

## **Patrones isoenzimáticos de variedades de arroz y arroces rojos en Venezuela<sup>1</sup>**

**Aída Ortiz<sup>2</sup>; Catalina Ramis<sup>3</sup>; Pablo Parra<sup>4</sup>;  
Antonio Díaz<sup>3</sup> y Luis López<sup>5</sup>**

### **ABSTRACT**

Rice (*Oryza sativa* L.) yield is highly determined for the variety planted and its seed quality. In Venezuela around 60% of the rice area is planted with certified seed. However, it is necessary to improve seed quality by using modern techniques of control and by decreasing red rice incidence of rice fields for certified seed. At Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, a trial was established with the objective of chemitaxonomical characterization of a group of rice varieties and red rices. In that trial, was evaluated 5 red rices: Barinas, Portuguesa 1, Portuguesa 2, Cojedes, and Calabozo and 5 rice varieties:

---

Recibido: octubre, 2001

Aceptado: octubre, 2002

<sup>1</sup> Trabajo financiado por el CDCH-UCV, CONICIT y Fundacite Aragua

<sup>2</sup> Instituto de Agronomía. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela Apto postal 4579. Maracay 2101. Venezuela. E-mail: ortiza@agr.ucv.ve

<sup>3</sup> Instituto de Genética. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela . Apto postal 4579. Maracay 2101. Venezuela. E-mail:dasilram@telcel.net.ve

<sup>4</sup> Instituto de Botánica. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Apto postal 4579. Maracay 2101. Venezuela

<sup>5</sup> Fundación Servicio para el Agricultor. Estación Experimental de Cagua-Aragua. Venezuela. E-mail:fusagri@reacciun.ve

Cimarrón (Tainung Sen 18 = Chianung Sen Yu 23), FONAIAP (P4070F3-3-RH3-7-1BA), Araure 4 (P2217F4-30-41B), Araure 1 (P849-45-1M-40-4-3-1M) and ZETA 15 (CT8008-16-24-2P-1M1-3P) were evaluated. Five replications to each genotype were established. The data were evaluated with an analysis of hierarchical tree using binary distance. Fourteen isoenzymatic systems (IDH, CAT, ACP, EST, PGD, PGM, SDH, PGI, POX, MDH, ACO, ADH, FDH, and GOT) were considered. The isoenzymes IDH, SDH, EST, PGD and PGI, showed polymorphism, which permits differentiation of the evaluated genotypes. PGI showed more isoenzymatic variation.

**Key words:** Rice, red rice, *Oryza sativa*, electrophoresis, isoenzymes

## COMPENDIO

La productividad del cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) está influenciado por la variedad sembrada y la calidad de la semilla utilizada. Aunque en Venezuela el 60 % de las siembras de este cereal se realiza con semilla certificada, es necesario mejorar su calidad, utilizando procesos modernos de control y disminuyendo la incidencia de arroz rojo en los campos de producción de semilla. Con la finalidad de caracterizar quimiotaquímicamente a algunas variedades de arroz y arroces rojos en Venezuela se estableció un ensayo en la Facultad de Agronomía-Universidad Central de Venezuela, Aragua. En este experimento se evaluaron cinco arroces rojos, identificados como: Barinas, Portuguesa 1, Portuguesa 2, Cojedes y Calabozo y cinco variedades de arroz: Cimarrón (Tainung Sen 18 = Chianung Sen Yu 23), FONAIAP (P4070F3-3-RH3-7-1BA), Araure 4 (P2217F4-30-41B), Araure 1 (P849-45-1M-40-4-3-1M) y ZETA 15 (CT8008-16-24-2P-1M1-3P). Se utilizaron 14 sistemas isoenzimáticos (IDH, CAT, ACP, EST, PGD, PGM, SDH, PGI, POX, MDH, ACO, ADH, FDH y GOT). Se estudiaron los datos mediante un análisis de árbol jerarquizado utilizando la distancia binaria según el programa estadístico SAS versión 6.2. Se realizaron cinco repeticiones para cada isoenzima. De las isoenzimas estudiadas las que presentaron polimorfismos y diferenciaron a los genotipos evaluados fueron EST, IDH, PDG, SDH y PGI, de éstas, la última mostró mayor variación isoenzimática.

**Palabras clave:** arroz, arroz rojo, electroforésis, isoenzimas, *Oryza sativa*

## INTRODUCCION

El arroz representa el cultivo alimenticio con mayor potencial de crecimiento para los próximos veinte años en Venezuela. En el año 2001 se sembraron 150010 hectáreas, con una producción de 737000 ton, y un rendimiento promedio de 4913 kg/ha (FAO, 2002).

El arroz rojo es considerado una maleza dentro de la normativa para la certificación de semillas de arroz, debido a que no se puede separar en el acondicionamiento de los lotes, por poseer dimensiones similares a la semilla de arroz, sin embargo la legislación sobre semillas vigente, permite una planta de arroz rojo por hectárea en los campos de semillas y hasta tres semillas por kilogramo de arroz (Normas generales sobre semillas, 1986).

La biología molecular aporta una herramienta para diferenciar genotipos a través del uso de técnicas sofisticadas como la electroforesis que puede realizarse a nivel genómico por rutas diferentes: indirecta (proteínas y isoenzimas), y otra directa (ADN). Estos análisis permiten identificar marcadores moleculares asociados con características morfológicas. Estos marcadores tienen dos características útiles para la diferenciación de germoplasma, primero no necesitan ser inducidos y no manifiestan epítasis (Ramírez *et al.*, 1991).

Las enzimas son proteínas que ejercen funciones catalíticas específicas, y pueden ser desde monoméricas (una sola cadena polipeptídica) hasta multiméricas (más de una cadena). El término isoenzima, se refiere a las diferentes formas moleculares que posee una enzima que tiene afinidad por el mismo sustrato (Market y Moller, 1959).

La variabilidad de las isoenzimas puede ser debido a causas primarias o genéticas (poseen varios genes que codifican diferentes cadenas polipeptídicas), o a causas secundarias postraduccionales (cuando el producto del gen, subunidad, es modificado), también existen otros tipos de diversidad de las isoenzimas como los alelos múltiples en un solo *locus* genético o varios *loci* genéticos (Ramírez *et al.*, 1991).

Las desventajas del uso de isoenzimas se refieren a la necesidad de una pequeña parte del genoma de la planta, que a veces no pueden ser detectadas, por ejemplo, en las proteínas estructurales no se conocen las formas de teñir sus productos o intervienen en muchas rutas metabólicas desconocidas, pero

fundamentalmente su limitante más fuerte, está en que las isoenzimas son influenciadas por la edad de la planta, debido a que los genes que controlan su expresión se manifiestan en estados específicos del desarrollo y en órganos o tejidos específicos (Ramírez *et al.*, 1991).

Glaszmann *et al.* (1988), desarrollaron un método simple y eficiente para el estudio de la variación isoenzimática en arroz, realizando extractos crudos de partes de plúmulas de arroz. Esto permitió estudiar la variación de 24 *loci* distribuidos en ocho cromosomas e identificar 76 alelos.

Lagenvin *et al.* (1990), utilizó la técnica de electroforesis para detectar diferencias entre arroces rojos, variedades de arroz, híbridos naturales e híbridos artificiales, estudiaron 17 sistemas isoenzimáticos que codificaban 25 *loci*, encontrando que solo tres enzimas (CAT, IDH-1 y PGI) mostraron diferencias entre los arroces rojos y variedades evaluadas lo que permitió comprobar la hibridización existente entre estos grupos.

Este trabajo pretende establecer las huellas digitales de algunas variedades de arroz en Venezuela y compararlos con las de algunos arroces rojos más frecuentes en el arrozal.

## MATERIALES Y METODOS

Se seleccionaron cinco arroces rojos tomando como criterio la frecuencia de su incidencia en cuatro zonas productoras de arroz, denominándose Barinas, Portuguesa 1, Portuguesa 2, Cojedes y Calabozo. Las variedades de arroz evaluadas fueron: Cimarrón (Tainung Sen 18 = Chianum Sen Yu 23), FONAIAP 1 (P4070F3-3-RH3-7-1BA) y Araure 4 (P2217F4-30-41B), Araure 1 (P849-45-1M-40-4-3-1M) y ZETA15 (CT8008-16-24-2P-1M1-3P). En los gráficos de la variedad ZETA15 se abrevió como su nombre genético CT-15.

La extracción de isoenzimas y corrida electroforética se realizó siguiendo la metodología de Glaszmann *et al.* (1988) y las modificaciones realizadas por Boskovic *et al.* (1993).

Para evaluar los ecotipos de arroz rojo y cultivares de arroz se utilizaron los siguientes sistemas isoenzimáticos: 1. Siquimato deshidrogenasas (SDH); 2. Alcohol

deshidrogenasa (ADH); 3. Isocitrato deshidrogenasa (IDH); 4. Catalasa (CAT); 5. Fosfoglucoasa deshidrogenasa (PGD); 6. Malato deshidrogenasa (MDH); 7. Fosfoglucomutasa (PGM); 8. Formato deshidrogenasa (FDH); 9. Fosfatasa ácida (ACP); 10. Glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT); 11. Esterasa (EST); 12. Aconitasa (ACO); 13. Fosfoglucoisomerasa (PGI); 14. Peroxidasa (POX).

**Geles de almidón:** la concentración de los geles de almidón de papa utilizada fue 12%, las soluciones buffer fueron tris citrato para las isoenzimas GOT y ACP; histidina/citrato: SDH, ADH, IDH, CAT, PGD, MDH, PGM, FDH y ACP y morfolina: EST, ACO, PGI y POX.

**Extracción de isoenzimas:** se utilizaron tejidos de plúmulas y coleóptilos de 4 y 15 días de edad, se maceraron en un mortero colocado sobre una bolsa de gel frío, utilizando una relación de 2:1, tejidos plántulas: solución de glutation, posteriormente se impregnó un papel de filtro (Whatman 5) con esta solución. Para cada genotipo y tejido evaluado se realizaron cinco repeticiones.

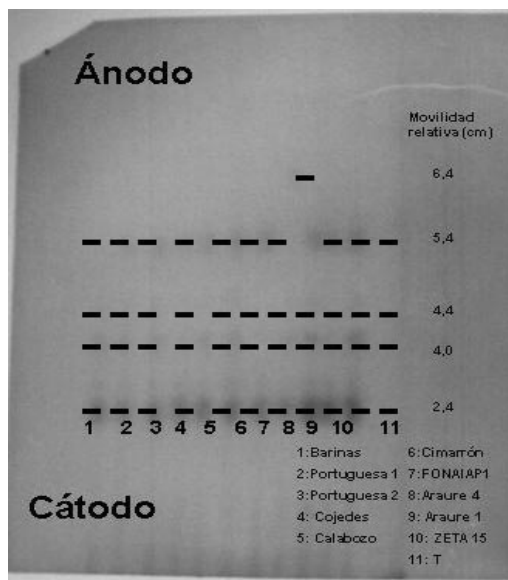
**Electroforesis:** la electroforesis se realizó a 2°C con una precorrida por 20 minutos, a 180 voltios, 40 m.a. y 7 watts. Posteriormente se retiraron del gel los porta muestras y se continuó la corrida electroforética durante tres a cuatro horas, a 180 voltios, 40 m.a. y no más de 7 watts para citrato e histidina/citrato y cinco horas, a 200 voltios, 30 m.a y más de 7 watts para morfolina.

**Teñido de enzimas:** finalizada la electroforesis, se cortaron 3cm del gel correspondiente al ánodo y los 5 cm del cátodo, descartándose para la mayoría de las isoenzimas con excepción de la esterasa y peroxidasa. Se procedió a seccionar el gel en capas de 2 mm de espesor. Las bandas del substrato colorante para cada isoenzima fueron reveladas por inmersión de las capas de gel dentro de la solución, para cada isoenzima se usó el substrato recomendado por Glaszmann *et al.* (1988): SDH, ADH, IDH, CAT, PGD, ACP, GOT, ACP, EST, PGI y POX, y Boskovic *et al.* (1993): MDH, PGM, FDH y ACO.

**Interpretación de los zimogramas:** se estudiaron los datos mediante un análisis de árbol jerarquizado utilizando la distancia binaria según el programa estadístico SAS versión 6.2. Se realizaron cinco repeticiones para cada isoenzima.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En las Figuras 1, 2, 3 y 4 se muestra que las isoenzimas esterasa (EST), isocitrato deshidrogenasa (IDH), fosfogluconato deshidrogenasa (PGD) y siquimato deshidrogenasa (SDH) produjeron polimorfismos en arroces rojos y variedades, de los cuales se puede mencionar que EST (Figura 1) permitió distinguir a Araure 4, con una banda que presentó esta variedad a los 6.4 cm. De manera similar, la IDH (Figura 2) diferenció a las variedades FONAIAP 1, Araure 4 y ZETA 15 de los demás tratamientos, debido a que éstas presentaron una banda a los 2.2 cm, ausentes en los otros genotipos. Igualmente, la isoenzima fosfogluconato deshidrogenasa (Figura 3) pudo discriminar al arroz rojo Cojedes, el cual mostró una banda a los 3.6 cm, ausentes en los demás genotipos. La isoenzima siquimato deshidrogenasa (Figura 4) separó al arroz rojo Cojedes y la variedad Araure 1 del resto de los genotipos, debido a que presentaron una banda a los 5.9 cm del origen, la cual no la tuvieron los otros materiales.



**Figura 1.** Patrón isoenzimático para EST de ecotipos de arroz rojo y variedades de arroz

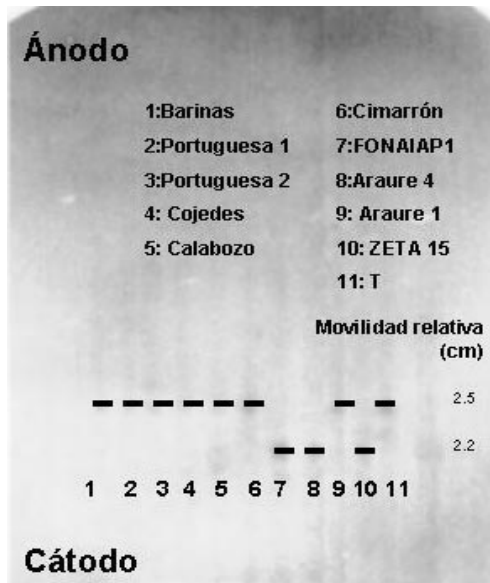


Figura 2. Patrón isoenzimático para IDH de ecotipos de arroz rojo y variedades de arroz

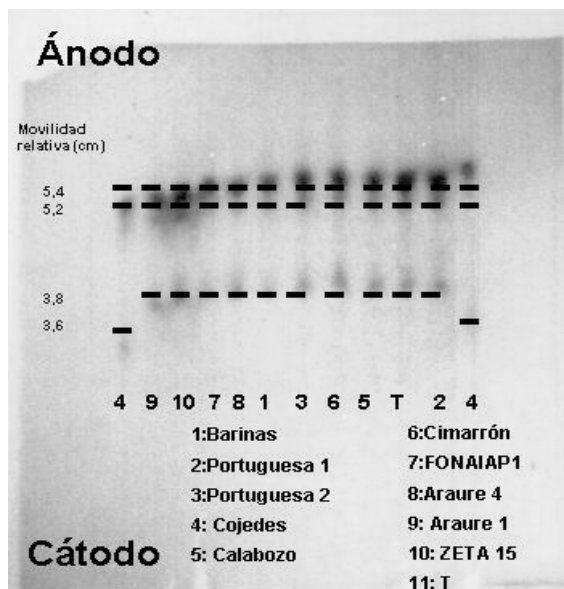
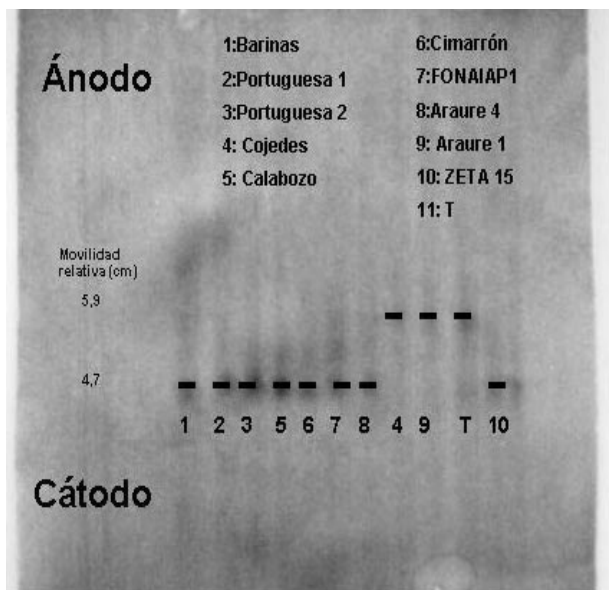
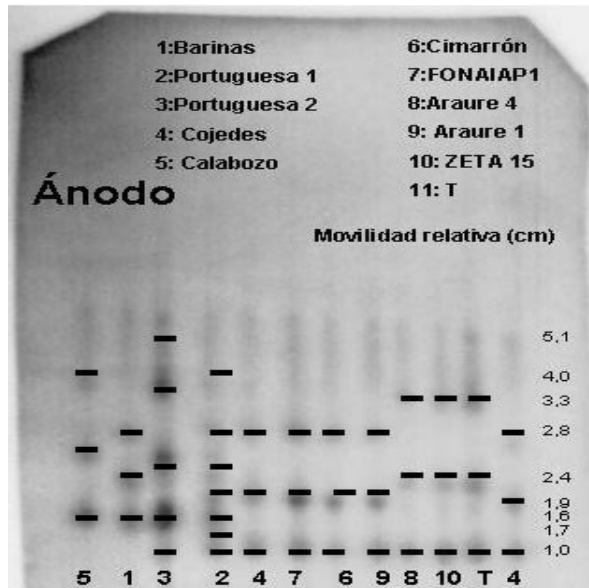


Figura 3. Patrón isoenzimático para PDG de ecotipos de arroz rojo y variedades de arroz



**Figura 4.** Patrón isoenzimático para SDH de ecotipos de arroz rojo y variedades de arroz

En la Figura 5, se observa que la isoenzima fosfoglucoasa isomerasa presentó mayor polimorfismo para los genotipos evaluados, pudiéndose diferenciar a Barinas, el cual presentó tres bandas ubicadas a 1.7; 2.4 y 3.3 cm del gel, completamente distinta al patrón observado en los otros tratamientos. Los arroces rojos Portuguesa 1 y Portuguesa 2, mostraron cinco bandas cada uno en diferentes lugares, pudiéndose inferir que estos arroces rojos pudieron estar formados por una mezcla de dos genotipos, Esta suposición se hace debido a que la isoenzima PGI en arroz es dimérica y está controlada genéticamente por dos genes (*pgi-1* y *pgi-2*) con cuatro alelos cada uno, los cuales producen tres combinaciones posibles (bandas) (Glaszmann *et al.*, 1988). Esta misma isoenzima, pudo diferenciar al arroz rojo Calabozo, el cual mostró un patrón electroforético individual con bandas a los 1.7; 2.8 y 4 cm desde el origen. Igualmente, se encontraron patrones de bandas similares para el grupo formado por Cojedes, Cimarrón, FONAIAP 1 y Araure 1 con una ubicación a 1; 1.9 y 3.3 cm del cátodo, así como también en Araure 4 y ZETA 15 con bandas a 2.4 y 4 cm del origen.



**Figura 5.** Patrón isoenzimático para PGI de ecotipos de arroz rojo y variedades de arroz

En la Figura 6 se observa que la isoenzima esterasa separó a los genotipos evaluados en dos grupos, diferenciándose en este caso solamente al cultivar Araure 4. Estos resultados indican que los arroces rojos tuvieron patrones de bandas similares a las variedades de arroz. Sin embargo, con la isoenzima esterasa, Augustin *et al.*, (1997), pudieron diferenciar al arroz rojo AV de las variedades utilizadas en Río Grande del Sur, Brasil.

El dendrograma mostrado en la Figura 7 indica que la isoenzima IDH organizó los tratamientos en dos grupos, conformado el primero por todos los arroces rojos y las variedades Cimarrón y Araure 1. El segundo grupo estuvo formado por las variedades FONAIAP 1, Araure 4 y ZETA 15. Así mismo, la Figura 8 muestra que el dendrograma de la enzima PGD pudo diferenciar al ecotipo de arroz rojo Cojedes de los demás genotipos evaluados. Sin embargo, la enzima SDH agrupó al arroz rojo Cojedes con la variedad Araure 1 y a los demás genotipos en otro grupo (Figura 9).

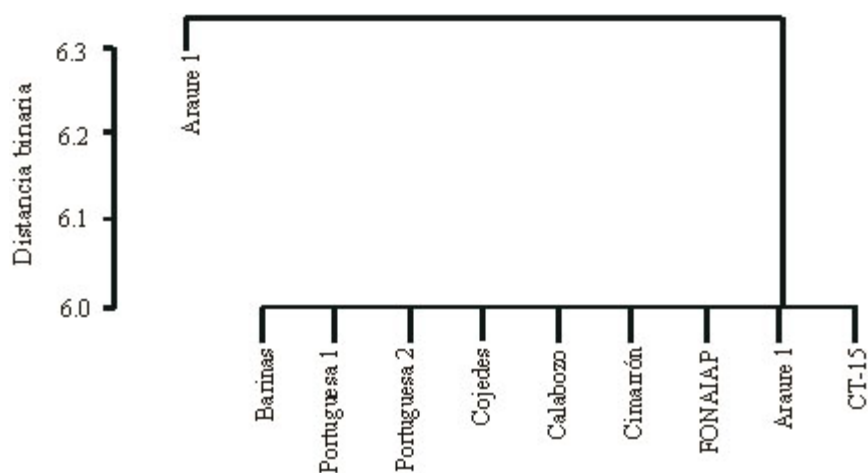


Figura 6. Dendrograma del patrón electroforético de la isoenzima esterasa (EST)

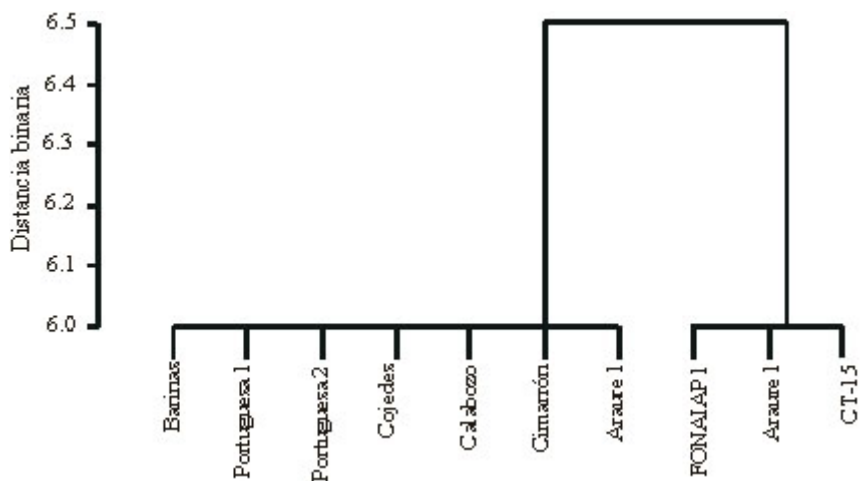
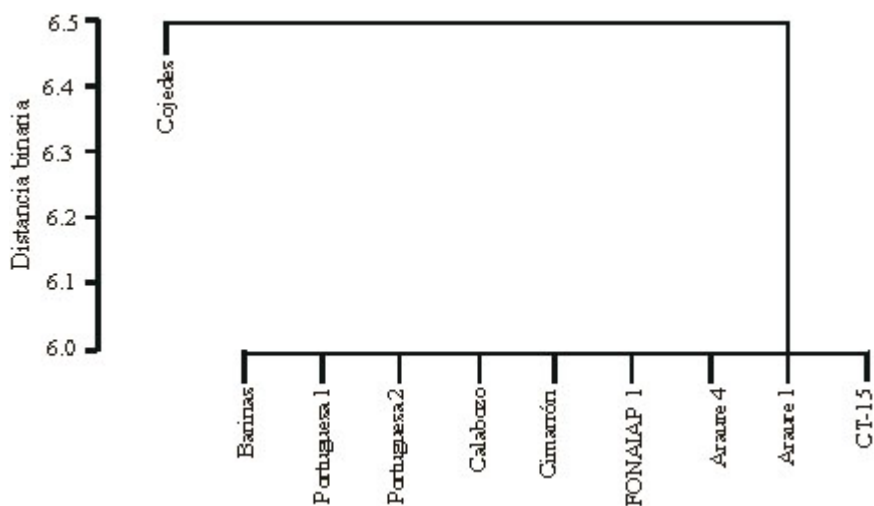
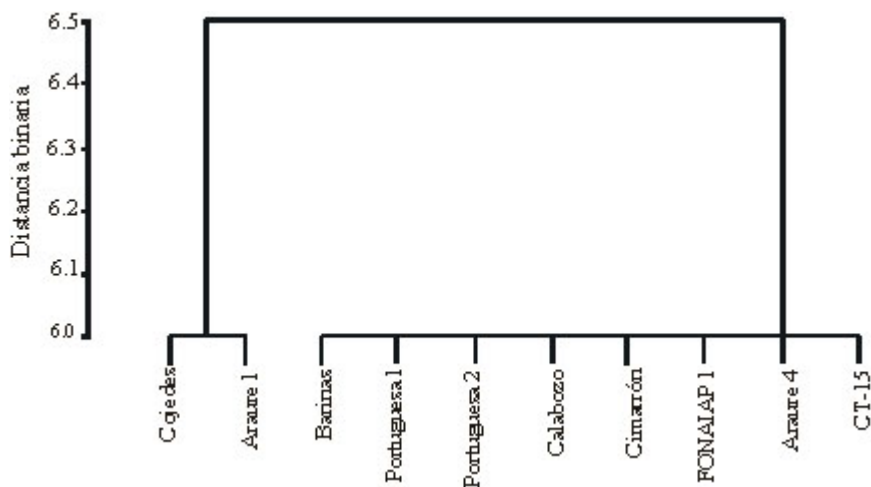


Figura 7. Dendrograma del patrón electroforético de la isoenzima isocitrato deshidrogenasa (IDH)

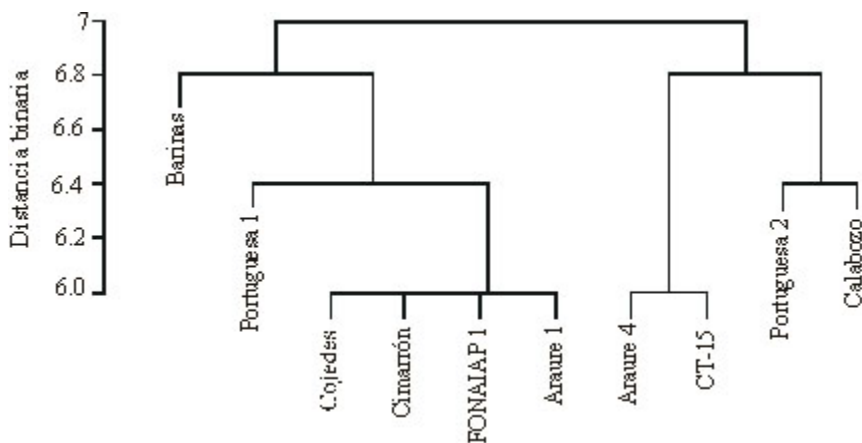


**Figura 8.** Dendrograma del patrón electroforético de la isoenzima fosfogluconato deshidrogenasa (PGD)



**Figura 9.** Dendrograma del patrón electroforético de la isoenzima siquimato deshidrogenasa (SDH)

En la Figura 10, se puede observar que el dendrograma de la isoenzima PGI muestra cinco grupos, en los cuales se destaca que el primero se formó con el arroz rojo Barinas, el segundo con Portuguesa 1, el tercero con Cojedes y las variedades Cimarrón, FONAIAP 1 y Araure 1, el cuarto con Araure 4 y ZETA 15 y el quinto con los arroces rojos Portuguesa 2 y Calabozo.



**Figura 10.** Dendrograma del patrón electroforético de la isoenzima fosfoglucoisomerasa (PGI)

Estos resultados indican que los arroces rojos se pudieron diferenciar de las variedades de arroz con la utilización de la isoenzima fosfoglucoisomerasa, con excepción del arroz rojo Cojedes, aunque éste se pudo separar del resto de los genotipos con la enzima PGD. Langevin *et al.* (1990), separaron los arroces rojos de las variedades con las isoenzimas catalasa (CAT), isocitrato deshidrogenasa (IDH) y fosfoglucoisomerasa (PGI). Similarmente, Augustin *et al.* (1997), diferenciaron el arroz rojo de las variedades de arroz con las enzimas PGI y EST.

El Cuadro 1 muestra la clave de identificación de los genotipos evaluados, los cuales bajo estos cinco sistemas isoenzimáticos se podrían diferenciar, por lo tanto estos análisis electroforéticos servirían de marco de referencia para las pruebas de calidad genética o dactiloscopia en el registro de cultivares en el país.

**Cuadro 1.** Clave de identificación de los polimorfismo producidos por las isoenzimas e ecotipos de arroz rojo y variedades de arroz

	EST	IDH	PGD	SDH	PGI
Barinas	-	-	-	-	
Portuguesa 1	-	-	-	-	
Portuguesa 2	-	-	-	-	
Cojedes	-	-	+	+	
Calabozo	-	-	-	-	
Cimarrón	-	-	-	-	
FONAIAP 1	-	+	-	-	
Araure 4	+	+	-	-	
Araure 1	-	-	-	+	
ZETA 15	-	+	-	-	

## CONCLUSIONES

Las enzimas malato deshidrogenasa (MDH), catalasa (CAT), formato deshidrogenasa (FDH), alcohol deshidrogenasa (ADH), aconitasa (ACO), peroxidasa (POX), fosfatasa ácida (ACP) y glutamato-oxalato transaminasa deshidrogenasa (GOT), no mostraron polimorfismo en los tratamientos evaluados.

La prueba de electroforesis de isoenzimas en geles de almidón, podría utilizarse como herramienta en el control de calidad de semillas de arroz y datiloscopia (huella digital) de los materiales genéticos evaluados en este estudio, con las isoenzimas fosfogluco isomerasa (PGI), fosfogluconato deshidrogenasa (PGD), esterasa (EST), sinquimato deshidrogenasa (SDH), isocitrato deshidrogenasa (IDH). Esta metodología podría hacerse extensiva a otras variedades nuevas, también utilizando las otras isoenzimas probadas en este ensayo que no dieron polimorfismos para los tratamientos como: alcohol deshidrogenasa (ADH), glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT), aconitasa (ACO), formato deshidrogenasa (FDH), malato deshidrogenasa (MDH), fosfogluco mutasa (PGM), peroxidasa (POX) y fosfatasa ácida (ACP).

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- Augustin, E.; F. Franco; A. Terres. 1997. Detectaçã de mistura varietal, e caracteizaçã de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) através de padrões isoenzimaticos. *En: XXII Reuniao da Cultura do Arroz irrigado, Anais. Balneario Camboriou. EPAGRI-IRGA-EMBRAPA/CPACT.*p. 84-86.
- Boskovic, R.; K. Tobutt; P. Arús; R. Messeguer. 1993. Methods of Molecular Marker Analysis in Prunus. First Meeting of the Prunus Mapping Project. Cabrils, Novembre 15 -19. 26 p.
- FAO. 2002. Faostat data base results (FAO). <http://apps1.fao.org>. Consulta 13 de septiembre, 2002.
- Glaszmann, J.; J. De Los Reyes; G. Khushi. 1988. Electroforetic variation of isozymes in plumules of rice (*Oryza sativa* L.). A key to the identification of 76 alleles at *loci*. *Irrs*. 134:1-13.
- Langevin, S; K. Clay; J. Grace. 1990. The incidence and effects of hibridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). *Evolution* 44(4):1000-1008.
- Market, C.; F. Moller. 1959. Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 45:753-763.
- Ministerio de Agricultura y Cria (MAC). 1986. Normas Generales sobre Semillas. Resolución Ministerial. MAC. DGSDA. Número 159. *Gaceta Oficial de Venezuela* N° 33.456.
- Ramirez, H.; A. Calderon; W. Rocca. 1991. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. *En: W. Rocca, L. Mroginski, (Eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones.* p. 825-856.