

UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS ELETROFORÉTICAS PARA O  
ESTUDO DE HETEROSE EM ARROZ (*Oryza sativa* L.)

ANTÔNIO COSTA DE OLIVEIRA

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. AKIHIKO ANDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Agosto - 1988

048u

Oliveira, Antônio Costa de.  
Utilização de técnicas eletroforéticas para  
o estudo de heterose em arroz (*Oryza sativa* L.).  
Piracicaba, 1988.  
105p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ  
Bibliografia

1. Arroz - Melhoramento. 2. Arroz - Vigor hí-  
brido - Técnica eletroforética. 3. Eletroforese  
aplicada. I. Escola Superior de Agricultura  
"Luiz de Queiróz", Piracicaba.

CDD 633.18

UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS ELETROFORÉTICAS PARA O  
ESTUDO DE HETEROSE EM ARROZ (*Oryza sativa* L.)

ANTÔNIO COSTA DE OLIVEIRA

Aprovada em: 01.08.1988

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Akihiko Ando

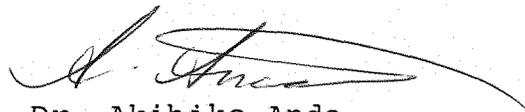
ESALQ/USP , CENA /USP

Prof. Dr. Paulo Sodero Martins

ESALQ/USP

Dr. Eric Derbyshire

CENA/USP



Prof. Dr. Akihiko Ando

Orientador

Aos meus pais e irmãos  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

- Ao prof. Dr. Akihiko Ando pelos grandes incentivos, ensinamentos e orientação.
- Ao Pesquisador Dr. Eric Derbyshire pela coorientação.
- À Pesquisadora Dra. Maria Teresa V. de Carvalho pelas idéias e incentivos.
- Ao prof. Fernando L. Cáprio da Costa pelo incentivo à carreira científica.
- Ao colega Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> José Sebastião Cunha Fernandes pelas discussões e auxílio na elaboração deste trabalho.
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) pelas facilidades concedidas.
- Aos funcionários e estagiários das Seções de Radiogenética e Biologia de Proteínas Vegetais pelo auxílio prestado.
- A todos os colegas do Departamento de Genética da ESALQ que, de uma forma ou de outra contribuíram para a execução deste trabalho.

# SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	II
RESUMO.....	V
SUMMARY.....	VI
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Composição proteica do arroz.....	04
2.2. Aplicação da eletroforese em estudos genéticos.....	06
2.2.1. Variações interespecíficas.....	08
2.2.2. Variações interespecíficas a nível de ploidia.....	10
2.2.3. Variações intraespecíficas.....	12
2.2.4. Identificação de cultivares.....	15
2.2.4.1. Padrões de proteínas não catalíticas.....	16
2.2.4.2. Padrões de isoenzimas.....	18
2.2.5. Predição de heterose.....	20
2.2.6. Controle genético de isoenzimas.....	23
2.2.7. Controle genético de proteínas não catalíticas.....	27
2.3. Heterose.....	28
2.3.1. Dominância e sobredominância.....	30
2.3.2. Modelo de heterose a nível molecular.....	31
2.3.3. Heterose e divergência genética.....	32
2.3.4. Indicadores de heterose em arroz.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. Material.....	37
3.2. Métodos.....	37

3.2.1. Análise do grão.....	37
3.2.1.1. Preparo de farinha e extração de proteína.....	37
3.2.1.2. Determinação do teor de proteína solúvel.....	38
3.2.2. Eletroforese.....	39
3.2.2.1. Eletroforese sob condições não dissociantes.....	39
3.2.2.2. Eletroforese sob condições dissociantes.....	39
3.2.3. Coloração de proteínas.....	43
3.2.3.1. Corante não específico.....	43
3.2.3.2. Corantes específicos.....	43
3.2.4. Cruzamentos.....	45
3.2.5. Indicadores de heterose.....	46
4. RESULTADOS.....	47
4.1. Composição de proteína solúvel em solução salina.....	47
4.2. Padrões eletroforéticos das proteínas.....	47
4.2.1. Padrões de proteína da fração solúvel em solução salina.....	47
4.2.2. Padrões polipeptídicos do endosperma.....	51
4.2.3. Padrões isoenzimáticos do endosperma.....	53
4.2.3.1. Desidrogenase málica.....	53
4.2.3.2. Fosfatase ácida.....	57
4.2.3.3. Esterase.....	61
4.3. Caracteres morfológicos de culti vares e híbridos.....	64
4.4. Análise da correlação dos carac- teres morfológicos com produção.....	64
4.5. Análise de variância.....	65

4.6. Comparação de médias.....	65
4.7. Análise da heterose.....	73
5. DISCUSSÃO.....	82
6. CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

Figura 1. Padrões proteicos das cultivares em gel de pH alcalino com uma concentração de 10% de acrilamida.....	49
Figura 2. Padrões polipeptídicos da fração de proteína solúvel do endosperma de arroz em gel de SDS com uma concentração de 10% de acrilamida.....	52
Figura 3. Diagramas de desidrogenase málica das cultivares de arroz e seus híbridos.....	55
Figura 4. Diagramas de fosfatase ácida das cultivares de arroz e seus híbridos.....	58
Figura 5. Diagrama dos padrões de esterase das cultivares de arroz e seus híbridos.....	62
Figura 6. Supostas composições alélicas de parentais e híbridos do cruzamento Bico Ganga x Kazusa Wase e seu recíproco.....	86

## LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Composição das soluções estoques do procedimento eletroforético sob condições não dissociantes em gel de pH ácido.....	40
Tabela 2. Composição das soluções estoques do procedimento eletroforético sob condições não dissociantes em gel de pH alcalino.....	41
Tabela 3. Composição das soluções estoques do procedimento eletroforético sob condições dissociantes.....	42
Tabela 4. Cultivares de arroz e suas características de peso do endosperma e composição de proteína solúvel.....	48
Tabela 5. Intensidade relativa das três bandas anódicas de migração rápida da enzima desidrogenase málica nas cultivares e híbridos analisados.....	56
Tabela 6. Intensidade de bandas de fosfatase ácida observadas nas cultivares de arroz e seus híbridos.....	60
Tabela 7. Intensidade de bandas de esterase observadas nas cultivares de arroz e seus híbridos.....	63
Tabela 8. Média das cultivares e gerações F1 para os caracteres analisados como indicadores de heterose.....	66
Tabela 9. Coeficientes de correlação entre os caracteres analisados e produção.....	67
Tabela 10. Análise de variância para o caráter número de grãos/planta nas cultivares e híbridos de arroz.....	68

Tabela 11. Análise de variância para o ca ráter peso de 1000 grãos das cultivares e hí bridos de arroz.....	68
Tabela 12. Análise de variância para o ca ráter produção (g/planta) das cultivares e hí bridos de arroz.....	69
Tabela 13. Médias de número de grãos/plan ta das cultivares e híbridos de arroz.....	70
Tabela 14. Médias de peso de 1000 grãos das cultivares e híbridos de arroz.....	71
Tabela 15. Médias de produção (g/planta ) das cultivares e híbridos de arroz.....	72
Tabela 16. Análise de heterose(H) e hete robeltiose(Hb) para o cruzamento Senshou x Bico Ganga.....	75
Tabela 17. Análise de heterose(H) e hete robeltiose(Hb) para o cruzamento Senshou x Pratão.....	76
Tabela 18. Análise de heterose(H) e hete robeltiose(Hb) para o cruzamento Kazusa Wase x Nuglin 24.....	77
Tabela 19. Análise de heterose(H) e hete robeltiose(Hb) para o cruzamento Bico Ganga x Kazusa Wase.....	78
Tabela 20. Análise de heterose(H) e hete robeltiose(Hb) para o cruzamento Guedes x Kazusa Wase.....	79
Tabela 21. Análise de heterose(H) e hete robeltiose(Hb) para o cruzamento Guedes x Senshou.....	80
Tabela 22. Análise de heterose(H) e hete robeltiose(Hb) para o cruzamento Agulha x Kazusa Wase.....	81

Tabela 23. Intensidades atribuídas às proteínas expressas pelos diferentes alelos que codificam a enzima MDH.....85

Tabela 24. Bandas de MDH e sua provável constituição em subunidades correspondentes aos diferentes alelos estabelecidos.....86

Tabela 25. Genótipos em F2, considerando a natureza triplóide do endosperma.....88

UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS ELETROFORÉTICAS PARA O ESTUDO  
DE HETEROSE EM ARROZ (Oryza sativa L.)

Autor: ANTÔNIO COSTA DE OLIVEIRA

Orientador: PROF. DR. AKIHIKO ANDO

RESUMO

A exploração da produtividade do arroz de sequeiro no Brasil é ainda muito pequena, mas pode ser melhorada pelo uso de genótipos mais responsivos do que os atualmente cultivados. A utilização de genótipos híbridos, diretamente por agricultores, ou de linhas di-haplóides, obtidas por cultura de anteras, poderia auxiliar na resolução deste problema.

Métodos eletroforéticos têm sido amplamente utilizados para a discriminação de genótipos em diversas culturas e têm demonstrado um bom potencial para a predição de heterose.

No presente trabalho, foram observados caracteres morfológicos e proteicos de cultivares brasileiras e japonesas de arroz e seus híbridos.

Correspondências entre determinados padrões proteicos e características vantajosas nos híbridos foram observadas. Os padrões de polipeptídeos, esterase, desidrogenase málica e fosfatase ácida foram diferentes para alguns genótipos ou grupos de genótipos, entre eles alguns com produção distinta dos demais. Por exemplo, os padrões de esterase apresentaram uma ligação entre a atividade enzimática, verificada por intensidade de coloração de bandas, e aumento no peso de grãos.

As possibilidades do uso destes procedimentos eletroforéticos para a predição de heterose foram discutidas.

UTILIZATION OF ELECTROPHORETIC TECNICS TO THE STUDY  
OF HETEROSIS IN RICE(Oryza sativa L.)

Author: ANTÔNIO COSTA DE OLIVEIRA

Adviser: PROF. DR. AKIHIKO ANDO

SUMMARY

The low productivity of upland rice in Brazil can be improved by the use of genotypes more responsive than the currently used cultivars. Such desirable genotypes could be hybrids, which can be utilized directly or through anther culture to provide di-haploid lines.

Electrophoretic methods have been applied for the discrimination of genotypes in various crops and have shown a potential value for the prediction of heterosis.

In the present work, morphological and protein traits were studied in Brazilian and Japanese cultivars of rice and their hybrids.

Relationships among specific protein profiles and advantageous traits in the hybrids, among the polipeptide profiles, and among the esterase, malic dehydrogenase and acid phosphatase patterns, were observed. They permit the discrimination of genotypes with higher productivity. For example, the esterase patterns showed a correlation between enzyme activity assessed by band colour intensity, and an increase of grain weight.

The potential use of electrophoretic procedures in the prediction of heterosis was discussed.

## 1. INTRODUÇÃO

O arroz (Oryza sativa L.) ocupa o segundo lugar em área, entre os cereais mais cultivados no mundo, representando o alimento básico para 4,5 bilhões de pessoas na Ásia. Outros continentes, como a África e a América Latina, têm aumentado a sua demanda rapidamente nos últimos anos.

Com uma produção de calorías e carboidratos por hectare inigualável por nenhum outro cereal nas práticas normais de cultivo, o arroz ainda apresenta uma produção de proteína por área e balanço de aminoácidos muito bons, só sendo superado pela aveia.

No Brasil, este cereal é cultivado em duas condições distintas: irrigado, no Sul do país e em cultivo de sequeiro, predominantemente nas regiões Central e Nordeste.

A exploração da produtividade, principalmente na região de cultivo de arroz de sequeiro, é ainda muito pequena, seja por condições de cultivo aquém da tecnologia disponível, seja pela utilização de genótipos pouco responsivos.

O melhoramento de cultivares de arroz tem sido desenvolvido em vários centros de pesquisa no país. Contudo, os métodos utilizados constituem-se principalmente de hibridação e seleção, resultando no gasto de vários anos desde o cruzamento inicial até o lançamento da variedade melhorada. Este método, embora de eficiência inegá

vel, retarda a obtenção de sucessivos genótipos superiores que venham a satisfazer demandas cada vez maiores de mercado.

Uma alternativa para este método, em arroz, seria o uso de cultivares híbridas, cuja viabilidade econômica já foi comprovada em países asiáticos, principalmente na China. Entretanto, as condições de produção da semente híbrida de arroz no Brasil ainda carecem de um aperfeiçoamento, visto que os materiais macho-estéreis adaptados são ainda em pequeno número e, principalmente, o problema de dispersão de pólen da linhagem restauradora para a linhagem macho-estéril ainda limita o uso desta técnica.

A cultura de anteras é uma técnica que pode auxiliar no problema de aumento do potencial de produtividade, visto que é uma técnica de rápida obtenção de genótipos homozigotos, e, quando realizada a partir de pólen de plantas F1, com uma maior facilidade de recuperação de genótipos superiores em relação à seleção normal em indivíduos diplóides segregantes.

A obtenção de híbridos para servir de base para esta técnica, está limitada pela necessidade de se verificar as capacidades de combinação entre linhagens parentais, o que obriga a uma redução do número de linhagens analisadas.

A eletroforese é considerada como uma das melhores técnicas de caracterização de genótipos e esta técnica tem sido amplamente aproveitada por vários pesquisadores em várias culturas. A aplicação desta técnica em arroz poderia ser estendida à discriminação de diferenças genéticas entre linhagens a serem usadas como parentais de híbridos.

Constituem os principais objetivos deste trabalho: (a) examinar a variabilidade entre genótipos de arroz através de eletroforese de proteínas catalíticas e não catalíticas; (b) estudar possíveis correlações entre diferenças proteicas nos parentais e vigor no híbrido entre os mesmos; (c) verificar a viabilidade dos procedimentos eletroforéticos selecionados no auxílio da escolha das melhores combinações de linhagens parentais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Composição proteica do arroz

As proteínas dos cereais há muito tempo têm recebido a atenção de pesquisadores. Com efeito em 1745, BECCARI realizou a extração do glúten a partir da farinha de trigo. Entretanto, estudos sistemáticos de classificação foram primeiramente realizados por Osborne, citado por FEILLET(1967), onde distinguiu as proteínas conforme a sua solubilidade em 4 grupos: as albuminas, solúveis em água e em soluções salinas diluídas; as globulinas, solúveis em meio salino neutro, mas insolúveis em água; as prolaminas, extraídas por solução aquosa de etanol; as glutelinas, fração residual, solúveis em meio alcalino. De um modo geral, as duas primeiras são reunidas em um só grupo e denominadas de proteínas solúveis. Deve-se a Rosenheim & Kajiura, citados por BOURDET(1956), o primeiro trabalho importante sobre as proteínas do arroz. Estes autores encontraram pequenas quantidades de albumina e globulina e traços de uma proteína solúvel em álcool. A quase totalidade das proteínas do grão correspondeu às características das glutelinas. Estas últimas foram denominadas de oryzenina. Esta relação de quantidades entre as frações do arroz foi confirmada em estudos posteriores( Lorsa & Hazai; Lindner et alii; Primo; citados por CAGAMPANG et alii, 1966). O próprio CAGAMPANG(1966) estabeleceu a relação de albumina: globulina: prolamina: glu

telina como 5:9:3:83 para a farinha de arroz.

Em geral, ambas as frações glutelina e prolamina predominam nos cereais, em contraste com o que é observado no arroz. Em cevada, milho e trigo, aproximadamente 70-80% da proteína da semente está contida na fração combinada de glutelina e prolamina denominada glúten. Este complexo é geralmente considerado como constituído de 50% prolamina e 50% glutelina, e estas são consideradas as proteínas de reserva da semente. O restante da proteína nestes cereais é aproximadamente 50/50 albuminas e globulinas (Pence & Mecham; citados por BOULTER, 1973). BOULTER (1973) menciona o arroz como possuindo outras proporções entre estas frações proteicas, sendo aproximadamente 50% da proteína constituída de glutelina. Também a aveia destaca-se do grupo pela constituição de globulina como fração principal.

Um fato marcante e relevante ao objetivo do presente trabalho é que em arroz não existe uma fração proteica universalmente aceita como base para estudos de identificação de cultivares. Estes estudos são amplamente difundidos em trigo e cevada, através das gliadinas (BUSHUK & ZILLMAN, 1978; MARCHYLO & La BERGE, 1980; BARRIGA et alii, 1983; LOOKHART, 1985).

O que promove uma vantagem destas espécies em relação ao arroz reside na facilidade de extração, visto que as gliadinas correspondem à fração prolamina, e esta, no arroz, é muito reduzida. Com base nestas limitações, diversos trabalhos têm sido feitos na tentativa de discriminar genótipos ou grupos de genótipos dentro do gênero Oryza, envolvendo uma ou mais das frações proteicas.

VILLAREAL & JULIANO (1978) estudaram as

propriedades da fração glutelina de 14 diferentes amostras de arroz. Segundo os autores, embora existisse uma tendência dos grupos japonica e javanica a uma menor fração glutelina do que os grupos indica, intermediários de O.nivara e O.glaberrima, todos os padrões foram similares apresentando uma proporção de 1:1:1 para as três subunidades da fração, indicando pouca possibilidade de se encontrar variantes para a glutelina do arroz.

Então, devido à pequena quantidade de prolamina e pouca variabilidade da fração glutelina, o caminho natural foi o aprofundamento dos estudos da fração solúvel (albumina + globulina). De fato, embora du CROS et alii (1979) tenham estudado o padrão de proteína total do arroz, concluíram que distinções entre cultivares são mais marcantes quando grãos não polidos são usados, acentuando-se assim a importância da fração albumina + globulina, que se encontra em maior quantidade na camada externa do grão. Entretanto, as variações encontradas nem sempre são de mesma magnitude, alguns pesquisadores como SARKAR & BOSE (1984) utilizaram esta fração com sucesso na distinção de cultivares, enquanto outros (KUSAMA et alii, 1984) não puderam distinguir grupos de cultivares com acentuadas diferenças de origem.

## 2.2. Aplicação da eletroforese em estudos genéticos

Ao nível molecular, a informação genética está armazenada em segmentos de ácido desoxirribonucleico. Esta informação é expressa através da transcrição em RNA e subsequente tradução em proteínas. Os genótipos podem se diferenciar uns dos outros na sua composição de DNA a par

tir de mutações, tais como adições, deleções ou substituições nas bases que compõem o DNA ou ainda modificações a nível cromossômico, por recombinações gênicas resultantes de cruzamentos. Estas modificações resultam em alteração do complemento proteico que é traduzido. Estas alterações podem ocorrer na sequência de aminoácidos de uma ou mais proteínas, por adições, deleções ou substituições dos mesmos, ou por novas combinações de proteínas. Portanto, genótipos podem ser distinguidos, pelo menos em teoria, através dos seus complementos proteicos.

Nas últimas décadas, vários procedimentos foram desenvolvidos com base na análise de misturas proteicas através da separação eletroforética de proteínas ou dos seus polipeptídeos constituintes. Moléculas carregadas, quando em solução, tendem a se movimentar quando submetidas a um campo elétrico, e proteínas com diferentes cargas líquidas tenderão a se movimentar com diferentes velocidades. Quando a migração acontece através de um gel, efeitos de restrição à passagem de proteínas em função do diâmetro dos poros do mesmo, são observados. Nesta situação, a migração da proteína ocorre em função da sua carga e também do seu tamanho ou configuração (MAURER, 1971).

As proteínas separadas são detectadas através de procedimentos de coloração apropriados, formando padrões de bandas ou manchas coloridas. Estes procedimentos compreendem substâncias que coram proteínas de todos os tipos (inespecíficos) e outras para proteínas com atividade enzimática específica. As enzimas com mesma atividade catalítica, mas com diferentes configurações espaciais, são denominadas isoenzimas (Markert & Moller; citados por McMILLIN, 1983). Estas proteínas têm sido amplamente explo

radas como marcadores genéticos. O desenvolvimento de um organismo do embrião até o adulto é acompanhado por diferenças na expressão das enzimas necessárias para as vias bioquímicas em diferentes tipos de células, tecidos e órgãos. A complexidade do padrão de expressão enzimática pode ser controlada por locos regulatórios. Esta regulação pode ocorrer nos níveis de transcrição, pós-transcrição, tradução e pós-tradução. Atualmente, pouca informação sobre a regulação gênica em eucariotos existe, entretanto, sistemas isoenzimáticos bem definidos podem auxiliar na elucidação de tais mecanismos( McMILLIN, 1983).

Analisando-se a íntima relação da eletroforese com a detecção de produtos gênicos diferentes, pode-se ter uma idéia dos diferentes campos da genética aos quais ela pode ser adicionada como uma ferramenta útil na resolução dos problemas existentes nestas áreas.

### 2.2.1. Variações interespecíficas

Vários zimogramas de fosfatase ácida foram analisados por PAI et alii(1975). Os autores analisaram extratos de lâmina e bainha foliar de cultivares de arroz pertencentes às espécies O. perennis Moench e O. sativa L., e concluíram que estes são controlados por alelos em três locos, Acp1, Acp2 e Acp3. Em Acp1, sete alelos codominantes foram encontrados, cada um produzindo um grupo de três bandas principais(A,M e C), e três bandas secundárias(a,m e c), e ainda, um alelo recessivo nulo(Acp<sup>nul</sup>). O loco Acp2 apresentou 2 alelos codominantes especificando as bandas Fa(anódica rápida) e Sa(anódica lenta), respectivamente, e um alelo recessivo nulo, Acp2<sup>nul</sup>. No loco Acp3

foram encontrados alelos controlando as bandas B e b, parecendo serem peculiares a O.perennis subespécie barthii, sendo que outros tipos, tanto do grupo perennis como do grupo sativa pareceram possuir alelos nulos.

Outros estudos isoenzimáticos no gênero Oryza, foram realizados por PALANICHAMY & SIDDIQ(1977). A análise dos padrões de peroxidase e esterase indicou que, apesar de similares, os grupos sativa e glaberrima possuem zimogramas específicos para esterase. Os mesmos autores, baseando-se em zimogramas semelhantes entre os tipos cultivados de O.sativa e a forma selvagem asiática O.perennis subespécie balunga, e ainda, o alto índice de similaridade(86,09%) entre estas, acreditam que esta evidência dê mais suporte à proposta de que O.perennis subespécie balunga é o provável ancestral de O.sativa.

Esta visão de aproximação de espécies dentro de um mesmo gênero também pode ser útil em situações onde se deseja obter produtos viáveis de cruzamentos interespecíficos. SULLIVAN et alii(1986) estudaram as proteínas de sementes de várias espécies do gênero Phaseolus, visando detectar uma correlação entre similaridades nos padrões proteicos e compatibilidade em cruzamentos interespecíficos. Os autores salientam que os dados eletroforéticos sozinhos não devem substituir os dados morfológicos e de hibridação, mas eles podem ser muito úteis para reforçar as evidências obtidas nestes.

### 2.2.2. Variações interespecíficas a nível de ploidia

Variações entre espécies relacionadas, mas com diferentes níveis de ploidia, podem ocorrer nos seus padrões proteicos de forma quantitativa, em consequência direta de diferentes dosagens gênicas, como também qualitativamente, em decorrência da presença de genomas adicionais.

O gênero Triticum, por compreender várias espécies cultivadas com diferentes níveis de ploidia, tem sido muito explorado neste sentido. JOHNSON et alii (1967) estudaram os padrões de proteína de espécies  $2n$  e  $4n$  do gênero, através de eletroforese de extratos de semente em gel de poliacrilamida. Foram observadas as homologias entre as espécies em relação às bandas proteicas, pela comparação de cada espécie com o padrão T.dicoccum(AABB). As homologias encontradas foram consistentes com os métodos convencionais na observação das relações de genoma entre os poliplóides de Triticum. T.dicoccoides(AABB) e outros tetraplóides AABB conhecidos apresentaram nove homólogos de albumina de migração rápida, enquanto T.timopheevi(AAGG) e outros tetraplóides AAGG conhecidos apresentaram sete. Os dois grupos de genomas apresentaram cinco bandas de albumina em comum. As subespécies de T.aestivum(AABBDD), hexaplóides, apresentaram 12 homólogos de albumina, 9 dos quais foram também homólogos com os 9 dos tetraplóides (AABB) e 3 atribuídos ao genoma doador (D). Diferenças entre espécies dentro de cada grupo de diferentes genomas tetraplóides e entre subespécies hexaplóides foram restritas às bandas de migração lenta das séries de gliadinas.

Conforme relatado por NAKAI(1977), variações em isoenzimas de esterase e proteína solúvel em diplóides e seus tetraplóides induzidos em várias espécies vegetais, podem ser detectadas através de focalização isoeletrica. A comparação de linhagens diplóides e seus correspondentes tetraplóides revelaram que três diferentes relações existem entre os zimogramas. No primeiro grupo, os diplóides e autotetraplóides têm os mesmos pontos isoelétricos com as mesmas atividades. No segundo, eles têm bandas com mesmos pI(ponto isoelétrico), mas as atividades de algumas bandas são maiores nos autotetraplóides do que nos diplóides. No terceiro grupo, diplóides e autotetraplóides têm algumas bandas com diferentes pI. No padrão de proteína solúvel e esterase foram encontradas as mesmas relações entre diplóides e seus autotetraplóides. Os resultados demonstraram que a duplicação de cromossomos por autotetraploidia trouxe diferenças quantitativas e, em alguns casos, diferenças qualitativas. Em arroz, todas as três situações ocorreram na análise de esterase das várias linhagens observadas, e as situações II e III na análise da proteína solúvel.

Observações específicas no gênero Oryza foram feitas por CHERN & KATAYAMA(1979). Estes autores avaliaram a similaridade entre espécies diplóides, seus híbridos F1, anfiplóides sintéticos e tetraplóides naturais, através da análise de extratos foliares pelos sistemas isoenzimáticos de peroxidase e fosfatase ácida. Os zimogramas de plantas F1 geralmente coincidiram com aqueles obtidos pela mistura de extratos dos parentais. Plantas F1 e seus respectivos anfiplóides sintéticos apresentaram coeficientes de similaridade acima de 96%. Os autores sugerem

que, no grupo de plantas estudado, pode ser assumido que um híbrido diplóide e um tetraplóide derivados da mesma combinação parental têm o mesmo zimograma.

ASINS et alii(1981) estabeleceram um sistema de peroxidase eficiente na distinção entre trigos tetraplóides e hexaplóides. Segundo os autores, no endosperma de trigos hexaplóides existe uma banda da isoenzima denominada "a", ausente nos tetraplóides.

### 2.2.3. Variações intraespecíficas

Desde que Kato, citado por HINATA & OKA(1962), classificou as variedades de arroz(O.sativa L.) em grupo indica e grupo japonica com base na sua esterilidade de F1 e outras diferenças, muitos têm sido os trabalhos visando métodos rápidos de discriminação destes grupos. Várias terminologias surgiram para definir as diferenças entre estes dois grupos e outros grupos intermediários foram descritos. Entretanto, ainda existem divergências entre os autores quanto à denominação destes grupos. Ecótipos(TAKAHASHI,1984), subespécies(SIDDIQ et alii,1972), raças(CHANG,1976) e outras denominações serão tratadas por grupos no presente trabalho.

Uma análise do polimorfismo de três sistemas isoenzimáticos(peroxidase, esterase e fosfatase ácida) foi realizada por SHAHI et alii(1969b) em 21 espécies do gênero Oryza. Poucas espécies apresentaram um zimograma característico, contudo, na análise de O.sativa, os resultados obtidos dos sistemas de peroxidase e fosfatase ácida foram suficientes para promover a distinção entre os grupos indica e japonica. Maiores diferenças puderam ainda

ser observadas pela análise de esterase.

Os padrões de proteína solúvel do arroz foram observados por SIDDIQ et alii(1972) que estudaram variações intra e intersubespecíficas. Os autores observaram que a variação em número e intensidade das bandas dentro dos grupos japonica e javanica foi relativamente pequena comparada com aquela encontrada no grupo indica e intermediários. A ordem de variabilidade observada, em sentido de crescente, foi indica, japonica e javanica. Analisando também a mobilidade das bandas, os autores encontraram que os grupos japonica e javanica tendem a mostrar uma maior porcentagem de proteínas de pouca mobilidade do que o grupo indica, assim reforçando a visão de que os dois primeiros grupos são de origem mais recente que o último.

Com base em índices de similaridade, obtidos da análise de padrões de esterase e peroxidase, alguns autores(PALANICHAMY & SIDDIQ,1977) sugeriram que os grupos japonica e javanica originaram-se do grupo indica, sendo que a maior homogeneidade do grupo japonica pode ser interpretada como sendo este de origem mais recente.

Um estudo amplo envolvendo 3746 variedades de arroz(O.sativa L.) foi realizado por CHERN & KATAYAMA (1982), analisando extratos de lâmina foliar através do sistema isoenzimático de fosfatase ácida. Foram encontrados quatro tipos de zimogramas, J( $Acpl^9/Acpl^9$ ), I( $Acpl^{-4}/Acpl^{-4}$ ), O( $Acpl^{nul}/Acpl^{nul}$ ) e um tipo mutante(M). Nove bandas, sete anódicas e duas catódicas foram encontradas. A banda 1C foi comum a todos os materiais examinados e, portanto, não foi considerada, subsequentemente, no estudo. O gene  $Acpl^9$  controla três bandas principais 1A-3A-5A e três secundárias 2A-4A-6A. Portanto,  $Acpl^9$  corresponde ao grupo

japonica analisado por PAI et alii(1975). O gene  $Acp1^{-4}$  controla três bandas com alta atividade 2C-1A-3A e três secundárias 2A-4A-7A, correspondendo ao zimograma típico de indica estudado por PAI et alii(1975). O gene  $Acp1^{nul}$  indica uma falha no grupo de bandas AMC(PAI et alii,1975). O tipo O apresentou uma banda secundária 7A(Fa), e o tipo M não apresentou o grupo AMC nem a banda 7A. O comportamento genético em cruzamentos recíprocos entre J e I sugere que estes tipos são controlados por um único loco  $Acp1$ , com dois alelos codominantes. O tipo O é controlado por um alelo recessivo  $Acp1^{nul}$ , e o tipo M por dois alelos recessivos  $Acp1^{nul}$  e  $Acp2^{nul}$ .

Uma proteína responsável pela síntese de amilose em arroz, produto do gene "waxy"(Wx), foi estudada por SANO et alii(1986). Estes autores encontraram dois alelos( $Wx^a$  e  $Wx^b$ ) neste loco. Os autores observaram uma correlação entre a presença do alelo  $Wx^b$  e uma baixa concentração de amilose, e sugerem que este tenha sido selecionado junto com esta característica em qualidade de grãos durante a domesticação. Pela comparação dos grupos japonica e indica, foi observado que o primeiro é caracterizado por um menor teor de amilose.

GUO et alii(1986) sugerem que o grupo japonica tenha se originado do grupo indica e que o ancestral direto da espécie cultivada é provavelmente O.sativa L. f. spontanea. Na análise da fração prolamina através de focalização isoelétrica, duas bandas parecem mudar de presença para ausente quando se observa grupos indica e japonica, respectivamente. Segundo os autores, os padrões de focalização isoelétrica de prolaminas do arroz poderiam servir como um indicador bioquímico para análise da quali

dade do arroz e para o estudo da sua evolução.

Métodos simplificados de discriminação de genótipos ou grupos de genótipos baseados na análise de locos isoenzimáticos têm sido descritos. GLASZMANN (1987a) relatou que, em arroz, os genes Pgi-1 e Pgi-2 que codificam as fosfoglucoisomerases, e Amp-1, Amp-2 e Amp-3, que codificam aminopeptidases possibilitaram a discriminação de 3000 variedades em 6 grupos distintos: indica(grupo I); japônica, com formas tropicais e temperadas(grupo VI), e quatro grupos marginais restritos ao norte do subcontinente indiano(grupos II a V).

Em outro trabalho, o mesmo autor estudou 15 locos polimórficos codificando para oito enzimas em 1688 cultivares tradicionais de arroz (O.sativa L.) da Ásia (GLASZMANN, 1987b). O autor estabeleceu 6 grupos entre as variedades: dois principais(grupos I e VI), dois pequenos (II e V), e dois satélites(III e IV). Baseado na analogia com outras classificações, o grupo I pode ser considerado como o grupo indica e o grupo VI como o grupo japônica. Entretanto, segundo o próprio GLASZMANN, estes termos têm sido usados de forma contraditória entre as várias classificações existentes.

#### 2.2.4. Identificação de cultivares

A análise eletroforética tem sido usada com muito sucesso na identificação de cultivares, tendo sido estabelecida em muitos países como método de rotina para análise de pureza de lotes de sementes, bem como em casos de registro de cultivares. A análise de proteínas tem sido realizada tanto em proteínas catalíticas como não catalíticas.

#### 2.2.4.1. Padrões de proteínas não catalíticas

Uma ampla revisão sobre as proteínas de reserva em leguminosas, legumina e vicilina, foi realizada por DERBYSHIRE et alii(1976). Estes autores tecem considerações sobre a estrutura, localização e distribuição destas proteínas na semente. Um amplo polimorfismo quanto a relação de proporções das diferentes proteínas de reserva entre espécies ou entre diferentes variedades de uma mesma espécie foi encontrado.

Distinções entre cultivares de arroz pela análise de polipeptídeos e de proteína total foram relatadas por du CROS et alii(1979). Estes autores concluíram que as diferenças são acentuadas quando são analisados grãos não polidos, em comparação com amostras extraídas de grãos não polidos.

Uma grande aplicabilidade do método desenvolvido por BUSHUK & ZILLMAN(1978) de eletroforese em gel ácido de poliacrilamida, foi constatada por MARCHYLO & La BERGE(1980). O método foi utilizado com eficiência na caracterização de cultivares de cevada, através das diferenças em padrões proteicos da fração hordeína, utilizadas no Canadá.

Analisando a composição polipeptídica de cultivares de arroz, AIRES-SILVA(1981) demonstrou que métodos eletroforéticos podem ser utilizados para detectar diferenças entre amostras, inclusive variedades tradicionais, linhagens novas produzidas em programas de melhoramento e também amostras empregadas em estudos nutricionais.

Os padrões proteicos de seis linhagens e variedades brasileiras de feijão (Phaseolus vulgaris) foram comparados por DERBYSHIRE et alii (1981), através do emprego de eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida. Segundo os autores, nenhuma diferença foi detectada entre os padrões de linhagens intimamente relacionadas, entretanto os padrões das linhagens de diferentes variedades não foram idênticos.

BARRIGA et alii (1983) utilizaram os métodos de BUSHUK & ZILLMAN (1978) e ZILLMAN & BUSHUK (1979), com algumas modificações para diferenciar cultivares de trigo. Os autores acreditam que a técnica é eficiente e pode ser utilizada amplamente na identificação de cultivares a nível oficial.

Os padrões de peptídeos da fração globulina do embrião de milho, segundo CROSS & ADAMS (1983), são distintos para cada linhagem endogâmica e podem ser usados como parte de testes de identificação.

Diferenças qualitativas e quantitativas na composição de proteínas solúveis (albumina + globulina) do arroz, foram observadas por SARKAR & BOSE (1984) nos padrões obtidos por análise eletroforética. Segundo os autores, o fato de cada variedade ter apresentado o seu próprio padrão, é um bom indicador da utilização do método para identificação de cultivares.

KUSAMA et alii (1984) observaram padrões de polipeptídeos da fração albumina + globulina de sementes de arroz descascadas. As cultivares analisadas pertenciam ao grupo japonica não glutinoso e ao grupo indica, e, apesar das diferenças de origem, não foram encontrados padrões polipeptídicos característicos.

As composições de gliadinas em extratos de uma semente e de uma mistura de sementes em trigo, foram comparadas por LOOKHART(1985), através de análise eletroforética. Segundo o autor, algumas vezes a heterogeneidade encontrada nas cultivares puras utilizadas representa biótipos e não é o resultado de cruzamentos naturais ou misturas. As cultivares utilizadas mostraram alguma variabilidade em padrões de bandas entre locais e entre sementes individuais, a extensão desta diferindo para cada cultivar.

A análise de proteínas do embrião de arroz permite um melhor conhecimento da afinidade genética de variedades do que aquele obtido de caracteres morfológicos (ALIAGA-MORELL et alii, 1987). Variedades com alto índice de proximidade morfológica são ainda discriminadas pela análise de proteína de embriões, o que confirma que estas últimas são um bom reflexo do genótipo do indivíduo, e portanto, uma útil ferramenta no estudo taxonômico.

#### 2.2.4.2. Padrões de isoenzimas

Um estudo amplo, envolvendo 776 variedades nativas de arroz (O. sativa L.) do Japão e introduzidas de sítios de coleta de vários países da Ásia, foi realizado por NAKAGAHRA et alii(1975). Na análise de isoenzimas de esterase em tecidos foliares foram detectadas 14 bandas anódicas(1A,2A,...,14A). Destas, nove bandas(1A,2A,6A,7A, 10A, 11A,13A e 14A) foram facilmente distinguíveis e sua combinação estabeleceu 27 tipos diferentes, indicando a presença de uma ampla variação.

Vários sistemas isoenzimáticos, álcool desidrogenase, catalase, peroxidase, esterase e fosfatase ácida

foram analisados por HEIDRICH-SOBRINHO(1982) em nove linhagens de milho. Segundo o autor, somente as diferenças encontradas no sistema de esterase já foram suficientes para distinguir as linhagens, entretanto, para a análise de um maior número de genótipos, os outros sistemas podem se tornar necessários.

A variabilidade aloenzimática entre extratos de plântulas de linhagens e híbridos de milho foi estudada por CARDY & KANNENBERG(1982), através de 12 sistemas . Os autores mostram que existe uma variabilidade adequada para identificação de cultivares e que a variabilidade existente em 22 locos foi suficiente para distinguir, como entidades individuais, 88 linhagens e 146 híbridos.

Estudos em mandioca, visando a obtenção de marcadores genéticos foram desenvolvidos por RAMIREZ et alii(1987). Entre os 16 sistemas observados, quatro enzimas: ACP(fosfatase acida), EST(esterase), GOT( glutamato oxalacetato transaminase) e PGI(fosfoglucoisomerase) apresentaram diferenças em padrões eletroforéticos as quais poderiam ser usadas como marcadores genéticos. A esterase mostrou-se com uma grande variação na zona de migração rápida, com pouca variação entre diferentes tecidos, sendo selecionada como marcador para uso de rotina na identificação de cultivares.

TOMAR & CHAUDHARI(1987) sugeriram o uso de isoenzimas de ribonuclease como marcadores genéticos para a diferenciação de variedades de grãos dormentes e não dormentes em arroz. Os autores observaram a ocorrência de 6 bandas de ribonuclease I, sendo que as bandas 3 e 4 foram específicas para variedades de grãos dormentes. Para ribonuclease II, foram observadas 3 bandas, sendo que a banda 3

mostrou-se também específica para variedades de grãos dormentes.

#### 2.2.5. Predição de heterose

As diferenças em padrões proteicos entre indivíduos podem servir como indicadores da capacidade de combinação entre estes, quanto ao vigor de híbrido no produto do seu cruzamento. Entretanto, os resultados obtidos por vários pesquisadores demonstram que a eficiência da predição baseada nestas características é variável.

Vários sistemas isoenzimáticos foram analisados por HUNTER & KANNENBERG(1971) em milho. Os autores concluíram que o índice de diversidade enzimática não pode ser utilizado sozinho na predição de capacidade específica de combinação entre linhagens, mas este pode servir como uma ferramenta a mais na seleção, uma vez que, quando comparados em classes, os cruzamentos em que os progenitores apresentavam um maior índice de diversidade, produziram híbridos superiores.

A correlação entre alelos codominantes de isoenzimas como marcadores de diversidade genética e heterose foi analisada, em milho, por HEIDRICH-SOBRINHO & CORDEIRO(1975). Embora apenas oito locos tenham sido estudados, os autores encontraram uma boa correlação entre os índices de diversidade genética e capacidade geral de combinação.

O comportamento de isoenzimas de esterase em sementes de arroz e sua relação com peso de grãos foram estudados por GUPTA & SINGH(1977). Quatro bandas catódicas foram encontradas(C1,C2,C3,C4), e os padrões de zimogramas

indicaram diferenças de intensidade entre estas bandas em variedades de grãos estreitos ("fine grain") e de grãos largos ("coarse grain"). As bandas C1 e C2 foram fortes nas variedades de grãos tipo "fine", enquanto C3 e C4 foram fortes nas de tipo "coarse". Estas bandas, específicas do endosperma, mostraram-se diferentes quanto à atividade metabólica, sendo C3 e C4 mais ativas que C1 e C2, contribuindo mais significativamente para o peso de grãos. Foi observado um efeito heterótico em cruzamentos do tipo "coarse"x"fine" e, segundo os autores, este efeito pode ser explicado pela presença das quatro bandas no genótipo híbrido. Também foi observado que a intensidade das bandas era dependente não somente da atividade como também da dosagem gênica na qual a banda foi produzida.

O grau de associação entre a porcentagem de similaridade entre linhagens de milho, baseada em análise eletroforética de três sistemas isoenzimáticos, e a produção de híbridos de seus cruzamentos aos pares, foi avaliado por GONELLA & PETERSON(1978). Foram obtidas as correlações entre as médias de produção dos híbridos e a porcentagem de similaridade de seus parentais(-0,42) e entre a porcentagem de similaridade e capacidade específica de combinação(-0,32). Embora os valores absolutos destes coeficientes não sejam altos, o sinal indica que maiores produções estariam associadas com maiores diversidades genéticas. Contudo, os autores concluíram que a utilidade destes sistemas na predição de heterose é muito pequena ou impraticável.

Um estudo populacional envolvendo a variabilidade enzimática em milho foi realizado por CHEVALLIER & DATTEE(1984). Foram observadas 29 populações-variedades da América Latina, 27 africanas e 1 composto denominado de Y,

através de oito sistemas isoenzimáticos. Os autores encontraram uma tendência de ligação entre heterose e distância entre as variedades estudadas. Foi observado que as variedades mais distantes do composto Y apresentaram, no cruzamento com este, um efeito de heterose. Entretanto, os autores acreditam que a heterose é um fenômeno controlado por um grande número de mecanismos biológicos, para ser abordada unicamente sob um aspecto bioquímico e mais precisamente diversidade isoenzimática.

Os padrões de esterase em embriões de arroz (O.sativa L.) de 114 combinações de linhagens macho-estéreis, mantenedoras, restauradoras e seus híbridos, foram relatados por YI et alii(1984). Foram descritas seis bandas principais denominadas 1A,3A,4A,5A,6A e 7A. Os zimogramas foram diferentes para os três tipos de linhagens e sete tipos diferentes de zimogramas foram encontrados nos híbridos. Os híbridos mostraram bandas complementares quando uma linhagem macho-estéril com banda 6A e uma restauradora com banda 3A ou 5A foram utilizadas como pais. Híbridos com bandas 3A e 6A complementares tiveram crescimento vegetativo vigoroso, enquanto aqueles com 5A e 6A complementares tiveram altas produções por planta. Foi ainda observado que o padrão do híbrido é influenciado pelo citoplasma e núcleo dos parentais.

Várias linhagens de milho foram comparadas por FREI et alii(1986) para testar o uso de alozimas como marcadores genéticos, visando prever a performance de cruzamentos. Ao todo, 21 locos em 406 linhagens foram observados e os autores encontraram uma associação geral entre diversidade de alozimas e produções altas, mas a segurança destas predições depende do "background" genealógico das

linhas.

#### 2.2.6. Controle genético de isoenzimas

O controle genético de isoenzimas de peroxidase foi investigado por SHAHI et alii(1969a) em zimogramas de híbridos entre linhagens de O.sativa e seu progenitor selvagem, a forma asiática de O.perennis. Os autores encontraram dois locos independentes, um tendo dois alelos  $Pe^{2A}$  e  $Pe^{4A}$ , especificando bandas 2A e 4A, respectivamente, produzindo em heterozigotos uma banda dimérica híbrida, 3A. O outro loco teve alelos  $Pe^{4C}$  e  $pe^{4C-}$ . O primeiro especificou uma banda 4C, enquanto o outro não produziu banda ativa. Os autores sugerem a presença de um gene regulador( $R^{4C}$ ), reprimindo a banda 4C.

ENDO et alii(1971) observaram extratos de palea, lema e bainha foliar de duas espécies de Oryza (O.sativa e O.perennis), através do sistema isoenzimático de fosfatase ácida. As plantas P1 apresentaram uma banda principal 3A, e, no mínimo, quatro bandas secundárias, 4A', 2A, 1A e 1C. As plantas P2 apresentaram uma banda principal 5A, e, no mínimo, cinco bandas secundárias, 6A, 4A', 3A', 2A e 1A. Nas plantas F1, três bandas principais 5A, 4A e 3A, e, no mínimo, quatro secundárias 6A, 2A, 1A e 1C foram detectadas. A banda 4A das plantas F1 foi sugerida como um dímero híbrido entre 3A e 5A de P1 e P2, respectivamente. Segundo os autores, as diferenças isoenzimáticas entre os dois zimogramas correspondem aos alelos presentes nos locos Acp1 e Acp2. O zimograma típico do grupo indica foi especificado por  $Acp1^{3A}$  e  $Acp2^{1C}$ , enquanto o zimograma do grupo japonica foi especificado por  $Acp1^{5A}$  e  $Acp2^0$ .

Em Arabidopsis thaliana, 84 raças foram utilizadas por JACOBS & SCHWIND(1973) para um estudo de controle do sistema isoenzimático de fosfatase ácida. Foram observados dois locos, AP-1 e AP-2, sendo o AP-1 mais ativo e de detecção mais rápida. Não foi encontrada variação intrarracial para AP-1, indicando que cada raça pode ser considerada homozigota para o loco AP-1. Três tipos de variantes da enzima codificada como AP-1 foram encontrados: F(rápido), I(intermediário) e S(lento), sendo que cada tipo compunha-se de quatro subunidades: uma principal(maior atividade), duas com migração mais lenta que a principal e uma com migração mais rápida que esta. Estas subunidades espalham-se num espaço equivalente ao dobro da distância entre dois tipos sucessivos, de modo que os padrões de I e S, e I e F se sobrepõem. Este arranjo paralelo sugere que uma mudança de carga de todos os componentes do grupo pode ser resultante de um evento simples em um gene controlando a fosfatase ácida e que as formas moleculares múltiplas desta enzima são produtos do mesmo gene. O padrão dos híbridos heterozigotos apresenta ambos os grupos de isoenzimas de cada parental homozigoto, sendo que alguns híbridos apresentam seis bandas ao invés de oito devido a uma sobreposição de bandas. Nas gerações F<sub>2</sub>, todos os tipos possíveis para cada cruzamento(FxS, FxI, IxS) foram encontrados nas progênes em proporções próximas a 1:2:1, concordando com a conclusão de que os variantes das enzimas AP-1 são controlados por três alelos em um loco(AP<sup>F</sup>, AP<sup>I</sup> e AP<sup>S</sup>), agindo sem dominância.

Sete linhagens de O. perennis e três linhagens de O. sativa foram analisadas por PAI et alii(1973) para a presença de isoenzimas de peroxidase nos tecidos de lâmina, bainha foliar, palea e lema. Foram encontradas as ban

das OC, 2A e 4A, especificadas por alelos codominantes  $Px1^{OC}$ ,  $Px1^{2A}$  e  $Px1^{4A}$ , respectivamente. Os dois últimos correspondem aos alelos  $Pe^{2A}$  e  $Pe^{4A}$ , respectivamente, descritos por SHAHI et alii(1969). Estes alelos produziram bandas híbridas 1A(entre OC e 2A) e 3A(entre 2A e 4A) em seus heterozigotos. Uma outra banda denominada 4C, especificada por um gene dominante( $Px2^{4C}$ , anteriormente  $Pe^{4C}$ ), independente dos alelos  $Px1$ , observada por SHAHI et alii(1969), foi encontrada. Esta banda mostrou-se específica de tecido para cada genótipo. Os autores sugerem a presença de um gene dominante denominado  $R_{LS}^{4C}$  ("leaf-sheath") reprimindo a presença de 4C na bainha foliar e  $R_{LB}^{4C}$  ("leaf-blade") na lâmina foliar.

Uma investigação envolvendo 1095 cultivares de arroz(*O.sativa* L.) foi realizada por NAKAGAHRA(1977). Examinando tecidos foliares através do sistema isoenzimático de esterase, este autor descreveu três locos envolvendo cinco alelos dominantes e dois nulos. A banda de menor mobilidade(1A) foi específica para um alelo dominante no loco Est1. O segundo grupo de bandas, 6A e 7A, foi controlada por alelos codominantes,  $Est2^S$  e  $Est2^F$  no loco Est2, onde ainda foi encontrado um alelo nulo. O terceiro grupo de bandas, 12A e 13A, foi controlado por alelos codominantes,  $Est3^S$  e  $Est3^F$ , no loco Est3.

Várias formas da enzima álcool desidrogenase foram descritas por SCANDALIOS(1977) em milho. Ao todo, cinco formas foram detectadas durante o desenvolvimento do grão. Destas, somente as formas mais comuns(ADH-1 e ADH-2) foram estudadas a fundo do ponto de vista genético. Foram encontrados dois variantes eletroforéticos para cada uma das duas isoenzimas, um relativamente rápido e um relativamente

lento(Scandalios ; citado por SCANDALIOS,1977). Foi encotrada uma ligação entre variantes de mesmo tipo, normalmente sendo observada uma linhagem endógama contendo os dois variantes rápidos das duas enzimas ou os dois variantes lentos. Heterozigotos entre tais variantes resultam em grãos que expressam codominantemente os tipos parentais, mas também uma enzima híbrida é encontrada na posição da ADH-2. O autor assume a existência de dois locos, adh-1 e adh-2, cada um com dois alelos, adh-1<sup>F</sup> codificando para o variante rápido e adh-1<sup>S</sup> para o variante lento de adh-1, o mesmo ocorrendo para adh-2<sup>F</sup> e adh-2<sup>S</sup>, de adh-2. Também foi encontrado um efeito de dosagem gênica nos heterozigotos dependendo da direção do cruzamento. Este efeito ocorre em consequência da natureza triplóide do endosperma, onde a contribuição materna é o dobro da paterna. Assim o cruzamento F<sub>1</sub> x S<sub>1</sub> resulta em um padrão no híbrido com uma concentração de atividade nas bandas rápidas, ocorrendo o inverso no cruzamento recíproco.

Também em milho, um controle genético foi proposto por GOODMAN et alii(1980) para o sistema de desudidrogenase málica. Foram encontrados pelo menos seis locos envolvidos, sendo três deles(Mdh1, Mdh2 e Mdh3) independentes e localizados principalmente na mitocôndria. Um alelo recessivo(mmm) localizado em um quarto loco no núcleo causa um aumento na mobilidade eletroforética das isoenzimas codificadas pelos três locos citados. Dois locos, Mdh4 e Mdh5, governam isoenzimas que são seletivamente inativadas por homogeneização com solução de ácido ascórbico e parecem ser não mitocondriais. Mdh4 e Mdh5 segregam independentemente entre si e de Mdh1, Mdh2 e Mdh3. Contudo foi observada uma forte ligação entre Mdh4 e o modificador de migração. Ale

los múltiplos foram encontrados em todos os locos, exceto no loco modificador de migração e alelos nulos foram encontrados em todos os locos, exceto em *Mdh4*. Foram observados heterodímeros inter e intra gênicos, formados entre as subunidades especificadas pelos três locos governando as enzimas mitocondriais. As mesmas interações alélicas e não alélicas foram observadas nos dois locos governando as variantes solúveis. Não foram constatados heterodímeros entre isoenzimas mitocondriais e solúveis.

ENDO(1981) analisou o sistema de peroxidase em linhagens selvagens e cultivadas de arroz, em extratos de palea, lema, lâmina e bainha foliar. As duas linhagens cultivadas de *O. sativa* mostraram-se homozigotas para o alelo  $Px^{2A}$  e apresentaram uma banda anódica de migração lenta (2A), enquanto que das três linhagens selvagens da espécie *O. perennis*, uma era homozigota para o alelo  $Px^{2A}$  e as outras duas para o alelo  $Px^{4A}$ , apresentando uma banda anódica de migração rápida (4A). Em indivíduos heterozigotos, tendo genótipo  $Px^{2A}Px^{4A}$ , três bandas de isoenzimas apareceram (2A, 3A e 4A). Diferenças distintas na proporção de intensidade das bandas foram observadas, e 5 classes foram estabelecidas. O autor sugere a presença de um gene receptor mutante (região de sítios promotores), adjacente ao loco *Px-1* e dois locos com genes reguladores independentes do loco *Px-1* influenciando esta herança.

#### 2.2.7. Controle genético de proteínas não catalíticas

Estudos sobre a localização dos genes estruturais da fração de prolaminas (secalinas) da proteína de

reserva do centeio e suas relações de ligação foram feitos por SHEWRY et alii(1984). As subunidades de secalina divi dem-se em HMW-secalina(alto peso molecular), 75k gama-secalina e ômega-secalina. Foram analisadas três linhagens endó gamas quanto à presença de três bandas: 1(HMW-secalina), 2 (75k gama-secalina) e 3(ômega-secalina). As linhagens foram caracterizadas como +(presença da banda) ou -(ausência da banda), sendo as linhagens 133, 48A e 48B,(+--),(--+) e (--+), respectivamente, quanto as bandas 1,2 e 3. A geração F2 do cruzamento 133x48A apresentou uma segregação não diferente de 9:3:3:1, para a análise de bandas 1 e 2, e 2 e 3, o que concordou com os dados obtidos no mesmo trabalho em que os genes estruturais para a banda 2 foram localizados no cromossomo 2R e aqueles para bandas 1 e 3, no cromossomo 1R. Em contraste, os resultados de ambos os cruzamentos mostraram ligação significativa entre as bandas 1 e 3. Os autores concluíram que as secalinas são governadas por alelos codominantes localizados em, no mínimo, três locos em dois diferentes cromossomos.

### 2.3. Heterose

A heterose é um fenômeno detectável no híbrido resultante do cruzamento de dois indivíduos. A magnitude da heterose é variável em função da combinação dos parentais.

O estudo da heterose, embora tenha tido o seu grande avanço após a redescoberta das leis de Mendel, vinha chamando a atenção dos pesquisadores há muito tempo. Estas idéias, ainda desprovidas de base genética clássica, muito contribuíram para a evolução do pensamento sobre o

assunto.

Segundo ZIRKLE(1952), o primeiro indivíduo híbrido em plantas foi descrito em 1716, e durante os quarenta e cinco anos seguintes, muitas descrições de plantas híbridas foram publicadas. Entretanto, os trabalhos encontrados careciam de uma base científica mais sólida. Um trabalho mais científico, relatando a hibridação de uma maneira mais sistemática foi publicado em 1766 por Koelreuter , citado por ZIRKLE(1952). Este pesquisador observou, entre outras coisas, vigor de híbrido em cruzamentos interespecíficos em Nicotiana, Dianthus, Verbascum, Mirabilis, Datura e outros gêneros(ZIRKLE,1952). Em 1793, Sprengel detalhou a estrutura de flores e mostrou como a autofecundação poderia ser evitada(ZIRKLE,1952). Em 1799, Knight, citado por ZIRKLE(1952), descreveu o vigor de híbrido como uma consequência normal do cruzamento de variedades e desenvolveu o seu princípio de antiendogamia. Em 1865, Naudin, citado por ZIRKLE(1952), encontrou vigor de híbrido em 24 cruzamentos dentre os 35 que havia realizado. Seus resultados em Datura foram espetaculares. Em cruzamentos recíprocos entre D. stramonium e D.tatula, a progênie apresentou o dobro da altura dos pais. DARWIN(1877), observando os efeitos sobre vigor de planta para várias características resultantes de fecundação cruzada e autofecundação em várias espécies vegetais, contribuiu muito para o pensamento da época.

No início do século XX, East e Shull, paralelamente, começaram a estudar os efeitos de autofecundação e fecundação cruzada em milho. Em 1912, East & Hayes, citados por HAYES(1952), levantaram o valor prático da heterozigose. East, citado por SHULL(1948), apresentou um con

ceito mendeliano de interação de alelos em um mesmo loco para explicar a heterose, onde dois alelos de um gene em particular tivessem desenvolvido uma função fisiológica divergente.

### 2.3.1. Dominância e Sobredominância

Desde os primeiros estudos visando explicar o vigor de híbrido e a depressão por endogamia em termos mendelianos, duas são as hipóteses principais. A primeira está baseada nas relações entre dominância e um efeito favorável, e entre recessividade e um efeito desfavorável. Deste modo, no cruzamento de genótipos distantes entre si, um grande número de locos seriam preenchidos por pelo menos um alelo dominante, oriundo em alguns locos do parental masculino e em outros do parental feminino. Esta complementação seria responsável pelo vigor de híbrido (Davenport; Keeble & Pellew; Wright; citados por CROW, 1952). Neste caso, entretanto, poder-se-ia argumentar que uma vez reunidos todos os alelos dominantes em um indivíduo homozigoto, este seria tão vigoroso quanto o híbrido. Contudo, esta situação ainda não foi obtida, o que faz com que se acredite não ser esta uma hipótese válida para todos os genes ou ainda na ocorrência de uma estreita ligação entre alelos favoráveis e desfavoráveis, dificultando assim uma recombinação neste sentido.

A hipótese da sobredominância sugere que o híbrido supera os pais pela vantagem da heterozigose em si. Stadler, citado por CROW (1952), observou que entre alelos R, em milho, certos heterozigotos têm mais áreas pigmentadas do que qualquer um dos homozigotos, e su

geriu que situações semelhantes poderiam ocorrer em locos diretamente ligados à produção.

Atualmente há uma tendência a se aceitar as duas teorias, podendo a heterose ser o produto de interações ocorrendo nas duas formas.

### 2.3.2. Modelo de heterose a nível molecular

Evidências favorecendo uma ou outra hipótese, dominância ou sobredominância, existem para várias características morfológicas. Um modelo com base molecular foi proposto por SCHWARTZ & LAUGHNER(1969). Estes autores sugeriram que, em milho, três diferentes alelos da enzima álcool desidrogenase(Adh1)  $Adh1^S$ ,  $Adh1^F$  e  $Adh1^{C(t)}$  interagem da seguinte maneira: os alelos especificam enzimas que diferem em carga, mas que em grãos maduros têm igual intensidade quando presentes na forma de autodímeros, enquanto que na forma de alodímero apresentam uma intensidade duas vezes maior. Um quarto alelo  $Adh1^{C(m)}$ , produz uma enzima que tem a mesma mobilidade eletroforética daquela correspondente ao alelo  $Adh1^{C(t)}$ , entretanto, é muito menos ativa. Estudos das propriedades físico-químicas das proteínas revelaram que a isoenzima  $C^m C^m$  difere essencialmente das isoenzimas codificadas pelos outros três alelos na sua estabilidade em pH alto. Os autores propuseram que o vigor de híbrido pode, em parte, resultar da combinação em indivíduos heterozigotos, de alelos para enzimas ativas mas relativamente instáveis com alelos os quais especificam enzimas estáveis mas inativas, e que os produtos gênicos interagem conferindo estabilidade e atividade a enzima híbrida, o que concorda com a hipótese da sobredominância.

### 2.2.3. Heterose e divergência genética

A heterose, por se tratar de um fenômeno de corrente da interação de diferentes alelos, tende a ser maior quanto maior o número de diferenças alélicas entre os pais, o que leva a conclusão de que quanto mais distanciados os pais, maior a heterose. Entretanto, existe um limite além do qual a distância entre os pais deixa de ser benéfica. MOLL et alii (1965) estudaram esta relação entre divergência genética e heterose em milho. Os autores observaram o produto do cruzamento de 8 variedades de quatro regiões: Sudeste e Centro-oeste dos Estados Unidos, Porto Rico e Sul do México, sendo duas variedades de cada região. O grau de diversidade genética entre as populações parentais foi obtido de uma avaliação de relações ancestrais e separação geográfica com adaptação a diferentes ambientes. Os parentais e gerações F1 e F2 foram cultivados nas quatro regiões de adaptação de modo a isolar a relação entre heterose e divergência genética. Os autores observaram que a heterose elevou-se com um aumento da divergência até um limite, além do qual cruzamentos extremamente divergentes mostraram uma diminuição na heterose. ARUNACHALAM & BANDYOPADHYAY (1984) estudaram os limites de divergência genética para ocorrência de heterose em Arachis hypogaea L. e Brassica campestris L. A divergência genética foi estudada pelo  $D^2$  e a divergência entre os pais foi dividida em quatro classes: DC-1 ( $D^2 \geq (m+s)$ ); DC-2 ( $D^2 < (m+s)$  e  $\geq m$ ); DC-3 ( $D^2 \geq (m-s)$  e  $< m$ ) e DC-4 ( $D^2 < (m-s)$ ). Os autores encontraram que, se  $\bar{m}$  e  $\bar{s}$  são a média e o desvio padrão dos valores de divergência (dados por  $D^2$ ) entre os pais, as chances para a

ocorrência de uma alta frequência de cruzamentos heteróticos e com altos valores de heterose são maiores quando os parentais são escolhidos tendo uma divergência entre si dentro do intervalo  $(m-s, m+s)$ , comparando com os cruzamentos entre parentais cuja divergência excede este intervalo.

#### 2.3.4. Indicadores de heterose em arroz

Várias características morfológicas e fisiológicas podem contribuir para que a produção de um híbrido seja elevada ou reduzida. Deste modo, vários pesquisadores estudam a direção das correlações entre estas características e produção, de modo que a heterose possa ser explorada cada vez mais. KAWANO et alii (1969) estudaram caracteres vegetativos em híbridos de arroz. Após 7 semanas do transplante, todas as plantas híbridas apresentaram um peso maior que a média dos pais. Para as características de teor de nitrogênio na planta, área foliar, taxa de peso de raízes/peso total, número de perfilhos e comprimento de folha, a maioria dos híbridos analisados mostrou valores superiores à média dos pais e mais da metade deles excedeu o maior pai. Foi encontrada uma correlação positiva entre o grau de heterose medida em peso de planta em estágios iniciais e esterilidade. Contudo, foram obtidos alguns híbridos altamente férteis que mostraram uma heterose considerável. Segundo os autores, a maior parte da heterose em arroz pode ser decorrente de um aumento de vigor vegetativo. Alta produção de grãos nos híbridos, segundo os mesmos, pode ser esperada em espaçamentos não-econômicos ou em misturas genéticas, mas, em estandes puros com condições convencionais de campo, isto não parece provável.

CHANG et alii(1973) encontraram valores de F1 superiores à média dos pais em altura de planta, número de panículas e produção de grãos por planta. Entretanto, heterobeltiose (superioridade sobre o maior pai) não foi observada. No F2, não foi detectada depressão por endogamia para nenhuma das características componentes da produção de grãos. Segundo os autores, a ausência de heterobeltiose e depressão por endogamia podem ser atribuídas principalmente a efeitos aditivos de genes controlando os componentes da produção. Também a esterilidade de espiguetas em três cruzamentos contribuiu para a dificuldade na detecção de heterose.

Várias combinações de cruzamentos foram avaliadas por MURAYAMA et alii(1974), em 4 diferentes condições culturais. Os autores observaram uma grande correlação entre produção de grãos, número de espiguetas por panícula e altura de colmo nas quatro condições observadas. BALDI & MALAGONI(1975) estudaram o comportamento de 22 híbridos do tipo japônica x japônica e 17 híbridos indica x japônica em confronto com seus progenitores, a fim de verificar o grau de heterose em condições agronômicas normais. Foi encontrada uma heterobeltiose para altura de colmo, comprimento de panícula e número de panículas por planta. A nível de caracteres vegetativos, o grau de heterose foi constantemente superior em cruzamentos indica x japônica em comparação com os cruzamentos japônica x japônica. Para o caráter produção, a heterose não foi alta, confirmando a perda relativa quando se cultiva o híbrido em condições padrões ao invés de em maiores espaçamentos. DZUBA(1975) observou uma alta correlação ( $r=0,96$ ) entre peso de grãos por panícula e número de grãos por panícula, também entre peso de grãos e com

primento de panícula( $r=0,72$ ) e ainda entre altura de planta e comprimento de panícula( $r=0,77$ ). KUMAR & SAINI(1980) estudaram o tipo de ação gênica atuante na herança de vários caracteres quantitativos em parentais, F1, F2, B1, B2 e F3 de dois cruzamentos intervarietais. Foram observados altura de planta, número de panículas por planta, comprimento de panícula, número de grãos por panícula, peso de 100 grãos e produção por planta. Segundo os autores, a análise dos componentes de variância indicou a presença de efeitos de dominância. Não foram detectados efeitos epistáticos. Em alguns caracteres como número de grãos por panícula e comprimento de panícula ainda foi detectada a importância de efeitos aditivos além de efeitos de dominância. KAUL & KUMAR (1982) analisaram as relações entre várias características em arroz. Entre as características de interesse econômico, os autores encontraram correlações positivas entre produção de grãos, número de perfilhos e altura de planta, enquanto que entre produção de grãos e largura de grãos, uma correlação negativa foi encontrada. Uma contradição parece existir na correlação entre número de perfilhos e produção, alguns pesquisadores colocando-a como positiva e outros como negativa.

VIRMANI et alii(1982) estudaram a manifestação de heterose em híbridos de arroz no IRRI( International Rice Research Institute). Segundo estes autores, foram observadas, para o caráter produção, heterose e heterobeliose em magnitudes de 73% e 59%, respectivamente, e heterose padrão de 43%. Os híbridos mostraram-se mais resistentes ao acamamento, embora fossem em média 5-10 cm mais altos. Os autores observaram que a heterose em produção foi devida principalmente ao aumento do número de espiguetas por paní

cula e um maior peso de 1000 grãos encontrados nos híbridos. Estes, contudo, foram inferiores a seus pais e variedades comerciais em número de panículas por unidade de área. Esta redução do perfilhamento nos F1 foi compensada pelo aumento do número de espiguetas por panícula e, consequentemente, os híbridos mostraram heterose positiva para espiguetas por m<sup>2</sup>. ANANDAKUMAR & RANGASAMY(1985) estudaram a heterose em alguns cruzamentos de arroz. Os autores observaram, além de heterobeltiose, a heterose padrão que foi denominada o desvio da média do híbrido em relação ao melhor entre todos os parentais utilizados no experimento, para o caráter analisado. Quatro cruzamentos dos que exibiram heterose padrão para produção, ainda mostraram heterose padrão para número de perfilhos. Dois dos cruzamentos mostraram heterose padrão para comprimento da folha bandeira em adição à produção. Para produção de grãos, foi obtida uma heterobeltiose entre -76,1% e 97,6% e uma heterose padrão variando entre -51,2% e 52,4% . SARDANA & BORTHAKUR(1985) estudaram a magnitude e extensão da heterose em ideótipos de diversas origens em arroz. Foram observados vários índices de heterose na comparação de 10 F1 e seus 5 parentais. Quando comparados com o melhor pai, 8 híbridos mostraram heterose positiva para produção de grãos, e valores máximos de heterose (152,98%) e heterobeltiose(128,85%) foram encontrados no cruzamento "Pizum" x "Jaya". Os autores sugerem que os níveis heteróticos encontrados podem suportar economicamente o uso de cultivares híbridas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

Foram utilizadas para este trabalho, cinco cultivares brasileiras de arroz: Agulha, Guedes, Bico Gan ga, Prató e Nuglin 24, e duas japonesas: Senshou e Kazusa Wase, pertencentes à coleção de germoplasma do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Quei roz"(ESALQ), USP. As sementes da cultivar Agulha foram ori ginalmente obtidas do Instituto Agrônomo de Campinas(IAC) e as sementes das demais cultivares brasileiras foram obti das do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão da Em presa Brasileira de Pesquisa Agropecuária(CNPAP/EMBRAPA) . As sementes das cultivares japonesas foram obtidas de multi plicações de sementes originalmente introduzidas da Estação Experimental de Arroz de Sequeiro do Ministério da Agricul tura do Japão.

#### 3.2. Métodos

##### 3.2.1. Análise do grão

##### 3.2.1.1. Preparo da farinha e extração de proteína

A casca e o embrião de pelo menos 10 cario pses das cultivares de arroz foram retiradas, sendo o mate rial restante triturado com o auxílio de um pilão e um almo

fariz, obtendo-se então a farinha do endosperma. Para a extração de proteínas, utilizou-se 40mg desta farinha para cada mililitro de solução de tampão fosfato salina (PBS) com  $\text{pH} = 7,2$ . A extração foi feita por agitação das amostras por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após a extração, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a  $27000\text{ g}$  a  $0^{\circ}\text{C}$  em centrífuga refrigerada (Sorvall, rotor 34).

Em algumas situações foram utilizados extratos provenientes de sementes individuais. Nestes casos, o material foi primeiramente macerado em um frasco contendo 0,25 ml de PBS, com o auxílio de um bastão de vidro. A extração foi feita agitando-se as amostras durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram posteriormente centrifugadas a aproximadamente  $550\text{ g}$  durante 5 minutos em temperatura ambiente em um centrifugador tipo Excelsa 2, marca FALERM.

Para a análise eletroforética sob condições dissociantes, as amostras foram aquecidas por 5 minutos a  $100^{\circ}\text{C}$  com a adição de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 2% e 2-mercaptoetanol a 0,1%.

Todos os tipos de amostra receberam, antes da aplicação, glicerol 80% até uma concentração final de 16%.

#### 3.2.1.2. Determinação do teor de proteína solúvel

A determinação de proteína foi feita através de uma reação colorimétrica, resultante da combinação da proteína com sulfato de cobre em meio alcalino e, posteriormente, pela redução do reagente de Folin pelo complexo proteína-cobre, segundo o método descrito por LOWRY (1951).

Para a análise da absorvância foi utilizado um espectrofotômetro marca Perkin-Elmer(Coleman 54 B). Foi preparada uma curva padrão utilizando-se diluições sucessivas de soro albumina bovina(BSA), a partir de uma concentração de 0,4 mg/ml.

### 3.2.2. Eletroforese

#### 3.2.2.1. Eletroforese sob condições não dissociantes

Neste sistema foram utilizados dois procedimentos distintos: gel em pH ácido(REISFELD et alii,1962) e gel em pH alcalino(DAVIS,1964). Para o gel de pH alcalino foram utilizadas as soluções descritas na Tabela 2. Para o gel de pH ácido foram utilizadas as soluções descritas na Tabela 1. Em ambos os sistemas o gel separador constituiu-se de soluções B, D e E, descritas nas Tabelas 1 e 2.

#### 3.2.2.2. Eletroforese sob condições dissociantes

A eletroforese de proteínas sob condições dissociantes foi feita pelo uso de uma modificação do procedimento descrito por LAEMMLI(1970). As soluções estoques utilizadas foram as descritas na Tabela 3.

Para o gel separador usou-se as soluções A, B e G(Tabela 3). Para o gel espaçador foram utilizadas as soluções B, D e E do sistema de DAVIS(1964), descritos na Tabela 2, com a inclusão de 0,1g de SDS/100 ml.

Tabela 1. Composição das soluções estoques do procedimento eletroforético sob condições não dissociantes em gel de pH ácido (pH=4,5).

---

	(A)		(B)
KOH 1N	- 48,00 ml	KOH 1N	- 48,00ml
Ácido acético glacial	- 17,20 ml	Ác. acético glacial	- 2,87ml
TMED	- 4,00 ml	TMED	- 0,46ml
H <sub>2</sub> O para	-100,00 ml	H <sub>2</sub> O para	-100,00ml
	pH 4,3		pH 6,8
	(C) 10%*		(D)
Acrilamida	- 40,00g	Acrilamida	- 10,00g
Bisacrilamida	- 1,05g	Bisacrilamida	- 2,5g
H <sub>2</sub> O para	-100,00ml	H <sub>2</sub> O para	-100,00ml
	(E)		(G)
Riboflavina	- 0,004g	Persulfato de amônia	- 0,28g
H <sub>2</sub> O para	-100,00ml	H <sub>2</sub> O	-100,00ml
Tampão para corrida			
Beta-alanina	- 31,20g		
Ácido acético	- 8,00ml		
H <sub>2</sub> O para	-1000ml		
	pH=4,5		

---

\*concentração final do polímero

Tabela 2. Composição das soluções estoques do procedimento eletroforético sob condições não dissociantes, em gel de pH alcalino.

---

	(A)		(B)
HCl 1N	- 48,00ml	HCl 1N	- 48,00ml
Tris	- 36,60g	Tris	- 5,98g
TMED	- 0,23ml	TMED	- 0,46ml
H <sub>2</sub> O para	-100,00ml	H <sub>2</sub> O para	-100,00ml
	pH 8,9		pH 6,7
	(C) 7%*		(D)
Acrilamida	- 28,00g	Acrilamida	- 10,00g
Bisacrilamida	- 0,74g	Bisacrilamida	- 2,50g
H <sub>2</sub> O para	-100,00ml	H <sub>2</sub> O para	-100,00ml
	(E)		(G)
Riboflavina	- 0,004g	Persulfato de	
H <sub>2</sub> O para	-100,00ml	amônia	- 0,14g
		H <sub>2</sub> O para	-100,00ml
Tampão para corrida			
Tris	- 6,00g		
Glicina	- 28,80g		
H <sub>2</sub> O para	-1000ml		
	pH=8,3		

---

\*concentração final do polímero

Tabela 3. Soluções estoques para eletroforese sob condições dissociantes.

---

	(A)	10%*		(B)
Bisacrilamida	-	0,80g	Tris 0,75 M	- 9,00g
Acrilamida	-	30,00g	H <sub>2</sub> O para	-100,00ml
H <sub>2</sub> O para	-	100,00ml		pH 8,8
	(D)		(G)	
Tris 0,75 M	-	9,00g	Persulfato de	
H <sub>2</sub> O para	-	100ml	amônia	- 0,84g
			TMED	- 0,15ml
			SDS	- 0,60g
Tampão de corrida			H <sub>2</sub> O para	-100,00ml
Solução (D)	-	100ml		
SDS	-	1,00g		
H <sub>2</sub> O para	-	1000ml		

---

\*concentração final do polímero

### 3.2.3. Coloração de proteínas

#### 3.2.3.1. Corante não específico

Para coloração de proteína total nos géis de SDS, pH alcalino e pH ácido, foi utilizada a seguinte solução:

Comassie blue	-	0,05g
Metanol	-	250,00ml
Ácido acético	-	70,00ml
H <sub>2</sub> O para	-	1000,00ml

Para descoloração foi utilizada a seguinte solução:

Metanol	-	250,00ml
Ácido acético	-	70,00ml
H <sub>2</sub> O para	-	1000,00ml

#### 3.2.3.2. Corantes específicos

##### A) Desidrogenase málica

- 1) NAD<sup>+</sup> (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid) -10,00mg
  - 2) NBT (Nitroblau-Tetrasodium-chloride) - 4,00mg
  - 3) PMS (Phenazine-Methosulfate) - 0,40mg
  - 4) KCN (Cianeto de potássio) - 6,50mg
  - 5) Malato de sódio -67,05mg
- Tampão fosfato 0,125 M pH 7,0

O gel foi colocado por 5 minutos na solução tampão (pré-incubação). As substâncias 1), 2), 3) e 4) foram dissolvidas em 20 ml de tampão. O malato de sódio foi dissolvido minutos antes da incubação. Os géis foram incubados por 10 minutos, lavados com água, mergulhados em solução de ácido acético a 7% por 1 minuto e fixados em solução de metanol a 10%.

#### B) Esterase

1) Fast Blue RR salt - 20,00mg/19,60 ml de solução tampão

2) alfa-naftil acetato- 4,00mg/ 0,40 ml de solução de acetona a 50%

Tampão fosfato 0,1 M pH 6,0

Foram misturadas as soluções 1) e 2) no momento da incubação. Os géis foram pré-incubados na solução tampão por 5 minutos e incubados por 1h e 30min. Após a incubação, os géis foram lavados com água e fixados em uma solução de glicerol a 10%.

#### C) Fosfatase ácida

1) Fast Red B salt - 20,00mg/18,00ml de tampão

2) alfa-naftil fosfato- 20,00mg/2,00ml de tampão

Tampão acetato 0,5 M pH 5,0

Foram misturadas as soluções 1) e 2) na hora da incubação. Os géis foram pré-incubados por 5min na solução tampão e incubados por 1h. Após a incubação, os

géis foram lavados com água e fixados em solução de glicerol a 10%.

#### 3.2.4. Cruzamentos

Nos meses de janeiro e fevereiro de 1987, foram feitos cruzamentos entre algumas destas cultivares mantidas em vasos em casa-de-vegetação.

Os cruzamentos foram realizados após emasculação das plantas com o uso de uma bomba de vácuo. Os cruzalamentos obtidos foram:

♀	♂
Senshou	x Bico Ganga
Senshou	x Pratao
Kazusa Wase	x Nuglin 24
Bico Ganga	x Kazusa Wase
Guedes	x Kazusa Wase
Guedes	x Senshou
Agulha	x Kazusa Wase

As sementes F1 obtidas destes cruzamentos foram germinadas em placas de Petri no laboratório, em 1º de outubro de 1987, tendo sido tratadas com SHELLGRAN (Malathion) a 10%. Após 1 semana as plântulas foram transfelridas para copos plásticos contendo vermiculita, sendo manltidas ainda no laboratório. Passados 4 dias da transferênlcia as plantas foram transplantadas para vasos definitivos em casa-de-vegetação, obtendo-se um estande final de duas plantas por vaso. Dois vasos de cada material, constituindo duas repetições, foram utilizados no experimento.

### 3.2.5. Indicadores de heterose

Os híbridos e parentais foram analisados conforme os seguintes parâmetros morfológicos:

- dias até 50% do florescimento(DAF);
- altura de planta(AP)-medida do solo até a extremidade da panícula do perfilho mais alto-na fase de grãos maduros;
- número efetivo de perfilhos por planta (NP);
- comprimento de folha bandeira(CF);
- largura de folha bandeira(LF);
- comprimento de panícula(CP);
- número de grãos por planta(NG);
- peso de 1000 grãos(PG), estimado a partir do peso de 100 grãos;
- produção de grãos por planta(P)

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. Composição de proteína solúvel em solução salina

As concentrações proteicas das sete cultivares estão apresentadas na Tabela 4. As cultivares mostraram uma variação na quantidade de proteína extraída, o que pode indicar uma variabilidade entre cultivares com relação ao teor de proteína ou à facilidade com que estas são extraídas. A concentração de proteína encontrada foi de  $1,61 \pm 0,12$  mg/ml, sendo este valor utilizado para o cálculo de volume de amostra necessário para a análise eletroforética.

##### 4.2. Padrões eletroforéticos das proteínas

###### 4.2.1. Padrões de proteína da fração solúvel em solução salina

Os padrões proteicos do endosperma das sete cultivares e dos seus sete híbridos estão apresentados na Figura 1. Foram observadas mobilidades entre 0,1 e 5,3 cm.

A banda de mobilidade 0,6 presente nas cultivares Senshou e Agulha, mas ausente nas cultivares Guedes, Bico Ganga, Pratão e Kazusa Wase, permaneceu no híbrido Guedes x Senshou, mas esteve ausente nos híbridos Senshou x Bico Ganga, Senshou x Pratão e Agulha x Kazusa Wase.

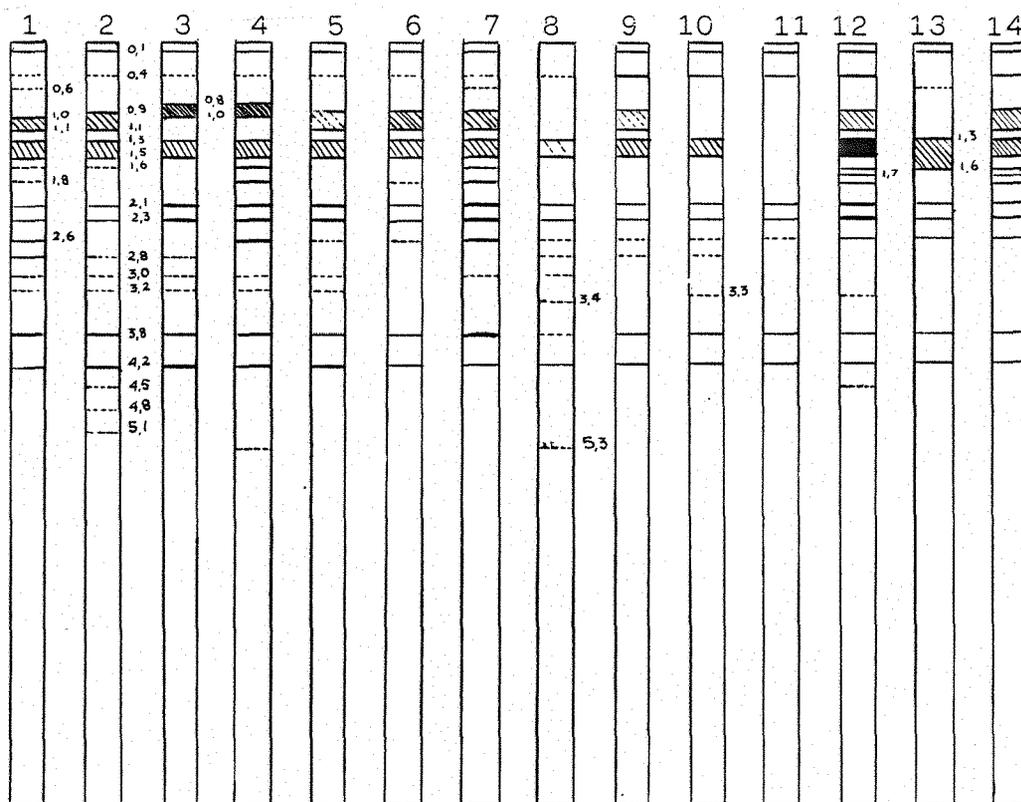
Na região de mobilidade entre 0,8 e 1,1, três tipos de banda foram encontrados, o primeiro correspondendo a uma banda com mobilidade entre 1,0 e 1,1, presente somente na cultivar Senshou. O segundo tipo de banda foi

Tabela 4. Cultivares de arroz e suas características de peso do endosperma e composição de proteína solúvel.

Cultivar	Peso do grão		Peso do endosperma		Relação	Proteína	
	(mg)	(média de 10 grãos)	(mg)	endosp. / grão (%)	(mg/ml)	mg/100 mg de farinha de endosperma	
Senshou	27,50		23,60	85,82	1,26	1,36	
Kazusa Wase	24,77		17,30	69,84	1,26	1,36	
Bico Ganga	30,44		24,00	78,84	1,83	1,92	
Guedes	29,94		20,00	66,80	1,75	2,20	
Pratão	27,45		23,80	86,70	1,55	1,64	
Nuglin 24	24,91		23,10	92,73	2,16	2,34	
Agulha	30,63		23,90	78,02	1,48	1,55	

característico das cultivares Kazusa Wase, Pratão, Nuglin 24 e Agulha, e localizou-se entre 0,9 e 1,1. Ainda para

Figura 1. Padrões proteicos\* das cultivares em gel de pH alcalino com uma concentração de 10% de acrilamida. Cultivares: (1)Senshou,(2)Kazusa Wase,(3)Bico Ganga,(4) Guedes,(5)Pratão,(6)Nuglin 24,(7)Agulha,(8)1 x 3,(9)1 x 5,(10)2 x 6,(11)3 x 2,(12)4 x 2,(13)4 x 1,(14)7 x 2.



\* as mobilidades apresentadas representam valores absolutos de migração no gel(cm).

esta banda, diferentes intensidades foram observadas. O terceiro tipo, com mobilidade entre 0,8 e 1,0 foi detectado nas cultivares Bico Ganga e Guedes. Entre os híbridos, quatro não apresentaram nenhuma banda na região, enquanto que os híbridos Senshou x Pratão, Guedes x Kazusa Wase e Agulha x Kazusa Wase apresentaram uma banda do tipo 2, sendo as bandas idênticas àquelas presentes nos parentais masculinos.

Foi observada uma banda de mobilidade entre 1,3 e 1,5 em todas as cultivares, com aproximadamente a mesma intensidade. Entre os indivíduos híbridos, foram encontradas diferentes intensidades para as mesmas.

Uma banda de mobilidade 1,6 foi encontrada nas cultivares Senshou, Kazusa Wase, Guedes e Agulha. Entre os híbridos, somente Guedes x Kazusa Wase, Agulha x Kazusa Wase e Guedes x Senshou apresentaram esta banda, sendo que neste último a banda não se distingue perfeitamente da banda de mobilidade imediatamente inferior.

Na região de mobilidade 1,8 foi detectada uma banda nas cultivares Senshou, Guedes, Nuglin 24 e Agulha. Contudo, somente os híbridos Guedes x Kazusa Wase e Agulha x Kazusa Wase apresentaram a mesma. Os híbridos Senshou x Bico Ganga e Senshou x Pratão não apresentaram esta banda.

Uma banda de mobilidade 2,6 foi observada na maioria das cultivares, exceto nas cultivares Kazusa Wase e Bico Ganga. Todos os híbridos apresentaram a banda, independentemente da sua ausência ou presença nos parentais.

Somente as cultivares Senshou, Kazusa Wase e Bico Ganga apresentaram uma banda de mobilidade 2,8. Nos

híbridos Senshou x Bico Ganga, Senshou x Prato e Kazusa Wase x Nuglin 24, esta também foi detectada.

Duas bandas de mobilidade 3,0 e 3,2 foram detectadas com a mesma intensidade na maioria das cultivares, exceto na cultivar Nuglin 24, onde nenhuma das duas foi detectada e na cultivar Agulha, estando a segunda banda ausente. Entre os híbridos analisados, somente aquele proveniente do cruzamento das cultivares Senshou x Bico Ganga apresentou a primeira banda. Os demais não apresentaram nenhuma das duas bandas.

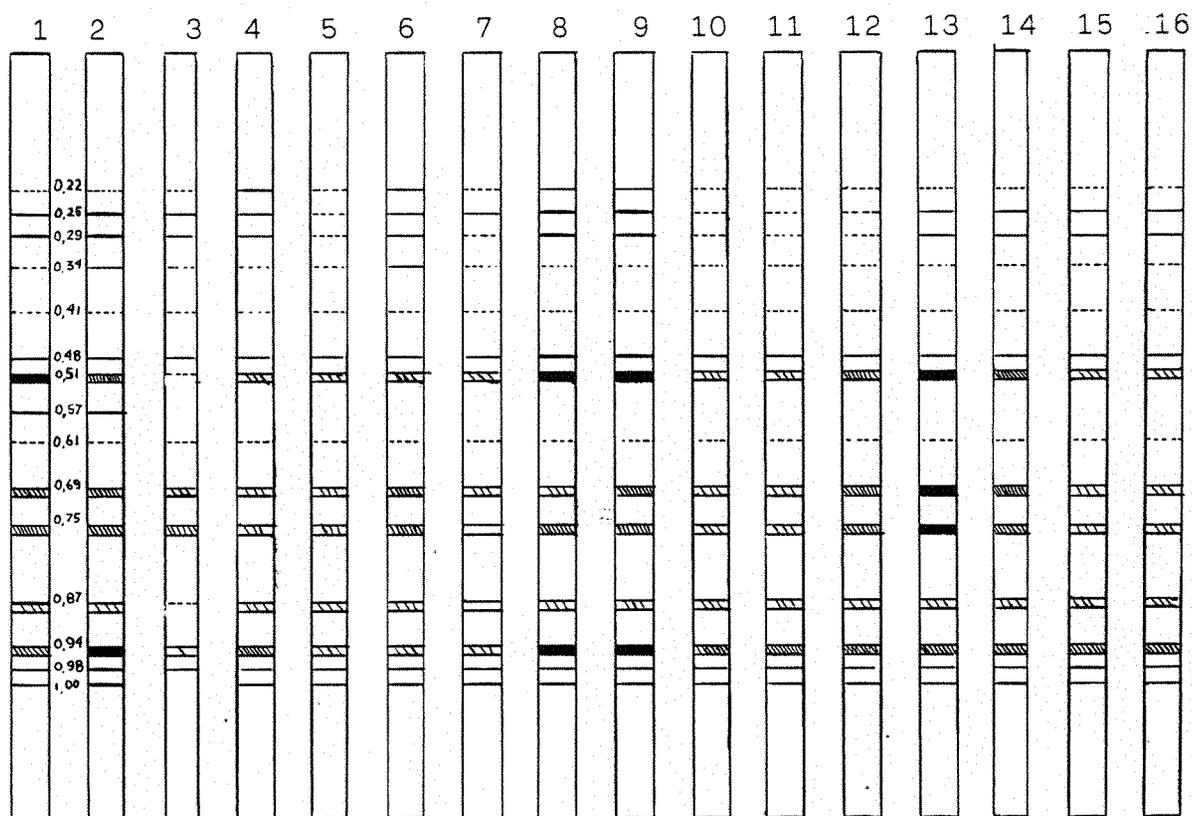
Os híbridos Kazusa Wase x Nuglin 24 e Guedes x Kazusa Wase mostraram uma banda de mobilidade 3,3, não detectada em nenhuma das cultivares parentais. Também foi detectada uma banda de mobilidade 3,4, presente somente no híbrido Senshou x Bico Ganga.

Três bandas de mobilidade 4,5, 4,8 e 5,1 foram detectadas somente na cultivar Kazusa Wase. A primeira banda também foi detectada no híbrido Guedes x Kazusa Wase. A cultivar Guedes e o híbrido obtido do cruzamento Senshou x Bico Ganga ainda apresentaram uma banda de mobilidade 5,3.

#### 4.2.2. Padrões polipeptídicos do endosperma

Os padrões polipeptídicos do endosperma das sete cultivares e dos seus nove híbridos estão apresentados na Figura 2. As mobilidades relativas dos polipeptídeos variaram de 0,22 a 1,00, sendo que as cinco bandas principais tiveram mobilidade relativa entre 0,51 e 0,94. O número de bandas detectado nos padrões foi praticamente o mesmo para todas as cultivares. Entretanto, somente as cultivares japonesas apresentaram um polipeptídeo de mobilidade relativa

Figura 2. Padrões de polipeptídeos\* da fração de proteína solúvel do endosperma de arroz em gel de SDS com uma concentração de 10% de acrilamida. (1)Kazusa Wase, (2) Senshou, (3)2 x 12, (4)2 x 14, (5)1 x 15, (6)12 x 1, (7)1 x 12, (8)13 x 1, (9)13 x 2, (10)1 x 16, (11)16 x 1, (12)Bico Ganga, (13) Guedes, (14)Pratão, (15)Nuglin 24, (16)Agulha.



\* as mobilidades apresentadas representam valores relativos de migração ( $mr = \text{mobilidade da banda} / \text{comprimento do gel}$ ).

0,57, e este componente não foi detectado na progênie de cruzamentos envolvendo estas cultivares.

Outras diferenças foram detectadas em intensidade de bandas. Os híbridos Guedes x Senshou e Guedes x Kazusa Wase apresentaram maior intensidade nas bandas de mobilidade 0,51 e 0,94, em relação aos demais híbridos. Os híbridos dos cruzamentos Kazusa Wase x Agulha e seu recíproco apresentaram pouca intensidade nas bandas e foram muito semelhantes entre si e ao parental Agulha.

As cultivares Pratão e Bico Ganga não apresentaram diferenças entre si, entretanto os híbridos provenientes dos cruzamentos Senshou x Bico Ganga e Senshou x Pratão foram diferentes quanto as intensidades das bandas de mobilidade relativa 0,51, 0,87 e 0,94.

Os híbridos Bico Ganga x Kazusa Wase e seu recíproco apresentaram diferenças de intensidade nas bandas de mobilidade relativa 0,69, 0,75 e 0,87.

#### 4.2.3. Padrões isoenzimáticos do endosperma

##### 4.2.3.1. Desidrogenase málica (MDH)

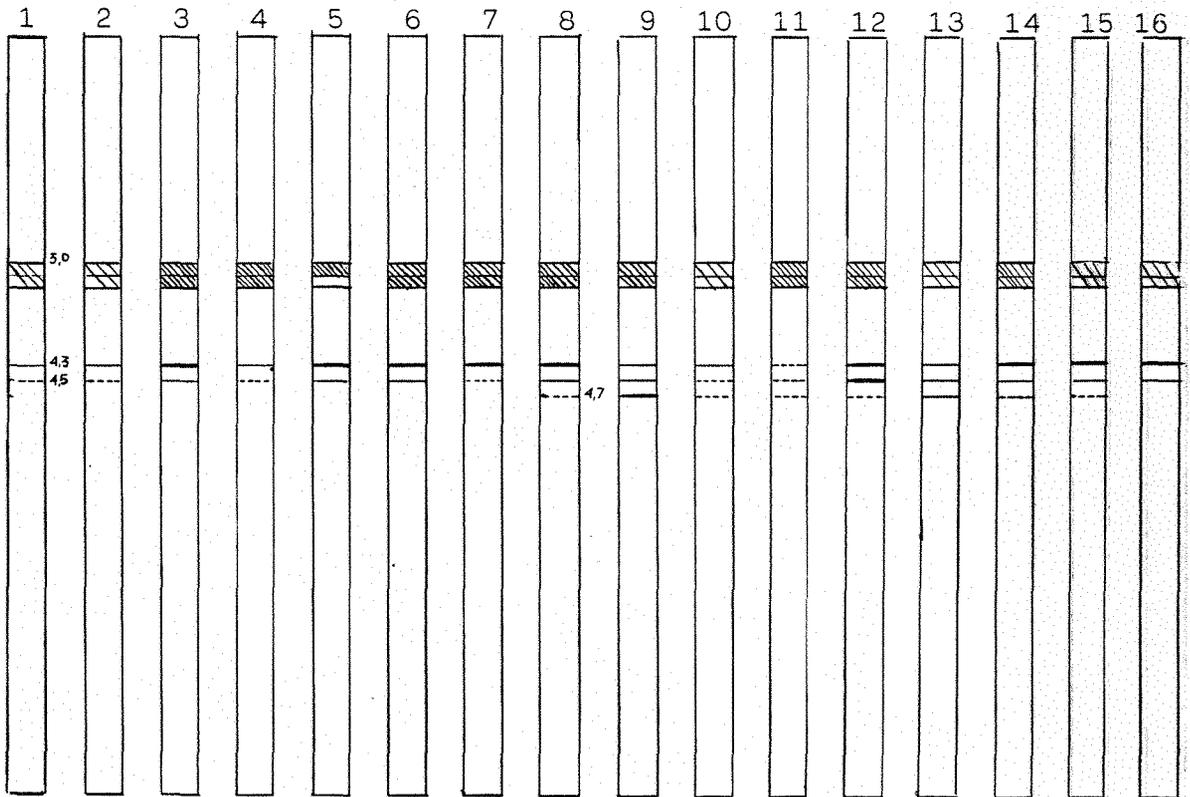
Os padrões de MDH das cultivares e seus nove híbridos estão apresentados na Figura 3. Cada amostra apresentou um conjunto de bandas de migração lenta (mobilidade  $\cong$  3,0) e um conjunto de bandas de migração rápida (mobilidade  $\cong$  4,3). No conjunto com migração lenta, as bandas não se destacaram individualmente tão bem quanto as do outro conjunto, entretanto, diferenças de intensidade puderam ser detectadas entre os materiais. As cultivares Senshou e Kazusa Wase apresentaram este conjunto com uma

baixa intensidade de coloração, enquanto que as cultivares Bico Ganga, Guedes, nuglin 24 e Agulha apresentaram uma forte intensidade para as três bandas. A cultivar Pratão apresentou as duas primeiras bandas fortes e terceira fraca. Os híbridos Bico Ganga x Kazusa Wase, Kazusa Wase x Bico Ganga, Kazusa Wase x Agulha, Guedes x Kazusa Wase e Guedes x Senshou apresentaram uma forte coloração. Os híbridos Agulha x Kazusa Wase, senshou x Pratão e Senshou x Bico Ganga apresentaram um conjunto com uma coloração fraca.

No conjunto de migração mais rápida, três padrões foram encontrados entre as cultivares. O primeiro, onde a primeira banda (mobilidade  $\approx 4,3$ ) tem coloração média (2) e a segunda banda é fraca (1), foi característico das cultivares Senshou, Kazusa Wase e Guedes. O segundo padrão, onde a primeira banda é forte (3) e a segunda tem coloração média (2), foi característico das cultivares Bico Ganga, pratão e Nuglin 24. O terceiro tipo foi apresentado pela cultivar Agulha e este padrão caracteriza-se por uma primeira banda forte (3) e uma segunda banda fraca (1).

Entre os híbridos, uma terceira banda foi detectada. Foram observados seis diferentes padrões quanto a intensidade relativa das bandas 1, 2 e 3, respectivamente. Os híbridos Bico Ganga x Kazusa Wase e Guedes x Senshou apresentaram um padrão tipo 3/2/1 (forte/média/fraca) para as bandas 1, 2 e 3, respectivamente. Mantendo-se a mesma ordem de bandas, os híbridos Kazusa Wase x Bico Ganga e Senshou x Pratão apresentaram um tipo 2/2/2 (média/média/média). Os híbridos Agulha x Kazusa Wase, padrão média/fraca/fraca, Kazusa Wase x Agulha (fraca/fraca/fraca), Guedes x Kazusa Wase (forte/forte/fraca) e Kazusa Wase x Nuglin 24 (forte/média/ausente), apresentaram padrões distintos.

Figura 3. Diagramas de desidrogenase málica das cultivares de arroz e seus híbridos. (1) Senshou, (2) Kazusa Wase, (3) Lico Ganga, (4) Guedes, (5) Pratao, (6) Nuglin 24, (7) Agulha, (8) 3 x 2, (9) 2 x 3, (10) 7 x 2, (11) 2 x 7, (12) 4 x 2, (13) 1 x 5, (14) 4 x 1, (15) 1 x 3, (16) 2 x 6.



\* as mobilidades apresentadas representam valores absolutos de migração no gel (cm).

As diferentes intensidades de cada banda do grupo de migração mais rápida estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Intensidade relativa das três bandas anódicas de migração rápida da enzima desidrogenase málica nas cultivares e híbridos analisados. (1- mobilidade  $\approx$  4,3; 2- mobilidade  $\approx$  4,5 e 3- mobilidade  $\approx$  4,7).

Cultivar	Banda 1	Banda 2	Banda 3
Senshou	2*	1	-
Kazusa Wase	2	1	-
Bico Ganga	3	2	-
Guedes	2	1	-
Pratão	3	2	-
Nuglin 24	3	2	-
Agulha	3	1	-
Senshou x Bico Ganga	3	2	1
Senshou x Pratão	2	2	2
Kazusa Wase x Nuglin 24	3	2	-
Bico Ganga x K. Wase	3	2	1
K. Wase x Bico Ganga	2	2	3
Guedes x K. Wase	3	3	1
Guedes x Senshou	3	2	1
Agulha x K. Wase	2	1	1
K. Wase x Agulha	1	1	1

\* intensidade = 3(forte), 2(média), 1(fraca)

#### 4.2.3.2. Fosfatase ácida

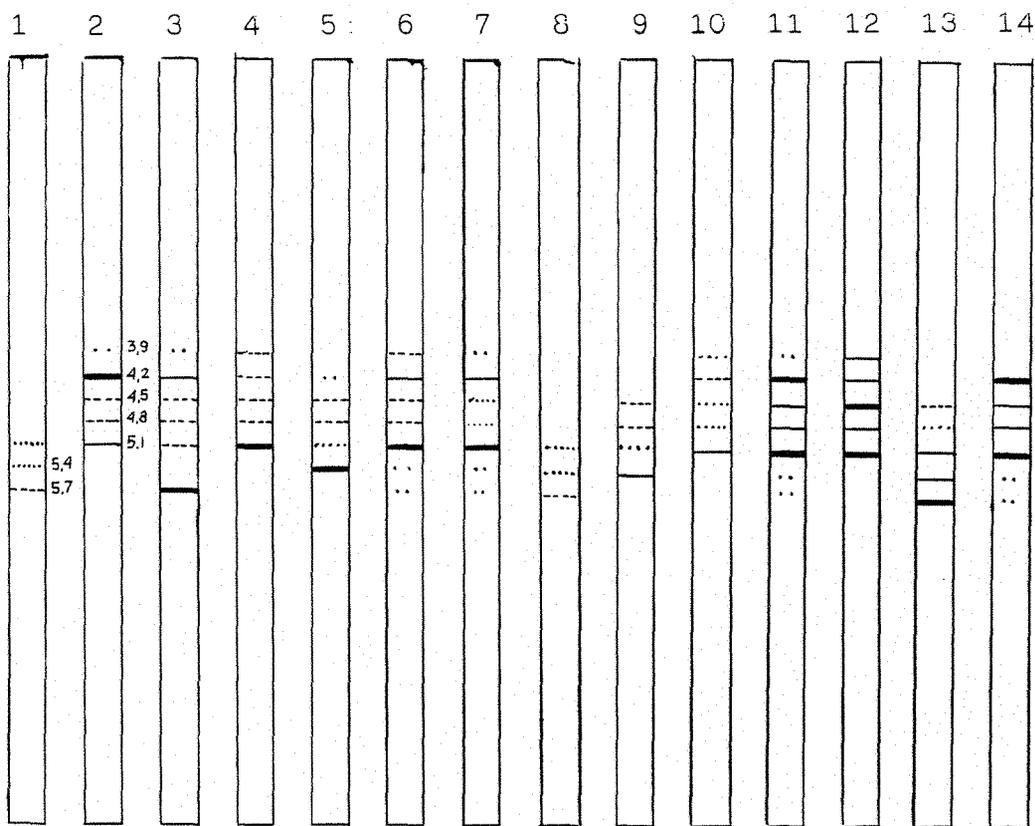
Os padrões de fosfatase ácida das sete cultivares e de seus sete híbridos estão mostrados na Figura 4.

Foram observadas sete bandas com migração anódica, com mobilidades variando entre 3,9 e 5,7. O número de bandas e a intensidade destas foi variável entre as amostras (Tabela 6). Entre as cultivares, todos os padrões foram diferentes, o mesmo ocorrendo entre os híbridos. Somente os padrões da cultivar Senshou e do híbrido Senshou x Bico Ganga foram idênticos. Os demais híbridos apresentaram padrões diferindo de ambos os parentais.

O híbrido Senshou x Pratão apresentou menor intensidade em algumas bandas e inclusive perda de bandas em relação aos parentais foi observada. O híbrido Kazusa Wase x Nuglin 24 apresentou a primeira banda (mobilidade = 3,9) com uma intensidade intermediária à encontrada nos parentais. As bandas 2, 3 e 4, com mobilidades de 4,2, 4,5 e 4,8, respectivamente, foram mais fracas no híbrido do que nos parentais. A banda 5 (mobilidade = 5,1) foi idêntica à banda 5 da cultivar Kazusa Wase. As duas últimas bandas, 6 e 7, com mobilidades de 5,4 e 5,7, respectivamente, não foram detectadas no híbrido.

O padrão apresentado pelo híbrido Bico Ganga x Kazusa Wase foi caracterizado pela acentuação da intensidade das bandas 3, 4 e 5 e um forte decréscimo da mesma na banda 7. A banda 1 foi idêntica àquelas apresentadas pelos parentais, que não diferiram entre si quanto a esta banda. A banda 2 foi idêntica em intensidade à cultivar Kazusa Wase e a banda 6 foi detectada com intensidade muito pequena, embora não estivesse presente nos parentais.

Figura 4. Diagramas de fosfatase ácida das cultivares de arroz e seus respectivos híbridos. (1)Senshou,(2)Kazusa Wase, (3)Bico Ganga,(4)Guedes,(5)Pratão,(6)Nuglin 24,(7)Agulha , (8)1 x 3,(9)1 x 5,(10)2 x 6,(11)3 x 2,(12)4 x 2,(13)4 x 1, (14)7 x 2.



\* as mobilidades apresentadas representam valores absolutos de migração no gel(cm).

O híbrido Guedes x Kazusa Wase apresentou uma maior intensidade nas bandas 1, 3 e 4, em relação aos parentais. A banda 2 foi detectada em uma intensidade intermediária a dos parentais e a banda 5 foi idêntica a encontrada na cultivar Guedes. As bandas 6 e 7 não foram detectadas nos parentais nem no híbrido.

No híbrido Guedes x Senshou não foram detectadas as bandas 1 e 2, presentes com pequena intensidade na cultivar Guedes. A banda 3 foi idêntica em intensidade à mesma banda na cultivar Guedes. A banda 4 foi menos intensa que a sua correspondente na cultivar Guedes. A banda 5 foi detectada em uma intensidade intermediária às apresentadas pelas mesmas bandas nos parentais. As bandas 6 e 7 foram bem mais intensas no híbrido em relação aos parentais.

O último híbrido analisado, obtido do cruzamento Agulha x Kazusa Wase não apresentou a banda 1, presente na cultivar Agulha. As bandas 2 e 5 foram as mais intensas dentre as apresentadas por este híbrido. A banda 2 foi idêntica à sua correspondente na cultivar Kazusa Wase e as bandas 5, 6 e 7 mantiveram as intensidades das mesmas bandas na cultivar Agulha. As bandas 3 e 4 foram mais intensas no híbrido quando comparado com os parentais.

Tabela 6. Intensidade de bandas de fosfatase ácida observadas nas cultivares de arroz e seus híbridos.

Cultivar	Bandas						
	1	2	3	4	5	6	7
Senshou	-	-	-	-	2*	2	3
Kazusa Wase	1	5	3	3	4	-	-
Bico Ganga	1	4	3	3	3	-	5
Guedes	3	3	3	3	5	-	-
Pratão	-	1	3	3	2	5	-
Nuglin 24	3	4	3	3	5	1	1
Agulha	1	4	2	2	5	1	1
Senshou x Bico Ganga	-	-	-	-	2	2	3
Senshou x Pratão	-	-	3	3	2	4	-
Kazusa Wase x Nuglin 24	2	3	2	2	4	-	-
Bico Ganga x Kazusa Wase	1	5	4	4	5	1	1
Guedes x Kazusa Wase	4	4	5	4	5	-	-
Guedes x Senshou	-	-	3	2	4	4	5
Agulha x Kazusa Wase	-	5	4	4	5	1	1

\* intensidade no sentido 5 (mais forte) para 1 (mais fraca)

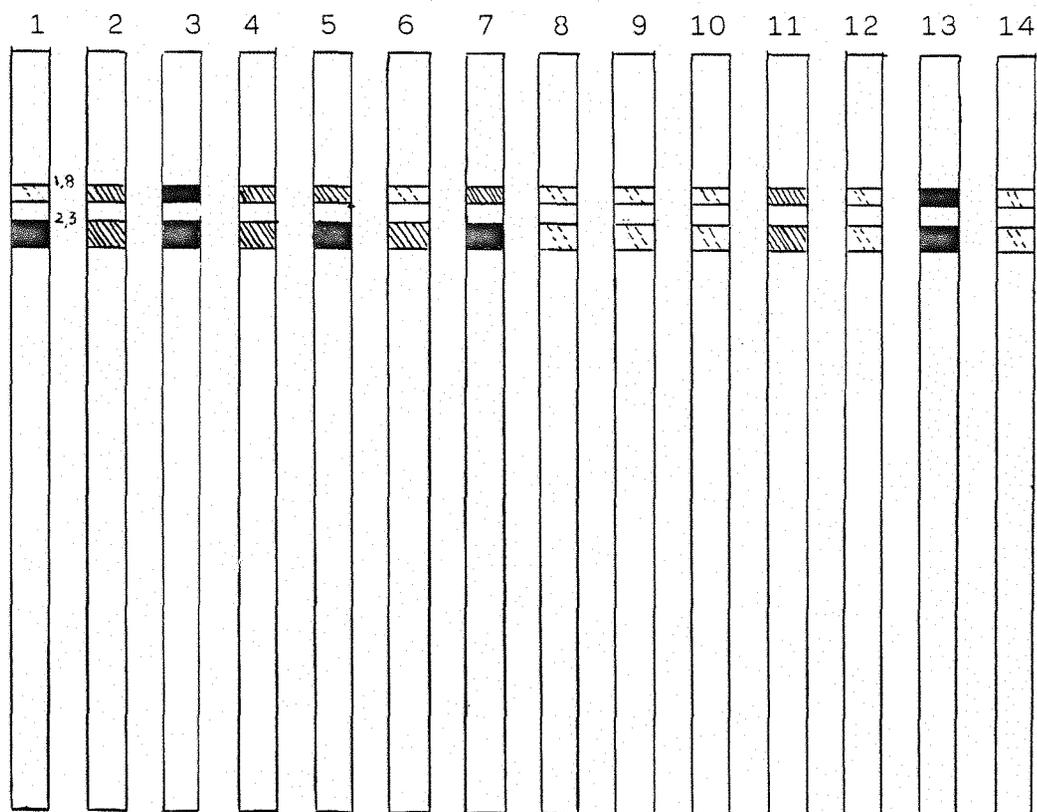
#### 4.2.3.3. Esterase

O diagrama das bandas de esterase está a apresentado na Figura 5. As intensidades das bandas nas a mostras analisadas estão mostradas na Tabela 7.

Foram observadas duas bandas de migração catódica para a enzima esterase em todas as amostras ana lisadas. Entre as cultivares, cinco diferentes padrões fora m observados. O padrão 1, encontrado na cultivar Senshou foi caracterizado por uma banda fraca de mobilidade 1,8(banda 1) e uma banda forte de mobilidade 2,3( banda 2). O padrão 2 constituído de bandas 1 e 2 com uma in tensidade média, foi encontrado nas cultivares Kazusa Wase e Guedes. Um terceiro padrão, correspondente à uma forte intensidade nas duas bandas, foi encontrado na culti var Bico Ganga. O quarto padrão foi observado nas cultiva res Pratão e Agulha, sendo caracterizado por uma banda 1 de intensidade média e uma banda 2 forte. O padrão 5, encontrado na cultivar Nuglin 24, foi definido por uma banda 1 fraca e uma banda 2 de intensidade intermediária.

Os híbridos apresentaram as duas bandas com intensidades equivalentes, entretanto, três diferentes tipos foram encontrados. Os híbridos Senshou x Bico Ganga, Senshou x Pratão, Kazusa Wase x Nuglin 24, Guedes x Kazusa Wase e Agulha x Kazusa Wase apresentaram as duas bandas fracas. O híbrido Bico Ganga x Kazusa Wase apresenta tou as duas bandas com intensidade intermediária, enquanto que o híbrido Guedes x Senshou foi caracterizado por duas bandas fortes.

Figura 5. Diagrama dos padrões de esterase das cultivares de arroz e seus híbridos. (1) Senshou, (2) Kazusa Wase, (3) Bico Ganga, (4) Guedes, (5) Pratao, (6) Nuglin 24, (7) Agulha, (8) 1 x 3, (9) 1 x 5, (10) 2 x 6, (11) 3 x 2, (12) 4 x 2, (13) 4 x 1, (14) 7 x 2.



\* as mobilidades apresentadas representam valores absolutos de migração no gel (cm).

Tabela 7. Intensidade de bandas de esterase observadas nas cultivares e híbridos de arroz.

Cultivar	Banda 1	Banda 2
Senshou	1	3
Kazusa Wase	2	2
Bico Ganga	3	3
Guedes	2	2
Pratão	2	3
Nuglin 24	1	2
Agulha	2	3
Senshou x Bico Ganga	3	3
Senshou x Pratão	3	3
Kazusa Wase x Nuglin 24	3	3
Bico Ganga x Kazusa Wase	2	2
Guedes x Kazusa Wase	3	3
Guedes x Senshou	1	1
Agulha x Kazusa Wase	3	3

#### 4.3. Caracteres morfológicos de cultivares e híbridos

As médias de altura de planta, dias até flo<sub>res</sub>cimento, número de perfilhos produtivos, comprimento de folha bandeira, largura de folha bandeira, comprimento de panícula, número de grãos por planta, peso de 1000 grãos e produção em g/planta das sete cultivares Senshou, Kazusa Wase, Bico Ganga, Guedes, Prató, Nuglin 24, Agulha e seus sete híbridos estão mostradas na Tabela 8. As cultivares japonesas foram mais precoces que as brasileiras, enquanto os híbridos apresentaram um ciclo de maturação intermediário.

As cultivares japonesas destacaram-se das brasileiras para o caráter número de perfilhos produtivos apresentando acima de 10 perfilhos por planta, enquanto que as brasileiras emitiram na faixa de 4 a 8 perfilhos/planta. Também para os caracteres comprimento e largura de folha bandeira, os dois grupos tenderam à uma distinção.

Para os caracteres altura de planta e comprimento de panícula, variações entre os materiais foram observadas, embora distinção entre os grupos não possa ser feita.

#### 4.4. Análise da correlação dos caracteres morfológicos com produção

Entre os caracteres analisados (Tabela 9), três apresentaram coeficientes de correlação significativos, sendo o caráter número de perfilhos produtivos significativo ao nível de 5% de probabilidade. Os caracteres dias até florescimento e número de grãos por planta apresentaram uma significância a um nível de 1% de probabilidade.

#### 4.5. Análise de variância

Para o cálculo da produção, apresentada em gramas/planta, dois caracteres foram utilizados: número de grãos por planta e peso de 1000 grãos. As análises de variância para estes caracteres estão apresentadas nas Tabelas 10, 11 e 12.

#### 4.6. Comparação de médias

As comparações de médias das cultivares e seus híbridos para os caracteres número de grãos por planta, peso de 1000 grãos e produção estão apresentadas nas Tabelas 13, 14 e 15, respectivamente. As observações foram realizadas em condições de casa-de-vegetação.

Para o caráter número de grãos por planta, foi observada uma superioridade das cultivares japonesas sobre as brasileiras, sendo que somente os híbridos mais pro dutivos foram semelhantes a cultivar Senshou.

A comparação de médias de peso de 1000 grãos mostrou que as diferenças existentes não são muito significativas, entretanto, alguns híbridos como Senshou x Bico Ganga, Guedes x Senshou e Senshou x Prató superaram as médias encontradas para os seus respectivos parentais.

A análise de médias de produção mostrou tam**ém** uma superioridade das cultivares japonesas em relação às brasileiras. Os híbridos Guedes x Senshou e Guedes x Kazusa Wase apresentaram produções não significativamente diferentes da cultivar Senshou.

Tabela 8. Média das cultivares e gerações F1 para os caracteres utilizados como indicadores de heterose.

CULTIVARES	AP (cm)	DAF	NP	CF (cm)	LF (cm)	CP (cm)	NG	PG (g)	P (g/planta)
Senshou	111,13 ± 0,53	87,0 ± 0,00	16,00 ± 3,54	27,70 ± 1,73	1,26 ± 0,06	19,71 ± 0,21	712,50 ± 65,05	27,50 ± 1,51	19,64 ± 2,87
Kazusa Wase	124,53 ± 3,15	89,0 ± 0,00	10,75 ± 0,35	33,07 ± 0,20	1,53 ± 0,08	24,80 ± 0,54	1087,25 ± 52,68	21,16 ± 1,55	22,97 ± 0,57
Bico Ganga	110,00 ± 4,95	124,0 ± 2,83	5,75 ± 1,77	41,82 ± 6,31	1,71 ± 0,05	23,15 ± 1,02	417,75 ± 30,76	30,44 ± 1,03	12,70 ± 0,51
Guedes	97,00 ± 3,89	153,5 ± 0,71	5,50 ± 0,71	35,14 ± 5,01	1,90 ± 0,01	22,57 ± 0,69	114,00 ± 7,07	25,56 ± 1,93	2,91 ± 0,04
Pratão	128,38 ± 7,60	135,5 ± 4,95	5,25 ± 1,77	36,30 ± 1,46	1,72 ± 0,00	21,38 ± 1,29	295,25 ± 8,84	27,45 ± 1,13	8,10 ± 0,08
Nuglin 24	148,00 ± 4,95	125,0 ± 1,41	4,25 ± 1,06	53,16 ± 9,93	1,83 ± 0,09	27,19 ± 3,18	403,00 ± 41,01	24,91 ± 0,89	10,02 ± 0,66
Agulha	122,13 ± 1,59	126,0 ± 9,90	7,25 ± 0,35	35,16 ± 3,88	1,57 ± 0,22	24,82 ± 1,87	336,50 ± 57,28	30,63 ± 0,67	10,29 ± 1,53
Senshou x B. Ganga	124,75	-*	102,0	-	1,37	-	362,00	-	11,18
Senshou x Pratão	124,75	-	103,0	-	1,50	-	420,00	-	11,66
K. Wase x Nuglin 24	142,00	-	111,0	-	1,43	-	289,00	-	7,16
B. Ganga x K. Wase	123,00	-	102,0	-	1,53	-	209,00	-	5,02
Guedes x K. Wase	128,75 ± 5,66	101,0 ± 0,00	9,25 ± 1,77	31,58 ± 0,54	1,52 ± 0,16	25,57 ± 0,44	575,75 ± 53,39	23,98 ± 0,28	13,82 ± 1,44
Guedes x Senshou	124,25 ± 0,35	96,0 ± 4,24	9,25 ± 0,35	35,32 ± 3,51	1,52 ± 0,01	24,90 ± 0,98	559,25 ± 78,14	29,94 ± 0,50	16,76 ± 2,62
Agulha x K. Wase	127,50 ± 0,35	102,5 ± 0,71	7,25 ± 1,06	28,69 ± 0,50	1,31 ± 0,11	23,51 ± 1,30	422,25 ± 26,52	25,14 ± 1,82	10,59 ± 0,10

AP = Altura de planta;

DAF = Dias até florescimento;

NF = Número de perfilhos produtivos;

CF = Comprimento de folha bandeira;

LF = Largura de folha bandeira;

\* = não foi possível calcular o desvio padrão devido a ausência de repetições.

CP = Comprimento de panícula;

NG = Número de grãos por planta;

PG = Peso de 1000 grãos;

P = Produção

Tabela 9. Coeficientes de correlação entre os caracteres analisados e produção.

Caráter	Coeficiente de correlação
Altura de planta	0,000007 <sup>ns</sup>
Dias até florescimento	-0,71 <sup>**</sup>
Número de perfilhos produtivos	0,58 <sup>*</sup>
Comprimento de folha bandeira	-0,25 <sup>ns</sup>
Largura de folha bandeira	-0,44 <sup>ns</sup>
Comprimento de panícula	-0,16 <sup>ns</sup>
Número de grãos por planta	0,96 <sup>**</sup>
Peso de 1000 grãos	-0,05 <sup>ns</sup>

ns, \* , \*\* = não significativo, significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Tabela 10. Análise de variância para número de grãos por planta das cultivares e híbridos de arroz.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	13	14000701,74	107746,29	46,60 **
Resíduo	10	23122,50	2312,25	
Total	23			

C.V.= 10,85%

\*\*= significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 11. Análise de variância para peso de 1000 grãos das cultivares e híbridos de arroz.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	13	201,78	15,52	9,96 **
Resíduo	10	15,58	1,56	
Total	23			

C.V.= 4,67%

\*\*= significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 12. Análise de variância para produção das cultivares e híbridos de arroz.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	13	696,26	53,56	26,09**
Resíduo	10	20,53	2,05	
Total	23			

C.V. = 12,32%

\*\*= significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 13. Médias de número de grãos por planta de cultivares e híbridos de arroz. Médias de duas repetições com duas plantas por repetição, obtidas em condições de casa-de-vegetação.

Cultivar	$\bar{x}$	
Kazusa Wase	1087,25	a
Senshou	712,50	b
Guedes x Kazusa Wase	575,75	bc
Guedes x Senshou	559,25	bc
Agulha x Kazusa Wase	422,25	cd
Senshou x Pratão	420,00	cd
Bico Ganga	417,75	cd
Nuglin 24	403,00	cd
Senshou x Bico Ganga	362,00	cde
Agulha	336,50	de
Pratão	295,25	de
Kazusa Wase x Nuglin 24	289,00	de
Bico Ganga x Kazusa Wase	209,00	de
Guedes	114,00	e

\*cultivares compreendidas por uma mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 14. Médias de peso de 1000 grãos de cultivares e híbridos de arroz. Médias de duas repetições com duas plantas por repetição, obtidas em condições de casa-de-vegetação.

Cultivar	$\bar{X}$ (g)	
Senshou x Bico Ganga	30,89	a
Agulha	30,63	a
Bico Ganga	30,44	ab
Guedes x Senshou	29,94	ab
Senshou x Prato	27,74	abc
Senshou	27,50	abc
Prato	27,45	abc
Guedes	25,58	abc
Agulha x Kazusa Wase	25,14	abc
Nuglin 24	24,91	abc
Kazusa Wase x Nuglin 24	24,77	abc
Bico Ganga x Kazusa Wase	24,02	bc
Guedes x Kazusa Wase	23,98	bc
Kazusa Wase	21,59	c

\* cultivares compreendidas por uma mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 15. Médias de produção (g/planta) de cultivares e híbridos de arroz. Médias de duas repetições com duas plantas por repetição, obtidas em condições de casa-de-vegetação.

Cultivar	$\bar{X}$	
Kazusa Wase	22,97	a
Senshou	19,64	ab
Guedes x Senshou	16,76	bc
Guedes x Kazusa Wase	13,82	bcd
Bico Ganga	12,70	cd
Senshou x Pratão	11,66	cde
Senshou x Bico Ganga	11,18	cde
Agulha x Kazusa Wase	10,59	de
Agulha	10,29	de
Nuglin 24	10,02	de
Pratão	8,10	def
Kazusa Wase x Nuglin 24	7,16	def
Bico Ganga x Kazusa Wase	5,02	ef
Guedes	2,91	f

\* cultivares compreendidas por uma mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.7. Análise da heterose

As análises de heterose (medida da diferença entre o híbrido e a média dos pais) e heterobeltiose (medida da diferença entre o híbrido e o pai apresentando o valor mais alto para a característica em questão), estão apresentadas nas Tabelas 16 a 22, compreendendo os sete híbridos e respectivos parentais observados.

O híbrido do cruzamento Senshou x Bico Ganga (Tabela 16) apresentou heterose e heterobeltiose positivas somente para os caracteres altura de planta e peso de 1000 grãos.

O segundo híbrido (Tabela 17), procedente do cruzamento Senshou x Pratão, mostrou uma heterose positiva para os caracteres altura de planta, largura de folha bandeira, comprimento de panícula e peso de 1000 grãos, e heterobeltiose positiva para os dois últimos.

O terceiro híbrido (Tabela 18), obtido do cruzamento Kazusa Wase x Nuglin 24, apresentou valores de heterose positivos para os caracteres altura de planta, número de perfilhos produtivos, comprimento de panícula e peso de 1000 grãos. Não foram observados valores positivos de heterobeltiose.

O quarto híbrido analisado (Tabela 19), proveniente do cruzamento Bico Ganga x Kazusa Wase, foi superior a média dos pais para os caracteres altura de planta e comprimento de panícula, apresentando ainda um valor de heterobeltiose positivo para este último.

O quinto híbrido observado (Tabela 20), correspondente ao cruzamento Guedes x Kazusa Wase, mostrou uma heterose positiva para os caracteres altura de planta, número de perfilhos produtivos, comprimento de panícula,

peso de 1000 grãos e produção. A heterobeltiose, no entanto, foi positiva para os caracteres altura de planta e comprimento de panícula.

O sexto híbrido(Tabela 21), obtido do cruzamento Guedes x Senshou, apresentou valores de heterose positiva para a maioria dos caracteres, foram eles: altura de planta, comprimento de folha bandeira, comprimento de panícula, número de grãos por planta, peso de 1000 grãos e produção. Este híbrido mostrou ainda heterobeltiose positiva para os caracteres altura de planta, comprimento de folha bandeira, comprimento de panícula e peso de 1000 grãos.

O último híbrido analisado(Tabela 22), proveniente do cruzamento Agulha x Kazusa Wase, foi superior a média dos pais somente para o caráter altura de planta. Também foi observada uma heterobeltiose positiva para o caráter neste cruzamento.

Tabela 16. Análise de heterose (H) e heterobeltiose (Hb) para o cruzamento Senshou x Bico Ganga.

Caráter	Senshou	B. Ganga	$\bar{X}$	$\bar{F1}$	H(%)	Hb(%)
AP(cm)	111,13	110,00	111,57	124,75	12,82	12,26
DAF	87,00	124,00	105,50	102,00	-3,32	-17,74
NP	16,00	5,75	10,88	5,50	-49,45	-65,62
CF(cm)	27,70	41,82	34,76	26,55	-23,62	-36,51
LF(cm)	1,26	1,71	1,49	1,37	-8,05	-19,89
CP(cm)	19,71	23,15	21,43	21,27	-0,75	-8,12
NG	712,50	417,75	565,13	362,00	-35,94**	-49,19**
PG(g)	27,50	30,44	28,97	30,89	6,63 <sup>ns</sup>	1,48 <sup>ns</sup>
P(g/pl.)	19,64	12,70	16,17	11,18	-30,86**	-43,08**

ns= não significativo pelo teste t, \*\*= significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 17. Análise de heterose (H) e heterobeltiose (Hb) para o cruzamento Senshou x Pratóo.

Caráter	Senshou	Pratóo	$\bar{X}$	$\bar{F}_1$	H(%)	Hb(%)
AP(cm)	111,13	128,38	119,76	124,75	4,17	-2,83
DAF	87,00	135,50	111,25	103,00	-7,42	-23,99
NP	16,00	5,25	10,68	10,00	-6,37	-37,50
CF(cm)	27,70	36,30	32,00	27,50	-14,06	-24,24
LF(cm)	1,26	1,72	1,49	1,50	0,67	-12,79
CP(cm)	19,71	21,38	20,55	21,79	6,03	1,92
NG	712,50	295,25	503,88	420,00	-16,65 <sup>ns</sup>	-41,05 <sup>**</sup>
PG(g)	27,50	27,45	27,48	27,74	0,95 <sup>ns</sup>	0,87 <sup>ns</sup>
P(g/pl.)	19,64	8,10	13,87	11,66	-15,93 <sup>ns</sup>	-40,63 <sup>**</sup>

ns= não significativo pelo teste t, \*\*= significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 18. Análise de heterose (H) e heterobeltiose (Hb) para o cruzamento Kazusa Wase x Nuglin 24.

Caráter	K. Wase	Nuglin 24	$\bar{X}$	$\bar{F1}$	H(%)	Hb(%)
AP(cm)	124,53	148,00	136,27	142,00	4,20	-4,05
DAF	89,00	125,00	112,50	111,00	-1,33	-11,20
NP	10,75	4,25	7,50	8,50	13,33	-20,93
CF(cm)	33,05	53,16	43,12	35,30	-18,14	-33,60
LF(cm)	1,53	1,83	1,68	1,43	-14,88	-21,86
CP(cm)	24,80	27,19	26,00	26,39	1,50	-2,94
NG	1087,25	403,00	745,13	289,00	-61,21**	-73,42**
PG(g)	21,16	24,91	23,04	24,77	7,51 <sup>ns</sup>	-0,56 <sup>ns</sup>
P(g/pl.)	22,97	10,02	16,50	7,16	-28,54**	-58,83**

ns= não significativo pelo teste t, \*\*= significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 19. Análise de heterose (H) e heterobeltiose (Hb) para o cruzamento Bico Ganga x Kazusa Wase.

Caráter	B. Ganga	K. Wase	$\bar{X}$	$\bar{F1}$	H(%)	Hb(%)
AP(cm)	110,00	124,53	117,27	123,00	4,89	-1,23
DAF	124,00	89,00	106,50	102,00	-4,23	-17,74
NP	5,75	10,75	8,25	7,00	-15,15	-34,88
CF(cm)	41,82	33,07	37,45	37,09	-0,96	-11,31
LF(cm)	1,71	1,53	1,62	1,53	-5,56	-10,53
CP(cm)	23,15	24,80	23,98	26,12	8,92	5,32
NG	417,75	1087,25	752,50	209,00	-72,23**	-80,78**
PG(g)	30,44	21,16	25,80	24,02	-6,90 <sup>ns</sup>	-21,19**
P(g/pl.)	12,70	22,97	17,84	5,02	-71,86**	-78,15**

ns= não significativo pelo teste t, \*\*= significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 20. Análise de heterose(H) e heterobeltiose (Hb) para o cruzamento Guedes x Kazusa Wase.

Caráter	Guedes	K. Wase	$\bar{X}$	$\bar{F1}$	H(%)	Hb(%)
AP(cm)	97,00	124,53	110,77	128,75	16,23	3,39
DAF	153,50	89,00	121,25	101,00	-16,87	-34,20
NP	5,50	10,75	8,13	9,25	13,78	-13,95
CF(cm)	35,14	33,07	34,11	31,58	-7,42	-10,13
LF(cm)	1,90	1,53	1,72	1,52	-11,63	-20,00
CP(cm)	22,57	24,80	23,69	25,57	7,94	3,11
NG	114,00	1087,25	600,63	575,75	-4,14 <sup>ns</sup>	-47,05 <sup>**</sup>
PG(g)	25,58	21,16	23,37	23,98	2,61 <sup>ns</sup>	-6,25 <sup>ns</sup>
P(g/pl.)	2,91	22,97	12,94	13,82	6,80 <sup>ns</sup>	-39,93 <sup>**</sup>

ns= não significativo pelo teste t, \*\*= significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 21. Análise de heterose(H) e heterobeltiose (Hb) para o cruzamento Guedes x Senshou .

Caráter	Guedes	Senshou	$\bar{X}$	$\bar{F1}$	H(%)	Hb(%)
AP(cm)	97,00	111,13	104,07	124,25	19,39	11,81
DAF	153,50	87,00	120,25	96,00	-20,17	-37,56
NP	5,50	16,00	10,75	9,25	-13,95	-42,19
CF(cm)	35,14	27,70	31,42	35,32	12,41	0,51
LF(cm)	1,90	1,26	1,53	1,52	-0,75	-20,00
CP(cm)	22,57	19,71	21,14	24,90	17,79	10,32
NP	114,00	712,50	413,25	559,25	35,33 <sup>**</sup>	-21,51 <sup>**</sup>
PG(g)	25,58	27,50	26,54	29,94	12,81 <sup>*</sup>	8,87 <sup>+</sup>
P(g/pl.)	2,91	19,64	11,27	16,76	48,71 <sup>**</sup>	-14,66 <sup>+</sup>

+, \* e \*\* = significativo entre 5-10%, 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Tabela 22. Análise de heterose(H) e heterobeliose (Hb) para o cruzamento Agulha x Kazusa Wase.

Caráter	Agulha	K. Wase	$\bar{X}$	$\bar{F1}$	H(%)	Hb(%)
AP(cm)	122,13	124,53	123,33	127,50	3,38	2,39
DAF	126,00	89,00	107,50	102,50	-4,65	-18,65
NP	7,25	10,75	9,00	7,25	-19,45	-32,56
CF(cm)	35,16	33,07	34,12	28,69	-15,91	-18,40
LF(cm)	1,57	1,53	1,55	1,31	-15,48	-16,56
CP(cm)	24,82	24,80	24,81	23,51	-5,24	-5,28
NG	336,50	1087,25	711,88	422,25	-40,69**	-61,16**
PG(g)	30,63	21,16	25,90	25,14	-2,97 <sup>ns</sup>	-17,92**
P(g/pl.)	10,29	22,97	16,63	10,59	-36,32**	-53,90**

ns= não significativo pelo teste t, \*\*= significativo ao nível de 1% de probabilidade.

## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, são observadas características bioquímicas, obtidas pela utilização de procedimentos eletroforéticos, e as morfológicas, correspondentes à parâmetros normalmente analisados como indicadores de neterose em arroz.

A análise eletroforética da fração de proteína solúvel em solução salina permitiu algumas observações sobre a herança destas proteínas no endosperma.

A banda de mobilidade 0,6 foi herdada somente quando estava presente no parental masculino, isto é, aparecendo somente no híbrido do cruzamento Guedes x Senshou, enquanto nos híbridos dos cruzamentos Senshou x Bico Ganga, Senshou x Pratão e Agulha x Kazusa Wase estanão foi detectada.

A mesma relação foi observada para as bandas da região de mobilidade entre 0,8 e 1,1, sendo as bandas no híbridos, quando presentes, idênticas aos parentais masculinos.

Uma banda de mobilidade 1,6, somente detectada nos híbridos em que os dois parentais apresentavam a mesma, foi observada. Isto pode indicar um efeito de dosagem gênica ou a dominância de um alelo nulo sobre um detectável. Entretanto, estas possibilidades necessitam de estudos mais aprofundados para serem confirmadas.

Em algumas bandas, como por exemplo as bandas de mobilidade 2,8, 3,0 e 3,2, a dificuldade de detecção no gel pode ser responsável pelas situações encontradas. O

híbrido Bico Ganga x Kazusa Wase não apresentou a banda 2,8, embora esta seja detectada em ambos os seus parentais.

A análise de proteína sob condições dissociantes permitiu distinguir as cultivares japonesas das cultivares brasileiras pela presença de um polipeptídeo de mobilidade relativa 0,57, nas primeiras. Entre os híbridos, também não foi detectada esta banda.

Com respeito à intensidade de bandas, alguns híbridos mantiveram a intensidade observadas nos pais, enquanto outros apresentaram uma diminuição desta. Os híbridos que apresentaram pelo menos duas bandas mais fortes que os demais foram os híbridos Guedes x Kazusa Wase e Guedes x Senshou, sendo estes os híbridos de melhor performance de produção.

O padrão da cultivar Guedes também destacou-se das demais cultivares brasileiras e pode representar um padrão de boa combinação com as cultivares japonesas observadas. Os resultados dos dois cruzamentos citados acima indicam que este procedimento eletroforético pode mostrar características proteicas que podem estar associadas a combinação entre cultivares. Entretanto, um maior número de cultivares de ambas as origens deve ser analisado para que os resultados possam ser extrapolados.

Na observação dos padrões da enzima desidrogenase málica, foram detectados dois conjuntos de três bandas, com uma aparente independência entre os mesmos com relação a padrões de intensidade. No segundo conjunto ( migração mais rápida ), foi encontrada uma terceira banda somente nos híbridos, indicando uma complementação entre alelos diferentes localizados nos parentais. Este resultado parece concordar com trabalhos já existentes. Conforme

SECOND(1982), existem complementações intergênicas na formação desta enzima, o que é também relatado por GOODMAN et alii(1980) em milho. A enzima, de acordo com os autores acima citados, apresenta-se na sua forma ativa como um dímero, composto de subunidades codificadas por alelos de um ou mais locos.

As situações comumente encontradas quando a enzima apresenta-se na forma de dímero, são aquelas em que os indivíduos híbridos apresentam uma forma intermediária entre duas bandas contrastantes presentes nos pais, ou, no caso de dominância, aquelas em que o indivíduo híbrido apresenta uma banda somente, equivalente ao pai dominante. Nos casos aqui analisados, o híbrido apresentou uma terceira banda, mas com mobilidade maior que as duas bandas dos pais. Com base nesta situação, foi construído um modelo genético consistente com as observações realizadas e, posteriormente o mesmo foi testado a nível de geração F<sub>2</sub>. O modelo, baseado na hipótese da existência de dois genes independentes controlando o caráter, parte de três postulados:

1. A1 tem maior atividade que A2;
2. B<sub>2</sub>B<sub>2</sub> não tem atividade;
3. B<sub>1</sub>B<sub>2</sub> tem maior atividade (aproximadamente o dobro) que B<sub>1</sub>B<sub>1</sub> que é instável.

Sendo A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> alelos do loco A e B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> alelos do loco B e que qualquer alelo de cada loco pode se combinar com outro de qualquer um dos dois locos. Assim sendo diferentes valores de intensidade foram atribuídos a cada alelo (Tabela 23). A suposta composição de cada banda está mostrada na Tabela 24.

Tabela 23. Intensidades atribuídas as proteínas expressas pelos diferentes alelos que codificam a enzima MDH.

Alelos e combinações	Intensidade relativa
A1	2
A2	1
B1	1
B2	0
A1A1	4
A1A2	3
A2A2	2
A1B1	3
A1B2	2
A2B1	2
A2B2	1
B1B1	2*
B1B2	4
B2B2	0

\* composição instável

Tabela 24. Bandas de MDH e sua provável constituição em subunidades correspondentes aos diferentes alelos estabelecidos.

Banda	Dímero
1	A1A1, A1A2 ou A2A2
2	A1B1, A1B2, A2B1 ou A2B2
3	B1B1, B1B2 ou B2B2*

\* não detectável

Para testar o modelo de controle genético, foi escolhido o cruzamento Bico Ganga x Kazusa Wase, do qual existiam sementes F1 e F2 disponíveis, assim como sementes F1 do seu recíproco. As supostas composições alélicas dos parentais e seus híbridos estão apresentadas na Figura 6.

Figura 6. Supostas composições alélicas de parentais e híbridos do cruzamento Bico Ganga x Kazusa Wase e seu recíproco.

Bico Ganga	x	Kazusa Wase
(A1A1A1B2B2B2)		(A2A2A2B1B1B1)
F1		
Bico Ganga x Kazusa Wase		Kazusa Wase x Bico Ganga
(A1A1A2B2B2B1)		(A2A2A1B1B1B2)
Banda 1 (4A1A1:4A1A2:1A2A2) - 3		(1A1A1:4A1A2:4A2A2) - 2
Banda 2 (2A1B1:4A1B2:2A2B1: :1A2B2) - 2		(2A1B1:1A1B2:4A2B1:2A2B2) - 2
Banda 3 (1B1B1:4B1B2:4B2B2) - 2		(4B1B1:4B1B2:1B2B2) - 3

As 16 combinações alélicas possíveis em F2 e suas intensidades estão apresentadas na Tabela 25.

Segundo os valores apresentados na Tabela 25, pode-se agrupar, devido a sua grande semelhança para as bandas 1 e 2, os fenótipos a,b,c,d,e e f(grupo 1), sendo os mesmos separados de um outro grupo(2) formado pelos fenótipos g,h,i e j. Pode-se assim observar uma proporção de 1:1.

Foram observados os padrões de MDH para duas amostras da população F2, cada uma contendo 16 indivíduos. Observando-se a semelhança para bandas 1 e 2, obteve-se 7:9 e 6:10, nas amostras 1 e 2, respectivamente. O número de indivíduos do grupo 2 foi encontrado em maior número nas duas amostras.

A terceira banda, quando em intensidade 2, foi considerada num limite de percepção visual e, deste modo não detectável. As bandas com intensidade  $\geq 3$ , que na Tabela 25 apresentam-se em número de duas em cada grupo, foram consideradas perceptíveis. Nas amostras observadas, foram detectados dois indivíduos apresentando a terceira banda, sendo que nas duas amostras estes indivíduos apresentavam bandas 1 e 2 características do grupo 1.

O presente modelo genético é consistente com a forma ativa da enzima e com as relações intergênicas observadas, assim como com a natureza triplóide do tecido analisado. Este modelo pode ser útil a estudos posteriores de caracterização de cultivares ou ainda servir de base para estudos de regulação gênica em organismos eucariotes.

Tabela 25. Genótipos em F2, considerando a natureza triplóide do endosperma.

Genótipo	Intensidade
A1A1A1B1B1B1	$\geq 3/\geq 3/2^*$ a <sup>+</sup>
A1A1A1B1B1B2	$\geq 3/\geq 3/\geq 3$ b
A1A1A1B1B2B2	$\geq 3/ 2/ 2$ c
A1A1A1B2B2B2	$\geq 3/ 2/ -$ d
A1A1A2B1B1B1	$\geq 3/\geq 3/ 2$ a
A1A1A2B1B1B2	$\geq 3/ 2/\geq 3$ e
A1A1A2B1B2B2	$\geq 3/ 2/ 2$ c
A1A1A2B2B2B2	$\geq 3/ 2/ -$ f
A1A2A2B1B1B1	2/ 2/ 2 g
A1A2A2B1B1B2	2/ 2/ $\geq 3$ h
A1A2A2B1B2B2	2/ 2/ 2 g
A1A2A2B2B2B2	2/ 1/ - i
A2A2A2B1B1B1	2/ 2/ 2 g
A2A2A2B1B1B2	2/ 2/ $\geq 3$ h
A2A2A2B1B2B2	2/ 1/ 2 j
A2A2A2B2B2B2	2/ 1/ - i

\* x/y/z = bandas 1,2 e 3, respectivamente.

+ fenótipos semelhantes apresentam a mesma letra.

A comparação dos padrões de desidrogenase málica com a performance dos híbridos analisados mostra uma correlação entre aumento da intensidade das bandas 1 e 2 (Tabela 5) em relação aos parentais, apresentado pelos híbridos Guedes x Senshou e Guedes x Kazusa Wase.

Na observação do grupo de isoenzimas de fosfatase ácida, a presença de sete bandas de migração anódica concorda parcialmente com os resultados obtidos por PAI et alii(1975), para um loco denominado Acpl. Entretanto, a relação de três bandas principais (A, M e C), e três bandas secundárias (a, m e c) não foi encontrada no presente trabalho. Em geral, foram observadas uma ou duas bandas principais e um número variável entre 2 e 5 para as bandas secundárias. A correspondência parcial entre as bandas observadas por PAI et alii(1975) e as observadas no presente trabalho é justificada pela diferença quanto ao tecido analisado, uma vez que os autores analisaram tecidos foliares, e diferentes situações podem ocorrer no endosperma.

Embora não tenham sido feitas inferências sobre a composição alélica das cultivares, foram observadas modificações na intensidade de bandas na comparação de híbridos e parentais. Na tabela 6, observando-se somente as bandas de maior intensidade(5), nota-se que os híbridos em geral mantêm a intensidade igual ou menor ao parental que possui a banda mais forte. Contudo, os híbridos Bico Ganga x Kazusa Wase, Guedes x Senshou e Guedes x Kazusa Wase apresentam as bandas 5, 3 e 7, respectivamente, mais fortes que qualquer um dos parentais. O híbrido Bico Ganga x Kazusa Wase, entretanto, apresenta um decréscimo acentuado na intensidade da banda 7, o que não ocorre com os outros dois híbridos. Neste sistema, portanto, também pa

rece ocorrer uma ligação entre uma intensificação de bandas principais e performance de híbridos.

Outro sistema isoenzimático observado foi o de esterase, onde duas bandas de migração catódica foram detectadas. Os resultados concordam com os obtidos por GUPTA & SINGH(1977), onde quatro bandas catódicas são definidas no endosperma, visto que cada banda obtida no presente trabalho poderia perfeitamente compreender duas bandas. Conforme o modelo do autor acima citado, as bandas C3 e C4, de migração mais rápida teriam uma maior contribuição para o peso de grãos, e bandas com forte intensidade seriam a característica de enzimas mais ativas e apareceriam em cultivares com maior peso de grãos. Comparando-se os resultados da Tabela 14 e da Figura 5, pode-se observar que as cultivares Agulha e Bico Ganga e o híbrido Guedes x Senshou estão entre os quatro primeiros na ordenação de médias de peso de grãos e apresentam uma ou duas bandas bem intensas. O híbrido Senshou x Bico Ganga, também entre os quatro, não correspondeu a relação estabelecida acima, pois apresentou ambas as bandas com pequena intensidade. Entretanto, os parentais deste híbrido mostraram pelo menos a segunda banda intensa, indicando que a predição baseada em padrões de parentais, pode ser viável em alguns casos.

O híbrido Guedes x Senshou foi o único híbrido que apresentou maior intensidade nas duas bandas em relação aos parentais, concordando com os resultados apresentados na Tabela 21 para heterobeltiose em peso de grãos.

Visando comparar padrões proteicos obtidos por eletroforese com diferenças morfológicas e avaliar o potencial desta técnica como ferramenta na pre

dição de heterose, vários caracteres comumente utilizados como indicadores de heterose foram analisados e quantificados. Foram observadas correlações significativas entre alguns destes caracteres e produção. O caráter dias até florescimento mostrou-se negativamente correlacionado com a produção, sendo as cultivares brasileiras utilizadas mais tardias e menos produtivas que as cultivares japonesas. Para o caráter número de perfilhos produtivos foi encontrada uma correlação positiva com a produção. Este resultado concorda com as observações de KAUL & KUMAR(1982), discordando, no entanto, das observações de VIRMANI et alii(1982).

Outra correlação positiva significativa, foi encontrada entre o caráter número de grãos por planta e produção. Não foi observada, entretanto, uma correlação significativa entre peso de 1000 grãos e produção, embora este caráter seja considerado um dos responsáveis diretos pela produção, juntamente com o caráter número de grãos por planta. Este fato pode ser explicado pela altíssima correlação encontrada entre este último e produção, tornando muito pequena a influência do primeiro.

O caráter altura de planta, embora não tenha apresentado uma correlação significativa com a produção, foi superior na maioria dos híbridos, que apresentaram heterose positiva em todos os cruzamentos e heterobeltiose positiva em cinco deles. Estes resultados concordam com as observações de KAWANO et alii(1969), que salientam que a maior parte da heterose em arroz pode ser devida a um aumento no vigor vegetativo.

Os híbridos apresentaram heterose positiva em cinco cruzamentos e heterobeltiose positiva em quatro, para o caráter comprimento de panícula. Estes resul

tados concordam com as observações de CHANG et alii(1973).

Embora nenhum dos sete híbridos analisados tenha apresentado uma heterobeltiose positiva para produção, algumas ligações entre os padrões proteicos e características de interesse agrônômico foram estabelecidas. Para que esta técnica seja mais eficiente nesta função, mais sistemas isoenzimáticos podem ser utilizados sem que haja perda de viabilidade do método.

Não somente o melhoramento para produção de híbridos pode ser beneficiado com a utilização desta técnica, mas também programas de melhoramento de arroz a través de cultura de anteras podem ser incrementados a partir da seleção de um maior número de híbridos mais rapidamente.

## 6. CONCLUSÕES

Foi observada uma correlação entre intensidade de bandas de esterase e o caráter peso de grãos nas cultivares de arroz analisadas. Quando o parental masculino apresentou maior ou igual intensidade na banda 2, observou-se valores de heterose positivos para peso de grãos no híbrido. Quando a intensidade desta foi menor no parental masculino, valores de heterose negativos foram observados.

Nos cruzamentos com heterose positiva em que o parental masculino era superior para o caráter peso de grãos, os híbridos apresentaram médias de peso de grãos similares a estes, entretanto, um valor positivo de heterobeltiose mais significativo foi encontrado no híbrido Guedes x Senshou, sendo este o único cruzamento onde a banda 2 era mais intensa no parental masculino.

Nos cruzamentos em que o parental masculino era inferior para o caráter, foram observados valores de heterobeltiose negativos, sendo a magnitude observada mais significativa quando a intensidade da banda 2 no parental masculino era menor.

No presente trabalho foi possível, portanto, obter-se um sistema isoenzimático que pode ser usado com relativa eficiência na predição do comportamento dos híbridos para o caráter peso de grãos em função do padrão proteico do endosperma das linhagens parentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES-SILVA, D.M.J. Estudo comparativo da composição polipeptídica de cultivares de arroz (Oryza sativa L.). Piracicaba, 1981. 72p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- ALIAGA-MORELL, J.R.; CULIÁÑES-MACIÁ, F.A.; CLEMENTE-MARTIN, G.; PRIMO-YÚFERA, E. Differentiation of rice varieties by electrophoresis of embryo protein. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 74: 224-32, 1987.
- ANANDAKUMAR, C.R. & RANGASAMY, S.R.S. Heterosis and selection indices in rice. Egyptian Journal of Genetics and Cytology, Giza, 14: 123-32, 1985.
- ARUNACHALAN, V. & BANDYOPADHYAY, A. Limits of genetic divergence for occurrence of heterosis - experimental evidence from crop plants. Indian Journal of Genetics and Cytology, New Delhi, 44: 548-54, 1984.
- ASINS, M.J.; BENITO, C.; PEREZ de la VEGA, M. Endosperm peroxidase electrophoresis patterns to distinguish tetraploid from hexaploid wheats. Euphytica, Wageningen, 30: 389-92, 1981.
- BALDI, G. & MALAGONI, R. Indagine preliminari su ibridi di riso, Il Riso, Milano, 24: 99-116, 1975.

- BARRIGA, P.B.; MANQUIÁN, N.T.; MANSILLA, R.T. Identificación de cultivares de trigo por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida. Agro Sur, Valdivia, 11: 61-3, 1983.
- BOURDET, A. Les protéines du riz. Annales de Technologie Agricole, Paris, 2: 282-7, 1956.
- BOULTER, D. Flowering plant proteins. In: MILLER, L.P., ed. Phytochemistry, New York, Van Nostrand Reinhold, 1973. v.2, p. 30-60.
- BUSHUK, W. & ZILLMAN, R.R. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams; I. Apparatus, method and nomenclature. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, 58: 505-15, 1978.
- CAGAMPANG, G.B.; CRUZ, L.J.; ESPIRITU, S.G.; SANTIAGO, R.G.; JULIANO, B.O. Studies on the extraction and composition of rice proteins. Cereal Chemistry, 43: 145-55, 1966.
- CARDY, B.J. & KANNENBERG, L.W. Allozymic variability among maize inbred lines and hybrids; applications for cultivar identification. Crop Science, Madison, 22: 1016-20, 1982.
- CHANG, T.T. Rice. In: SIMMONDS, N.W., ed. Evolution of Crop Plants, Edinburgh, Longman Scientific & Technical, 1976. cap. 31, p. 98-104.

- CHANG, T.T.; LI, C.C.; TAGUMPAY, O. Genotypic correlation, heterosis, inbreeding depression and transgressive segregation of agronomic traits in a diallel cross of rice (Oryza sativa L.) cultivars. Botanical Bulletin of Academia Sinica, Taipei, 14: 83-93, 1973.
- CHERN, J.L. & KATAYAMA, T. Cytogenetical studies on the genus Oryza; XII. Electrophoretic estimation of progenitor of the C genome species constituting tetraploid-punctata (BBCC). Japanese Journal of Genetics, Mishima, 54: 157-164, 1979.
- CHERN, J.L. & KATAYAMA, T. Genetic analysis and geographical distribution of acid phosphatase isozyme in cultivated rice, Oryza sativa L., Japanese Journal of Genetics, Mishima, 57: 143-53, 1982.
- CHEVALLIER, M.M. & DATTEE, Y. Variabilité enzymatique chez le maïs. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, 26: 214-28, 1984.
- CROSS, J.W. & ADAMS, W.R. Differences in the embryo-specific globulins among maize inbred lines and their hybrids. Crop Science, Madison, 23: 1160-2, 1983.
- CROW, J.F. Dominance and overdominance. In: GOWEN, J.W., ed. Heterosis, Iowa, Iowa State College Press, 1952. cap. 18, p. 282-97.
- DARWIN, C. Des effets de la fécondation croisée et de la fécondation directe dans le règne végétal. Paris, C.

Reinwald et Cie., 1877. 496p.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis; II. Method and application to human serum proteins. Annual New York Academy of Science, New York, 121: 404-27, 1964.

DERBYSHIRE, E.; MÜLLER, H.P.; CARVALHO, M.T.V.; CROCOMO, O. J. Protein profiles of brazilian beans (Phaseolus vulgaris) obtained by electrophoresis in slabs of polyacrilamide gel. Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 3: 100-109, 1981.

DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J.; BOULTER, D. Legumin and Vicilin, storage proteins of legume seeds. Phytochemistry, London, 15: 3-24, 1976.

DUCROS, D.L.; WRIGLEY, C.W.; BLAKENEY, B. Fractionation of rice-grain proteins gradient gel electrophoresis and gel isoelectric focusing characterization of rice genotypes. Il Riso, Milano, 28: 375-83, 1979.

DZUBA, V.A. Genetic researches and their use in rice breeding. Il Riso, Milano, 24: 191-5, 1975.

ENDO, T. Differential regulation of peroxidase isozymes coded by Px-1 locus in rice. Japanese Journal of Genetics, Mishima, 56: 175-83, 1981.

ENDO, T.; SHAHI, B.B.; PAI, C. Genetic convergence of the specific acid phosphatase zymograms in Oryza sativa. Japanese Journal of Genetics, Mishima, 46: 147-52, 1971.

- FEILLET, P. Les protéines solubles des céréales. Annales de Technologie Agricole, Paris, 16: 135-89, 1967.
- FREI, O.M.; STUBER, C.W.; GOODMAN, M.M. Use of allozymes as genetic markers for predicting performance in maize single cross hybrids. Crop Science, Madison, 26: 37-42, 1986.
- GLASZMANN, J.C. A simplified method to classify rice varieties with isozymes. International Rice Research Newsletter, Manila, 12: 5-6, 1987.
- GLASZMANN, J.C. Isozymes and classification of Asian rice varieties. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 74: 21-30, 1987.
- GONELLA, J.A. & PETERSON, P.A. Isozyme relatedness of inbred lines of maize and performance of their hybrids. Maydica, Bergamo, 23: 55-61, 1978.
- GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W.; LEE, C.N.; JOHSON, F.W. Genetic control of malate dehydrogenase isozymes in maize. Genetics, Baltimore, 94: 153-68, 1980.
- GUO, Y.J.; FERHNSTRÖN, M.H.; YU, G.Z.; LIAN, Y.N.; HUANG, S. D. Classification of chinese rice varieties by electrofocusing. Cereal Chemistry, St. Paul, 65: 1-3, 1986.
- GUPTA, V.K. & SINGH, S.P. Biochemical basis of hybrid vigour. The genetics of grain weight of Oryza sativa. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 49: 259-64,

1977.

- HAYES, H.K. Development of the heterosis concept. In: GOWEN, J.W., ed. Heterosis. Iowa, Iowa State College Press, 1951. cap.3, p.49-65.
- HEIDRICH-SOBRINHO, E. & CORDEIRO, A.R. Codominant isoenzymic alleles as markers of genetic diversity correlated with heterosis in maize (Zea mays L.). Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 46: 197-9, 1975.
- HEIDRICH-SOBRINHO, E. Isoenzimas como marcadores genéticos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 17: 281-6, 1982.
- HINATA, K. & OKA, H.I. A survey of hybrid sterility relationships in the Asian forms of Oryza perennis and Oryza sativa. Japanese Journal of Genetics, Mishima, 37: 314-28, 1962.
- HUNTER, P.B. & KANNENBERG, L.W. Isoenzyme characterization of corn inbreds and its relationship to single cross hybrid performance. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, 13: 649-55, 1971.
- JACOBS, M. & SCHWIND, F. Genetic control of isozymes of acid phosphatase in Arabidopsis thaliana. Plant Science Letters, Amsterdam, 1: 95-104, 1973.
- JOHNSON, B.L.; BARNHART, D.; HALL, O. Analysis of genome and species relationships in the polyploid wheats by

- protein electrophoresis. American Journal of Botany, New York, 54: 1089-98, 1967.
- KAUL, M.L.H. & KUMAR, V. Genetic variability in rice. Genetica Agraria, Roma, 36: 257-68, 1982.
- KAWANO, K.; KUROSAWA, K.; TAKAHASHI, M. Heterosis in vegetative growth of the rice plant. Japanese Journal of Breeding, Mishima, 19: 335-42, 1969.
- KUMAR, I. & SAINI, S.S. Estimates of genetic effects for various quantitative characters in rice (Oryza sativa L.). Genetica Agraria, Roma, 34: 35-48, 1980.
- KUSAMA, T.; YANAGI, S.O.; IWAMOTO, M. Comparison of rice (Oryza sativa L.) seed proteins from several varieties. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, 48: 1649-1651, 1984.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London, 227: 680-5, 1970.
- LOOKHART, G.L. Gliadin electrophoretic in foundation Arkan wheat grown at 16 Kansas agricultural stations in 1983. Cereal Chemistry, Saint Paul, 62: 355-60, 1985.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological and Chemistry, Baltimore, 193: 165-275, 1951.

MARCHYLO, B.A. & LA BERGE; D.E. Barley cultivar identification by electrophoretic analysis of hordein proteins; I. Extraction and separation of hordein proteins and environmental effects on the hordein electrophoregram. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, 60: 1343-50, 1980.

MAURER, H.R. Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. Berlin, Walter de Gruyter, 1971. 210p.

McMILLIN, D.E. Plant isozymes; a historical perspective. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J., ed. Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam, Elsevier, 1983. p. 3-15.

MOLL, R.M.; LONQUIST, J.M.; VÉLEZ FORTUNO, J.; JOHNSON, E. C. The relationship of heterosis and genetic divergence in maize. Genetics, Baltimore, 52: 139-44, 1965.

NAKAGAHRA, M. Genic analysis for esterase isoenzymes in rice cultivars. Japanese Journal of Breeding, Tokyo, 27: 141-8, 1977.

NAKAGAHRA, M.; AKIHAMA, T.; HAYASHI, K.I. Genetic variation and geographic cline of esterase isozymes in native rice varieties. Japanese Journal of Genetics, Mishima, 50: 373-82, 1975.

NAKAI, Y. Variations of esterase isozymes and some soluble proteins in diploids and their induced autotetraploids

in plants. Japanese Journal of Genetics, Mishima, 52: 171-81, 1977.

PAI, C.; ENDO, T.; OKA, H.I. Genic analysis for peroxidase isozymes and their organ specificity in Oryza perennis and Oryza sativa. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, 15: 845-53, 1973.

PAI, C.; ENDO, T.; OKA, H.I. Genic analysis for acid phosphatase isozymes in Oryza perennis and Oryza sativa. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, 17: 637-50, 1975.

PALANICHAMY, K. & SIDDIQ, E.A. Study of interrelationship among A-Genome of the genus Oryza through isoenzyme variation. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 50: 201-10, 1977.

RAMIREZ, H.; HUSSAIN, A.; ROCA, W.; BUSHUK, W. Isozyme electrophoresis of sixteen enzymes in five tissues of cassava(Manihot esculenta C.) varieties. Euphytica, Wageningen, 36: 39-48, 1987.

REISFELD, R.A.; LEWIS, V.T.; WILLIAMS, D.E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature, London, 195: 281-3, 1962.

SANO, Y.; KATSUMATA, M.; OKUNO, K. Genetic studies of speciation in cultivated rice; 5. Inter and intraespecific differentiation in the waxy gene expression of rice. Euphytica, Wageningen, 35: 1-9, 1986.

- SARDANA, S. & BORTHAKUR, N. Heterosis in rice. Indian Journal of Agricultural Sciences, New Delhi, 55: 765-6, 1985.
- SARKAR, R. & BOSE, S. Electrophoretic characterization of rice variations using single seed(salt soluble) proteins. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 68: 415-9, 1984.
- SCANDALIOS, J.G. Isozymes; genetic and biochemical regulation of alcohol dehydrogenase. In: SMITH, M. ed. Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants. London, academic Press, 1977. cap. 7, p.129-53.
- SCHWARTZ, D. & LAUGHNER. A molecular basis for heterosis. Science, Washington, 166: 626-7, 1969.
- SECOND, G. Origin of the genic diversity of cultivated rice (Oryza spp.); study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. Japanese Journal of Genetics, Mishima, 57: 25-57, 1982.
- SHAHI, B.B.; CHU, Y.E.; OKA, H.I. Analysis of genes controlling peroxidase isozymes in Oryza sativa and Oryza perennis. Japanese Journal of Genetics, Mishima, 44: 321-8, 1969.
- SHAHI, B.B.; MORISHIMA, H.; OKA, H.I. A survey of variations in peroxidase, acid phosphatase and esterase isozymes of wild and cultivated Oryza species. Japanese Journal of Genetics, Mishima, 44: 303-19, 1969.

- SHEWRY, P.R.; BRADBERRY, D.; FRANKLIN, J.; WHITE, R.P. The chromosomal locations and linkage relationships of the structural genes for the prolamin storage proteins( secalins) of rye. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 69: 63-9, 1984.
- SHULL, G.M. What is "heterosis"? Genetics, Baltimore, 33: 439-46, 1948.
- SIDDIQ, E.A.; NERKAR, Y.S.; MEHTA, S.L. Intra and inter subspecific variation in soluble proteins of Oryza sativa L. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 42: 351-6, 1972.
- SULLIVAN, J.G. & FREYTAG, G. Predicting interespecific compatibilities in beans (Phaseolus) by seed protein electrophoresis. Euphytica, Wageningen, 35: 201-9, 1986.
- TAKAHASHI, N. Differentiation of ecotypes in Oryza sativa L. In: TSUNODA, S. & TAKAHASHI, N., ed. Biology of Rice, Tokyo/Amsterdam, Japan Scientific Society Press/Elsevier, 1984. p.31-67.
- TOMAR, J.B. & CHAUDARY, R.C. Biochemical basis of grain dormancy in rice. Genetica Agraria, Roma, 41: 193-200, 1987.
- VILLAREAL, R.M. & JULIANO, B.O. Properties of glutelin from mature and developing rice grain. Phytochemistry, London, 17: 177-82, 1978.

- VIRMANI, S.S.; AQUINO, R.C.; KHUSH, G.S. Heterosis breeding in rice (Oryza sativa L.). Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 63: 373-80, 1982.
- YI, Q.M.; SHI, S.Y.; JIANG, J.R. Analysis of the esterase isozymes in three lines and F1 in Oryza sativa and prediction of heterosis. Acta Botanica Sinica, Jiangsu, 26: 506-12, 1984.
- ZILLMAN, R.R. & BUSHUK, W. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams; II. Effects of environmental and experimental factors on the gliadin electrophoregram. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, 59: 282-6, 1979.
- ZIRKLE, C. Early ideas on inbreeding and crossbreeding. In: GOWEN, J.W., ed. Heterosis. Iowa, Iowa State College Press, 1951. cap.1, p.1-13.