar claramente as cultivares das subespécies indica e japônica em duas regiões distintas no gel. O *primer* 44 separa o grupo de cultivares indica em duas regiões no gel, sendo que as cultivares IR 64 e Jasmine, não descendentes de genótipos nacionais, são distinguidas no gel por situarem-se em região distinta das demais formando um subgrupo dentro do grupo *indica*.

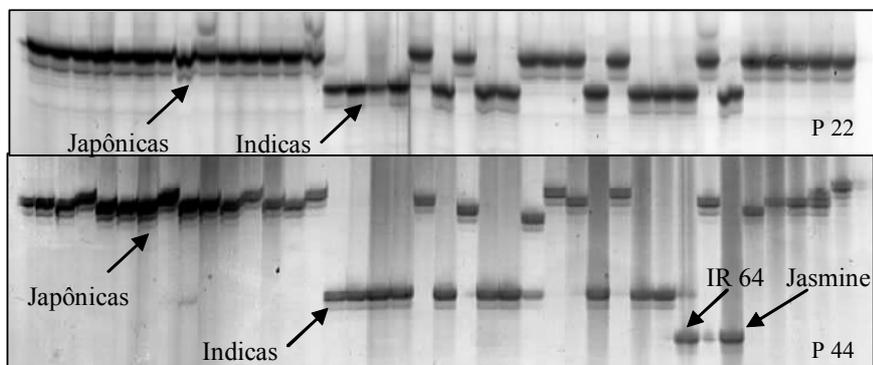


FIGURA 3. Padrões de bandas observados a partir da amplificação dos *primers* 22 e 44. PRI/WUR, Wageningen, Holanda, 2004.

Dentre os grupos formados, os quais podem ser visualizados no dendrograma apresentado na Figura 2, o grupo 1, composto por cultivares que podem ser classificadas como japônicas, foi subdividido em 4 subgrupos. O primeiro, com as cultivares Rio Verde, Canastra, Rio Parnaíba, Douradão, Cabaçu, Confiança, Progresso, Carisma, Bonança e Maravilha; o segundo com as cultivares BRS Soberana, IRAT 112, CAS 8812, CAS 8993; o terceiro subgrupo com as cultivares Araguaia, Caiapó, Guarani, Carajás e Primavera; o quarto subgrupo com as cultivares IAC 202, BRS Firmeza, Formosa, BRS Bujuru, Sasanishiki, Carnarole e INIA Taquari. Dentro desse último grupo, apenas três genótipos são cultivados em sistema irrigado, que são as cultivares INIA Taquari, BRS Bujuru e BRS Firmeza, as demais são cultivadas no sistema de sequeiro. Um subgrupo, dentro desse grupo, reuniu as cultivares Formosa, BRS Bujuru, Sasanishiki e Carnaroli, todas japônicas, com características de apresentar grão curto, característica estas que destacam essas cultivares das demais. Esse agrupamento novamente fortalece o valor de marcadores em regiões expressas dos genomas, tendo sido agrupadas nele todas as cultivares com uma importante característica em comum.

O segundo grupo de cultivares, apenas com cultivares da subespécie *índica*, foi dividido em dois subgrupos. Subgrupo 1, com as cultivares BRS Taim, IRGA 420, BR-IRGA 420, BR-IRGA 417, Supremo I, BR-IRGA 409, BR-IRGA 410, Epagri 112, El Paso L 144, IRGA 418, BRS Pelota, todas oriundas de Programas de Melhoramento Genético do Sul do Brasil, com exceção da cultivar El Paso L 144, que embora desenvolvida pelo INIA, Uruguai, possui descendentes daquele programa. No segundo subgrupo com as cultivares IR 64, desenvolvida pelo IRRI, Filipinas e Jasmine, cultivar aromática originada em Taiwan. Sendo assim, essa descendência explica a subdivisão dentro do grupo das cultivares da subespécie *índica*.

Os padrões de bandas encontrados na análise dos microssatélites não permitiram o relacionamento direto desses com as características morfológicas a que esses genes estavam relacionados.

4 CONCLUSÕES

É possível localizar microssatélites em ou próximos a genes, assim como desenhar primers para esses.

A análise de microssatélites permite a caracterização e a individualização de todas as cultivares estudadas.

A análise dos microssatélites selecionados permite classificar os genótipos quanto a subespécie a que pertencem.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y; INAGAKI, A. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. **Theoretica and Applied Genetics**, NewYork, v. 94, n. 1, p. 61-67, Jan. 1997.

BARROS, E. G. **Métodos bioquímicos e moleculares aplicados à identificação e avaliação da pureza genética de plantas**. Sete Lagoas, MG: EMBRAPA/ CNPMS, 1998. (Palestra apresentada no Curso de Qualidade e Análise de Sementes).

BELÓ, A. et al. **Evaluation of rice (oryza sativa L.). genetic resources and its classification in the indica indica/japonica subspecies**. Disponível em: <www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/03/03pdf/03-026.pdf>. Acesso em: 20 Nov. 2003.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Área plantada safra 2002/2003**. Disponível em: <www.conab.gov.br/safras.asp>. Acesso em: 18 set. 2003.

CRISCI, J. V.; ARMENGOL, M. F. L. **Introducción a la teoria y practica de la taxonomia numerica**. Washington: Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1983. 132 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Embrapa. **A cultura do arroz**. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/pesquisa/arroz.htm>>. Acesso em: 01 set. 2002.

FAO. Food and Agricultural Organization. **Rice area, yield, and production**. Disponível em: <www.FAO.org>. Acesso em: 18 set. 2003.

FEDERIZZI, L. C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S. **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FULTON, T. M.; CHUNWONGSE, J.; TANKSLEY, S. D. Micropep Protocol for extraction of DNA from Tomato and other herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Report**, New Brunswick, v. 13, n. 3, Sept. 1995.

GARLAND, S. H.; LEWIN, L.; ABEDINIA, M.; HENRY, R.; BLAKENEY, A. The use of microsatellite polymorphisms for the identification of Australian breeding lines of rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 108, n. 1, p. 53-63, 1999.

GOFF, S. A.; RICK, D.; LAU, T. H.; PRESTING, G.; WANG, R. L.; DUNN, M. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. *ssp. japonica*). **Science**, Washington, v. 296, n. 5565, p. 92-100, Apr. 2002.

GUIMARÃES, E. P.; BORRERO, J.; OSPINAREY, Y. Genetic diversity of upland rice germoplasm distributed in Latin America. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, mar. 1996.

GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; SHARMA, S.; et al. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. **Molecular Genetics and Genomics**, New York, v. 270, p. 315-323, 2003.

KANTETY, R. V.; SINGH, R.; KUMAR, N.; BALAYAN, H. S. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. **Molecular Genetics and Genomes**, New York, v. 48, n. 4, p. 501-510, Dec. 2002.

MILACH, S. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características In: MILACH, S. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141 p.

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, mar. 1996.

RAVI, M.; GEETHANJALIS, S.; SAMEEYFARHEEN, F.; MAHESWARAN, M. Molecular marker based genetic diversity analysis in rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD and SSR markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 133, n. 2, p. 243-252, 2003.

RIGGATO, 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.

SANTHY, V.; MOHAPATRA, T.; DADLAM, M.; SHARMA, S. P.; SHARMA, R. P. DNA markers for testing distinctness of rice (*Oryza sativa* L.) **Plant Varieties and Seeds**, Cambridge, v. 13, n. 3, p. 141-148, Dec. 2000.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, May 1984.

TEMNYKH, S.; DECLERDK, G.; LUKASHOVA, A.; LIPOVICH, L.; McCOUCH, S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, Length variation, Transposon Associations, and Genetic marker potential. **Genome Research**, Plainview, v. 11, n. 8, p. 1441-1452, Aug. 2001.

VAN DE WIEL, C.; ARENS, P. , VOSMAN, B. Microsatellite retrieved in lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 1, p. 139-149, Feb. 1999.

VARSHNEY, R. K.; HU, S. N.; WANG, N.; WONG, G. K. S.; LI, S. G.; LEIN B.; DENG, Y. J.; DAÍ, L.; ZHOU, X.Q.; TAO, M.; WANG, J.; ZHU, L. H.; YUAN, L. P. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. **Cereal & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 7, n. 2, p. 537-546, 2002.

YU, J.; THILL, T.; STEIN, N.; LANGRIDGE, GRANER, A. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. *ssp. indica*). **Science**, Washington, v. 296, n. 5565, p. 79-92, Apr. 2002.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A caracterização de cultivares de arroz pode ser realizada com sucesso utilizando-se marcadores morfológicos, isoenzimáticos ou moleculares. Porém cada um deles com potencialidades e limitações em diferentes níveis.

Os marcadores morfológicos destacam-se pela facilidade de análise, não exigindo equipamentos sofisticados. Por outro lado, esses marcadores possuem várias limitações. Destacamos algumas dificuldades observadas, tendo sido a principal a subjetividade no momento da classificação de determinados descritores, aliado à ausência da disponibilidade de padrões de comparação. Outro fator limitante é a influência do ambiente, que foi observada, por exemplo, quando da análise da antocianina no colmo em diferentes ambientes. Por último, destacamos o tempo exigido para a obtenção de alguns descritores a serem avaliados, os quais são, em sua maioria, a partir do estágio reprodutivo. Esses marcadores são recomendados para a comparação de cultivares contrastantes, além da necessidade de um técnico experiente para a realização das avaliações.

Os marcadores isoenzimáticos podem ser considerados úteis na distinção das variedades, apesar da não diferenciação de alguns genótipos nesse estudo. Destaca-se a rapidez na obtenção dos resultados, pois as análises podem ser realizadas a partir de sementes, além da fácil interpretação desses e a simplicidade na execução da técnica. É importante ressaltar que esses marcadores podem sofrer influência do ambiente. Dessa forma, é importante serem analisados sistemas isoenzimáticos que não sofram essa influência, além da utilização de sementes com alta qualidade fisiológica e livre de patógenos. Esses descritores são recomendados como uma alternativa da análise dos marcadores moleculares. Dependendo dos equipamentos e profissionais disponíveis podem oferecer resultados confiáveis, porém é fundamental o

conhecimento do comportamento dos sistemas isoenzimáticos analisados quanto a influência ambiental.

Por meio dos marcadores microssatélites foi possível diferenciar e identificar todos os genótipos utilizados nesse estudo. Esses apresentam resultados de fácil interpretação e com pequeno número de análises é possível identificar com clareza e precisão um grande número de genótipos. Os resultados são obtidos em poucas horas, além da possibilidade de análise de qualquer tecido em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. A partir do presente estudo coloca-se a disposição primers eficientes para a identificação das principais cultivares de arroz utilizadas no Brasil. Os marcadores moleculares são, dessa forma, os recomendados para a distinção e identificação de genótipos sempre que forem verificadas dificuldades na análise morfológica e tenha-se disponível mão de obra e equipamentos especializados.