

AVANCES EN LA OBTENCIÓN DE HUELLAS MOLECULARES EN GENOTIPOS DE ARROZ MEDIANTE ISOENZIMAS CON FINES DE PROPIEDAD INTELECTUAL

María Cecilia Perdomo Leiva*, Erika Arnao*, Catalina Ramis**,
Yreny de Faria** e Iris Pérez-Almeida***

RESUMEN

La caracterización de variedades se realiza generalmente mediante descriptores morfológicos, los cuales presentan limitaciones como alta influencia ambiental y poca capacidad de distinguir genotipos élitos emparentados. Como alternativa se ha propuesto la caracterización bioquímica basada en el polimorfismo isoenzimático para la caracterización y descripción de cultivares de arroz, como una estrategia complementaria y de bajo costo. El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de las isoenzimas en la obtención de huellas moleculares de variedades de arroz venezolanas. Para ello se evaluaron coleoptilos de 5 días de edad provenientes de 10 genotipos de arroz, con los sistemas isoenzimático: EST, ACP y SDH, separados electroforéticamente en geles discontinuos de poliacrilamida. A partir de los zimogramas obtenidos para las tres isoenzimas, se construyó una matriz de presencia/ausencia de bandas con la cual se realizó un análisis de agrupamiento (UPGMA) basado en la distancia de Jaccard. El dendrograma obtenido permitió distinguir solamente cinco genotipos, lo que evidencia la necesidad de utilizar un mayor número de isoenzimas para obtener la huella molecular de variedades de arroz venezolanas.

Palabras Clave: Isoenzimas; marcadores moleculares; *Oryza sativa* L.

* Investigadores. Fundación para la Investigación Agrícola DANAC.
E-mail: marac.perdomo@danac.org.ve - erika.arnao@danac.org.ve

** Profesora Agregado y Asistente de Investigación, respectivamente. UCV. Facultad de Agronomía. Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola.

*** Investigadora. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP).
E-mail: iperez@inia.gob.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

ADVANCES ON ISOENZYME MOLECULAR FINGERPRINTING OF RICE GENOTYPES WITH INTELLECTUAL PROPERTY RIGHT PURPOSES

María Cecilia Perdomo Leiva*, Erika Arnao*, Catalina Ramis**, Yreny de Faria** e Iris Pérez-Almeida****

SUMMARY

Variety characterization is usually performed using morphological descriptors. These descriptors are highly influenced by environmental conditions, and they poorly distinguish among closely related lines. As an alternative, biochemical characterization using isozymes polymorphism is a relative low-cost method better suited to characterize rice germplasm, particularly closely related rice lines. The objective of this research was to evaluate isozymes as molecular markers suited for fingerprinting of Venezuelan rice varieties. A set of ten rice varieties was screened. From each, five day-old coleoptiles were collected. The isozyme systems used were EST, ACP y SDH, on discontinued acrylamide gels. From the resulting zymograms, a present/absent matrix was constructed. Grouping analysis was obtained using the UPGMA method, calculated from Jaccard coefficients. The dendrogram obtained only distinguished five of the varieties, indicating that more isozyme systems are required for molecular fingerprinting of Venezuelan rice varieties.

Key Words: Isozymes; molecular markers; *Oryza sativa* L.

* Investigadores. Fundación para la Investigación Agrícola DANAC.
E-mail: marac.perdomo@danac.org.ve - erika.arnao@danac.org.ve

** Profesora Agregado y Asistente de Investigación, respectivamente. UCV. Facultad de Agronomía. Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola.

*** Investigadora. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP).
E-mail: iperez@inia.gob.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

Dado el hecho que el mejorador debe aplicar una serie de procedimiento para la obtención de una nueva variedad, que involucra entre otros aspectos, el conocimiento científico, tiempo, esfuerzo e inversiones financieras, en los últimos años se ha implementado a nivel mundial, sistemas de protección de las variedades obtenidas en programa de mejoramiento (Guevara, 2005). Esto ha surgido como un incentivo a la capacidad creadora del mejorador, mediante el reconocimiento a la inversión financiera, que estimulen futuras creaciones.

Para obtener la protección de las variedades vegetales, se debe cumplir con los requisitos de: distinción, uniformidad y estabilidad. En Venezuela, la verificación de los requisitos se realiza a través del Servicio Nacional de Semilla (SENASA), utilizando descriptores morfológicos. Estos descriptores, pese a que juegan un papel muy importante en la divulgación de las características morfológicas, poseen algunas limitaciones como alta influencia ambiental y poca capacidad de distinguir cultivares emparentados (Díaz, 2005).

Las variedades de arroz a ser registrada comúnmente satisfacen los estándares de homogeneidad y estabilidad, no sucede igual con la distinción, debido a la estrecha base genética de las variedades (Cueva-Pérez *et al.*, 1992). En tal sentido, se ha propuesto la utilización de marcadores moleculares para la descripción y caracterización de cultivares de arroz, entre ellos, se encuentran los marcadores bioquímicos, basado en el polimorfismo isoenzimático, y los marcadores basados en ADN (Medida *et al.*, 2006). Estas metodologías son herramientas complementarias y de bajo costo para cumplir con el requisito de distinguibilidad. Rodríguez (2001) y Ortiz *et al.* (2002) señalan que estas herramientas son útiles también para la verificación de la pureza varietal en Venezuela. Por esta razón, se propuso realizar una evaluación preliminar de la capacidad de las isoenzimas para la obtención de huellas moleculares de variedades de arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se efectuó en el Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central

de Venezuela. Como material vegetal se utilizó 10 genotipos de arroz, como tejido vegetal se seleccionó coleóptilos de arroz de 5 y 15 días después de la emergencia de plántulas sembradas en cámara húmeda.

Las muestras se homogeneizaron en un mortero, con la adición de un tampón de extracción llamado Glutation, a una relación de 1:2 (tejido:tampón). Las enzimas evaluadas fueron las esterasas (EST: E.C.3.1.1.1), fosfata ácida (ACP: E.C.3.1.3.2) y shikimato deshidrogenasa (SDH: E.C.1.1.1.25).

La separación electroforética se realizó en geles discontinuos de poliacrilamida de 6-10% para las enzimas EST y ACP, y de 6-8% para la SDH. Como buffer de corrida se utilizó tris-glicina 1X. La corrida electroforética se realizó a 4 °C y constó de una precorrida a 70 voltios durante 15 min y una corrida a 100 voltios durante 2h aproximadamente. Para el revelado fue empleada la metodología de Vallejos (1983) con algunas modificaciones del Laboratorio de Genética Molecular CIBA.

A partir de los zimogramas obtenidos para las tres isoenzimas, se construyó una matriz binaria con base a la presencia (1) y ausencia (0) de bandas, a partir del cual se estimó el coeficiente de similitud Jaccard, utilizado para originar el dendrograma mediante el análisis de agrupamiento (UPGMA) con la asistencia de software NTSYS (versión 2,1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El dendrograma obtenido permitió observar la alta similitud entre los materiales y la escasa variabilidad de la base genética de las variedades arroz evaluadas para los tres sistemas isoenzimáticos (Figura). Estos resultados confirman la reducción de la base genética de los cultivares de arroz que se ha observado en los últimos años, debido principalmente al número reducido de progenitores empleados en la mayoría de los programas de mejoramiento genético de América Latina. Muestra de ello, es que durante el período 1971-1989, las líneas de arroz liberadas en América Latina y en el Caribe tienen en su genealogía 14 cultivares comunes, provenientes de siete países (Cuevas-Pérez *et al.*, 1992).

En cuanto a la distinguibilidad de los materiales, sólo en 5 genotipos se logró una combinación de bandas que permite diferenciarlos de los demás; por lo que es necesario evaluar un mayor número de sistemas isoenzimáticos para lograr la distinguibilidad de todas las variedades.

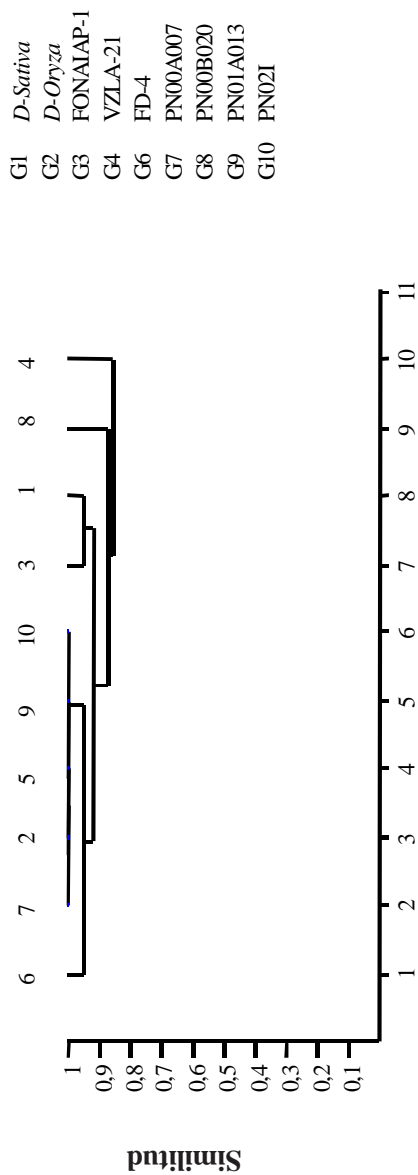


FIGURA. Dendrograma obtenido por el método UPGMA basado en la distancia de Jaccard.

CONCLUSIÓN

-Estos resultados evidencian la necesidad de utilizar un mayor número de isoenzimas y/o complementar con otro tipo de marcadores de ADN para lograr una mayor diferenciación de las variedades.

BIBLIOGRAFÍA

DÍAZ, A. 2005. Marcadores Moleculares: Estadística Básica. Instituto de Genética. FAGRO-UCV.

CUEVAS-PÉREZ, F., E. GUIMARAEZ, L. BERRIO and D. GONZÁLES. 1992. Genetic base of irrigated-rice in Latin America and the Caribbean, 1971-1989. *Crop. Sci.* 32: 1054-1059.

GUEVARA, A. 2005. Propiedad intelectual de variedades mejoradas: Patentes, UPOV, o un Sistema sui generis. [En línea] http://archive.idrc.ca/library/document/101488/chap3_s.html#USO%20ALA%20%20BIODIVERSIDAD

MEDINA, R., M. FALOCI, M. MARASSI y MROGINSKI. 2006. Identificación de variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivadas en Argentina mediante marcadores bioquímico: su utilidad potencial para el registro de cultivares. [En línea] http://www.ipgri.cgiar.org/pgnewsletter/article.asp?id_article=1&id_issue=143

ORTIZ, A., C. RAMIS, P. PARRA, A. DÍAZ y L. LÓPEZ. 2002. Patrones isoenzimáticos de variedades de arroz y arroces rojos de Venezuela. *Revista Facultad Agronomía.* 28:117-130.

RODRÍGUEZ, N. 2001. Evaluación de la erosión de la semilla de arroz (*Oryza sativa* L.) en el sistema de producción de semillas certificadas en Portuguesa. Tesis de maestría. Maracay, Ven. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 55 p.

VALLEJOS, E. 1983. Enzyme activity staining. **In:** Isozyme and plant genetics and breeding, Ed. S. D. Tanksley y T. J. Orton Elsevi, Amsterdam. Parte A, 469-516.