

## Isoenzimas en la Identificación de Híbridos

### Híbridos intraespecíficos e interespecíficos

El uso de las isoenzimas en la identificación de híbridos se basa en la codominancia, una propiedad que las caracteriza y que permite la detección de genotipos heterocigóticos. Por ello, las isoenzimas se usan extensivamente para la detección de híbridos sexuales o somáticos. Es posible que, en híbridos intraespecíficos o interespecíficos, se deba ensayar un número mayor de sistemas enzimáticos para encontrar suficientes isoenzimas que difieran en ambos padres. Esta condición depende, por supuesto, de la variabilidad genética de las especies con que se trabaje. Por ejemplo, si se desea detectar híbridos entre variedades diferentes de tomate (*Lycopersicon esculentum*), una de las pocas enzimas que puede usarse (Figura 37.6) es la alcohol deshidrogenasa (Tanksley y Jones, 1981) ya que la variabilidad respecto a isoenzimas en esta especie es mínima. Por el contrario, si se desea detectar híbridos entre el tomate cultivado y sus especies silvestres, son muchas las enzimas que se pueden usar para este propósito; así por ejemplo, Vallejos y Tanksley (1983) produjeron híbridos entre *L. esculentum* y *L. hirsutum* heterocigotos para 17 loci enzimáticos, mientras que Tanksley et al. (1981) obtuvieron híbridos entre *L. esculentum* y *L. penellii* heterocigotos para 12 loci enzimáticos. Otro ejemplo, también en el género *Lycopersicon*, es la identificación de híbridos somáticos por fusión de protoplastos entre *L. peruvianum* y *L. penellii* partiendo de cinco loci heterocigóticos.<sup>2</sup> En apio (*Apium graveolens*) la variabilidad es muy restringida, y aunque a menudo se observan diferencias entre variedades, el número de alozimas para cada uno de los 10 loci estudiados (Figura 37.1) no es mayor de tres (Orton, 1983). Las diferencias entre el apio y otras umbelíferas son mucho más conspicuas; por ejemplo, Madjarova y Bubarova (1978) identificaron híbridos entre apio y perejil basados en zimogramas de peroxidasas. Estudios hechos en este laboratorio indican que ambas especies se caracterizan por alozimas diferentes para ocho enzimas que fueron ensayadas.<sup>3</sup>

En las coles (*Brassica oleracea*) la variabilidad dentro de las diferentes variedades hortícolas (brócoli, coliflor, repollo y otras) y entre ellas es muy extensa y permite la identificación de híbridos (Figuras 37.3 y 37.7) de manera rutinaria (Arús et al., 1982). Muchas casas productoras de semillas

2. Información sin publicar (Adams y Quirós).

3. Información sin publicar (Quirós).

usan isoenzimas para determinar el porcentaje de contaminación, con líneas parentales, de variedades híbridas  $F_1$ . Esta técnica puede servir también para identificar las líneas parentales de los híbridos registrados.

En especies tetraploides, como la alfalfa (*Medicago sativa*) y la papa (*Solanum tuberosum*), también es posible identificar híbridos pero empleando geles más complejos, debido a la posibilidad de encontrar plantas tetraalélicas, es decir, heterocigóticas para cuatro alelos en un mismo locus (Figura 37.4). Estas especies se encuentran también como diploides, lo que ha facilitado el estudio de la herencia de varias isoenzimas a este nivel<sup>4</sup> que es mucho menos complejo (Quirós y Morgan, 1981). Además, se han investigado otras especies diploides relacionadas con estos dos cultivos. Por ejemplo, en las especies anuales *Medicago turbinata* y *M. truncatula* los híbridos interespecíficos fueron detectados (Figura 37.2) mediante las isoenzimas de leucina-amino peptidasa (Quirós y Ostafichuk, 1983).

Estos ejemplos indican que el número de sistemas disponibles para el investigador es muy grande, y que fácilmente se hallan suficientes diferencias especialmente en los híbridos interespecíficos.

### Híbridos intergenéricos

Es más probable encontrar diferencias enzimáticas entre las especies parentales que forman parte de estos híbridos, los cuales se obtienen casi exclusivamente mediante fusiones de células somáticas. Lo Schiavo et al. (1983) resumen varios casos en los que se han identificado híbridos somáticos entre géneros y especies diferentes (Cuadro 37.2). La interpretación de los zimogramas de estos híbridos es con frecuencia difícil por la falta de integración entre los genomios de las especies parentales, o por la eliminación preferencial de cromosomas de una de las especies. Hay casos en que no se forman heterodímeros o bandas híbridas, quizás por la falta de homología entre los polipéptidos de ambas especies. Otra dificultad de la interpretación puede ser la presencia de bandas inesperadas relacionadas con los genotipos de los padres, sobre todo cuando se analiza tejido proveniente de callos; este fenómeno puede deberse a la expresión de genes que son activos en el callo pero no lo son en los tejidos normales de la planta. Por ejemplo, en papa y en alfalfa, los zimogramas de peroxidasa observados en callos son bastante diferentes de aquellos observados en las raíces de las plantas que los originaron (Figuras 37.9 y 37.10). En estos

4. Información sin publicar (Quirós y McHale).

Cuadro 37.2. Enzimas usadas para la identificación de híbridos intergenéricos obtenidos por fusión somática.

Especies hibridadas	Enzimas indicadoras
<i>Nicotiana glauca</i> + <i>Glycine max</i>	aspartato-amino transferasa alcohol deshidrogenasa
<i>Petunia hybrida</i> + <i>Parthenocysus tricuspidata</i>	peroxidasa
<i>Daucus carota</i> + <i>Petroselinum hortense</i>	esterasa, glutamato-oxalacetato transaminasa, 6-glucosa-fosfato deshidrogenasa
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Lycopersicon esculentum</i>	Proteína, fracción I
<i>Arabidopsis thaliana</i> + <i>Brassica campestris</i>	esterasa, peroxidasa, alcohol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa

FUENTE: Lo Schiavo et al., 1983.

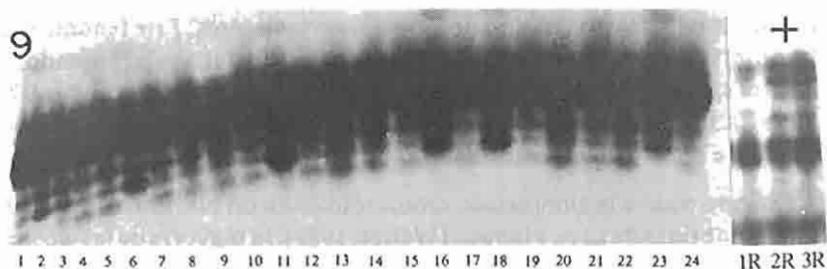


Figura 37.9. Zimogramas de la peroxidasa obtenidos de callos provenientes de una planta de papa. Los callos de las líneas 2, 6, 11, 16, 18 y 23 han perdido la banda de menor migración, por variación somaclonal inducida por el cultivo de estos tejidos durante un período extenso. Las tres últimas líneas representan los zimogramas de la planta madre obtenidos de raíces, como referencia para mostrar las diferencias de expresión genética entre ambos tejidos.

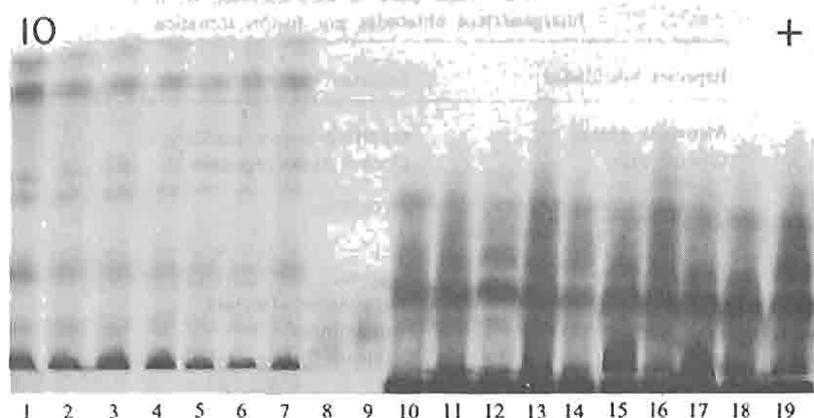


Figura 37.10. Zimogramas de la peroxidasa en alfalfa. Las siete primeras líneas, contando desde la izquierda, corresponden a raíces de plantas con el mismo fenotipo. Las líneas 10 a 19 corresponden a callos obtenidos de una de estas plantas. Son visibles las diferencias de expresión en ambos tejidos.

casos es indispensable usar, como testigos, callos obtenidos de las plantas parentales. Además, cuando los tejidos han pasado por varios ciclos de cultivo, sufren con frecuencia aberraciones cromosómicas y mutaciones que en conjunto se conocen como variación somaclonal; estas alteraciones pueden modificar el genotipo de las plantas resultantes. Este fenómeno se ha observado en apio (Orton, 1983), en papa<sup>5</sup> y en alfalfa<sup>6</sup> y ha causado, en los tres casos, la pérdida de expresión de algunas alozimas. La Figura 37.9 muestra un ejemplo de este fenómeno en callos de papa obtenidos partiendo de protoplastos de mesófilo.

Cuando ocurre la eliminación cromosómica en un híbrido, como en las células híbridas de soya y tabaco (Wetter, 1977), la mayoría de las isoenzimas de estas células son la expresión del genoma de aquel padre del cual se conservan los cromosomas; en el ejemplo citado, los cromosomas de la soya permanecen, pero los del tabaco son eliminados. El fenotipo del producto resultante de esta fusión se acercó mucho al de la soya, y tenía muy pocas isoenzimas del tabaco, que también fueron eliminadas con el trascurso del tiempo. Después de ocho meses de cultivo, de la línea híbrida se obtenían los zimogramas típicos de la soya.

5. Quirós y Jayne. Información sin publicar.

6. Quirós y Schipper. Información sin publicar.

En híbridos obtenidos entre especies taxonómicamente tan diferentes como las mencionadas antes se recomienda ensayar el mayor número posible de enzimas, dando preferencia a las monoméricas, para evitar confusiones debidas a la ausencia de heterodímeros en casos de discordancia genética. Siempre se deben incluir en el mismo gel las plantas parentales, como testigos, obteniendo las muestras de un mismo tejido; así se podrá determinar con precisión el fenotipo de los híbridos para facilitar su identificación.

## Otras Aplicaciones de las Isoenzimas

Muchos usos se pueden dar a las isoenzimas como marcadores genéticos: así como identifican híbridos, también detectan individuos homocigóticos, una aplicación inmediata en programas dirigidos a la obtención de haploides. Si se parte de plantas heterocigóticas respecto a varios loci de isoenzimas, los haploides que se originen o los diploides doblados a partir de tejidos haploides serán hemicigotos y homocigotos, respectivamente; éstos se expresarán en el gel como fenotipos de una sola banda enzimática. Este procedimiento ha sido usado por Munyón y Tanksley (1984) en *Capsicum* sp.

Las isoenzimas también se usan para identificar poliploides cuando se cruzan plantas de genotipos diferentes. Por ejemplo, si se obtienen tetraploides a partir de una planta diploide que es heterocigótica para cierto locus enzimático, y ésta se cruza luego con individuos diploides que son homocigóticos para un tercer alelo en ese locus, los triploides resultantes se manifestarán mediante un fenotipo trialélico.

El hallazgo de ligamiento entre isoenzimas y genes que gobiernan características cuantitativas ha permitido estimar el número de genes e interacciones genéticas que determinan esas características. Rick (1983) presenta varios ejemplos de esta aplicación en el tomate.

Rick (1983) resume otros usos de las isoenzimas en plantas, tomando como modelo el tomate. Por ejemplo, la selección de plantas resistentes a nematodos se hace partiendo de la enzima fosfatasa ácida: la alozima Aps-1<sup>1</sup> está ligada al gen Mi que confiere resistencia a *Meloidogyne incognita*, de modo que no es necesario inocular las plantas para seleccionar los fenotipos resistentes; basta con muestrear los tejidos de las hojas y obtener sus zimogramas de fosfatasa ácida. Otro ligamiento muy útil se ha encontrado en el tomate entre el locus de peroxidasa, Prx-2, y el gen *ms-10* que confiere esterilidad masculina; en este caso los fenotipos de peroxidasa

son el criterio para detectar, antes de la floración, plantas homocigóticas o heterocigóticas para esterilidad masculina.

Las isoenzimas se usan también para determinar porcentajes de polinización cruzada prácticamente en cualquier cultivo; dado que caracteres como ése (isoenzimas) no afectan la morfología de las plantas, éstas no sufren discriminación por parte de los insectos polinizadores.

Esta técnica puede tener muchas otras aplicaciones que estarían limitadas sólo por la imaginación del investigador. En este capítulo no se mencionan los estudios en que se han empleado estos marcadores genéticos para estudiar la dinámica de poblaciones y la evolución en muchas especies de plantas, porque tales trabajos son muy extensos.

## **Nuevas Técnicas para Desarrollar Marcadores Genéticos**

La nueva técnica de los fragmentos de restricción de ADN prueba ser aún más eficaz que la de las isoenzimas, ya que los marcadores genéticos se identifican a nivel del ADN, antes de la transcripción y traducción de éste. En algunos casos, la expresión de estos genes sufre modificaciones posttranscripcionales en el proceso, que pueden confundir la lectura de los geles. En otras circunstancias, la expresión de las isoenzimas varía en los diferentes órganos de las plantas, lo que no ocurre con los fragmentos de restricción.

Cuando esta técnica emplea ADN del núcleo celular, equivale a la técnica de las isoenzimas pero con las ventajas ya descritas. Si además se practica con el ADN de cloroplastos y mitocondrias, se puede obtener información precisa sobre la constitución citoplasmática de los híbridos que resultan de las fusiones somáticas. Esta técnica es muy valiosa; sin embargo, es mucho más laboriosa, más costosa, y requiere el manejo de isótopos radioactivos. Beckmann y Soller (1983) consideran el potencial de los fragmentos de restricción del ADN como técnica aplicable a la fitotecnia.

## **Referencias**

- Arús, P.; Tanksley, S. D.; Orton, T. J. y Jones, R. A. 1982. Electrophoretic variation as a tool for determining seed purity and for breeding hybrid varieties of *Brassica oleracea*. *Euphytica* 31:417-428.

- Beckmann, J. S. y Soller, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: Methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67:35-43.
- Cardy, B. J.; Stuber, C. W. y Goodman, M. M. 1981. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). Institute of Statistics. Mimeo Series No. 1317. North Carolina State University, Raleigh, NC, E.U.
- Gottlieb, L. D. 1971. Gel electrophoresis: A new approach to the study of evolution. *BioSci.* 21:939-944.
- Hunter, R. L. y Markert, C. L. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125:1294-1295.
- Lo Schiavo, F.; Mela, L.; Nuti Ronchi, V. y Terzi, M. 1980. Electrophoretic mobility of isozymes from different plant species and its possible use in identifying cell hybrids. *Plant Sci. Lett.* 18:45-55.
- ; Giuliano, G. y Terzi, M. 1983. Identifying natural and parasexual hybrids. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A.* Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 305-312.
- Madjarova, D. J. y Bubarova, M. G. 1978. New forms obtained by hybridization of *Apium graveolens* and *Petroselinum hortense*. *Acta Horticulturae* 73:65-72.
- Markert, C. L. y Moller, F. 1959. Multiple form of enzymes: Tissue ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 45:753-763.
- McMillin, D. E. 1983. Plant isozymes: A historical perspective. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A.* Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 3-13.
- Munyón, I. P. y Tanksley, S. D. 1984. Spontaneous and induced variation in diploid and haploid peppers (*Capsicum annum* L.). *HortSci.* 19:545.
- Orton, T. J. 1983. Celery and celeriac (*Apium graveolens* L.). En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part B.* Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 351-367.
- Pearce, L. C. y Brewbaker, J. L. 1973. Applications of isozyme analysis in horticultural science. *HortSci.* 8:17-22.
- Prakash, S.; Lewontin, R. C. y Hubby, J. L. 1969. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations; IV: Patterns of genetic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 61:841-858.
- Quirós, C. F. 1975. Exine pattern of a hybrid between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennellii*. *J. Hered.* 66:45-47.

- . 1981. Starch gel electrophoresis technique used with alfalfa and other *Medicago* species. *Can. J. Plant Sci.* 61:745-749.
- . 1983. Alfalfa, Luzerna. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part B.* Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 253-294.
- y Morgan, K. 1981. Peroxidase and leucine-aminopeptidase in diploid *Medicago* species closely related to alfalfa: Multiple gene loci, multiple allelism and linkage. *Theor. Appl. Genet.* 60:221-228.
- y Ostafichuk, L. 1983. Allozymes and genetic variability in *Medicago turbinata*, *M. truncatula*, and their hybrids. *Can. J. Genet. Cytol.* 25: 286-291.
- Rick, C. M. 1960. Hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennellii*: Phylogenetic and cytogenetic significance. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 46:78-82.
- . 1983. Tomato. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part B.* Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 147-165.
- ; Tanksley, S. D. y Fobes, J. F. 1979. A pseudoduplication in *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 76:3435-3439.
- Shields, C. R.; Orton, T. J. y Stuber, C. W. 1983. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A.* Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 443-468.
- Smithies, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels. *Biochem. J.* 61-629.
- Tanksley, S. D. 1979. An efficient and economical design for starch gel electrophoresis. *Rept. Tomato Genet. Coop.* 29:37-38.
- y Jones, R. A. 1981. Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing for the genetic purity of F<sub>1</sub> hybrids of tomato. *HortSci.* 16:179-180.
- ; Medina-Filho, H. y Rick, C. M. 1981. The effect of isozyme selection on metric characters in an interspecific backcross of tomato: Basis for an early screening procedure. *Theor. Appl. Genet.* 60:291-296.
- Vallejos, C. E. 1983. Enzyme activity staining. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A.* Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 469-516.
- y Tanksley, S. D. 1983. Segregation of isozyme markers and cold tolerance in an interspecific backcross of tomato. *Theor. Appl. Genet.* 66:241-247.
- Wetter, L. R. 1977. Isozyme patterns in soybean-*Nicotiana* somatic hybrid cell lines. *Molec. Gen. Genet.* 150:231-235.