

# Identificación de variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivadas en Argentina mediante marcadores bioquímicos: su utilidad potencial para el registro de cultivares

R.D. Medina✉, M.M. Faloci, M.A. Marassi y L.A. Mroginski

Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), CC 209, 3400 Corrientes, Argentina. Tel: +543783427589; Fax: +543783427131; E-mail: ricardomedina@agr.unne.edu.ar

## Resumen

Identificación de variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivadas en Argentina mediante marcadores bioquímicos: su utilidad potencial para el registro de cultivares

Cuarenta y cinco variedades de arroz cultivadas en Argentina fueron caracterizadas por electroforesis de isoenzimas, utilizando geles discontinuos de poliacrilamida no desnaturalizantes (PAGE). Los sistemas isoenzimáticos analizados fueron: Fosfatasa ácida (ACP), Diaforasa (DIA), Esterasas (EST), Malato deshidrogenasa (MDH) y Siquimato deshidrogenasa (SDH). El sistema SDH mostró la mayor variabilidad formando 21 grupos, mientras que MDH evidenció el menor polimorfismo generando sólo 9. La identificación de todas las variedades se logró evaluando los cinco sistemas. Ello muestra que los marcadores bioquímicos pueden constituir un complemento o una alternativa a ser utilizada para caracterizar, identificar y registrar las variedades de arroz en Argentina.

## Résumé

## Summary

Identification of rice varieties (*Oryza sativa* L.) cultivated in Argentina using biochemical markers: their potential utility for the registration of cultivars

Forty five rice varieties grown in Argentina were analyzed through isozyme analysis using discontinuous native polyacrylamide gels electrophoresis (PAGE). Polymorphic isozymes used to distinguish among the cultivars were: acid phosphatase (ACP), diaphorase (DIA), esterases (EST), malate dehydrogenase (MDH) and shikimate dehydrogenase (SDH). The SDH system showed the highest degree of variability in the banding patterns—21 groups were formed—compared to the MDH system which showed the least isozyme polymorphism—only 9 groups were formed. The tested varieties could be uniquely identified when all five isozyme were evaluated. These results show that biochemical markers could complement or be an alternative method of characterization, identification and registration for rice varieties in Argentina.

**Key words:** isozyme analysis, varietal identification, *Oryza sativa*

## Introducción

Desde los comienzos del siglo XX la necesidad de protección de las creaciones fitogenéticas hizo que los fitomejoradores buscaran los medios legales por los que se les conceda un dominio temporal sobre su obtención, logrando en 1930 en EE.UU. la aprobación de la Ley de Patentes de Plantas (Jadue Díaz 1999). Treinta años después se creó la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) que, desde entonces, se ha encargado de armonizar las normas jurídicas para la protección de variedades en los estados miembros. De común acuerdo las naciones participantes reconocen los exámenes de distinción varietal como un prerrequisito para su protección (Bayle 1983).

La Ley Argentina de Semillas y Creaciones Fitogenéticas N° 20.247 (Boletín Oficial, 16/IV/1973), en su Art. 20 dispone que para registrar un cultivar, el mismo debe diferir de otros conocidos a la fecha de solicitud y debe poseer

características suficientemente homogéneas y estables a través de generaciones sucesivas.

Las variedades a ser registradas comúnmente satisfacen los estándares de homogeneidad y estabilidad, sin embargo, los requerimientos de distinción son los más difíciles de establecer, en especial en materiales genéticamente emparentados. Para el registro o lanzamiento de una nueva variedad de arroz se recurre a los descriptores morfológicos (IRRI 1988) y aunque su utilización sigue siendo reglamentaria, es necesaria la búsqueda de alternativas.

Otros tipos de atributos han recibido especial atención para ser explotados como criterio de distinción de variedades. Entre ellos se encuentran los marcadores bioquímicos (proteínas, isoenzimas, metabolitos secundarios) y los basados en el análisis del ADN (ácido desoxirribonucleico).

Los análisis basados en las proteínas e isoenzimas han pasado a ser efectivamente utilizados en la caracterización

de variedades desde la década de los '70, posibilitando también la estimación de la variabilidad y las relaciones entre genotipos (Milach 1999).

El análisis del polimorfismo isoenzimático ha sido de gran valor para la caracterización, distribución y cuantificación de la diversidad genética del germoplasma de arroz en distintos países (Glaszmann 1987; Kochko 1987; Sie y Ghesquiere 1992; Cai y Morishima 1997). Blair et al. (1999), Virk et al. (2000) y Luce et al. (2001), examinando la diversidad de los recursos genéticos de arroz con distintos marcadores, han adoptado como estudio de referencia el reportado por Glaszmann (1987), quien estudió 1688 variedades de arroz asiáticas con 8 sistemas isoenzimáticos.

La identificación de variedades de arroz fue descripta empleando técnicas tales como el análisis del polimorfismo de los fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD, random amplified polymorphic DNA) por Ko et al. (1994), Mackill (1995) y Virk et al. (2000), el polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP, amplified fragment length polymorphism) por Mackill et al. (1996) y Virk et al. (2000) y el estudio de las intersecuencias simples repetidas (ISSR, intersimple sequence repeat) por Blair et al. (1999) y Virk et al. (2000) o de secuencias simples repetidas (SSR, simple sequence repeat o microsatellites) por Garland et al. (1999) y Luce et al. (2001). Estas técnicas han mostrado una amplia variación en su capacidad de discriminación. No obstante, cada una de estas estrategias de identificación junto a los marcadores de otro tipo, aportan una invalorable información para la caracterización de variedades.

Esta creciente disponibilidad de técnicas bioquímicas y moleculares, que revelan un mayor nivel de polimorfismo y consistencia en los resultados, abre el espectro de posibilidades para que los organismos oficiales cuenten con herramientas potencialmente eficientes para la identificación, el registro y la protección de las variedades.

Si bien el uso de estos marcadores aún no está generalizado, algunos países han implementado su aplicación como complemento de las características morfológicas. Tal es el caso de Inglaterra que ha incorporado como criterio de distinción varietal para trigo (*Triticum aestivum* L.) los perfiles electroforéticos de gliadinas (Milach 1999), de Francia que para la identificación y el registro de líneas de maíz (*Zea mays* L.), trigo y cebada (*Hordeum vulgare* L.) emplean patrones isoenzimáticos (Lombard et al. 2000) y de Italia, que utilizan el análisis de hordéinas para cebada siguiendo un protocolo de la UPOV (Delogu et al. 1993).

Estos antecedentes y las características propias de las evaluaciones basadas en marcadores bioquímicos (simplicidad, alta sensibilidad, reproducibilidad, carácter no destructivo y celeridad en la obtención de resultados a un costo considerablemente menor comparado con los marcadores moleculares) los postulan como un método de elección al momento de buscar otros criterios que complementen a los existentes.

El objetivo del presente trabajo fue encontrar polimorfismos isoenzimáticos que permitan diferenciar 45 variedades de arroz empleadas en Argentina, para que en el futuro puedan ser utilizados como efectivos marcadores de distinción.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Para este estudio se utilizaron plantas de diferentes variedades de arroz (*Oryza sativa* L.), pertenecientes a todos los tipos comerciales, representando gran parte del germoplasma presente en Argentina. Dichas variedades fueron: 'Altamirano P.A.', 'Arroyo Grande P.A.', 'Bluebelle', 'Calá P.A.', 'Colonia Macías 5 C.A.', 'Chacarero P.A.', 'Chajarí P.A.', 'EMBRAPA-6-Chuí', 'CT 6919 INTA', 'Cypress', 'Don Ignacio FCAYF', 'Don Juan INTA', 'El Paso 144', 'El Paso 227', 'EPAGRI 107', 'Fortuna INTA', 'Gená P.A.', 'Guaviraví P.A.', 'Guayquiraró P.A.', 'IR 1529 INTA', 'BR/IRGA 409', 'BR/IRGA 410', 'BR/IRGA 416', 'BR/IRGA417', 'La Plata Itapé P.A.', 'La Candelaria P.A.', 'La Plata Mochi P.A.', 'Lemont', 'Mandisoví P.A.', 'Maybelle', 'Mocoi F.C.A.', 'Mocoretá P.A.', 'Montiel P.A.', 'Ñancay P.A.', 'Palmar P.A.', 'Petei F.C.A.', 'Quebracho P.A.', 'Rico', 'R.P. 2', 'EMBRAPA-7-Taim', 'Taipero P.A.', 'Tebonett', 'Villaguay P.A.', 'Yeruá P.A.' y 'Yuquerí'.

### Análisis de isoenzimas

Los extractos crudos se prepararon a partir de 50 mg de hojas jóvenes en activo crecimiento de plantas obtenidas a partir de semillas germinadas en tierra estéril, en frascos de 382 cm<sup>3</sup> sigilados con Resinite AF-50® (Casco S.A.C., Buenos Aires) e incubados en un cuarto climatizado a 27±2°C con 14hs de fotoperíodo y con una intensidad lumínica de 116 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Las muestras se homogeneizaron en un mortero con buffer de extracción: 0,1 M de Tris/HCl pH=6,8 + 2% de glicerol + 0,1% de β-mercaptoetanol + 0,01% de azul de bromofenol, en relación 0,1 g ml<sup>-1</sup>. Los homogenizados se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 minutos, se fraccionaron en alícuotas y se conservaron a -70°C.

Se analizaron 5 sistemas isoenzimáticos: Fosfatasa ácida: ACP (E.C. 3.1.3.2), Diaforasa: DIA (E.C. 1.6.4.3), Esterasas: EST (E.C. 3.1.1. -), Malato deshidrogenasa: MDH (E.C. 1.1.1.37) y Siquimato deshidrogenasa: SDH (E.C. 1.1.1.25) en geles discontinuos de poliacrilamida no desnaturalizantes 3% - 7,5% (PAGE), utilizando buffer de electrodo 0,025 M de Tris/HCl + 0,192 M de glicina, pH=8,3; según Laemmli (1970).

Dependiendo del sistema isoenzimático, se sembraron entre 18 y 20 μL del homogenado por muestra. La electroforesis se llevó a cabo a 4°C y a intensidad constante de 1,2 mA/cm. El revelado se efectuó sumergiendo los geles en la mezcla de reacción específica para cada sistema enzimático: ACP, MDH y SDH según Arulsekhar y Parfitt (1986); DIA según Stuber et al. (1988) y EST según Soltis et al. (1983).

Luego de la aparición de las bandas coloreadas que revelan la actividad enzimática, los geles fueron lavados varias veces con agua destilada y secados a temperatura ambiente entre hojas de papel celofán.

Se analizaron cualitativamente las bandas isoenzimáticas y se calcularon las movilidades electroforéticas relativas (R<sub>e</sub>) para cada una de ellas.

Se representó la capacidad de diferenciación varietal de los sistemas evaluados a través del porcentaje acumulado de diferenciación varietal de cada sistema más el que surge de

la combinación aditiva de las demás isoenzimas empleadas, comenzando por los sistemas isoenzimáticos más polimórficos y siguiendo por los menos polimórficos.

## Resultados y discusión

Los zimogramas obtenidos fueron claramente legibles, muy consistentes y altamente reproducibles en corridas electroforéticas independientes.

Para la identificación de 45 variedades de arroz se utilizaron los 5 sistemas isoenzimáticos más polimórficos entre los 15 analizados por Medina et al. (1998).

En los perfiles isoenzimáticos se visualizaron 57 bandas, 39 polimórficas y las restantes 18 monomórficas. En las Apéndices

1A y 1B (online) se transcriben los zimogramas indicando presencia (+) y ausencia (-) de bandas isoenzimáticas y los grupos que originaron. En la Figura 1 A, 1 B, 1 C, 1 D y 1 E se esquematizan los perfiles isoenzimáticos de los 5 sistemas evaluados. En la Figura 2 se pueden observar los zimogramas de algunos de los grupos varietales formados a partir de los 5 sistemas isoenzimáticos analizados.

Del análisis de los patrones de bandas obtenidos surge que el sistema SDH ha generado la máxima cantidad de grupos (21) constituyéndose el marcador más polimórfico. Los sistemas EST y ACP han presentado una considerable variabilidad, que se tradujo en la discriminación de 15 y 14 grupos, respectivamente. Ello concuerda con Glazmann (1987), Sie y Ghesquiere (1992), Cai y Morishima (1997) quienes también han considerado estas isoenzimas de utilidad para la diferenciación de grupos varietales. En otras especies como yam (*Dioscorea cayenensis* Lam. y *D. rotundata* Poir.), EST y SDH resultaron heteromórficos (Dansí et al. 2000), sin embargo, en kiwi (*Actinidia deliciosa* [A. Chev.] C.F. Liang et A.R. Ferguson) Messina et al. (1991) evidenciaron patrones de bandas de SDH idénticos en todos los cultivares evaluados.

MDH fue el sistema menos polimórfico permitiendo la menor agrupación. Ello coincide con lo reportado por Kochko (1987) quien analizó la variabilidad isoenzimática de variedades de arroz en África, resultando éste uno de los sistemas más monomórficos. También Tao y Sugiura (1987) observaron que dicho sistema fue el que produjo la menor cantidad de grupos en cultivares de kaki (*Diospyros kaki* Lf.).

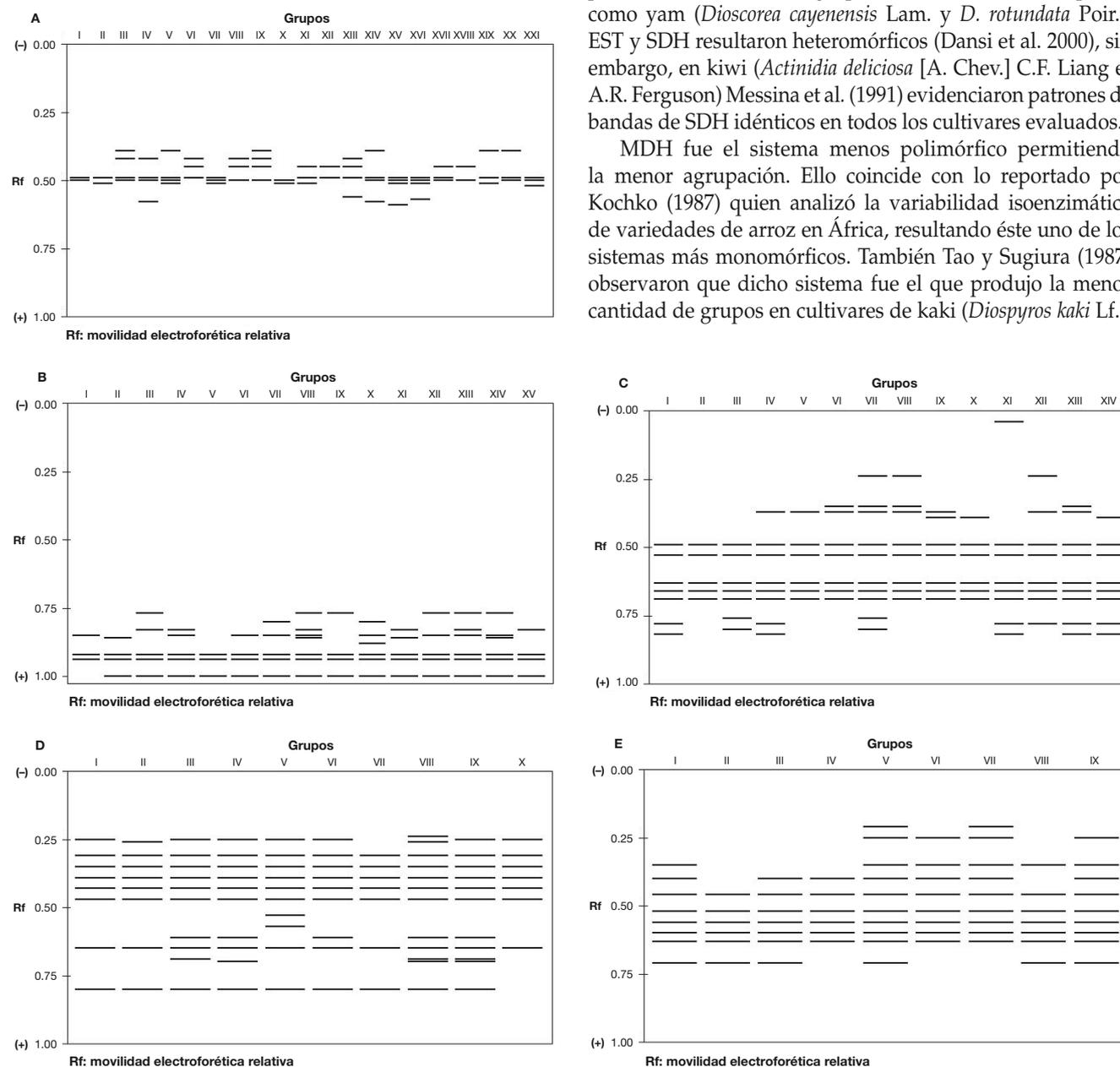
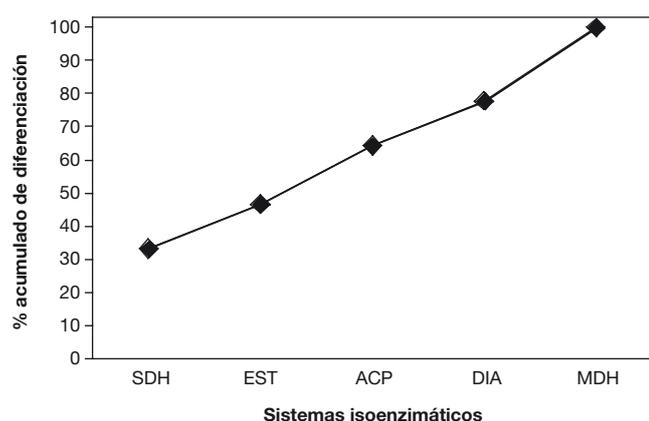


Figura 1. Patrones isoenzimáticos de SDH (A), EST (B), ACP (C), DIA (D) y MDH (E) para diferentes grupos varietales.





**Figura 3.** Capacidad de diferenciación varietal de los sistemas isoenzimáticos empleados.

maní forrajero (*Arachis Pintoi* Krap. & Greg.). Marquard y Chan (1994) con 6 sistemas isoenzimáticos distinguieron 45 cultivares de manzano silvestre (*Malus spp.*). Sin embargo, Hussain et al. (1987) caracterizaron 20 cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) solamente con el patrón de bandas de EST.

Para la mayoría de las especies, los exámenes de Distinción, Homogeneidad y Estabilidad (DUS) únicamente confían en la comparación de características morfológicas entre los cultivares candidatos y todos los previamente registrados que componen la colección de referencia (Lombard et al. 2000) si bien, como ha sido mencionado anteriormente, existen ejemplos del uso de marcadores bioquímicos como complementarios. Los protocolos que se basan en las características morfológicas tienen ciertas limitaciones. En primer lugar tienen un costo económicamente elevado, dado que requieren evaluaciones en distintas localidades y un cierto número de réplicas, lo que se complica aún más cuando año tras año se incrementa el tamaño de la colección. Por otra parte las características deben evaluarse a lo largo de todo el ciclo del cultivo y por más de un ciclo, dependiendo de la especie, lo que conlleva un mayor consumo de tiempo. En este contexto, los exámenes DUS podrían beneficiarse de las bondades y ventajas que les brindarían los marcadores bioquímicos y moleculares.

La identificación de variedades de arroz mediante el análisis de marcadores moleculares basados en ADN se ha llevado a cabo utilizando varias técnicas. Ko et al. (1994) utilizando 22 cebadores arbitrarios pudieron diferenciar 27 variedades de distinto origen empleando RAPD, aunque algunas de ellas presentaron altos porcentajes de similitud (88–97%). Mackill et al. (1996) estudiaron 14 variedades con tres sistemas marcadores: AFLP, RAPD y microsatélites, siendo este último el que generó mayor polimorfismo intra e intersubespecífico. Luce et al. (2001) evaluando 16 cebadores microsatélites lograron identificar 419 variedades adaptadas a condiciones europeas, si bien 82 de ellas presentaron un alto polimorfismo intravarietal.

Aunque no sea posible la comparación de dichas técnicas sin el empleo del mismo número de marcadores, se puede afirmar que los análisis de RAPD resultan un método

simple y rápido, si bien son frecuentemente criticados por el escaso polimorfismo revelado (Mackill 1995), por su falta de reproducibilidad (Karp y Edwards 1997; Lee y Henry 2001) y su poca transferibilidad de un laboratorio a otro según lo reportado por Ferreira y Grattapaglia (1998). Los marcadores microsatélites son útiles para la identificación de variedades porque brindan un alto nivel de polimorfismo (Ferreira y Grattapaglia 1998; Garland et al. 1999; Luce et al. 2001), aunque su tasa de mutabilidad es 500 veces mayor de lo normal (Jarne y Lagoda 1996), siendo ésta una de las razones por las que se explica el fenómeno del polimorfismo intravarietal, pudiendo hacer dificultoso el establecimiento de un determinado patrón identificatorio que sirva como referencia y sea estable durante un elevado número de generaciones.

Virk et al. (2000) compararon experimentalmente la capacidad de discriminación de cuatro estrategias de identificación (isoenzimas, AFLP, microsatélites e ISSR) considerando un número similar de marcadores para cada una. Ellos reportaron que a excepción de ISSR, las demás técnicas clasifican las variedades de arroz de acuerdo a Glaszmann (1987), siendo las isoenzimas y los AFLP los más eficientes. Los marcadores AFLP tienen un alto poder de discriminación debido a que generan un considerable número de bandas que pueden analizarse en un único gel, sin embargo, son técnicas que incluyen mayor número de etapas y la exigencia de un alto nivel de pureza del ADN que implica un mayor consumo de tiempo y mayores costos operativos (Ferreira y Grattapaglia 1998; Lee y Henry 2001).

Empleando 5 sistemas isoenzimáticos fue factible identificar 45 variedades de arroz cultivadas en Argentina, brindando una herramienta complementaria que podría ser considerada para el registro de cultivares. Si bien no se puede afirmar que se trata del mejor método de identificación ya que no se estudiaron otros métodos comparativamente, esta estrategia se presenta como una técnica no destructiva, de simple resolución y de alta sensibilidad que requiere muy poco material por individuo. Éste, comparado con otros sistemas de marcadores, es de bajo costo operativo y de establecimiento (Ferreira y Grattapaglia 1998). Por otra parte, la variabilidad ontogenética y aquella debida al ambiente pueden ser eliminadas en un sistema de trabajo controlado garantizando una alta reproducibilidad del método.

Si bien las bases estatuidas para la mayoría de los exámenes DUS que se realizan para el otorgamiento de una licencia de protección y registro de una nueva variedad seguirán siendo los caracteres morfológicos y fenológicos, la UPOV, en circunstancias donde se hace difícil determinar la distinción varietal, ha aceptado el uso de marcadores bioquímicos como una alternativa (Camlin 2001) y de hecho existen algunos ejemplos de su utilización en la identificación y registro de cereales (Lombard et al. 2000).

## Conclusiones

Con este trabajo se ha demostrado que es posible diferenciar 45 variedades de arroz empleadas en Argentina mediante la evaluación de cinco sistemas isoenzimáticos (ACP, DIA,

EST, MDH y SDH), siendo la electroforesis en minigeles discontinuos de poliacrilamida no desnaturalizantes un método eficiente que permite un análisis muy sensible con la obtención de resultados inmediatos. Ello, sumado a las vastas evidencias de la utilidad de los marcadores bioquímicos para la identificación varietal, inclusive en diversas especies, incrementa la probabilidad que, en un futuro cercano, sean considerados y empleados como criterio en los exámenes de distinción para el registro nacional de variedades de arroz en Argentina.

## Referencias

- Arulsekar S, Parfitt D. 1986. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and fig. *HortScience* 21:928-933.
- Bayle DC. 1983. Isozymic variation and plant breeders rights. In: Tanksley SD, Orton TJ, editors. *Isozymes in plant genetics and breeding*. Part A. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, Holland, pp. 129-146.
- Blair MW, Panaud O, McCouch SR. 1999. Intersimple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 98:780-792.
- Boletín Oficial de la República Argentina. 16/IV/1973. Ley de Semillas y Creaciones Fitogenéticas N° 20.247.
- Cai HW, Morishima H. 1997. *Indica-japonica* differentiation of Bangladesh rice cultivars detected by isozyme analysis. *Rice Genetics Newsletter* 14:29-30.
- Camlin, MS. 2001. Possible future roles for molecular techniques in the identification and registration of new plant cultivars. In: Doré C, Dosba F, Baril C, editors. *Proceeding of the International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture*. Acta Horticulturae (ISHS) N° 546, Montpellier, France, pp. 289-296.
- Dansi A, Mignouna HD, Zoundjihekpon J, Sangare A, Asiedu R, Ahoussou N. 2000. Using isozyme polymorphism to assess genetic variation within cultivated yams (*Dioscorea cayenensis/Dioscorea rotundata* complex) of the Republic of Benin. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47:371-383.
- De los Reyes BG, Brar DS, Khush GS. 1989. Identification of four new isozyme loci in rice. *Rice Genetics Newsletter* 6:103-106.
- Delogu G, Terzi V, Cattivelli L, Stanca AM. 1993. Le varietà di orzo coltivate in Italia. Edizioni L'informatore agrario X, Verona, Italia.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN Documento 20. EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia, Brasil.
- Garland SH, Lewin L, Abedinia M, Henry R, Blakeney A. 1999. The use of microsatellite polymorphisms for the identification of Australian breeding lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 108:53-63.
- Glaszmann JC. 1987. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 74:21-30.
- Hussain A, Bushuk W, Ramirez H, Roca W. 1987. Identification of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars by electrophoretic patterns of esterase isozymes. *Seed Science and Technology* 15:19-22.
- International Rice Research Institute. 1988. Standard evaluation system for rice (*Oryza sativa* L.). 3rd Edition. IRRI, Los Baños, Philippines, pp. 1-54.
- Jadue Díaz Y. 1999. Certificación de variedades: la visión de UPOV. En: Pagliano D, editor. *Calidad genética y sanitaria. Un instrumento para la competitividad de la cadena agroindustrial*. IICA-PROCISUR, Montevideo, Uruguay, pp. 53-60.
- Jarne P, Lagoda P. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11(10):424-429.
- Karp A, Edwards KJ. 1997. Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity. In: Ayad WG, Hodgkin T, Jaradat A, Rao VR, editors. *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*. Report of the International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) Workshop, 9-11 October 1995, Rome, Italy, pp. 11-22.
- Ko HL, Cowan DC, Henry RJ, Graham GC, Blakeney AB, Lewin LG. 1994. Random amplified polymorphic DNA analysis of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Euphytica* 80:179-189.
- Kochko A. 1987. Isozymic variability of traditional rice (*Oryza sativa* L.) in Africa. *Theoretical and Applied Genetics* 73:675-682.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lee LS, Henry RJ. 2001. Commercial applications of plant genotyping. In: Henry RJ, editor. *Plant Genotyping: the DNA fingerprinting of plants*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 265-273.
- Lombard V, Baril CP, Dubreuil P, Blouet F, Zhang D. 2000. Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: consequences for varietal registration. *Crop Science* 40:1417-1425.
- Luce C, Noyer JL, Tharreau D, Ahmadi N, Feyt H. 2001. The use of microsatellite markers to examine the diversity of the genetic resources of rice (*Oryza sativa*) adapted to European conditions. In: Doré C, Dosba F, Baril C, editors. *Proceeding of The International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture*. Acta Horticulturae (ISHS) N° 546, Montpellier, France, pp. 221-230.
- Maass BL, Torres AM, Ocampo CH. 1993. **Morphological and isozyme characterization of *Arachis Pinto* Krap. et Greg. nom. nud. germplasm.** *Euphytica* 70:43-52.
- Mackill DJ. 1995. Classifying *japonica* rice cultivars with RAPD markers. *Crop Science* 35:889-894.
- Mackill DJ, Zhang Z, Redoña ED, Colowit PM. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39:969-977.
- Marquard R, Chan Ch R. 1994. Identification of crab apple cultivars by isozymes. In: *Proceeding of the 8th Conference of the Metropolitan Tree Improvement Alliance and International Ornamental Crabapple Society*. US National Arboretum, Washington DC, USA, pp. 87-96.
- Medina RD, Faloci MM, Marassi MA, Mroginski LA. 1998. Caracterización isoenzimática de variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivadas en Argentina. En: *Actas de la III Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Vol. 3. Universidad Nacional del Nordeste. EUDENE, Corrientes, Argentina, pp. 101-104.
- Messina R, Testolin R, Morgante M. 1991. Isozymes for cultivar identification in kiwifruit. *HortScience* 26:899-902.
- Milach SCK. 1999. Disponibilidad de técnicas moleculares para la identificación varietal. En: Pagliano D, editor. *Calidad genética y sanitaria. Un instrumento para la competitividad de la cadena agroindustrial*. IICA-PROCISUR, Montevideo, Uruguay, pp. 30-37.
- Quirós CF, Mc Grath M, Stites JL. 1987. Use of stem proteins and isozymes for the identification of celery varieties. *Plant Cell Reports* 6:114-117.
- Sie M, Ghesquiere A. 1992. Isozyme polymorphism and classification of rice varieties from Burkina Faso in Africa. *Rice Genetics Newsletter* 9:75-76.
- Soltis D, Haufler C, Darrow D, Gastony G. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers and staining schedules. *American Fern Journal* 73:9-27.
- Stuber CW, Wendel JF, Goodman MM, Smith JS. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis and enzymes from maize (*Zea mays* L.). In: *Technical Bulletin 286, North Carolina, Agricultural Research Service*. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA, pp. 1-87.
- Tao R, Sugiura A. 1987. Cultivar identification of Japanese persimmon by leaf isozymes. *HortScience* 22:932-935.

- Tobolski JJ, Kemery RD. 1992. Identification of red maple cultivars by isozyme analysis. *HortScience* 27:169–171.
- Virk PS, Zhu J, Newbury HJ, Bryan GJ, Jackson MT, Ford-Lloyd BV. 2000. Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica* 112:275–284.

**Apéndice 1A. Patrón de bandas isoenzimáticas de 22 variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) y grupos varietales formados (en números romanos), está disponible en [http://www.ipgri.cgiar.org/pgrnewsletter/default.asp?id\\_issue=143](http://www.ipgri.cgiar.org/pgrnewsletter/default.asp?id_issue=143)**

**Apéndice 1B. Patrón de bandas isoenzimáticas de 23 variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) y grupos varietales formados (en números romanos), está disponible en [http://www.ipgri.cgiar.org/pgrnewsletter/default.asp?id\\_issue=143](http://www.ipgri.cgiar.org/pgrnewsletter/default.asp?id_issue=143)**

**Apéndice 2. Sistemas isoenzimáticos identificatorios para cada variedad, está disponible en [http://www.ipgri.cgiar.org/pgrnewsletter/default.asp?id\\_issue=143](http://www.ipgri.cgiar.org/pgrnewsletter/default.asp?id_issue=143)**