

Análisis de 19 accesiones de arroz (*Oryza sativa* L.) mediante la electroforesis de isoenzimas y proteínas totales.

Clara González Arencibia*, Sandra Díaz Solís**, María Isabel Román Gutiérrez***, Xonia Xiqués Martín*, Marilyn Florido Bacallao****, Regla Mercedes Lara Rodríguez***** y Leneidy Pérez Pelea*

*Facultad de Biología, Universidad de La Habana

**Estación Experimental de Arroz «Los Palacios»

***Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INIVIT

****Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, INCA

RESUMEN

Se realizó la caracterización genético-bioquímica de 19 accesiones de arroz (*Oryza sativa* L.) utilizando la electroforesis en gel de poliácridamida (PAGE), para las isoenzimas peroxidadas, esterases y polifenoloxidasas y para las proteínas totales, empleando extractos foliares. Los resultados de los electroforetogramas fueron procesados mediante el paquete de programas MAT-GEN y un análisis de conglomerados (Cluster). Se demostró la presencia de variabilidad genética para estos genotipos, ya que se encontraron diferencias en los patrones de bandas para todos los sistemas proteicos. Además en el dendrograma se observa la formación de diez grupos, con las mayores semejanzas dentro de los grupos IV y V.

Palabras clave: Arroz, electroforesis, isoenzimas, proteínas totales

ABSTRACT

A genetic-biochemistry characterization was made for 19 rice accessions using leaves extracts in polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) for peroxidase, esterase and polyphenoloxidase isozymes and total proteins. The results were processed by MAT-GEN software and Cluster Analysis. The genetic variability was demonstrated because in all protein systems studied differences in electrophoretic patterns were demonstrated. The dendrogram showed the formation of ten groups with the main similarities in the IV and V groups.

Key words: rice, electrophoresis, isozymes, total proteins

INTRODUCCIÓN

Actualmente un tercio del planeta depende del arroz (*Oryza sativa* L.), como elemento básico de su dieta. Estas cifras indican que la producción global de arroz debe incrementarse en un 70% para satisfacer la demanda, ya que para el año 2005 la población humana será de 8,3 mil millones de habitantes. Esto requiere de nuevas estrategias de investigación, para lograr un aumento sostenible de la producción de arroz, preservando al mismo tiempo el medio ambiente y el bienestar de los productores. Los estudios del polimorfismo isoenzimático de los recursos fitogenéticos pueden ser muy útiles para el reporte y mantenimiento de la diversidad genética presente en las colecciones (Fedearroz, 1997a y b).

Las isoenzimas y las proteínas totales, han sido utilizadas para estudiar la dinámica poblacional, agrupar los sistemas de varias especies y para estimar la variabilidad genética presente entre especies y variedades de diferentes cultivos (Bouvier, 1993).

Dada su utilidad como un instrumento capaz del marcaje genético, desde hace más de una década se han desarrollado diversos estudios encaminados a conocer la composición isoenzimática en el género *Oryza* (Second

y Trouslot, 1980; Iglesias *et al.*, 1995 a y b). Con vistas a estudiar las diferencias entre los tipos índica y japónica de arroz, Sano y Morishima en 1992 realizaron una amplia colecta en Asia determinando la presencia de seis loci polimórficos que codifican para isoenzimas, los cuales son empleados actualmente para la clasificación en este cultivo.

En nuestro país, Iglesias y González (1995 a) utilizaron los estudios isoenzimáticos, para detectar posibles marcadores bioquímicos de la salinidad en variedades de arroz, que pueden ser de utilidad en la selección de genotipos tolerantes a dicho estrés.

En este trabajo, los objetivos son:

-Realizar la caracterización genético-bioquímica de 19 accesiones de arroz, para tres sistemas isoenzimáticos y las proteínas totales.

-Determinar las afinidades genéticas entre las accesiones, a través de los resultados electroforéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal:

Se estudiaron 19 accesiones de arroz (*Oryza sativa* L.),

de la colección de germoplasma de la Estación Experimental del Arroz «Los Palacios», en Pinar del Río, que incluyó genotipos cubanos y variedades procedentes de diversos países (Tabla I). La siembra en el campo se realizó de forma directa a chorrillo, en parcelas de 2 metros de largo por 2 metros de ancho (4m²), a una distancia de 15 centímetros entre surcos, mediante un diseño completamente aleatorizado con 4 réplicas (MINAGRI, 1994).

Estudio Electroforético:

Para los análisis electroforéticos se emplearon extractos foliares a partir de la colecta de hojas sanas del tercio medio, cuando las plantas tenían 45 días. Se maceraron 5 gramos de estas hojas en un mortero, a las que se les agregó 30 gotas de una solución de sacarosa al 20%. Los extractos fueron filtrados en tela de gasa envasados en frascos de cristal y mantenidos a -4° C hasta su utilización. Las corridas electroforéticas se realizaron en gel de poliacrilamida (PAGE) con buffer de corrida Tris-glicina 0.04 M de pH 8.3, en una cámara vertical Mighty Small II de Pharmacia Biotech para buffers discontinuos (Orstein, 1964; Davis, 1964). Para las isoenzimas peroxidadas, polifenoloxidasas y esterases, se empleó un gel de separación de 8.5%. En el caso de las proteínas totales, se utilizó el sistema SDS-PAGE con un gel de separación del 12%. Después de las tinciones empleadas para cada sistema proteico (Tabla II), los geles fueron conservados en una solución de ácido acético glacial al 10% (González, 1989).

Análisis Estadístico:

A partir de los resultados obtenidos en los electroforetogramas, se analizaron las semejanzas entre los genotipos mediante el empleo del paquete de programas MAT-GEN (Sigarroa y Cornide, 1995), para obtener la matriz de similitud por el índice de Apóstol o Simple Matching (Apóstol, 1993). La matriz de similitud fue procesada por un Análisis de Conglomerados (Cluster) (Daviers, 1973) para representar mediante un dendrograma las relaciones fenéticas entre el material estudiado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición electroforética de las proteínas totales permite apreciar un total de nueve bandas, siendo comunes seis de ellas a todas a las accesiones (Fig. 1). De las tres bandas polimórficas, la ubicada en 3.0 unidades no aparece solamente en el caso de Perla de Cuba, mientras que se encuentran ausentes las bandas de 2.4 y 2.5 unidades, en IR-1529-430, Perla de Cuba, Century Patna, M-55, IR-36, IR-837 y en el mutante 8551. Para otros cultivos como la piña y el tomate, también aparece un alto número de bandas en los proteinogramas y las diferencias entre las entidades están dadas por la ausencia de algunas de ellas, más que por la presencia de bandas propias (Arias, 1998; Florido, 1999).

En el zimograma de las isoenzimas peroxidadas (Fig. 2) se constató la existencia de una alta actividad enzimática

TABLA I

Accesiones, progenitores y procedencia.

Nº	ACCESIONES	Progenitores	Procedencia
1	IR-1529-430	Sigadis 2/TN-1//IR-24	Filipinas
2	Perla de Cuba	IR-1529-430/VNIIR3223	Cuba
3	J-104	IR-880-5-2//IR-930-16-1	Perú
4	INCA LP-1	J-104/Amistad 82	Cuba
5	Ceysvoni	SML 997/Awai	Surinam
6	Century Patna	Tejas Patna/Rexoro/IR Blurssa	U.S.A.
7	M-55	-	-
8	IR-36	IR-1561-228//4*IR-24/O.Niv//CR 94-3	Filipinas
9	Pokkali	-	Srilanka
10	Tetep	-	-
11	IR-759-54-2-2	IR-8/(Peta/3 x Dawn)	Filipinas
12	IR-837	IR-262-43-8-11/Niaw San Pahtawng	Filipinas
13	Cica-8	CICA-4//F1 IR-665/Tetep	Colombia
14	INCA LP-2	IR-759-54-2-2/6066	Cuba
15	INCA LP-5	2077/CP1-C8	Cuba
16	INCA LP-8	Somación Amistad '82	Cuba
17	Oryzica-1	P 1223/P 1225	Colombia
18	2084 Vietnamita	-	-
19	8551	Mutante Amistad'82	Cuba

TABLA II
Métodos de Tinción Empleados.

SISTEMA	TINCION
PEROXIDASAS	Iglesias y González, 1991
POLIFENOLOXIDASAS	Guedes y Rodríguez, 1974
ESTERASAS	González y González, 1981
PROTEINAS TOTALES	Laemmli, 1970

desde el punto de vista cualitativo, pues este sistema presentó un total de doce bandas, de las cuales, cuatro solamente fueron comunes a todas las accesiones. La divergencia entre los zimogramas para este sistema entre las accesiones estudiadas concuerda con lo esperado, dadas las notables diferencias morfoagronómicas y de resistencia que presentan las mismas.

Estas isoenzimas son muy empleadas por ser uno de los sistemas más polimórficos y el papel que desempeñan en la biosíntesis de los componentes de la pared celular, la diferenciación celular y la resistencia a factores bióticos y abióticos (Iglesias, 1995 a y b).

Para las isoenzimas esterasas se observa también un alto polimorfismo, ya que se presentan un total de ocho bandas, de las cuales tres son comunes a todas las accesiones, tres bandas son polimórficas y se presentan bandas propias en cuatro accesiones (Fig.3).

El polimorfismo que se observa para estas isoenzimas ha

sido reportado también en otros cultivos como plátanos, bananos, cítricos, ajo y tomate (Román *et al.*, 1997; Florido, 1999).

En la figura 4 se presenta el zimograma de las isoenzimas polifenoloxidasas, con un total de cinco bandas, de las cuales solamente la banda de 1.5 unidades está ausente en 11 de las accesiones estudiadas.

La presencia de un marcado monomorfismo en estas isoenzimas ha sido referido para otros cultivos por González (1989) y González *et al.*(1998).

Con el fin de examinar la variabilidad isoenzimática en un grupo de variedades de arroz utilizando extractos de hojas, semillas y raíces, se estudiaron los sistemas peroxidasas, esterasas, polifenoloxidasas, amilasas, leucinoaminopeptidasas y glutámico oxidotransferasas, los que revelaron la presencia de un polimorfismo tisular y varietal importante, así como una mayor actividad enzimática y resolución electroforética para las isoenzimas peroxidasas, esterasas y polifenoloxidasas (Iglesias y González, 1991 a).

Diversos estudios han demostrado la relación existente entre algunos caracteres morfoagronómicos y genético-bioquímicos, la cual es de utilidad en la identificación de genotipos y en los programas de mejoramiento genético (Stilber *et al.*, 1982; Price, 1984; Frey *et al.*, 1986; Iglesias *et al.*, 1991 b).

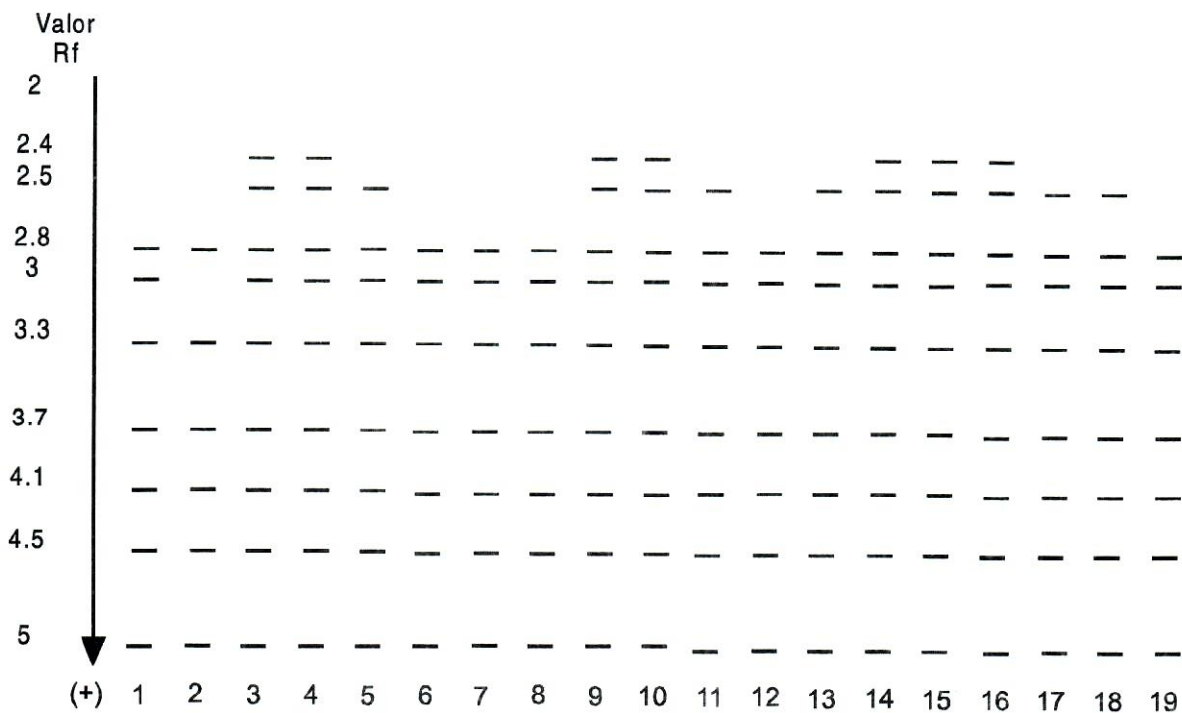


Fig. 1. Proteinograma para las accesiones estudiadas.

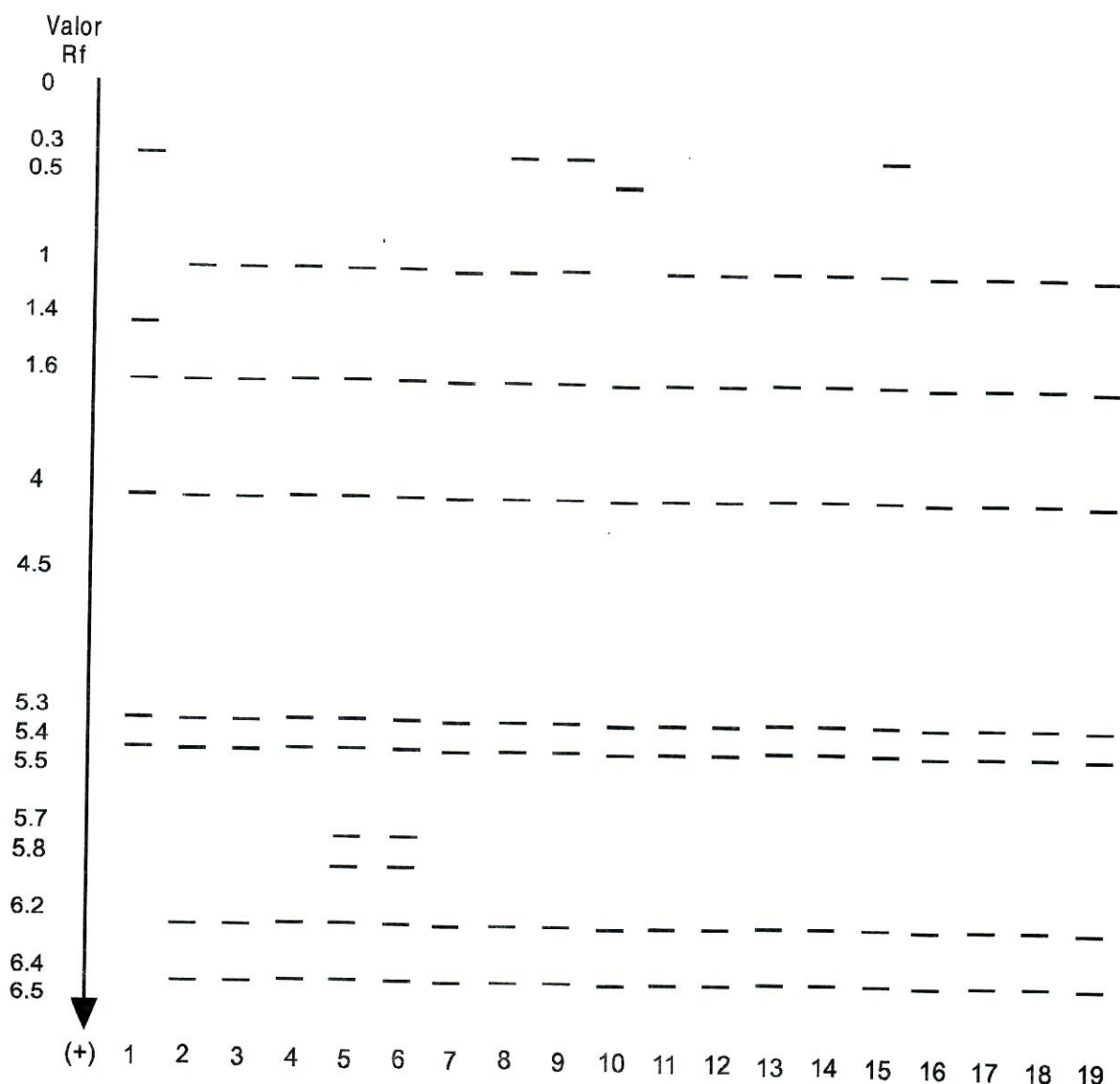


Fig. 2. Zimograma de peroxididasas.

En la tabla III se presenta un análisis general, teniendo en cuenta el total de bandas de cada sistema proteico, el número de bandas polimórficas en cada uno de ellos y el porcentaje de polimorfismo que se presenta en los mismos. Para todos los sistemas se obtuvo un 50% de polimorfismo, lo que indica la utilidad de los mismos en la caracterización de este banco de germoplasma, siendo las isoenzimas peroxididasas y esterasas las de mayor variabilidad. Resultados similares fueron obtenidos en arroz por Iglesias y González (1991), Iglesias *et al.* (1991; 1994) y González (1996).

Los resultados del Análisis de Conglomerados aparecen en la figura 5 con la formación de 10 grupos.

Las mayores semejanzas se presentan dentro de los grupos IV y V. En el grupo IV aparecen la mayoría de los

tipos INCA LP, los cuales fueron obtenidos por métodos convencionales y biotecnológicos en la Estación Experimental del Arroz «Los Palacios», a los que se le unen las accesiones comerciales actualmente en producción Perla de Cuba y J-104, todas ellas con un alto potencial productivo. El grupo V incluye la mayoría de las variedades introducidas en nuestro país, desde Colombia y Filipinas.

Al realizarse un análisis de conjunto, queda establecida la semejanza existente entre todas las accesiones, lo que indica orígenes similares o el empleo de progenitores comunes en los diferentes cruzamientos. En tal sentido, Deus *et al.* (1997) y Fuentes *et al.* (1999) han señalado como una de las principales limitaciones de los programas de mejoramiento en América Latina, las reducidas fuentes de variabilidad genética existentes en este cultivo.

TABLA III

Análisis integral de la variabilidad genética a partir de los resultados electroforéticos.

SISTEMA	TOTAL DE BANDAS POR SISTEMA	No. DE BANDAS MONOMORFICAS	No. DE BANDAS POLIMORFICAS (%)
PEROXIDASAS	12	4	8 (66.6)
ESTERASAS	8	3	5 (62.5)
POLIFENOLOXIDASAS	5	4	1 (20.0)
PROTEINAS TOTALES	9	6	3 (33.3)
GENERAL	34	17	17 (50.0)

CONCLUSIONES

- Los sistemas isoenzimáticos y las proteínas totales permitieron detectar las diferencias entre las accesiones, siendo las isoenzimas peroxidasas y esterasas las más polimórficas.

- La metodología empleada en este trabajo es útil en la evaluación del polimorfismo varietal de arroz, dada la alta resolución y estabilidad electroforética de los sistemas estudiados.

- La semejanza existente entre las variedades indica orígenes similares y el empleo de progenitores comunes en diferentes cruzamientos; las mayores afinidades genéticas aparecen dentro de los grupos IV y V, de los 10 grupos conformados.

- Se comprobó que no existen genotipos duplicados para las accesiones de arroz estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

Apóstol BL. 1993. Estimation of the number of frell sibling families at on ovoposition site using RAPD-PCR markers: Aplicaciones to mosquito *Aedes aegypti*. Theor. Appl. Genet. 86:991-1000.

Arias E. 1998. Utilización de las enzimas en la caracterización de plantas de piña (*Ananas spp.*) de interés para el mejoramiento. Tesis de Maestría, Universidad de La Habana, Cuba: 50pp.

Bouvier L. 1993. Haploide chez le pommier (*Malus domestica* Borkh.) et le poirier (*Pyrus communis* L.) These. Universite Paris: 120pp .

Daviers JC. 1973. Stadistics and date analysis in Geology. I. Wiley Sons Inc. :536pp.

Davis BJ. 1964. Disc electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. Ann. NY. Acad. Sci. 121: 404-427.

Deus JE, Suárez E, Fuentes JL, Padrón E. 1997. Development of new semidwarf source for rice with different cytoplasm (cv. Basmasti-370 and Gloria).

Proceeding of I International Symposium on Nuclear and Related Techniques in Agriculture, Industry, Health and Environment. III Workshop on radiation and isotopes in Agriculture. Cuba: 52-54.

Fedearroz. 1997a. 50 años de Fedearroz. Arroz 46 (408): 15-52.

Fedearroz. 1997 b. Crecimiento y estado de desarrollo de la planta de arroz. Tomado de la Guía de Estudios CIAT. Correo Fedearroz 8 (84): 4-5.

Florido M. 1999. Caracterización de variedades y especies silvestres de tomate atendiendo a características morfobioquímicas y tolerancia al calor. Tesis de Maestría, Universidad de La Habana, Cuba:87pp.

Frey OM, Stilber W, Goodman MM. 1986. Use of allozymes as genetic markers for predicting performance in maize single cross hybrids. Crop Science (Madison) 26 (1): 37-42.

Fuentes JL, Escobar F , Alvarez A, Gallego G , Duque MC, Ferrer M, Deus JE, Tohme J. 1999. Analysis of genetic diversity in cuban rice varieties using AFLP, RAPD and isozyme markers. Euphytica, 10: 1-9.

González C. 1989. Comportamiento genético- bioquímico de la lima Persa SRA-58 (*Citrus latifolia* Tan.) sobre diferentes patrones en Cuba. Tesis de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana: 100pp.

González C, González JA. 1981. Estudio de patrones para la lima Persa. III. Caracterización isoenzimática. Cienc. Tec. Agric. 4 (2): 102-108.

González C, Valdés M, Román MI, Xiqués X, García H, Hernández I ,Márquez M. 1998. Empleo de técnicas citogenéticas e isoenzimáticas en el estudio de haploides de *Nicotiana* spp. En: Resúmenes del III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones. La Habana, Cuba: 240pp.

González LM. 1996. Uso de la radioinducción de mutaciones en la obtención de genotipos de arroz tolerantes a la salinidad. Tesis de Doctor en Ciencias Agrícolas. Cuba: 92pp.

- Guedes MEM, Rodríguez CJ. 1974. Disc electrophoresis patterns of phenoloxidase, from leaves of coffee cultivars. Sep. de Portugalial Acta Biologica. Serie A. 8: 169-177.
- Iglesias L, González MC. 1991. Estudio del polimorfismo bioquímico en arroz (*Oryza sativa* L.). Cultivos Tropicales 12 (2): 42-47.
- Iglesias L, González MC. 1995 a. Estudios isoenzimáticos asociados con la tolerancia a la salinidad en arroz (*Oryza sativa* L.). Cultivos Tropicales 16 (1): 64-69.
- Iglesias L, González MC. 1995 b. Variation in the total protein composition of a rice varietal group submitted to saline stress. Cultivos Tropicales 16 (1): 81-83.
- Iglesias L, Pérez N, Simón E , González MC. 1991 b. Asociación entre los caracteres morfoagronómicos y bioquímicos en arroz (*Oryza sativa* L.). Cultivos Tropicales 12 (2): 53-55.
- Iglesias L, Simón E, Pérez N , González MC. 1994. Estudio del grado de congruencia taxonómica en la clasificación de las variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) Cultivos Tropicales 15 (1): 85-89.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T₄. Nature. 227:680-685.
- MINAGRI. (1994). Instructivo Técnico del Arroz. La Habana, Unión de Complejos Agroindustriales del Arroz: 54pp.
- Ornstein L. 1964. Disc electrophoresis. Background and theory. Ann. NY. Acad. Sci, No. 121: 321-349.
- Price SC. 1984. Estimates of population differentiation obtained from enzyme polymorphisms and quantitative characters. J. Heredity, 75: 141-142.
- Román MI, Rodríguez A, Xiqués X, González C , Rayas A, M. J. González. 1997. Caracterización isoenzimática de 17 clones diploides de plátano fruta *Musa spp*. Biología, Vol. 11 (1): 61-70.
- Sano R, Morishima H. 1992. Indica-Japonica differentiation of rice cultivars viewed from variations in key characters and isozymes, with special reference to landraces from the Himalayan hilly areas. Theor. Appl. Genet., 84 (3-4): 266-274.
- Second G, Trouslot P. 1980. Electroforese d'enzymes de Riz (*Oryza* spp.). Travaux et documents d'Orstom. (120): 88pp.
- Sigarroa A, Cornide MT. 1995. Marcadores moleculares para la selección de variedades vegetales. Avances en Biotecnología Moderna. Vol. 3: 17- 47.
- Stilber CW, Goodman MM, Moll RH. 1982. Improvement of yield and bear number. Resulting from selection at enzyme loci in a maize population. Crop Science (Madison), 22: 737-740.
- Recibido:** 31 de enero del 2001.
- Direcc. de los autores:** *Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Calle 25 # 455 e/ J e I Vedado. Plaza 10400. Ciudad de la Habana, Cuba. **Estación Experimental de Arroz «Los Palacios», km 3 ½, Carretera Central, Sierra Maestra. Gaveta Postal No 1 Los Palacios, CP 22900. ***Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INIVIT, Aptdo 6 Santo Domingo, CP 53000, Cuba. ****Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, INCA, Carretera Tapaste a San José de Las Lajas, Gaveta Postal No 1, La Habana, CP 32700.

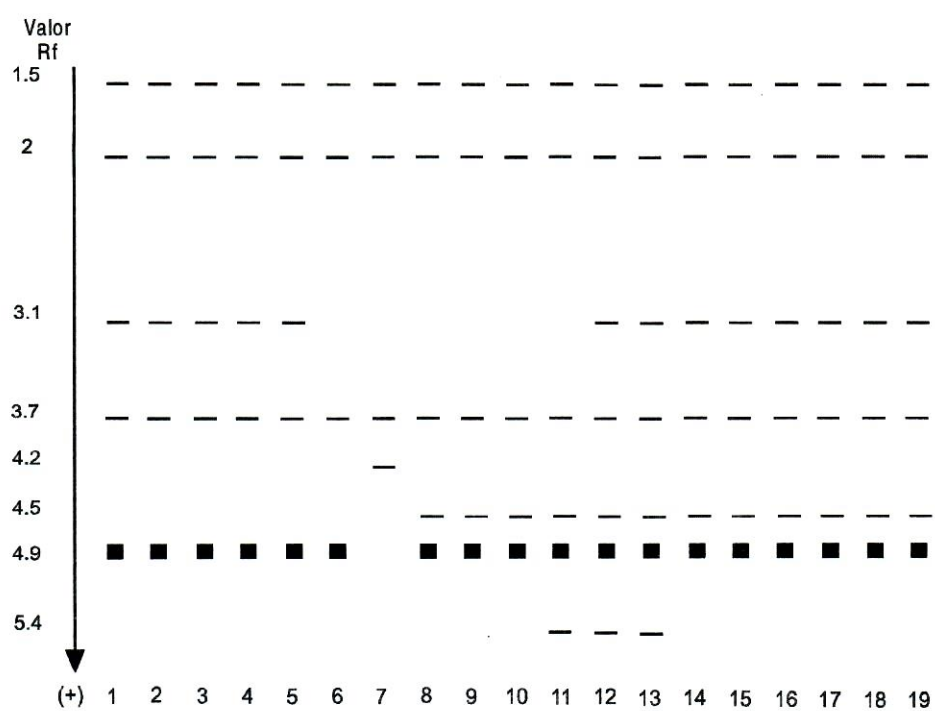


Fig. 3. Zimograma de esterazas.

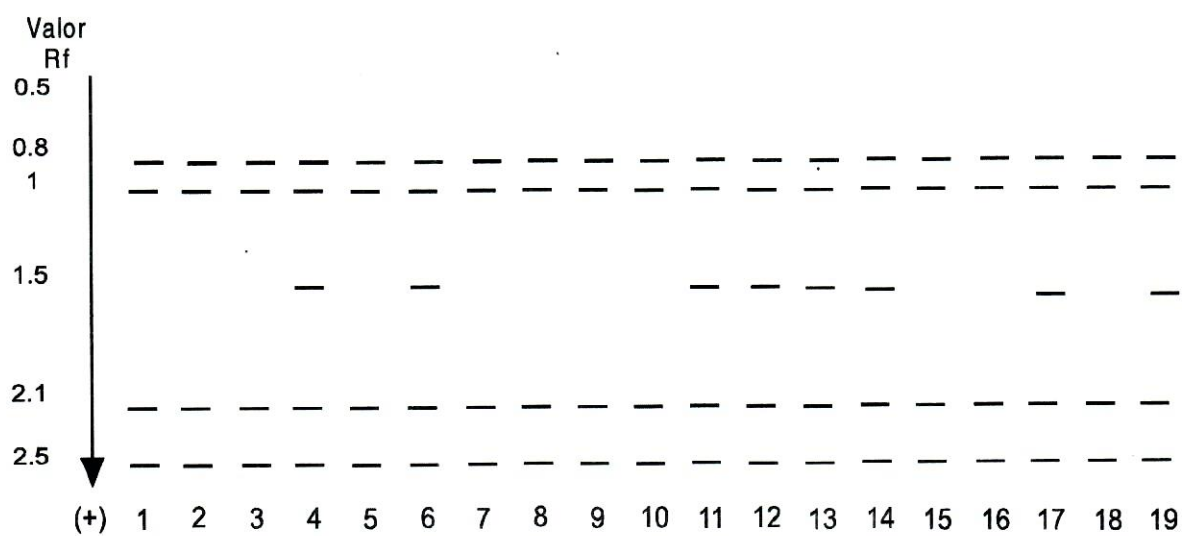


Fig. 4. Zimograma de polifenoloxidasas.

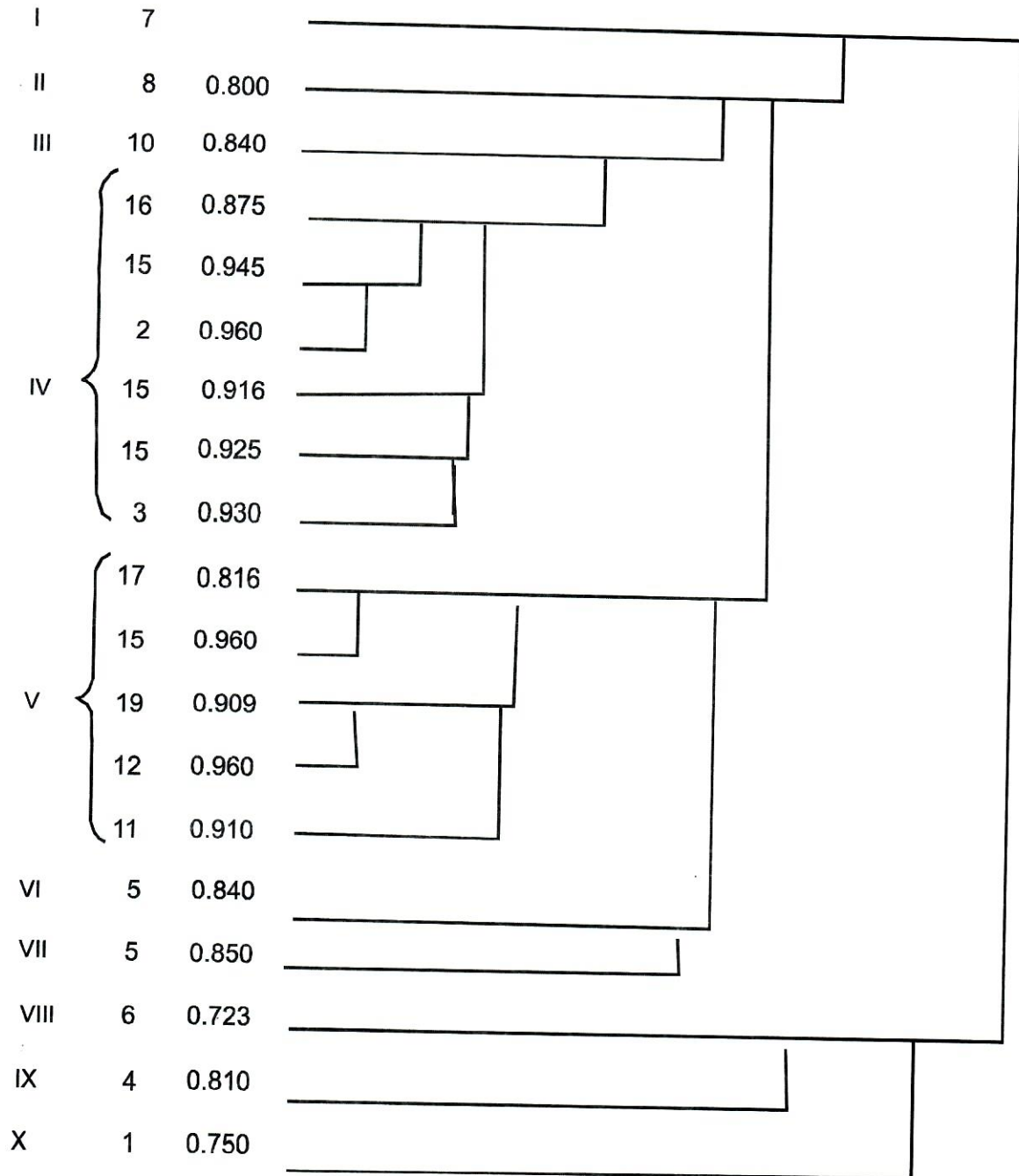


Fig. 5. Dendrograma obtenido mediante el análisis de conglomerados de los resultados de los sistemas isoenzimáticos y proteínas totales.