Cultivos Tropicales 15(1):53-56,1994

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD ISOENZIMATICA EN CULTIVARES DE ARROZ (*O. sativa* L.) OBTENIDOS POR INDUCCION DE MUTACIONES CON RAYOS GAMMA Y NEUTRONES RAPIDOS

J. L. Fuentes, E. Padrón y Lourdes Iglesias

ABSTRACT. This research work studied the isoenzymatic variability of a group of rice (cv. J-104) mutants obtained through gamma ray and fast neutron (14 MeV) mutation induction. Among all enzymatic systems studied, peroxidases, sterases, polyphenoloxidases and alcohol dehydrogenases, the first two were the most polymorphous ones. All mutants tested were classified into four groups according to the multiple conrrespondence factorial analysis of isoenzymatic variants detected. Results showed that both gamma radiations and fast neutrons generate a great variability which can be detected by means of isoenzymatic patterns. It also discusses the biochemical variability existing upon biochemical variants generated through mutational induction in the analyzed material.

Key words: Rice, *Oryza sativa*, genetic variation, isozymes, induced mutation, biochemical genetics

RESUMEN. Se estudió la variabilidad isoenzimática en un grupo de mutantes de arroz (cv. J-104), obtenidos por inducción de mutaciones con rayos gamma y neutrones rápidos (14 MeV). De los sistemas enzimáticos estudiados: peroxidasas, esterasas, polifenoloxidasas y alcohol deshidrogenasas, las isoenzimas esterasas y peroxidasas resultaron las más polimórficas. Fueron clasificados en cuatro grupos los mutantes examinados, sobre la base del análisis factorial de correspondencia múltiple efectuado a partir de las variantes isoenzimáticas detectadas. Los resultados obtenidos demuestran que las radiaciones gamma y los neutrones rápidos generan una alta variabilidad que puede ser detectada por medio de patrones isoenzimáticos. Se discute la variabilidad bioquímica existente sobre la base de las variantes bioquímicas generadas por inducción de mutaciones en el material analizado.

Palabras claves: Arroz, *Oryza sativa*, variación genética, isoenzimas, mutación inducida, genética bioquímica

INTRODUCCION

El mejoramiento por radiomutagénesis ha devenido en los últimos años una importante vía para la obtención de variedades promisorias en numerosos cultivos de interés económico. Dentro de estas, el cultivo del arroz ha recibido una atención especial, contándose ya en la actualidad con 251 nuevas variedades que han sido introducidas en la producción (Wang, 1991).

En nuestro país se desarrolla desde 1988, un programa de mejoramiento en el cultivo del arroz mediante el empleo de radiaciones ionizantes (Deus *et al.*, 1991, y González *et al.*, 1992), a partir del cual se han obtenido mutantes promisorios que se encuentran en fase de generalización. Sin embargo, hasta la fecha no se dispone de información precisa sobre la variabilidad genética generada por la aplicación de estas en dichos materiales.

J. L. Fuentes, Investigador y Dr. E. Padrón, Investigador Titular del grupo de Radiobiología, Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo de la Energía Nuclear (CEADEN), 5ta. Ave. y 30, Miramar, Ciudad Habana; Dra. Lourdes Iglesias, Investigador Titular del departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal No. 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Dado que el polimorfismo enzimático constituye un instrumento eficaz, que ofrece una medida más directa de la variabilidad genética que el empleo de marcadores convencionales (Lourdes Iglesias y María C. González, 1991), se desarrolló el presente trabajo con el objetivo de examinar la variabilidad isoenzimática generada por la acción de radiaciones ionizantes en mutantes obtenidos a partir de la variedad J-104.

MATERIALES Y METODOS

El material vegetal de partida estuvo constituido por un grupo de mutantes obtenidos por Deus *et al.* (1991) a partir de la variedad J-104 (Tabla I).

Las semillas de la generación M_6 de dichos mutantes y su testigo fueron cultivadas en condiciones de invernadero. Muestras de tejido foliar (0.2 g) fueron homogeneizadas en frío mediante el empleo de una solución de sacarosa al 20 %. Los análisis electroforéticos fueron efectuados en un sistema de tampones discontinuos y geles de poliacrilamida, según la metodología descrita por Lourdes Iglesias, Lima y Simón (1974). En todos los casos se utilizó la variedad J-104 como testigo, analizándose dos réplicas como mínimo por cada sistema enzimático examinado (Tabla II).

Tabla I. Relación de los cultivares estudiados

No. de orden	No. de germoplasma	Mutágeno aplicado	Dosis
1	3114	γ	200 Gy
2	2965	N	20 Gy
3	2998	N	20 Gy
4	3100	N	20 Gy
5	3102	N	20 Gy
6	3180	N	20 Gy
7	3103	N	20 Gy
8	3094	N	20 Gy
9	3081	N	20 Gy
10	3082	N	20 Gy
11	J-104*	–	–

γ - rayos gamma (^{60}Co)
N - neutrones rápidos (14 MeV)
* - Material de partida para el trabajo mutagénico

Tabla II. Sistemas enzimáticos utilizados

Sistemas enzimáticos	Abreviatura
I - Oxidorreductasas	
Polifenoloxidasas	Pox
Peroxidasas	Px
Alcohol deshidrogenasas	Adh
II - Hidrolasas	
Esterasas	Est

Para la caracterización de los sistemas enzimáticos en estudios (isoenzimas peroxidasas (Px), polifenoloxidasas (Pox), esterasas (Est), alcohol deshidrogenasas (Adh)), fueron empleadas las técnicas de tinción y conservación descritas por Lourdes Iglesias y María C. González (1991).

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

RESULTADOS Y DISCUSION

De los cuatro sistemas enzimáticos analizados (Tabla II), solo los sistemas Px, Est y Adh resultaron polimórficos.

Resultados similares han sido obtenidos por Endo y Morishima (1983) en diferentes especies de arroz. En general, se ha indicado que las isoenzimas Px y Est se encuentran entre los sistemas más polimórficos en plantas (Second y Trouslot, 1980; Glazmann, 1982; Lourdes Iglesias y María C. González, 1991).

En el zimograma de Px se puede observar la existencia de tres bandas polimórficas de un total de seis detectadas (Tabla III). En este sistema fueron detectados cuatro grupos diferentes de individuos que corresponden a las variantes 1, 2, 3, 4 respectivamente (Figura 1a).

Tabla III. Polimorfismo detectado en cada sistema enzimático

No. de bandas	Sistemas enzimáticos			
	Px	Est	Adh	Pox
Monomórficas	3	1	3	2
Polimórficas	3	7	1	–
Total	6	8	4	2

De forma general, el sistema Est resultó el más polimórfico, dado que se detectaron siete bandas de un total de ocho observadas (Figura 1b). Estas bandas polimórficas conformaron ocho variantes diferentes que agruparon a todos los individuos analizados.

En cambio, los perfiles electroforéticos de isoenzimas Adh (Figura 1c) se caracterizaron por mostrar un menor polimorfismo que los dos anteriores, dada la presencia de una sola banda polimórfica de un total de cuatro observadas.

Por el contrario, el sistema de Pox mostró una notable homogeneidad electroforética, comprobándose para todos los individuos en estudio un patrón común de dos bandas monomórficas (Figura 1d), lo cual contrasta con lo detectado por Lourdes Iglesias y María C. González (1991) en este cultivo.

Al comparar los patrones electroforéticos obtenidos de los mutantes estudiados con el testigo J-104, se pudo observar tanto la aparición de nuevas bandas como la ausencia de algunas de ellas en el caso de los sistemas Px y Est; en cambio, en el caso del sistema Adh, solo se observó ausencia de bandas.

Lo anterior se corroboró al efectuar los cálculos correspondientes al por ciento de cada variante del total de individuos presentados en la tabla IV, lo que revela la notable variabilidad existente en el material examinado.

Tabla IV. Por ciento de cada variante obtenida de los perfiles electroforéticos con respecto al total de cultivares estudiados

No. de variantes obtenidas	Sistemas enzimáticos			
	Px	Est	Adh	Pox
1	18.1	9	91*	100*
2	27.2	9	9	-
3	45.4	36.3	-	-
4	9*	9	-	-
5	-	9	-	-
6	-	9		
7	-	9	-	-
8	-	9*	-	-

* Variante que presenta el patrón electroforético del testigo *O. sativa* (cv. J-104)

Por otra parte, el tratamiento preliminar de la matriz de datos, conformada por los 11 genotipos diferentes estudiados y las 11 variables bioquímicas originales, analizadas por factorial de correspondencia múltiple (Tabla V), permitió detectar la existencia de una notable diversidad bioquímica en la distribución de los individuos por cada una de las clases definidas.

El análisis de los valores y vectores propios (Tabla VI) reveló que los tres ejes considerados extrajeron el 72 % de la variabilidad; aunque los ejes 1 y 2 fueron determinantes para estos resultados, dado por la contribución ejercida en dichos ejes, principalmente por la presencia de la segunda banda del perfil electroforético de Px (PxA_2), la quinta ($EstH_2$) y sexta bandas ($EstI_2$) del perfil de Est, así como la ausencia de la séptima banda ($EstJ_1$) del perfil electroforético de Est.

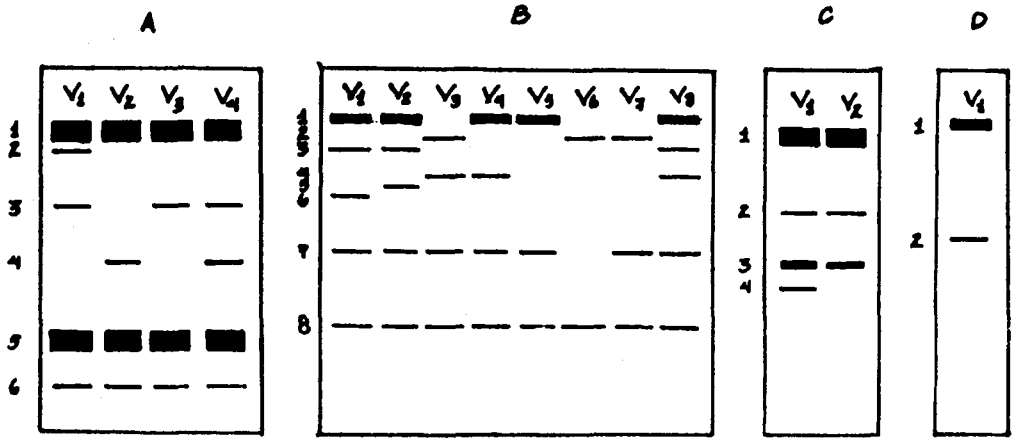

Figura 1. Patrones de bandas isoenzimáticas de las distintas variantes obtenidas del tejido foliar del material estudiado: A) Px, B) Est, C) Adh y D) Pox

Tabla V. Cantidad de individuos en cada clase para las variables bioquímicas detectadas

Variables	No. de la banda en el perfil electroforético	Modalidades	Definición de la clase	No. de individuos en la clase
Px_a	2	1	0*	9
		2	1*	2
Px_b	3	1	0	3
		2	1	8
Px_c	4	1	0	7
		2	1	4
Est_d	1	1	0	6
		2	1	5
Est_e	2	1	0	5
		2	1	6
Est_f	3	1	0	6
		2	1	3
Est_g	4	1	0	5
		2	1	6
Est_h	5	1	0	10
		2	1	1
Est_i	6	1	0	10
		2	1	1
Est_j	7	1	0	1
		2	1	10
Adh_k	4	1	0	1
		2	1	10

0* ausencia de la banda
1* presencia de la banda

Tabla VI. Matriz de valores y vectores propios

	Eje 1	Eje 2	Eje 3
λ_i	0.43	0.16	0.19
% de contribución de cada eje	43	16	13
% de contribución acumulado	43	59	72
Autovectores			
Px_{a1}	-0.588	0.494	0.083
Px_{a2}	2.635	-2.224	-0.374
Px_{b1}	-1.798	-2.470	-0.766
Px_{b2}	0.671	0.926	0.287
Px_{c1}	0.679	1.003	0.860
Px_{c2}	-1.195	-1.754	-1.506
Est_{d1}	-1.183	-0.089	-0.569
Est_{d2}	1.414	0.107	-0.683
Est_{e1}	1.414	0.107	0.683
Est_{e2}	-1.183	-0.089	0.569
Est_{f1}	-0.738	0.507	-0.559
Est_{f2}	1.961	-1.352	-1.491
Est_{g1}	0.794	-1.275	1.781
Est_{g2}	-0.666	1.062	-1.484
Est_{h1}	-0.266	0.222	-0.037
Est_{h2}	2.635	-2.224	-0.374
Est_{i1}	-0.266	0.222	0.037
Est_{i2}	2.635	-2.224	-0.374
Est_{j1}	-1.690	-5.008	4.542
Est_{j2}	0.168	0.501	-0.454
Adh_{k1}	-2.099	-1.725	-5.575
Adh_{k2}	0.207	0.172	0.559

λ_i valores propios
Letras de la a hasta la k son las variables asignadas a las bandas polimórficas de los sistemas estudiados
1 y 2 son las modalidades de cada variable bioquímica

En la figura 2 se muestra la amplia distribución de los individuos y las variables examinadas en los planos 1 y 2.

Sobre la base de la diversidad bioquímica detectada, fueron clasificados los individuos estudiados en cuatro grupos bioquímicamente diferentes, donde los grupos III y IV se encuentran muy distantes del que incluye al testigo (grupo I).

Resultó de interés comprobar la presencia de los cultivares 3114 y 2965 dentro de un mismo grupo, en los cuales están siempre presentes las bandas 3($EstF_2$), 5($EstH_2$) y 6($EstI_2$) del perfil electroforético de Est, así como la segunda (PxA_2) del perfil de Px, a pesar de que los cultivares mencionados son originados de mutágenos diferentes (Tabla I).

Por otra parte, se encontró que los perfiles electroforéticos de Est de los cultivares analizados se caracterizaron por estar relacionada la presencia de la tercera (PxB_2) banda y la ausencia de la cuarta (PxC_1), excepto en el testigo J-104.

De igual forma, se encontró la existencia de una relación definida entre la presencia de la primera banda ($EstD_2$) y la ausencia de la segunda ($EstE_1$) en los perfiles electroforéticos de Est y viceversa.

Los resultados obtenidos demuestran que las radiaciones gamma y neutrones rápidos generan una alta variabilidad, que puede ser detectada por medio de patrones isoenzimáticos; resultados similares han sido obtenidos en otros cultivos (Susana Pérez y Lourdes Iglesias, 1992). La base de datos obtenidos de estos

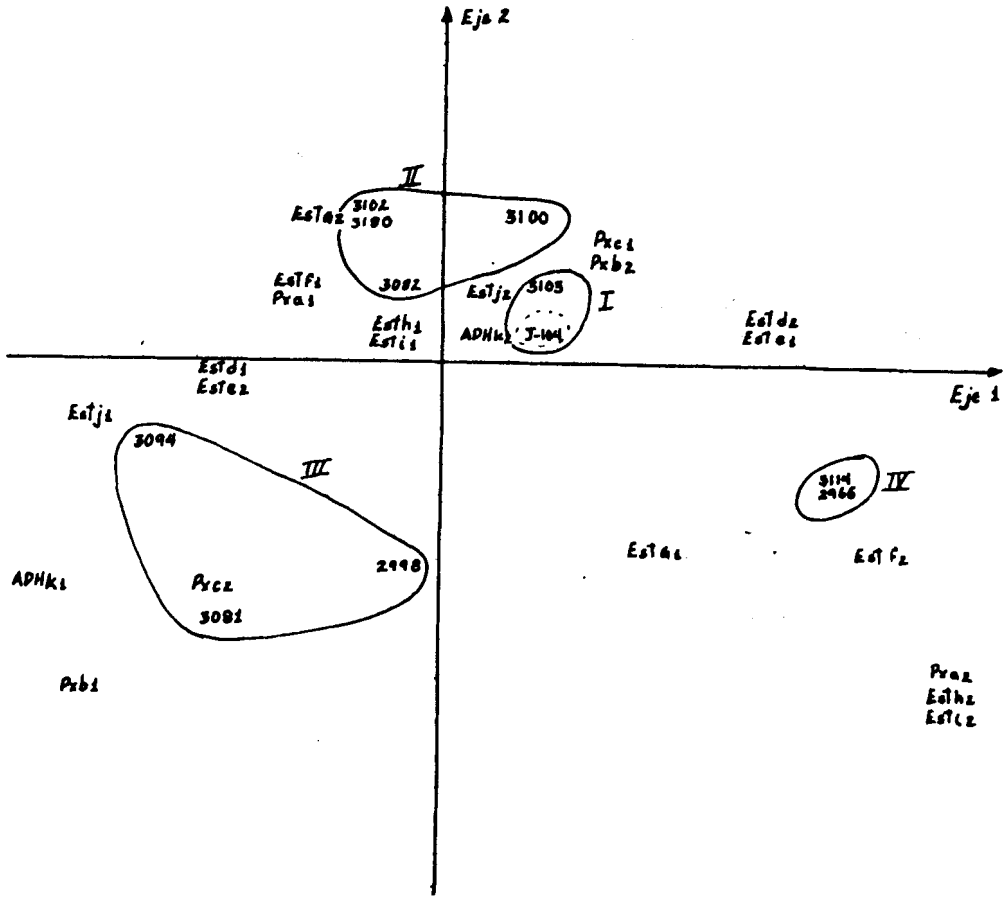

Figura 2. Representación gráfica de la variabilidad bioquímica generada por rayos λ y neutrones rápidos en el material estudiado

trabajos, conjuntamente con los estudios de marcadores moleculares que, como los RFLP (Fuentes *et al.*, 1993), se efectúan en aquellas variedades de arroz de mejores características genéticas, permitirán disponer de marcadores genéticos que viabilicen los programas de mejoramiento por inducción de mutaciones que actualmente se encuentran en desarrollo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la asistencia técnica brindada por Sonia Altanéz durante la ejecución de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

Empleo de la inducción de mutaciones y el cultivo de tejido en el programa de mejoramiento del arroz *Oryza sativa* L. de Cuba. / J. E. Deus.../*et al.*/.- Viena: IAEA-SM, 1991.- 461 p.

Endo, T. Isozymes in Plant Genetics and Breeding. /T. Endo, H. Morishima.- Amsterdam : Elsevier Science Publisher, 1983.

Fuentes, J. L. /*et al.*/. Análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) en la caracterización de dos especies de arroz. Cultivos Tropicales (La Habana) 14(2-3):116-119, 1993.

Glazmann, J. C. Variabilité enzymatique en riz (*Oryza sativa* L.) son importance pour la compréheusion de la structure écogéographique de l'espéce. /J. C. Glazmann.- En: Memoires et Travaux de l'Irat (9:1982).- 126 p.

Iglesias, Lourdes y María C. González. Estudios del polimorfismo bioquímico en arroz (*Oryza sativa* L.). Cultivos Tropicales (La Habana) 12 (2):42-47, 1991.

Iglesias, Lourdes, H. Lima y J. P. Simón. Isoenzyme Identification of Zygotic and Nucellar Seedlings in Citrus. J. Hered. (Londres) 65:81-84, 1974.

González, María C. /*et al.*/. Radiosensibilidad en variedades de arroz (*Oryza sativa* L.). Cultivos Tropicales (La Habana) 13(2-3):92-94, 1992.

Pérez, Susana y Lourdes Iglesias. Estudio isoenzimático de clones de ajo / Susana Pérez, Lourdes Iglesias.- En: VII Seminario Científico del INCA. BIOFERTRO'92. Programa y Resúmenes, 1992.- 92 p.

Second, A. Electrophorèse d'enzymes de riz (*Oryza* sp.). /A. Second, P.Trouslot.- En: Travaux et documents de L'ortom. (120:1980).-88 p.

Wang, L. Q. Mutation Breeding Program in P.R. China. /L.Q. Wang.- En: Proc. of Symposium: Plant Mutation Breeding For Crop Improvement. Viena : IAEA, 1991.- t.1, p.20.

Recibido: 16 de julio de 1993
Aceptado: 15 de octubre de 1993