

Estudios bioquímicos para la selección *in vitro* de variedades de arroz con tolerancia a estrés hídrico

Aymara García^{1*}, Marilyn Florido² y Regla M. Lara². *Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Investigaciones de Riego y Drenaje Avenida Camilo Cienfuegos y Calle 27 Arroyo Naranjo Cuba email: iird@ceniai.inf.cu

² Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar estudios bioquímicos para la selección *in vitro* de variedades de arroz con tolerancia a estrés hídrico en la búsqueda de posibles marcadores que permitan la diferenciación de las variedades en cuanto a su grado de tolerancia ante este factor abiótico. Se determinaron los porcentajes de daños medido por la permeabilidad de la membrana celular, a muestras de callos de cuatro variedades cubanas de diferentes grados de tolerancia a la sequía (Perla de Cuba, Jucarito- 104, Amistad- 82 e INCA LP-7) que fueron incubados en soluciones simuladoras del estrés hídrico (0, -0.5, -1.0, -1.5 MPa) durante 24 y 72h. A las 72h de incubar los callos con la solución de -1.0 MPa, se realizaron análisis electroforéticos de los sistemas isoenzimáticos: peroxidasa, fosfatasa ácida y esterasa en un sistema discontinuo de poliacrilamida y asimismo, se evaluó la actividad de la enzima peroxidasa y los contenidos de proteínas totales y prolina. Los resultados permitieron detectar un comportamiento diferencial de las variedades en cuanto a su grado de tolerancia al utilizar -1.0 MPa y se discute la posibilidad de usar algunos de las variables en la detección de tolerancia a estrés hídrico.

Palabras clave: actividad peroxidasa, callo, isoenzimas, marcador, PEG, prolina, proteínas totales

ABSTRACT

This research paper was carried out in order to make biochemical studies for *in vitro* selection of water stress tolerance rice varieties with the aim of looking for possible markers which may be useful to genotypic discrimination against such abiotic factor. The percentages of damages measured by cellular membrane permeability were calculated in callus from rice varieties (Perla de Cuba, Jucarito-104, Amistad-82 and INCA LP-7) having different water stress degrees at 24 and 72h of incubating with solutions at different PEG-6000 levels (0, -0.5, -1.0, -1.5 MPa). After 72h of incubating calluses at -1.0 MPa, electrophoretical analyses developed in a discontinued system of polyacrilamide gels of the isoenzymes: peroxidase, fosfatases and esterases as well as, peroxidase activity, total protein and proline contents were determined. The result showed differential response of varieties at -1.0 MPa having present its tolerance degree being useful the PEG concentration and some biochemical characters to detect water stress tolerance.

keywords: callus, isoenzymes, markers, PEG, peroxidase activity, proline, total protein

INTRODUCCIÓN

Dentro de los programas de mejoramiento genético para la tolerancia a estrés medioambiental resulta de vital importancia el establecimiento de marcadores que permitan incrementar la eficiencia en la selección temprana de genotipos con mayor tolerancia al estrés hídrico y la variabilidad genética. Por ello, ha sido objeto de estudio la variación tanto de sistemas isoenzimáticos como de la actividad de algunas enzimas porque en alguna medida se conocen las bases bioquímicas de la tolerancia y cuales de estas pudieran constituir mecanismos adaptativos que se inducen en las plantas y que a su vez, presenten una estrecha vinculación con el estrés (Weng, 2002).

En Cuba, se ha trabajado en la búsqueda de posibles marcadores bioquímicos para la selección en condiciones de salinidad de variedades de arroz (Iglesias y González, 1995 a y b), y de caña de azúcar tanto para estrés salino como hídrico (Díaz, 1998, Guía, 1998) y asimismo, recientemente se informó el estudio de algunos sistemas para la tolerancia a altas temperaturas en tomate (Florido *et al.*, 2002). Sin embargo, existe muy poca información sobre la evaluación y detección de posibles marcadores bioquímicos para la selección de genotipos de arroz tolerantes al estrés hídrico, por lo que, teniendo presente la incidencia negativa de la sequía en la agricultura cubana durante los últimos años y la necesidad de incorporar una mayor cantidad de variedades a la producción arrocería

nacional, el presente trabajo tuvo por objetivo realizar estudios bioquímicos en la búsqueda de marcadores que puedan ser de utilidad en la selección temprana de genotipos de arroz que muestren adaptabilidad a estas condiciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron cuatro variedades cubanas de arroz con diferentes respuestas a la sequía: Perla de Cuba (Perla); Tolerante, Jucarito 104 (J-104); Susceptible, Amistad- 82 (A-82); Tolerante e INCA LP- 7 (LP- 7); Tolerante (González, 1993, Alfonso, 1998)

Formación de callos

La siembra y la desinfección de las semillas maduras, 100 por cada variedad, se efectuaron según la metodología descrita por González (1993).

Inducción del estrés hídrico

Se prepararon soluciones de polietilenglicol (PEG-6000) a diferentes potenciales osmóticos (-0.5, -1.0 y -1.5 MPa) según Gupta *et al.* (1993), así como un tratamiento control que no se le añadió el PEG- 6000.

Determinación de la permeabilidad de la membrana celular

Se pesaron 0.05g de callos de cada variedad que se incubaron en 5 ml de solución a los diferentes potenciales osmóticos, señalados anteriormente, durante 24 y 72h a 25 ± 2 g°C y fotoperíodo de 16h, se utilizaron por tratamiento cinco viales de capacidad de 30 ml. Se determinó por conductimetría la permeabilidad de la membrana celular siguiendo la técnica descrita por García *et al.* (1999). El daño total de la membrana celular expresado en porcentaje fue calculado por tratamiento.

Análisis electroforéticos

Se pesaron 0.1g de callos de cada variedad y se incubaron a -1.0 MPa durante 72h. Posteriormente estos callos y otros sin tratar con PEG- 6000 fueron homogeneizados en frío con buffer que contenía sacarosa al 20% y 0.002% de ditiotrinol y se centrifugó a 12 000 gravedades a 4°C durante 20 minutos. Los extractos obtenidos se analizaron en un sistema discontinuo de geles de poliácridamida al 85% según lo recomendado por Iglesias y González (1991). Para la caracterización de los sistemas peroxidasas, fosfatasa ácida y esterasas se utilizaron las técnicas de tinción y conservación descritas por Iglesias (1986). En todos los casos se realizaron tres lecturas réplicas por cada muestra analizada y se confeccionaron los zimogramas en

base al número, movilidad electroforética media e intensidad de tinción utilizando en este último caso la escala propuesta por Brewbaker y Hasegawa (1975).

Actividad de la enzima Peroxidasa y los contenidos de Proteínas totales y Prolina

Extracción y determinación de la actividad peroxidasa y el contenido de proteínas totales: Se pesaron 0.25g de callos y se homogeneizaron en 5 ml de buffer tris-HCl pH 7.4. Posteriormente se centrifugó a 12 000 gravedades a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante fue usado tanto para determinar la actividad de la enzima peroxidasa según el método descrito por Reynaldo (1990), definiéndose como unidad de actividad enzimática (UAE) la cantidad de enzima que provoca un cambio en la absorbancia de $0.01 \text{ min}^{-1} \text{ g masa fresca}^{-1}$, como para cuantificar el contenido de proteínas totales con el método de Lowry *et al.* (1951) con BSA como patrón.

Extracción y determinación del contenido de prolina: Para la extracción se adicionaron 7 ml de agua hirviendo a 0.25g de material vegetal, se maceró durante 2-3 minutos. La solución se filtró sobre algodón y se aforó a 10 ml. La determinación del contenido de prolina se realizó según Bates *et al.* (1973).

En los experimentos, repetidos tres veces, se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Los datos se procesaron mediante análisis de varianza por variedad docimándose las diferencias significativas entre tratamientos por la prueba de rango múltiple de Duncan (1951).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la permeabilidad de la membrana celular

En la tabla 1 se aprecia que a las 24h de incubar los callos en las soluciones de PEG- 6000 no se detectaron variaciones en la respuesta de las variedades pero a las 72h se encontró variabilidad de los genotipos en estudio que se correspondió con su grado de tolerancia al estrés hídrico. Las variedades A-82 y Perla no se afectaron al tratar los callos con soluciones de PEG-6000, mientras si lo hicieron la LP- 7 a -1.5 y la J-104 a -1.0 y -1.5 MPa. A partir de este resultado fue posible establecer las 72h como tiempo adecuado para la incubación del explante ante el PEG- 6000 y seleccionar la solución de -1.0 MPa para evaluar la tolerancia de las variedades a través de algunos indicadores bioquímicos. Este tipo de análisis ha sido propuesto por varios autores como método eficiente en la detección de tolerancia al estrés salino en variedades de arroz (Chowdry *et al.*, 1995) y a la tolerancia a altas temperaturas en soya (Florido *et al.*, 1996) y tomate (Florido *et al.*, 1999).

Tabla 1 Análisis del porcentaje de daño celular medido por la permeabilidad de la membrana a las 24h y 72h de incubar los callos de arroz ante diferentes potenciales osmóticos (PO).

PO (MPa)	24 h de tratamiento de los callos				72 h de tratamiento de los callos			
	Perla	J-104	A-82	LP- 7	Perla	J-104	A-82	LP- 7
-0.5	19.46	19.73	18.75	19.24	23.0	27.7 b	27.3	25.8 b
-1.0	19.37	19.42	17.44	19.55	34.4	64.3 a	30.6	28.2 b
-1.5	19.55	19.46	16.35	19.55	35.3	77.4 a	31.9	58.9 a
ES(±)	0.7 ns	0.75 ns	0.78 ns	0.65 ns	3.88 ns	7.04**	2.74 ns	1.49***
C.V.(%)	15.48	16.86	15.77	14.18	25.13	24.94	23.54	10.05

Medias con letras iguales no difieren, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Análisis electroforéticos

Los resultados del análisis electroforéticos revelaron la existencia de variaciones en la composición de las isoenzimas estudiadas. Así, se puede apreciar en el zimograma de las Peroxidasas (Fig. 1) un

aumento en la intensidad de tinción en la primera banda para las variedades Perla, A-82 y LP- 7 cuando los callos se trataron con la solución estresante a -1.0 MPa, y sin embargo, la variedad J-104 mostró ausencia de la última banda para este mismo tratamiento.

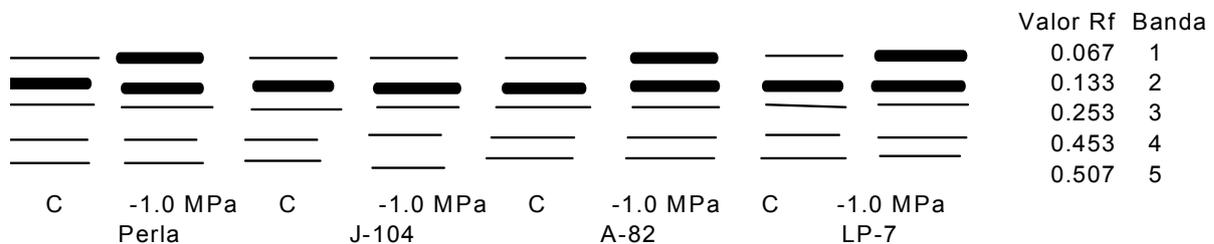


Figura 1 Zimograma Peroxidasas en callos de diferentes variedades de arroz por efecto del PEG-6000.

De hecho, el aumento en la intensidad de tinción detectado en la isoenzima peroxidasas en presencia de PEG- 6000 ha sido también encontrado por Echenique y Polci (1994) que han indicado que dicha isoenzima forma parte del sistema de control de peróxidos en las células vegetales y de protección a las membranas celulares (Iglesias y González, 1995).

Por el contrario, se observó para fosfatasa ácida (Fig. 2) que la solución a -1.0 MPa de PEG-6000 no afectó a esta isoenzima para las variedades tolerantes mientras que para la susceptible en presencia de PEG- 6000 hubo incremento en la tinción de la banda de mayor movilidad y disminución en la de menor.

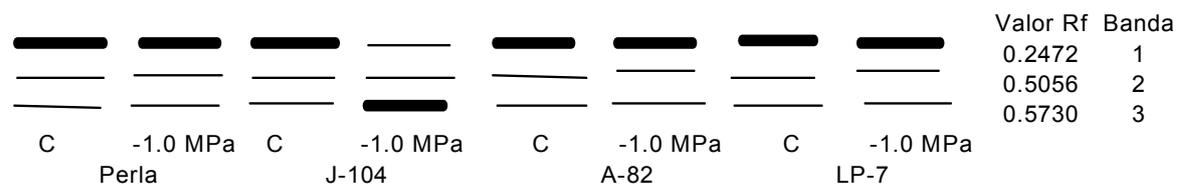


Figura 2. Zimograma Fosfatasa ácida en callos de diferentes variedades de arroz por efecto del PEG-6000.

En la fig. 3 se muestra el zimograma Esterasas donde no hubo variaciones en la variedad Perla. En contraste, cuando los callos se sometieron a la solución de -1.0 MPa para la A-82 y LP- 7 se detectó ausencia de la primera banda y asimismo de la segunda y quinta bandas para J-104. En esta última variedad apareció una nueva banda que pudiera estar asociada con mecanismos adaptativos de la planta para sobreponerse al estrés (Iglesias, 1994).

Echenique y Polci (1994) encontraron un incremento en la intensidad de la tinción y la aparición de algunas

bandas para los sistemas esterases y fosfatasa ácida en plántulas de pasto de un cultivar susceptible tratadas con PEG-6000 y no así en el tolerante, sugiriendo que el déficit hídrico induce una importante solubilización de las fosfatasa ácida y otras hidrolasas en plantas que evitan la sequía y no en aquellas que la toleran.

Al parecer las variedades tolerantes al estrés hídrico logran mantener un mejor balance entre la síntesis y la degradación en presencia de este factor ambiental.

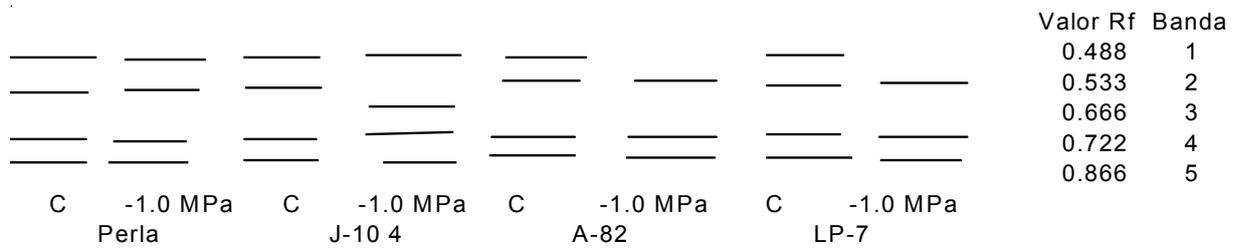


Figura 3 Zimograma Esterasas en callos de diferentes variedades de arroz por efecto del PEG-6000.

Actividad de la enzima peroxidasa y contenidos de proteínas totales y prolina

De manera general la actividad de la enzima peroxidasa (Tabla 1) se incrementó para las variedades tolerantes en la solución a -1.0 MPa que se caracterizaron por una mayor actividad que la variedad susceptible. Aunque existen algunos criterios al respecto, Pérez *et al.* (1997) plantearon que el incremento en los niveles

basales de las enzimas unido a la acción de otros compuestos antioxidantes puede constituir una adaptación de las plantas a las condiciones de estrés.

Las peroxidases poseen la capacidad de eliminar el peróxido de hidrógeno por lo que su incremento puede ser una respuesta protectora que impide la formación de especies activadas de oxígeno y prevenir la formación de radicales hidroxilo.

Tabla 1. Comportamiento de la actividad de la enzima peroxidasa (UAE min.⁻¹) en callos de diferentes variedades de arroz por efecto del PEG-6000.

PO (MPa)	Perla	J-104	A-82	LP- 7
0	295.3 b	216.8 a	254.5 b	226.3 b
-1.0	386.5 a	159.2 b	327.4 a	287.3 a
ES(±)	4.37**	5.44**	4.43**	7.92***
C.V.(%)	12.0	17.2	13.4	17.7

Medias con letras iguales no difieren, según la prueba de rangos múltiples de Duncan * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 PO. potencial osmótico.

Del mismo modo, se encontró un aumento del contenido de proteínas totales (Tabla 2) a favor de las variedades tolerantes ante la solución simuladora del estrés hídrico, no así en la susceptible que disminuyó significativamente su contenido. Este resultado está en concordancia con lo señalado por otros autores tanto en condiciones de estrés hídrico como salino

(Chandler y Robertson, 1994, Echevarría *et al.*, 1995, 1996, García *et al.*, 1999) considerado como una medida de protección ante el estrés osmótico, respuesta que pudiera estar vinculada con la expresión de genes específicos en presencia de estrés hídrico que favorecen la inducción de proteínas que en condiciones óptimas de disponibilidad de agua no son sintetizadas (Pérez *et al.*, 1996).

Tabla 2. Comportamiento del contenido de proteínas totales (mg.gmf⁻¹) en callos de diferentes variedades de arroz por efecto del PEG-6000.

PO (MPa)	Perla	J-104	A-82	LP- 7
0	5.5 b	3.4 a	4.1 b	3.4 b
-1.0	6.3 a	2.4 b	5.9 a	4.6 a
ES(±)	0.09***	0.1***	0.13**	0.12***
C.V.(%)	3.73	9.5	4.7	6.0

Medias con letras iguales no difieren, según la prueba de rangos múltiples de Duncan *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 PO. potencial osmótico.

En cuanto al contenido de prolina la tabla 3 muestra que las variedades Perla y A-82 presentaron un incremento en la concentración de este aminoácido en el tratamiento con -1.0 MPa respecto al control; por el contrario las variedades

LP- 7 y J-104 mantuvieron igual comportamiento en ambos tratamientos. La acumulación de prolina es un fenómeno común que tiene lugar en plantas sujetas a déficit hídrico (Jerez *et al.*, 1994). En ocasiones, ha sido usado como criterio útil para

la selección de variedades adaptadas a estrés hídrico (Mukane *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha indicado que no siempre se acompaña de una mayor tolerancia a estrés. Al respecto, en arroz para condiciones de salinidad durante el estudio de dos variedades con diferentes grados de tolerancia no se observó correlación positiva entre

el contenido de prolina y la tolerancia a la sal, lo que al parecer depende de las características genéticas y bioquímicas de cada especie (Echevarría *et al.*, 1995, 1996). Estos criterios sugieren que la acumulación de prolina puede ser inefectiva sino se mejoran otros parámetros del proceso adaptativo.

Tabla 3. Comportamiento del contenido de prolina (m.gmf⁻¹) en callos de diferentes variedades de arroz por efecto del PEG-6000.

PO (MPa)	Perla	J-104	A-82	LP- 7
0	26.1 b	23.1	27.2 b	28.3
-1.0	23.5 a	21.2	33.7 a	27.8
ES(±)	1.94*	0.9 ns	1.78*	0.8 ns
C.V.(%)	6.1	4.8	3.9	2.1

Medias con letras iguales no difieren, según la prueba de rangos múltiples de Duncan
* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 PO. potencial osmótico.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados se concluye que al incubar callos de diferentes variedades de arroz en una solución simuladora del estrés hídrico con PEG- 6000, a -1.0 MPa de potencial osmótico, durante 72h y con la evaluación tanto del porcentaje de daño, medido por la permeabilidad de la membrana celular, como por algunas variables bioquímicas como las isoenzimas, la actividad de la enzima peroxidasa y el contenido de proteínas totales, se encontró un comportamiento diferencial de las variedades y se corroboró con el grado de tolerancia de éstas al estrés hídrico, lo que se sugiere su empleo como posibles marcadores bioquímicos para este factor abiótico en los programas de mejoramiento genético que se realizan en este cultivo.

REFERENCIAS

Alfonso, R (1998) Determinación de parámetros genéticos - fisiológicos indicadores del estrés hídrico para su empleo en el mejoramiento genético del arroz (*Oryza sativa* L.) y la estabilidad varietal. Tesis IIA, Cuba

Bates, LS (*et al.*) (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207

Chowdhry, M, Moseki, B y Browling, D (1995) A method for screening rice plant for salt tolerance. *Plant and Soil* 171: 317-322

Brewbaker, J L y Hasegawa PM (1975) Polymorphisms of the major peroxidase of maize isoenzyme III. En: JL Brewbaker, P M Hasegawa. (Eds) *Developmental Biology Press*, 15p. Academic London

Chandler, PM y Robertson, M (1994) Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 113-141

Díaz, P (1998) Evaluación de la tolerancia a la salinidad en somaclones en la caña de azúcar (*Saccharum* sp). Tesis CENIC

Duncan, D B (1951) A significance test for differences between ranked treatment in analysis of variance. *Virginia J.Sci.* 2:171-189

Echenique, CV y Polci PA (1994) Cambios isoenzimáticos inducidos por estrés hídrico y temperatura en Pasto Llorón. *Turrialba Revista Interamericana de Ciencias Agrícolas* 44(1): 10-17

Echevarría, I, Reynaldo, I y Mainardi, S (1995) Algunos aspectos del metabolismo nitrogenado en semillas de arroz germinadas en dos concentraciones de NaCl. I. Variedad Amistad' 82. *Cultivos Tropicales* 16(1):43-45

Echevarría, I, Reynaldo, I y Mainardi, S (1996) Some aspects of nitrogen metabolism in rice seeds germinating at two NaCl concentrations. II. Pokkali variety. *Cultivos Tropicales* 17(1):20-23

Florida, M, Iglesias, L, Varela, M y Ponce, M (1996) Respuesta al estrés de calor en un grupo de variedades de soya (*Glycine max* L. Merrill) *Cultivos Tropicales* 17(1):92-96

Florida, M, Lara, RM, Plana, D y Alvarez, M (1999) Establecimiento de un método eficiente para evaluar la tolerancia al calor en tomate (*Lycopersicon* spp). *Cultivos Tropicales* 20 (2): 69-73

Florida, M, Alvarez, M, Lara, RM, Plana, D y García, A (2002) Patrones electroforéticos de peroxidasas, catalasas, superóxido dismutasa y proteínas totales en plántulas de tomate sometidas a estrés de temperaturas. *Cultivos Tropicales* 23(1): 45-48

González, M (1993) Uso de la variación somaclonal en el mejoramiento genético para la tolerancia a la salinidad en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) Tesis ISCAH-INCA, La Habana

Guía, Y (1998) Evaluación y selección *in vitro* para la tolerancia a la sequía de la caña de azúcar. Tesis. CNIC. 45p.

Gupta, AK, Singh, J, Kaur, N y Singh, R (1993) Effect of polyethylenglycol induced water stress on germination and reserve carbohydrate metabolism in Chickpea cultivars differing in tolerance to water deficit. *Plant Physiology Biochem.* 31(3): 359-378

Iglesias, L (1986) Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*G. max* L. Merrill) Tesis de Doctorado ISCAH 232p.

- Iglesias, L y González M (1991) Estudio del polimorfismo bioquímico en arroz (*O. sativa* L.). *Cultivos Tropicales* 12(2): 42-47
- Iglesias, L (1994) Revisión sobre diversos aspectos relacionados con la tolerancia al estrés de calor en plantas. *Cultivos Tropicales*. 15(2):99-107
- Iglesias, L y González, M (1995 a) Estudios isoenzimáticos asociados con la tolerancia a la salinidad en el arroz (*Oryza sativa* L.). *Cultivos Tropicales* 16(1): 64-69
- Iglesias, L y González, M (1995 b) Variation in the total protein composition of rice varietal group submitted to saline stress. *Cultivos Tropicales* 16(1): 81-83
- Jerez, E, Torres, W, Dell'Ámico, J y Morales D (1994) Comportamiento del cultivo de la papa sometido a diferentes niveles de humedad en el suelo II Análisis del estado hídrico de las plantas. *Cultivos Tropicales* 15(2):28-33
- Lowry, OH (1951) Protein Measurement by Folin Reagent, *J.Biol.Chem.* 193: 265-276.
- Mukane, MA (1996). Biochemical markers for water stress in pigeonpea genotypes. *Journal of Maharashtra Agricultural Universities*. 21(1):140-141
- Pérez, E, Gidekel, M, Segura, M, Herrera, L y Ochoa, N (1996) Effects of water stress on plant growth and root proteins in three cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) with different levels of drought tolerance. *Physiologia Plantarum*. 96: 284-290
- Pérez, I, Dell'Amico, J, Rodríguez, P y Reynaldo, I (1997) Alteraciones fisiológicas y bioquímicas de los cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) ante condiciones de inundación. *Cultivos Tropicales* 18(3) 30-35
- Reynaldo, I (1990) El daño por frío en los frutos de toronja (*Citrus paradisi*) CV Marsh y su relación con el metabolismo fenólico. INCA. Tesis
- Weng, JH (2002) Genetic variation of *Zoysia* in Taiwan as analyzed by isoenzyme patterns and salinity tolerance. *Plant Production Science* 5(3): 236-241