

Caracterización de las proteínas de reserva y cultivo de anteras para el desarrollo de genotipos de arroz de alta calidad nutricional

Alma L Martínez¹, Elsa Ventura¹, Uriel Maldonado², Mirna M Sánchez¹,
Crescencio Bazaldúa¹, Alma A del Villar¹

¹Departamento de Biotecnología, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, IPN
PO 24, Yautepec, Morelos 62731, México

Fax: 01 (55) 57 29 60 00; E-mail: eventura@ipn.mx

²Campo Experimental Zacatepec, Biotecnología Vegetal, INIFAP
Km 0.5, Carretera Zacatepec-Galeana, AP 12, Zacatepec, Morelos, México

RESUMEN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es de gran importancia económica mundial, pues es el cereal de mayor consumo humano, por ello es importante buscar alternativas para mejorar sus propiedades nutricionales. En este trabajo se muestran los resultados sobre la caracterización bioquímica de las proteínas de reserva en semillas de generaciones segregan (F2 y F4) de híbridos (Morelos A-92 [MA92; indica] x Koshihikari [Kosi; japónica] y Kosi x MA92) de arroz, así como la inducción de androgénesis. El contenido más alto de proteínas totales (10.77%) se detectó en Kosi x MA92 (F2). El genotipo Kosi x MA92 generación F4 presentó los niveles más altos de albúminas, globulinas y prolaminas, y el menor porcentaje de glutelinas (21.48%). Se obtuvieron resultados relevantes en el perfil electroforético de las globulinas del híbrido Kosi x MA92 (segregante F4), con 13 bandas cuyos pesos moleculares estuvieron entre 13 y 110 kDa, y en el perfil electroforético de las glutelinas solo hubo tres bandas de 13, 16 y 21 kDa. La androgénesis se indujo con el medio de cultivo N6 adicionado con ANA, 2.0; KIN, 1.0; glicina, 2.0 mg/L y glutamina, 500 mg/L; maltosa 5% y agar 8 g/L. La conversión de estructuras embriogénicas a plantas se hizo en el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS), suplementado con AIA, 0.5; ANA, 0.5; KIN, 2.0 mg/L; sacarosa, 30 mg/L y agar 8 g/L.

Palabras clave: proteínas de reservas, híbridos, androgénesis, mejoramiento genético, *Oryza sativa* L.

Biotecnología Aplicada 2005;22:37-40

ABSTRACT

Characterization of storage proteins and anther culture for the development of high nutritional quality rice genotypes. Rice (*Oryza sativa* L.) is economically important worldwide since it is the cereal most highly consumed by humans; so, it is important to improve its nutritional properties. This paper reports the results of the biochemical characterization of storage proteins in seeds of segregating generations (F2 and F4) from (Morelos A-92) [MA92; Indica] x Koshihikari [Kosi; japonica] and Kosi x MA92 rice hybrids as well as induction of androgenesis. The highest total protein content (10.77%) was detected in Kosi x MA92 (F2). The F4 generation from Kosi x MA92 genotype showed the highest levels of albumin, globulins, and prolamins as well as the lowest percentage of glutelins (21.48%). The electrophoretic profile of globulins isolated from Kosi x MA92 hybrid (segregant-F4) showed 13 bands with 13-110 kDa molecular weights while glutelins just three bands (13, 16, and 21 kDa). Androgenesis was induced in the N6 culture medium, supplemented with ANA, 2.0; KIN, 1.0; glycine, 2.0 and glutamine, 500 mg/L, maltose 5%, and agar 8 g/L. The conversion of embryogenic structures into plants was performed in Murashige & Skoog (MS) supplemented with AIA, 0.5; ANA, 0.5, and KIN, 2.0 mg/L, sucrose, 30 and agar, 8 g/L.

Keywords: storage proteins, hybrids, androgenesis, genetic improvement, *Oryza sativa* L.

Introducción

El arroz es el cereal de mayor consumo humano y de gran importancia económica mundial. Sus granos están constituidos por 90% de almidón y solo 10% de proteínas. A pesar del bajo contenido, su importancia nutricional se debe a la calidad proteica, ya que posee un elevado índice de aminoácidos esenciales (del 60%), superior al de otros granos de amplio consumo como el maíz y el trigo (con valores de 40 y 43%, respectivamente) [1]. Las proteínas de reserva en las semillas de arroz están constituidas por albúminas (5%), globulinas (10%), prolaminas (5%) y glutelinas (80%) [2]. La caracterización bioquímica de estas proteínas

permite identificar genotipos con propiedades nutricionales importantes, por ejemplo: el índice de aminoácidos esenciales (IAE), el cual está determinado por la cantidad de aminoácidos que necesita el cuerpo humano, pero que no es capaz de metabolizar por sí mismo, y por tanto, requiere, su ingestión. Este índice es directamente proporcional al contenido de la fracción de globulinas, que en las leguminosas representa entre el 75 y el 95% de la proteína total [3]. Tradicionalmente, el mejoramiento genético del arroz se ha enfocado hacia las características agronómicas del cultivo, incrementar la producción

1. Eggum. Food and Nutrition Research Institute, 1980. In: Rice Human Nutrition, (eds.). IRRI-FAO. Rome; 1993.

2. Takaiwa F, Ogawa M, Okita TW. Rice Glutelins. In: Seed Proteins. Ed. by Shewry PR, Casey R. Kluwer Academic Publishers. Norwell MA, USA; 1999.

3. Freitas RL, Ferreira RB, Teixeira AR. Use of a single method in the extraction of the seed storage globulins from several legume species. Application to analyse structural comparisons within the major classes of globulins. International journal of food science and nutrition 2000; 51:341-52.

por unidad de superficie, inducir su resistencia a problemas fitosanitarios y a mejorar las características de industrialización, con el fin de aumentar el rendimiento del grano entero. En la actualidad existen nuevos retos; la demanda de productos nutracéuticos, es cada vez mayor, lo que conduce a la necesidad de investigar aún más, con el propósito de que las propiedades nutricionales sean superiores y de reducir los problemas alérgicos específicos de los cereales [4]. Una de las alternativas para ello es el desarrollo de genotipos con un elevado contenido de globulinas, por su relación directa con el IAE. Estos genotipos pueden ser sometidos a técnicas de micropropagación por cultivo de anteras. Esta técnica es una herramienta complementaria en el mejoramiento genético, pues posee la ventaja de fijar las características deseadas en un tiempo menor (50%) al requerido por el método tradicional de pedigrí.

La integración de las metodologías de mejoramiento genético tradicional, el cultivo de anteras y la caracterización bioquímica y molecular, posibilita la generación de variedades diferenciadas de arroz con elevado valor nutricional y sin alérgenos, que pueden ofrecerse en nichos de mercado específicos, lo cual incrementará las utilidades de los productores de arroz. Algunos reportes indican que en las últimas décadas ha disminuido drásticamente la superficie cultivada de este cereal, debido a los altos costos de cultivo. El objetivo de esta investigación fue caracterizar bioquímicamente las proteínas de reserva de generaciones segregantes de híbridos de arroz, con la finalidad de encontrar genotipos con mayor contenido de globulinas, y establecer una metodología de micropropagación, mediante el cultivo de anteras de los híbridos seleccionados.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizaron semillas de las generaciones segregantes F2 y F4 de híbridos de arroz, obtenidas de las cruces directas de Kosihikari (japónica) x Morelos A-92 (índica) (Kosi x MA92) y MA92 x Kosi, y como control: sus progenitores. Estos genotipos forman parte del Banco de Germoplasma del Campo Experimental Zacatepec-INIFAP, en Zacatepec, Morelos, México.

Determinación del contenido de proteínas totales

Las semillas se descascarillaron de forma manual, se molieron en un molino analítico Teckmar A-10 (Teckmar, Estados Unidos) y la harina obtenida se pasó por una malla de 80 μ m de diámetro para homogeneizar el tamaño de las partículas. El contenido de nitrógeno total de cada híbrido se determinó mediante el método de Kjeldahl [5]. Para calcular el porcentaje de proteína total se utilizó un factor de conversión de 5.85, específico para cereales.

Fraccionamiento de las proteínas de reserva

Las proteínas de reserva (albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas) se obtuvieron a partir de la harina con base en su solubilidad, con el empleo del método de Osborne, modificado por Teixeira y Ferreira [6].

Para el fraccionamiento de las proteínas se utilizó harina-solución extractora en una relación 1:10 (m/V). El proceso se inició con la extracción de albúminas, para lo cual se adicionó una solución de CaCl_2 10 mM y MgCl_2 10 mM, y se mantuvo en agitación constante durante 4 h a 4 °C. Después se centrifugó a 10 000 g por un lapso de 1 h. El sobrenadante fue dializado contra agua por 12 h y posteriormente almacenado a 4 °C. El precipitado se resuspendió en una solución de Tris-HCl 100 mM, NaOH 10%, EDTA 10 mM y EGTA 10 mM, pH 7.5. Se dejó en agitación constante por 4 h a 4 °C y se centrifugó a 10 000 g durante 1 h. El sobrenadante se dializó contra agua, y se obtuvieron así las globulinas. El precipitado se resuspendió en etanol al 75% para la extracción de las prolaminas. Se mantuvo en agitación durante 12 h y posteriormente se centrifugó a 10 000 g durante 1 h. El sobrenadante se dializó contra ácido acético al 1%. Finalmente, el precipitado se sometió a una última extracción para obtener las glutelinas al solubilizarlas en una solución de H_3BO_3 50 mM, β -mercaptoetanol al 1% (V/V), dodecil sulfato de sodio (SDS, del inglés *sodium dodecyl sulfate*) al 1% y pH 10. Se dejó en agitación durante 4 h a temperatura ambiente, para después centrifugar a 10 000 g durante 1 h. El sobrenadante se dializó contra agua. Las fracciones proteicas y la harina residual se almacenaron a 4 °C para su posterior caracterización.

Determinación del contenido de nitrógeno en las proteínas de reserva

Una vez obtenidas las cuatro fracciones de proteínas (albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas) y la harina residual, se procedió a cuantificar su contenido proteico mediante el método de Kjeldahl.

Perfiles electroforéticos

La caracterización bioquímica de las proteínas de reserva se realizó mediante la técnica de electroforesis (SDS-PAGE) propuesta por Shagger y Von Jagow [7] en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida al 10%. Se aplicaron 15 μ L de cada fracción proteica por carril y se utilizó una corriente de 20 mA por gel. Después del corrimiento, los geles se fijaron con ácido tricloroacético al 12% y se tiñeron con Azul de Coomassie R-250 en una concentración final de 0.25% (m/V). Para determinar el peso molecular (PM) de las cadenas polipeptídicas, se utilizó como referencia un grupo de proteínas estándares preteñidas (miosina 205 kDa, β -fosforilasa 97 kDa, albúmina de suero bovino 66 kDa, ovoalbúmina 45 kDa, anhidrasa carbónica 29 kDa y α -lactoalbúmina 14 kDa) (de Bio-Rad, California, Estados Unidos).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y se aplicó la prueba de Tukey para realizar la comparación de medias, con $\alpha = 0.05$. Las letras iguales entre dos o más tratamientos indican que no hubo diferencia significativa.

Cultivo de anteras

Colecta y desinfestación de anteras

Las panículas de los híbridos MA92 x Kosi y Kosi x MA92, se colectaron en el campo cuando los granos

4. Sinagawa-García SR, Rascon-Cruz Q, Valdez-Ortiz A, Medina-Godoy S, Escobar-Gutiérrez A, Paredes-López O. Safety Assessment by *in vitro* Digestibility and Allergenicity of Genetically Modified Maize with an Amaranth 11S Globulin. *J Agric Food Chem* 2004;52:2709-14.

5. Nkonge C, Ballance GM. A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination on micro-Kjeldahl digests. *J Agric Food Chem* 1982;30:416-20.

6. Ferreira BR, Franco E, Teixeira RA. Calcium and magnesium-dependent aggregation of legume seed storage proteins. *J Agric Food Chem* 2000; 47:3009-15.

7. Shagger, Von JG. Tricine-sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987;166:368-79.

8. Trejo G, Maldonado AU, Salcedo MG, De Jesús SA, Martínez BB, Rodríguez MM, Jiménez AA. The effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. *Plant Cell Tiss Org Cul* 2002;71:41-6.

de polen se encontraban en estado uninucleado mediotardío [8]. Después se sometieron a un pretratamiento frío a 6 °C durante diez días y se desinfectaron en condiciones asépticas, se colocaron en una solución de NaOCl al 1.2% (V/V) durante 10 min. Posteriormente se enjuagaron con abundante agua destilada estéril.

Inducción de callo embriogénico

Las anteras se extrajeron de la parte media de la panícula [9] y se colocaron en placas de Petri desechables de 60 x 15 mm que contenían el medio de cultivo N6 [10], suplementado con ANA 2.0 mg/L, KIN 1.0 mg/L, glicina 2.0 mg/L, glutamina 500 mg/L, maltosa 5% y agar 8 g/L [11]. Se sembraron 208 anteras del genotipo MA92 x Kosi y 423 de Kosi x MA92. El porcentaje de inducción de callo embriogénico se obtuvo al contar las anteras con callo y dividir ese número entre las anteras sembradas. El resultado se multiplicó por 100. La conversión de las estructuras embriogénicas en plantas se hizo en el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) [12], adicionado con AIA 0.5 mg/L, ANA 0.5 mg/L, KIN 2.0 mg/L, sacarosa 30 g/L y agar 8 g/L [13].

Resultados y discusión

Contenido de proteínas totales

En la tabla 1 se muestran los porcentajes de proteína total obtenidos en las harinas para cada uno de los genotipos de arroz. El contenido de proteína se incrementó de 7.59% en MA92 a 9.67, y 10.77% en los híbridos (generaciones segregantes F2 y F4). Los valores fueron ligeramente superiores cuando el progenitor femenino fue Kosi (japónica). El incremento en el contenido de proteína total podría estar relacionado con alguna diferencia en la información genética de la variedad de arroz de la subespecie japónica.

Determinación del porcentaje de las proteínas de reserva

En la tabla 2 se muestra el porcentaje de las proteínas de reserva (albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas) y la harina residual, obtenidas a partir de harina de los diferentes genotipos de arroz. El genotipo Kosi x MA92 generación F4 presentó los niveles más altos de albúminas, globulinas y prolaminas, así como el menor porcentaje de glutelinas (21.48%). En comparación con la gene-

Tabla 1. Contenido de proteína total en diferentes genotipos de arroz

Genotipo de arroz	Proteína total (%)*
Kosi x MA92 F2	10.77
Kosi x MA 92 F4	10.37
MA92 x KOSI F2	10.64
MA92 x KOSI F4	9.67
Kosi	9.78
MA92	7.59

* Porcentaje N x 5.85, promedio de tres repeticiones

Tabla 2. Porcentaje de proteínas de reserva en cada genotipo

Proteína de reserva	KOSI x MA92 F2 %	KOSI x MA92 F4 %	MA92 x KOSI F2 %	MA92 x KOSI F4 %	KOSI %
Albúminas	11.39 b	14.74 a	6.91 d	8.11c	7.86 c
Globulinas	14.69 c	29.64 a	19.49 b	21.25 b	19.23 b
Prolaminas	17.24 b	25.24 a	16.64 b	17.18 b	15.17 b
Glutelinas	48.89 ab	21.48 c	49.38 a	41.97 b	44.34 b
Harina residual	7.56 cd	7.82 bc	7.38 cd	10.57 a	9.86 ab

Los valores se reportan en porcentaje y representan el promedio de tres repeticiones. Los resultados fueron convertidos a su logaritmo natural (Ln) para el análisis estadístico. Letras iguales indican que no existe diferencia significativa $\alpha=0.05$.

ración segregante F2 del mismo híbrido, este genotipo mostró un incremento de 50.4, 31.7 y 22.7% en el contenido de globulinas, prolaminas y albúminas, respectivamente, mientras que la fracción de glutelinas disminuyó en 56.1%.

Los genotipos MA92 x Kosi y Kosi x MA92 (segregante F2) presentaron el mayor porcentaje de glutelinas (49.38 y 48.89%, respectivamente). Estos resultados demuestran que es factible obtener genotipos de arroz con características genéticas diferentes e incrementar su valor nutricional, lo cual marca la perspectiva de generar estos genotipos diferenciados que puedan ser destinados a nichos especiales de mercado.

Características estructurales de las proteínas de reserva

Los perfiles electroforéticos de globulinas y glutelinas presentan similitudes tanto en el número de subunidades como en los pesos moleculares de los genotipos de arroz estudiados. En la figura 1, se presenta el patrón electroforético de las globulinas para cada genotipo de arroz. El carril con el número 1 corresponde al genotipo Kosi x MA92 generación F4, en el cual las bandas de las globulinas se observan más definidas e intensas en comparación con los otros genotipos. Esto parece indicar que hubo mayor acumulación de esta fracción proteica en ese genotipo. Los pesos moleculares de las subunidades que conforman a las globulinas de los genotipos de arroz fueron similares a los reportados por Fukushima [14]. Las bandas observadas corresponden a pesos mole-

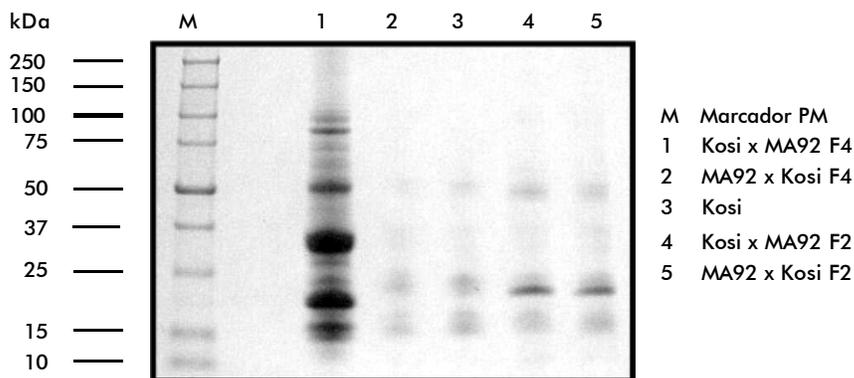


Figura 1. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de globulinas de diferentes genotipos de arroz.

9. Mandal N, Gupta S. Another culture of an interspecific rice hybrid and selection of fine grain type with submergence tolerance. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1997;51:79-82.

10. Chu CC, Wang CC, Sun CS. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin* 1975;28 (5):659-68.

11. Faruque MO, Farzana T, Zeba T, Seraj I, Sarker RH, Khatun AA. Variations in green plant regeneration response from anthers of indica rice and their hybrids with japonica cv. Taipei 309. *Plant Cell Tiss Org Cul* 1998;54:191-5.

12. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 1962;15:473-97.

13. Ventura ZE, Salcedo MG, Hernández LA, Martínez BB, Jiménez AA, Trejo TG, De Jesús SA, Velásquez VM. *In vitro* regeneration and acclimatization of plants of tumeric (*Curcuma longa* L.) in a hydroponic system. *Biotechnol Aplic* 2003; 20(1):25-31.

14. Fukushima D. Structures of plant storage proteins and their functions. *Food Rev Int* 1991;353-81.

culares entre 11 a 112 kDa; las de 20, 27, 55 y 80 kDa estaban en mayor proporción.

El perfil electroforético de la fracción de las glutelinas de los cinco genotipos de arroz reveló pesos moleculares para las subunidades en un intervalo de 13 a 100 kDa (Figura 2); las de 14, 18, 22, 34 y 57 kDa estaban en mayor proporción. En otras variedades de arroz se han reportado pesos moleculares de estas subunidades que son similares [2].

Es importante resaltar que hubo una disminución significativa en la fracción de glutelinas en el genotipo Kosi x MA92 generación F4, cuyo perfil electroforético solo muestra tres bandas de 13, 16 y 21 kDa. También presentó el contenido de globulinas más elevado, con 13 bandas de pesos moleculares entre 13 y 110 kDa.

Inducción de callo embriogénico

El callo obtenido del híbrido Kosi x MA92 fue friable y de color blanco-cremoso. En él se observó la presencia de agregados de aproximadamente 1 mm, de consistencia dura. El callo del híbrido MA92 x Kosi fue similar al anterior en cuanto al tamaño del agregado y a la consistencia, pero de color blanco y de aspecto aterciopelado (Figura 3). Esas características corresponden a las de un callo embriogénico, según lo reportado para otros genotipos de arroz; provenientes de diversos explantes, incluso de anteras [15].

El callo embriogénico se transfirió a un medio de conversión y se desarrollaron estructuras embriogénicas de color verde. Estas estructuras embriogénicas continuaron su desarrollo hasta volverse brotes vigorosos, los cuales fueron transferidos a un medio MS suplementado con ácido indolacético (1.5 mg/L), y bencilaminopurina (0.2 mg/L) donde formaron un sistema radical abundante (Figura 4).

Conclusiones

Los resultados del presente estudio revelaron que en el híbrido de arroz Kosi x MA92 de la generación segregante F4 hubo una disminución significativa (más del 50%) de la fracción de glutelinas y un incremento del contenido de globulinas, prolaminas y albúminas, el cual fue superior en la fracción de globulinas (más del 50%). Esto demuestra la posibilidad de obtener genotipos mejorados de arroz, para elevar su valor nutricional. Estas características bioquímicas pueden ser fijadas en las plantas en un menor tiempo, mediante la técnica de cultivo de anteras, con la cual fue posible regenerar plántulas de los híbridos MA92 x Kosi y Kosi x MA92. La integración de las metodologías de mejoramiento genético tradicional, cultivo de anteras y caracterización bioquímica, posibilita la obtención de variedades diferenciadas de arroz que cubran las necesidades de los consumidores y de la industria, e incrementen, a su vez, las utilidades de los productores de arroz.

Recibido en agosto de 2004. Aprobado en diciembre de 2004.

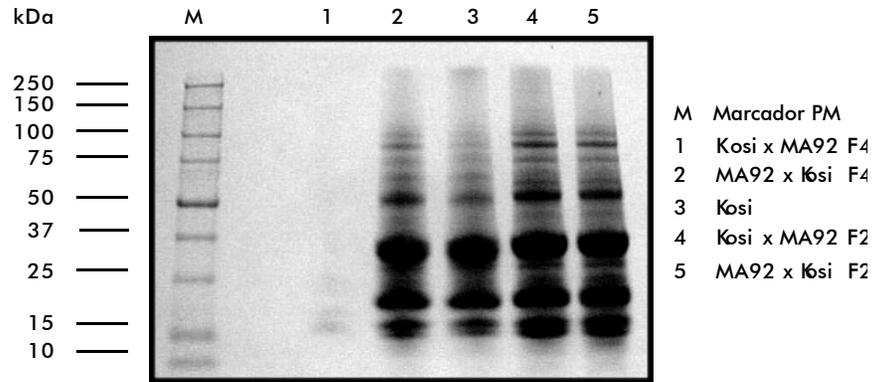


Figura 2. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de glutelinas en diferentes genotipos de arroz.

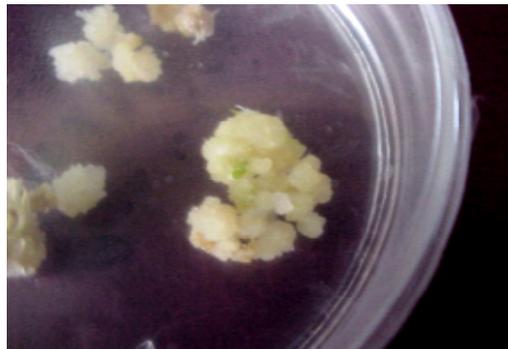


Figura 3. Callo embriogénico obtenido por cultivo de anteras.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó gracias al financiamiento otorgado por la CGPI-IPN a los proyectos "Inducción de embriogénesis somática, en líneas celulares de dos híbridos haploides de arroz (*Oryza sativa* L.)", clave CGPI-20010743 y "Caracterización bioquímica y molecular de variedades de arroz (*O. sativa* L.)", clave 20020758.

15. Oono K. *In vitro* methods applied to rice. In: *Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture*. THA Thorpe (ed.) 1981. p. 273-98.



Figura 4. a) Conversión de estructuras embriogénicas en planta. b) Desarrollo de raíces en brotes obtenidos a partir de reestructuras embriogénicas.