ESTUDIO DEL POLIMORFISMO BIOQUIMICO EN ARROZ (Oryza sativa, L.)

Lourdes Iglesias y María C. González
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas

Palabras claves: *Genética, polimorfismo bioquímico, Oryza* sativa, *arroz, cultivo in vitro*

ABSTRACT. Electrophoretical analyses were carried out, in order to characterize the isoenzymatic composition of several tissues (seed, leaf and root) coming from 28 rice varieties cultivated *in vitro* at a MS medium. A notable monomorphism was detected in the material tested, however, the greatest heterogeneity was recorded in some enzymatic systems, such as Polyphenoloxidases, Peroxidases and Esterases, which enable their use, as a complement for the varietal identification studies in rice crop. The biochemical divergence degree existing among genotypes was also determined, besides establishing the highest contributing variables upon variability, which could be useful for the genetical breeding programs performed in rice crop at present.

RESUMEN. Fueron desarrollados análisis electroforéticos, para caracterizar la composición isoenzimática en diversos tejidos (semilla, hoja y raíz) de 28 variedades de arroz cultivadas *in vitro* sobre un medio MS. Se comprobó la existencia de un marcado monomorfismo en el material examinado, no obstante, la mayor heterogeneidad detectada en algunos sistemas enzimáticos como Polifenoloxidasas, Peroxidasas y Esterasas posibilita el uso de los mismos como complemento para los trabajos de identificación varietal en el cultivo. Se determinó el grado de divergencia bioquímica existente entre los genotipos estudiados y establecidas las variables que mayor contribución ejercieron a la variabilidad, lo cual puede resultar de utilidad práctica en los programas de mejoramiento genético que actualmente se realizan en este cultivo.

INTRODUCCION

El polimorfismo enzimático constituye un aspecto particularmente interesante de la variabilidad fenotípica, ya que al ser esta representativa de sistemas genéticos bastante simples, brindan un reflejo directo de la variabilidad genética.

Dada su utilidad como un instrumento eficaz de 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; Glaszman *et al.*, 1990).

Sin embargo, no se cuenta con información sobre trabajos similares, realizados dentro de este cultivo en nuestras condiciones, ya que la mayoría de los estudios en esta dirección, han estado más bien dirigidos a la determinación de la variación electroforética de las fracciones proteicas del arroz (Elena Inocencio, Castillo y Esther Ramírez, 1980).

Teniendo en cuenta todo lo antes expuesto, fue realizado el presente trabajo con el fin de examinar la variabilidad enzimática existente en un grupo de variedades de *O. sativa* L.

MATERIALES Y METODOS

Para el desarrollo del presente trabajo, se examinaron un total de 28 variedades de arroz, correspondientes a diferentes tipos botánicos y procedencias (Tabla I), las cuales fueron cultivadas *in vitro* sobre un medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

Fueron tomadas de cada una de las variedades en estudio muestras de diversos tejidos: semilla (S), hoja (H) y raíz (R), para la realización de los análisis electroforéticos de los seis sistemas enzimáticos analizados (Tabla II).

Las muestras de tejido foliar y radicular (0.2 g de tejido verde de la hoja terminal y 0.1 g de tejido radicular, respectivamente) fueron homogeneizados en frío, mediante el empleo de una solución de sacarosa al 20 %.

Se siguió el mismo procedimiento para la preparación de los extractos de semilla, utilizando para ello muestras individuales de semillas previamente desinfectadas con lejía comercial y pregerminadas bajo condiciones de laboratorio.

Los análisis electroforéticos fueron efectuados en un sistema de tampones discontinuos y geles de pollacrilamida, según la metodología descrita en trabajos anteriores (Lourdes Iglesias, Lima y Simón, 1974). En todos los casos se utilizó la variedad J-104 como testigo, realizándose no menos de seis análisis por cada muestra examinada. Para la caracterización de los diversos sistemas enzimáticos en estudio, fueron empleadas las técnicas de tinción y conservación que se relacionan en la tabla III.

Tabla I. Relación de variedades de arroz estudiadas

Número de orden	Número de catálogo	Nombre de la variedad	Variedad * botánica	Procedencia
1	3	Blue Bonnet	fortuna	EE.UU
2	222	I-7 P 1043	parnelli	México
3	328	Dawn	tawnica	EE.UU
4	1612	Pokkeli	sudensis	Srilanka
5	1625	J-104	gilánica	Perú
6	1654	Amistad-82	gilánica	Cuba
7	1656	IR 1552	dicolorata	Filipinas
8	1717	IRAT-8	gilánica	Francia
9	1725	Victoria de Girón 3	mútica	Cuba
10	1740	LP 622-I	breviaristata	Cuba
11	1741	Arroz Jíbaro	plilippensis	Cuba
12	1742	Gonzalo I	fortuna	Cuba
13	1743	Gonzalo II	fortuna	Cuba
14	1744	Arroz de los campos 3/4	chombhanica	Cuba
15	1745	Gonzalo III	breviaristata	Cuba
16	1746	Nere	fortuna	Cuba
17	1747	M-1	fortuna	Cuba
18	1748	M-2	caylonica	Cuba
19	1749	Century I	fortuna	Cuba
20	1750	B.B. Amarillo	elongata	Cuba
21	1751	Century II	fortuna	Cuba
22	1752	Cristal I	gilánica	Cuba
23	4024 S	Ecia 67	breviaristata	Cuba
24	4024 J	Ecia 67	breviaristata	Cuba
25	4032	Ecia 164	breviaristata	Cuba
26	6066	Ecia 31-14-1-1-1	mútica	Cuba
27	6067	Ecia 31-14-1-1-3-13	mútica-gilánica	Cuba
28	1796	Somewake	percoránica	Japón

* Clasificación botánica de acuerdo con Gustchin (1938)

Tabla II. Sistemas enzimáticos analizados

Sistemas enzimáticos	Abreviatura	Clasificación enzimática
I- Oxidoreductasas		
Polifenoloxidasas	Pox	1.10.3.1
Peroxidasas	Px	1.11.1.7
II- Transaminasas		
Aspartato Amino transferasa	Got	2.6.1.1
III- Hidrolasas		
Esterasas	Est	3.1.1
Leucino Amino-peptidasas	Lap	3.1.4
Amilasas	Am	3.2.1.2

Para la determinación de la reacción al fenol (F), en las semillas de las variedades en estudio, se siguió el procedimiento descrito por Glaszman (1984), distinguiéndose dos clases de semillas: aquellas cuyas glumelas se coloreaban (F O1) y aquellas que no desarrollaban color (F O2).

Se utilizó el análisis factorial de corrrespondencia múltiple, para determinar el grado de divergencia bioquímica existente entre los genotipos en estudio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos de forma conjunta han revelado la existencia de un polimorfismo tisular y varietal importante para algunos de los sistemas enzimáticos analizados en este cultivo.

De hecho, se comprobó (Tabla IV) la existencia en general de una mayor actividad enzimática y resolución electroforética en los sistemas polifenoloxidasas, peroxidasas y esterasas para los tres tejidos examinados.

De igual forma, se detectó la presencia de una marcada especificidad tisular en los perfiles electroforéticos de dichas isoenzimas (Figuras 1, 2 y 3).

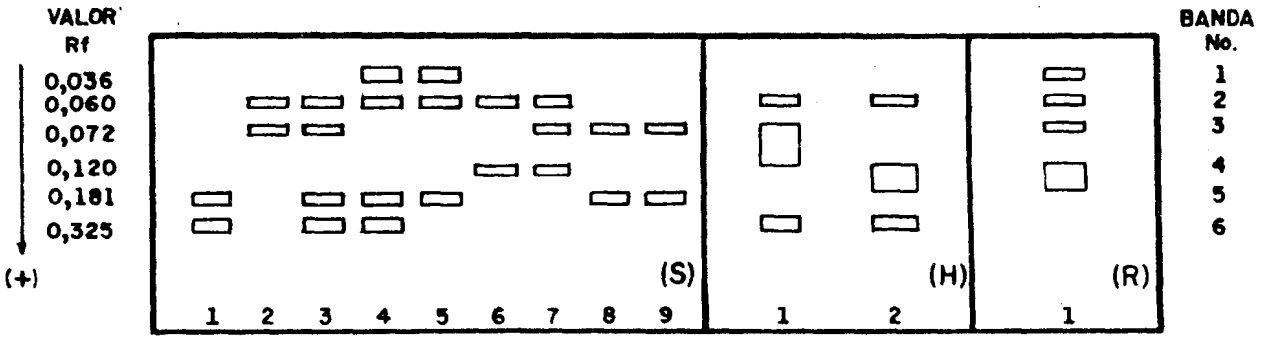

Figura 1. Patrones de bandas de isoenzimas polifenoloxidasas en diversos tejidos, semilla (S), Hoja (H) y raíz (R) de variedades de arroz

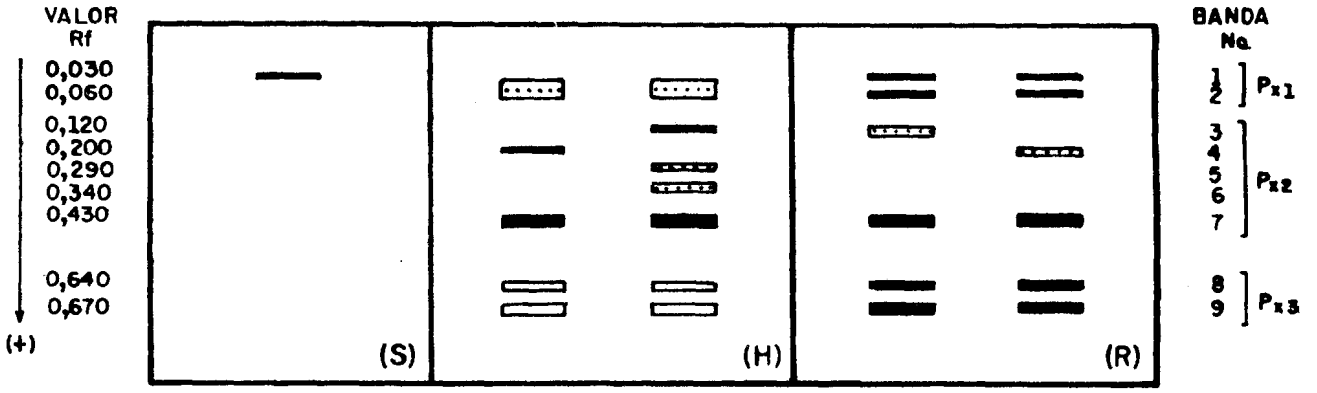

Figura 2. Patrones de bandas isoenzimas peroxidasas en diversos tejidos, semilla (S), hoja (H) y raíz (R) de variedades de arroz

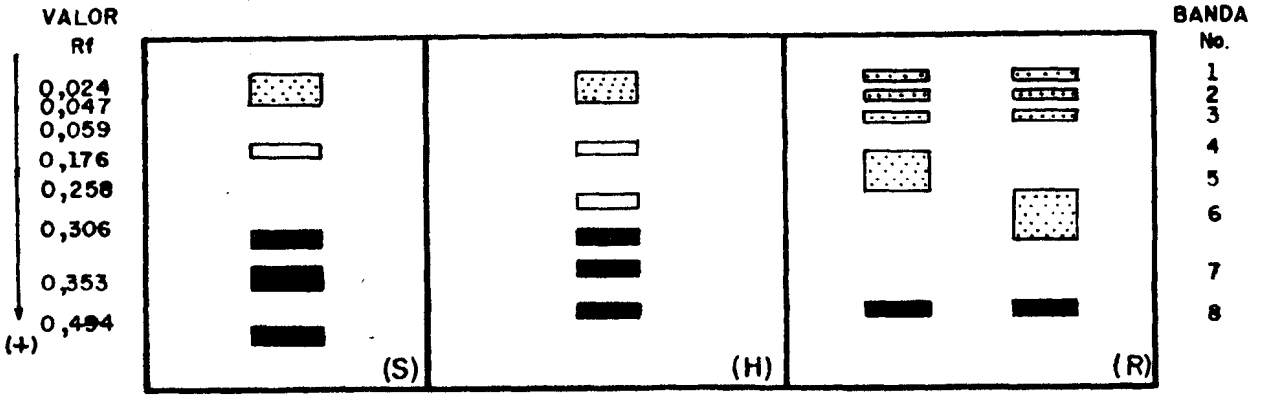

Figura 3. Patrones de bandas de isoenzimas esterasas detectados en diversos tejidos, semilla (S), hoja (H) y raíz (R) de variedades de arroz

Tabla III. Métodos de tinción y conservación empleados

	Sistemas enzimáticos	Métodos de tinción	Métodos de conservación
Oxidoreductasas	Pox	Esen y Soost (1974)	Etanol 30 %
	Px	Lourdes Iglesias, Lima y Simón (1974)	Acido acético 7 %
Transaminasas	Got	Selander et al. (1971)	Acido acético 7 %
Hidrolasas	Est	Lourdes Iglesias, Lima y Simón (1974)	Acido acético 7 %
	Lap	Brewer y Sing (1970)	Acido acético 7 %
	Am	Auriau et al. (1976)	Acido acético 7 %

Tabla IV. Actividad enzimática en diversos tejidos de arroz

Sistemas enzimáticos	Semilla	Hoja	Raíz
Polifenoloxidasas	+ +	+ +	+ +
Peroxidasas	+ + +	+ + +	+ + +
Aspartato amino transferasas	0	+	–
Esterasas	+ +	+ + +	+ + +
Leucino amino peptidasas	0	+	+
Amilasas	+ + +	0	+ +

+ + + actividad fuerte, buena calidad del diagrama
+ + actividad presente pero débil, diagrama medianamente bueno
+ actividad tenue, bandas con pobre resolución
0 no actividad detectable
– no examinado

Estos resultados corroboran lo planteado por Second y Trouslot (1980) y Second (1982), quienes han indicado la presencia de un marcado polimorfismo tisular en este cultivo y confirman lo señalado por diversos autores (Scandalios, 1974 y Brewbaker y Hasegawa, 1975) referente a que cada tejido posee su propio patrón característico, en virtud de las marcadas diferencias fisiológicas de los mismos. Muchos autores creen que la diversidad enzimática responde a los roles metabólicos, que difieren ligeramente de un tejido a otro y que la regulación de la información genética es la base para la especificidad metabólica de los diferentes tejidos de la planta (Tanksley y Orton, 1983).

Ahora bien, sobre la base de estos resultados fueron seleccionados los sistemas enzimáticos y tejidos, que presentaron una mayor actividad y resolución electroforética, con vistas a evaluar el polimorfismo varietal existente en el material vegetal bajo estudio.

De esta forma, el análisis integral de la variabilidad isoenzimática detectada (Tabla V) reveló la existencia de valores relativamente elevados, de sitios con actividad enzimática monomórfica , aunque cabe significar la presencia de una mayor heterogeneidad molecular en los sistemas polifenoloxidasas, peroxidasas y esterasas.

Diversos autores (Nakagahra, 1977; Second y Trouslot, 1980; Inouye y Hasegawa, 1980; Fu y Bai, 1981; Glaszman, 1984) han puesto de manifiesto la significación, particularmente del empleo de las isoenzimas esterasas y peroxidasas, para la detección de diferencias intervarietales dentro del arroz cultivado.

El empleo de esos sistemas enzimáticos conjuntamente con las variantes de isoenzimas polifenoloxidasas, pueden resultar de particular interés, como complemento para los trabajos de identificación varietal que se realizan en este cultivo.

Por otra parte, el tratamiento preliminar de la matriz de datos de base, a los 28 genotipos en estudio y cinco variables originales, analizadas por factorial de correspondencias múltiples (Tabla VI), permitió detectar la existencia de una notable similitud en la distribución del número de individuos por cada una de las clases.

Tabla V. Variabilidad en la composición enzimática de diversos tejidos de arroz

Número de bandas	Sistemas enzimáticos													
	Pox			Px			Got	Est			Lap		Am	
	S	H	R	S	H	R	H	S	H	R	H	R	S	R
Monomórficas	–	1	4	1	4	5	2	–	6	4	1	3	1	2
Polimórficas	6	2	–	–	4	2	–	–	–	2	–	–	–	–
Total	6	3	4	1	8	7	2	–	6	6	1	3	1	2

S semilla H hoja R raíz

Tabla VI. Cantidad de individuos (campos) en cada clase para las variantes bioquímicas detectadas

Variables	Modalidades	Definición de la clase	Cantidad de individuos en clase
F	01	0	15
	02	1	13
Px (H)	01	0	14
	02	1	14
Pox (H)	01	0	12
	02	1	16
Px (R)	01	0	12
	02	1	16
Est (R)	01	0	15
	02	1	13

El análisis de los valores y vectores propios (Tabla VII) reveló que los tres ejes considerados extrajeron más del 80 % de la variabilidad, dado por la contribución ejercida principalmente por la presencia de la variante

Tabla VII. Matriz de valores y vectores propios

	Eje 1	Eje 2	Eje 3
λ_i	0.41	0.23	0.20
% contribución de cada eje	41	23	20
% contribución acrilamida	41	64	83
Autovectores:			
1 F (01)	1.261	0.396	0.179
2 F (02)	**-1.452**	0.457	-0.207
3 PxH (01)	1.202	-0.571	-0.517
4 PxH (02)	**-1.199**	0.574	0.517
5 PoxH (01)	-0.773	0.136	**-2.296**
6 PoxH (02)	0.582	-0.112	1.722
7 PxR (01)	1.128	**1.397**	-0.858
8 PxR (02)	-0.844	-1.048	0.644
9 Est R (01)	0.532	-1.615	-0.406
10 Est R (02)	-0.611	**1.864**	0.468

(01), (02) modalidades de cada variable bioquímica
λ_i valores propios

positiva de reacción al fenol (F O2) y el de peroxidasa en hoja (P x H O2) en el eje 1 por la no presencia de la variante peroxidasa en raíz (P x R O1) y presencia de la variante esterasa en raíz (Est R O2) en el eje 2.

En la figura 4 se puede apreciar la amplia distribución de los individuos y las variables examinadas en los planos 1 y 2. Así se pudo comprobar cierta relación entre la presencia de las variantes peroxidasas en hoja (P x H O2) y raíz (P x R 02), con la ausencia de la variante polifenoloxidasa en hoja (Pox H 01) y una reacción positiva al fenol (F 02) de las variedades ubicadas en la parte izquierda de los ejes 1 y 2.

De acuerdo con estos resultados, fueron clasificadas las variedades en estudio en siete grupos, alguno de los cuales como el grupo VII, caracterizado por la variedad Pokkali, que muestra características fenotípicas muy distintivas, divergió de la mayoría de los genotipos en estudio. Asimismo variedades fenotípicamente muy semejantes como la J-104 y las variedades ECIA 67 (4024 S y 4024 S) mostraron una gran similitud bioquímica.

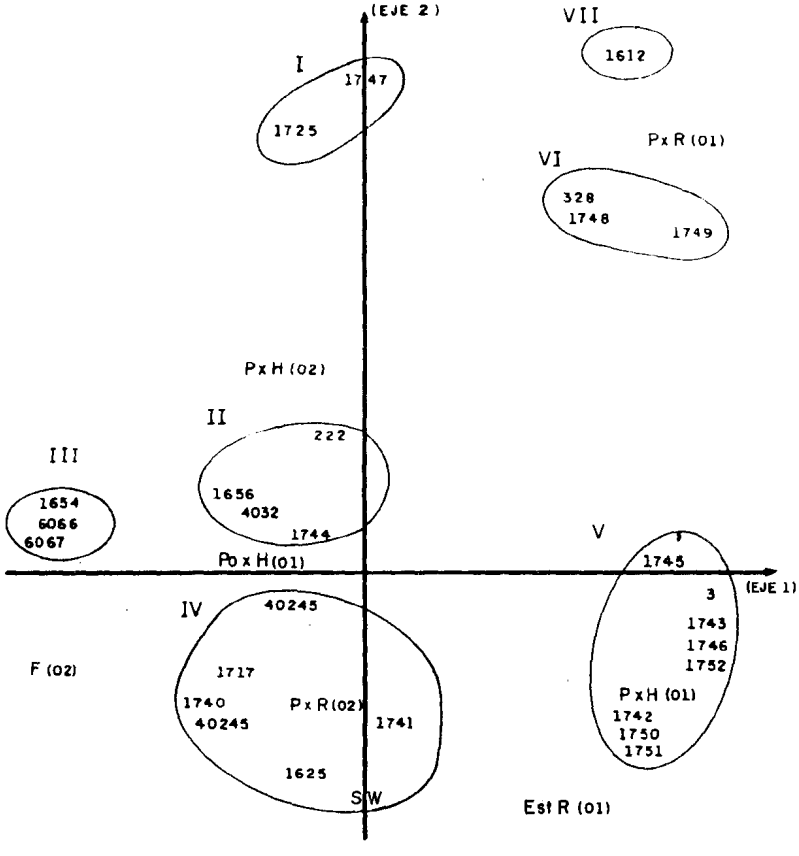

Figura 4. Representación gráfica de la diversidad bioquímica detectada en variedades de arroz por el análisis factorial de correspondiencias múltiples

BIBLIOGRAFIA

Auriau, P. [*et al.*]. Variabilité génétique de la composition des gliadines, glutelines, amylases, esterases et phosphatases acides du blé. (**T. aestivum**). **Ann. Amel. Plantes** (Paris)26:51-66, 1978.

Autran, J. C. y A. Bourdet. L'identification des varietés de blés: etablissement d'un tableau general de determination fondée sur le diagramme électrophoretique de gliadines du grain. **Ann. Amel. Plantes** (Paris)25:277-301, 1975.

Brewer, G. J. An introduction to isozyme techniques. / G. J. Brewer, C. F. Singh.— Nueva York : Academic Press, 1970.— 186 p.

Brewbaker, T. L. Polymorphisms of the major peroxidases of maize. Isozyme III. Developmental Biology. / T. L. Brewbaker, Y. Hasegawa.— San Francisco : Academic Press, 1975.— 15 p.

Esen, A. y R. K. Soost. Polyphenoloxidase catalyzed browning of young shoot extracts of Citrus trees. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** (Londres)99:484-489, 1974.

Fu, P. Y. y Q. Bai. Genetic studies on rice isozymes. II. Classification and geographical distribution of cultivated rice by isozyme study. **Plant Breeding Abstract** 82, 1981.

Glaszman, J. C. Variabilité enzymatique du riz (**O. sativa** L.). Memoires et travaux de L'IRAT No. 9, 1984.— 126 pp.

Gustchin, G. G. Clasificación botánica del arroz cultivado. **Arroz** (Moscú), 1938.

Iglesias, Lourdes, H. Lima y J. P. Simón. Isoenzyme identification of zygotic and nucellar seedling in Citrus. **J. Hered.** (Londres)65:81–84, 1974.

Iglesias, Lourdes. Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (**Glycine max.** (L.) Merrill). / Lourdes Iglesias.— Tesis de grado (C.Dr. en Ciencias Agrícolas; INCA; 1986.— 232 h.

Inocencio, Elena, D. Castillo y Esther Ramírez. Electroforesis de disco de las fracciones proteicas de 6 líneas de arroz con alto contenido de proteínas. **Ciencia y Técnica en la Agricultura. Arroz** (La Habana)3(2):129–143, 1980.

Inouye, J. y T. Hasegawa. Clasification of floating rice varieties by acid phosphatase and peroxidase zymogram. **Jpn. J. Trop. Agric.** (Tokio)24(4):159–164, 1980.

Murashige, T. y F. A. Skoog. A revised medium for rapid growth on bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** (Praga)15:473–497, 1962.

Nakagahra, M. Genic analysis for esterase isoenzymes in rice cultivars. **Jpn. J. Breed.** (Tokio)27(2):141–148, 1977.

Scandalios, J. G. Isoenzymes in development and differentiation. **Ann. Rev. Plant. Physiol.** (Praga)25:225–258, 1974.

Second, G. y P. Trouslot. Electrophorese d'enzymes de Riz (**Oryza** sp.). Travaux et documents de l'Orstom. No. 120, 1980.– 88 p.

Second, G. Origen of the genic diversity of cultivated rice (**Oryza** spp.) Study of the plymorphism scored at 40 isozyme loci. **Jpn. J. Genet.** (Tokio)57:25–27, 1982.

Selander, R. H. [*et al.*]. Biochemical polymorphism and systematics in the genus Peromyscus. I. Variation in the old-field mouse (Peromyscus polionotus). **Stud. Genet.** 6:49–80, 1971.

Tanksley, S. D. Isozymes in plant genetics and breeding. / S. D. Tanksley, T. J. Orton.— Amsterdan: Elsevier Science Publishers, 1983.

Recibido: 29 de enero de 1990
Aceptado: 1ro. de junio de 1990

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRICOLAS

BOLETIN No. 9

ANALISIS DE LOS METODOS APLICADOS EN EL MEJORAMIENTO GENETICO DE LA PAPA (Solanum tuberosun, L.)

M. Martínez

MAYO 1990