

Capítulo 37

Isoenzimas como marcadores genéticos para identificar híbridos en el cultivo de tejidos

C. F. Quirós*

Agradecimientos

El autor agradece a Raquel Quirós y a Osvaldo Ochoa por la asistencia prestada en la revisión del manuscrito.

* Department of Vegetable Crops, University of California, Davis, California, E. U.

Introducción

En el trascurso de las investigaciones dirigidas a la obtención de híbridos, ya sea sexuales o somáticos, es indispensable la presentación de pruebas concluyentes de que el producto obtenido es en realidad un híbrido. En muchos casos, esta prueba se basa en criterios morfológicos, cuando las características de ambos padres son conspicuamente diferentes y permiten su identificación en el híbrido resultante. Por ejemplo, los híbridos obtenidos entre las dos especies de tomate *Lycopersicon esculentum* y *L. pennellii* pueden distinguirse debido a características intermedias evidentes en las hojas, las flores y el polen, y además por la heterosis (Rick, 1960; Quirós, 1975). En otros casos, las características morfológicas no son lo suficientemente diferentes como para permitir esta identificación de manera definitiva; un caso especialmente crítico son los híbridos somáticos, que se obtienen mediante el cultivo de tejidos.

El cultivo de células y tejidos produce con frecuencia mutaciones y aberraciones cromosómicas (ver Capítulos 8 y 13) que modifican en muchos casos el fenotipo de los individuos resultantes, y dan pie a confusión en la identificación precisa y definitiva de los híbridos. En los últimos años se ha hecho énfasis en la obtención de isoenzimas como marcadores genéticos no sólo para el estudio genético de las especies sino para aplicarlos a muchos aspectos de la investigación básica; una de estas aplicaciones es la identificación de híbridos intraespecíficos e interespecíficos.

Isoenzimas como Marcadores Genéticos

Conceptos básicos

El descubrimiento de las isoenzimas ha favorecido la creación de marcadores genéticos más eficientes que los morfológicos ya que, por lo general, permiten distinguir genotipos homocigóticos de los heterocigóticos; en otras palabras, permiten igualar el fenotipo de un individuo con su respectivo genotipo. Antes del advenimiento de esta técnica, la variación genética en una especie o en una población se hacía partiendo de la identificación de mutantes recesivos, los cuales en el estado homocigótico resultan en fenotipos aberrantes. Sin embargo, estos últimos son raros, ya que la mayor parte de las características morfológicas son cuantitativas y, por tanto, están gobernadas por varios pares de genes cuya expresión está afectada por el ambiente.

La simplicidad de la técnica utilizada para detectar isoenzimas, denominada electroforesis, ha hecho posible su uso y aplicación en la investigación genética de un gran número de especies vegetales. McMillin (1983) presenta una perspectiva histórica del desarrollo de las isoenzimas. Los principales eventos que marcaron el uso de esta técnica fueron el desarrollo de la electroforesis de almidón por Smithies (1955) y la demostración de que las isoenzimas pueden visualizarse en los geles por medio de tintes histoquímicos (Hunter y Markert, 1957). Estos dos últimos autores propusieron el término 'zimograma' para denominar el patrón de bandas enzimáticas en los geles. El término isoenzima (o isozima) fue propuesto por Markert y Moller (1959) para designar diferentes formas moleculares de enzimas que catalizan un mismo sustrato.

Gottlieb (1971) y Peirce y Brewbaker (1973) presentan un resumen de los conocimientos necesarios para usar las isoenzimas como marcadores genéticos, así como otras aplicaciones de éstas. El uso de las isoenzimas se basa en la existencia de la heterogeneidad enzimática en las plantas; este fenómeno se evidencia cuando las enzimas —según sus cargas eléctricas y por medio de la electroforesis— se separan en sus diferentes formas moleculares. Este efecto permite estudiar la variabilidad genética existente entre individuos a nivel de enzimas o de proteínas. La diferencia de cargas eléctricas entre una enzima y otra es el resultado de cambios en su estructura molecular que pueden consistir, en casos muy sencillos, en simples sustituciones de aminoácidos en la estructura primaria o, en casos más complejos, en que sea diferente el número de polipéptidos que forman parte de cada enzima (cadenas de aminoácidos). Esta variación corresponde, generalmente, a diferencias en la secuencia del genoma, lo que permite caracterizar la variación a nivel molecular.

Aunque las isoenzimas catalizan el mismo sustrato, pueden ser molecularmente muy diferentes porque, por lo regular, son sintetizadas por genes distintos que despliegan su actividad en diferentes tejidos. Además, es posible encontrar variación en las isoenzimas producidas por el mismo gen cuando éstas representan la expresión de alelos diferentes; esta variación alélica es más tenue y casi siempre es efecto de sustituciones simples de uno o pocos aminoácidos. Prakash et al. (1969) acuñaron el término 'aloenzima' ('alozima') para describir las isoenzimas producidas por alelos diferentes del mismo gen.

La técnica de la electroforesis consiste en situar un extracto proteico obtenido del tejido de una planta en un medio de soporte —ya sea un papel de celulosa, o un gel hecho de almidón de papa, de poliacrilamida o de agarosa— y someterlo a un campo eléctrico durante varias horas; el campo

hace que las diferentes isoenzimas migren en el medio según sus cargas eléctricas. Después de esta operación, el gel se incuba en una solución que contenga tanto el sustrato sobre el que actúa la enzima que se desea separar, como los cofactores necesarios más un tinte que se acople al producto de la reacción. Las isoenzimas se visualizan como bandas de color que aparecen en el gel.

Para usar las isoenzimas eficazmente como marcadores genéticos es necesario establecer claramente cuántos pares de genes las determinan, la modalidad de herencia, y su tipo de estructura molecular, es decir, si están formadas por un polipéptido (monoméricas), por dos (diméricas), o por más de dos. Estos estudios se hacen mediante pruebas de progenie y cruzamientos entre individuos de fenotipos diferentes caracterizados por zimogramas distintos. En general, las alozimas de los loci isoenzimáticos segregan monogénicamente; sin embargo, en ocasiones, las segregaciones pueden estar distorsionadas por modificaciones postrascricpcionales a las que están sujetas algunas enzimas, ya sea por genes modificadores o por artificios de la extracción (Rick et al., 1979). Peirce y Brewbaker (1973) informan sobre tres patrones de bandas básicos que se ajustan al tipo de segregación de las isoenzimas, y que se describen a continuación:

Bandas rápidas y bandas lentas. Este tipo de variación genética en el patrón de bandas es típico de las enzimas monoméricas; en el caso más simple, la proteína que expresa cada alelo de un locus dado se aprecia como una banda que se caracteriza porque tiene una distancia de migración fija en el gel (se asume que la electroforesis se lleva a cabo siempre bajo las mismas condiciones). Si se tiene un individuo heterocigótico, su fenotipo se expresa como un zimograma constituido por dos bandas (una rápida y otra lenta) que representan el genotipo del individuo; la expresión simultánea de ambos alelos en un locus se denomina codominancia. La progenie resultante de la autofecundación de un individuo heterocigótico segregará conforme a la razón mendeliana 1:2:1, donde 1 corresponde a los dos genotipos homocigóticos y 2 al genotipo parental heterocigótico. La codominancia es otra de las grandes ventajas de las isoenzimas que permite la detección de genotipos híbridos (Figuras 37.1, 37.2 y 37.3).

Es muy común la presencia de alelos múltiples en loci enzimáticos. Por ejemplo, en *Lycopersicon* spp. se han reportado 22 alozimas para el locus Adh-1 (Rick, 1983) y en alfalfa (Quirós, 1983) 9 alozimas para el locus Prx-1 (Figura 37.4). En casos más complejos, un alelo puede expresarse como dos bandas o como un grupo de varias bandas, siendo éste el caso de la mayor parte de las peroxidases en el tomate (Rick et al., 1979) o de las

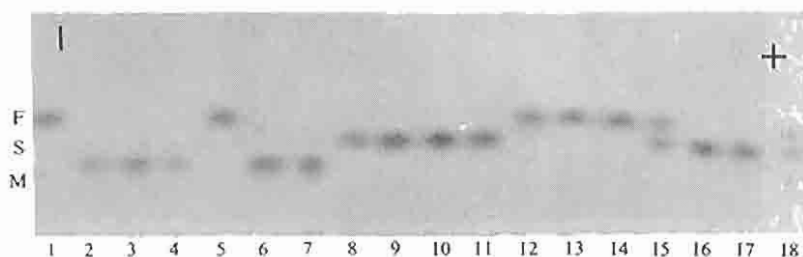


Figura 37.1. Fenotipos de apio para la enzima fosfoglucomutasa, locus Pgm-2. Los individuos en las líneas 15 y 18, contando desde la izquierda, son heterocigóticos para los alelos Pgm-2^F y Pgm-2^M. Las enzimas gobernadas por este locus son monoméricas, ya que los fenotipos heterocigóticos no muestran una banda híbrida de migración intermedia. Los demás individuos son homocigóticos para los tres alelos que se encuentran en el apio. La alozima de menor migración corresponde al alelo Pgm-2^S.

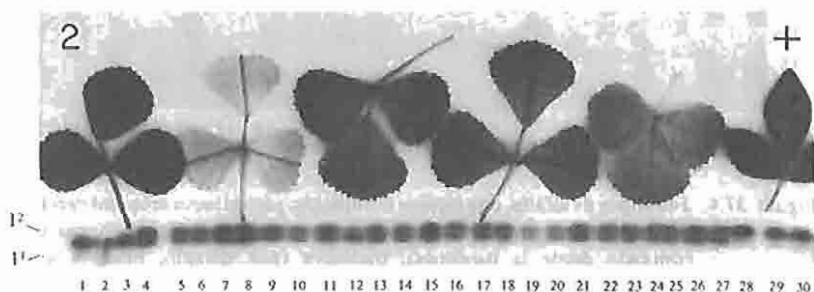


Figura 37.2. Híbridos entre *Medicago turbinata* y *M. truncatula* determinados por el locus monomérico Lap¹-I, origen de la enzima leucina-aminopeptidasa. Los tres primeros individuos, contando desde la izquierda, corresponden a la primera especie, y son homocigóticos para el alelo Lap¹-I¹; los tres últimos individuos corresponden a la segunda especie, siendo homocigóticos para el alelo Lap¹-I². Los demás son híbridos entre ambas especies, y heterocigotos para ambos alelos.

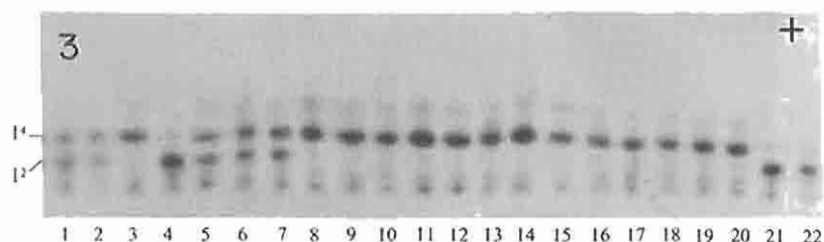


Figura 37.3. Fenotipos de brócoli para el locus monomérico Lap-I. Los individuos en las líneas 1, 2, 5, 6, y 7, contando desde la izquierda, son heterocigóticos para las alozimas Lap-I² y Lap-I⁴; los individuos en las líneas 4, 21 y 22 son homocigóticos para el último alelo. Las demás plantas son homocigóticas para el primer alelo. Nótese que los fenotipos homocigóticos para ambos alelos muestran una banda secundaria o 'sombra' en la parte superior, que es la de mayor migración; también se observa esta banda en los híbridos. Las bandas más tenues debajo de la alozima Lap-I⁴ parecen corresponder a un segundo locus; su herencia aún no ha sido estudiada.

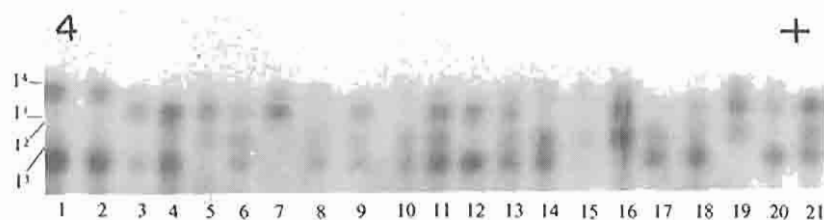


Figura 37.4. Fenotipos de alfalfa, una especie tetraploide, para el locus monomérico Prx-1. En este gel se aprecian individuos heterocigóticos dialélicos (líneas 1 a 5, contando desde la izquierda), trialélicos (por ejemplo, líneas 6 y 9) y tetraalélicos (líneas 11 y 13). Ellos forman parte de la progenie resultante de la autofecundación de una planta tetraalélica.

malatodeshidrogenasas en la papa.¹ Estas bandas no segregan en las progenies de los individuos que las poseen; siempre se transmiten como un solo grupo (Figura 37.5), lo que puede deberse a posibles duplicaciones

1. Quirós y McHale. Información sin publicar.

genéticas porque están tan cerca la una de la otra en el cromosoma que no sufren recombinación. Otra explicación posible de que un alelo se exprese como un grupo de bandas es que la isoenzima sufre una modificación postrascricional o postraduccional que resulta en 'sombras' o bandas secundarias.

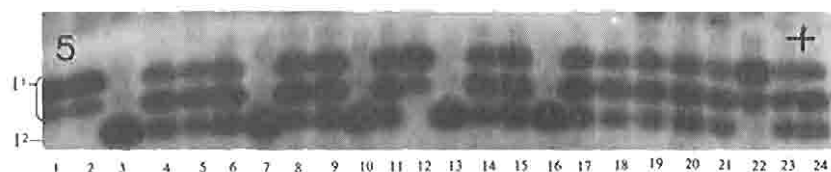


Figura 37.5. Fenotipos de la papa diploide *Solanum phureja* que segrega respecto a las alozimas del locus dimérico Mdh-I, origen de la enzima malato-deshidrogenasa. Individuos homocigóticos para el alelo Mdh-1¹ (por ejemplo, las líneas 1 y 2 contando desde la izquierda) están caracterizados por dos bandas, de las cuales la inferior es una banda 'sombra' cuyo origen se desconoce; en cambio, los homocigóticos para el alelo Mdh-1² sólo muestran una banda (por ejemplo, las líneas 3 y 7). Los heterocigóticos muestran tres bandas, y es difícil saber si la banda intermedia es la 'sombra' de la alozima 1¹ o si es una banda híbrida (heterodímero). Sin embargo, la mayor intensidad de la banda intermedia indica que ésta es un heterodímero resultante de la combinación de los polipéptidos producidos por ambos alelos.

Bandas híbridas. Estas bandas se presentan como genotipos heterocigóticos respecto a enzimas de estructura polimérica, es decir, aquellas conformadas por más de una cadena de polipéptidos. En el caso más simple, es decir, el de un individuo heterocigótico para una enzima dimérica y cuyos alelos producen polipéptidos diferentes, estos últimos, además de combinarse entre sí para formar alozimas de tipo parental, se combinan también entre ellos para formar una isoenzima híbrida, que migrará a una posición intermedia entre las dos isoenzimas parentales (Figuras 37.6 y 37.7). La progenie resultante de la autofecundación de este individuo también segregará en la proporción mendeliana 1:2:1.

Alelos nulos. Estos alelos, que son raros, determinan la ausencia de bandas en el gel; el fenómeno puede deberse a polipéptidos defectuosos incapaces de desarrollar actividad enzimática, o a genes represores que actúan sobre loci enzimáticos causando la inactividad de algunos alelos.

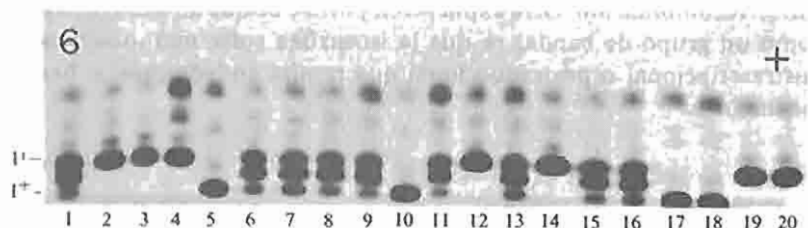


Figura 37.6. Zimogramas del tomate para el locus dimérico *Adh-1*, origen de la enzima alcohol-deshidrogenasa. Los individuos que representan fenotipos con tres bandas son heterocigóticos para los alelos *Adh-1⁺* y *Adh-1⁻* (por ejemplo, las líneas 1, y 6 a 9 contando desde la izquierda).

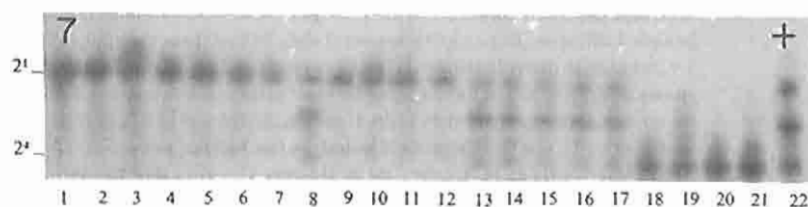


Figura 37.7. Zimogramas del brócoli para el locus dimérico *Pgm-2*. Los individuos heterocigóticos para los alelos *Pgm-2⁺* y *Pgm-2⁻*, caracterizados por tres bandas, se muestran en las líneas 8, 13 a 17, y 22, contando desde la izquierda. En este caso se pueden apreciar también bandas 'sombas' producidas por cada alelo, que se hacen evidentes en los híbridos como bandas tenues entre las tres bandas principales de mayor intensidad.

Los alelos nulos se comportan como recesivos, lo que impide detectar individuos heterocigóticos (Figura 37.8); por tanto, un individuo heterocigótico para un alelo nulo, al ser autofecundado, segregará según la razón mendeliana 3:1, 3 para presencia y 1 para ausencia de la alozima (en el recesivo homocigótico). En este caso no se puede igualar el genotipo con el fenotipo, ya que los genotipos homocigóticos dominantes y los heterocigóticos tendrán el mismo fenotipo. Cuando la concentración de la muestra es baja, no se observan bandas en el gel, resultado que se confunde con un fenotipo nulo; en estos casos, es recomendable repetir el ensayo con muestras más concentradas.

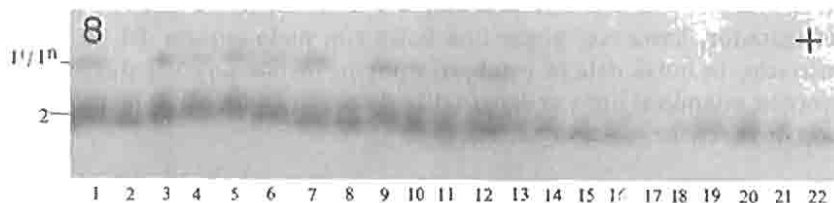


Figura 37.8. Zimogramas de la alfalfa correspondientes a plantas homocigóticas respecto al alelo nulo $Lap-1^N$ (líneas 2, 8, y 13 a 22, contando desde la izquierda). Los demás individuos en este gel son homocigóticos para el alelo $Lap-1^1$ o heterocigóticos para ambos alelos. La banda inferior, de migración lenta, corresponde a un segundo locus, $Lap-2$.

Electroforesis horizontal en geles de almidón

Esta es la técnica más versátil, económica y práctica para el estudio de las isoenzimas en plantas y, por tanto, la que se tratará en este capítulo. La resolución de la mayoría de las isoenzimas obtenidas con esta técnica es bastante buena; para algunas enzimas, es mejor aún que en geles de poliacrilamida. La gran ventaja de los geles de almidón es que se cortan en tajadas, cada una de las cuales se puede ensayar en un sistema enzimático diferente; otra de sus ventajas es que en ellos se pueden analizar extractos sin purificar, y una tercera, la inocuidad del almidón porque no posee toxicidad alguna. Los recursos necesarios para desarrollar esta técnica son mínimos; en su mayor parte, el equipo puede construirlo el mismo investigador.

El sistema consta básicamente de los siguientes elementos:

- Un molde para formar el gel.
- Dos depósitos (reservorios), uno en cada extremo del molde, para contener la solución tampón (o 'bófer'); cada depósito está provisto de un electrodo: uno de ellos es el polo positivo o ánodo y el otro el polo negativo o cátodo, en el sistema.
- Dos toallas, esponjas, o cualquier otro material absorbente para poner en contacto la solución tampón con el gel.
- Una unidad de corriente continua, como fuente de poder, capaz de producir 40 vatios (400 voltios, 100 mA).

El gel y los depósitos se colocan en un refrigerador para llevar a cabo la electroforesis a una temperatura de 2 a 5 °C. Si no se dispone de un refrigerador, basta con poner una bolsa con hielo encima del gel para enfriarlo; la bolsa deberá cambiarse por lo menos una vez durante el proceso, cuando el hielo se derrita. El gel se enfría para evitar la inactivación de las enzimas por el calor.

Los moldes para vaciar los geles son diferentes en uno u otro laboratorio, y su tamaño depende básicamente del número de muestras que se quieren ensayar en cada gel. El grosor de los geles se determina por número de tajadas que se desea obtener de cada uno o, en otras palabras, por el número de sistemas enzimáticos que se quiera ensayar; por lo regular tienen de 6 a 9 mm porque las tajadas que se obtienen son de aproximadamente 1.5 mm. Tanksley (1979), Cardy et al. (1981), Quirós (1981), y Shields et al. (1983) presentan en forma detallada varios diseños para la construcción del equipo de electroforesis en almidón.

Las recetas de geles son también muy variadas, y su elección depende de la especie y de las enzimas que se estudian. La combinación de geles de tris-citrato (pH 7.8) e histidina (pH 5.7) es muy versátil, y se recomienda usarlos primero para ensayar especies que no hayan sido estudiadas antes. Las recetas para prepararlos, así como las soluciones tampones para los depósitos, se muestran en el Cuadro 37.1.

Quirós (1981) describe el procedimiento para la preparación de geles que puede resumirse en las siguientes líneas. Se prepara el volumen necesario de solución tampón según el número de geles que se desee procesar; cada gel tiene, normalmente, un volumen aproximado de 250 ml. Luego se disuelve el almidón en 1/3 de la solución tampón, usando un Erlenmeyer de filtración al vacío (con salida lateral) y con ayuda de un agitador magnético; mientras tanto, se calientan los 2/3 restantes de la solución en un frasco volumétrico hasta el punto de ebullición, y en ese momento se extrae el agitador magnético. Empleando guantes aislantes del calor, se sostiene el Erlenmeyer por el cuello mientras que con la otra mano se introduce el cuello del frasco volumétrico que contiene la solución caliente, invirtiéndolo completamente; durante la maniobra, ambos frascos se mueven rotatoriamente.

La suspensión caliente de almidón se pone en la hornilla durante unos segundos hasta que empiece a hervir; se retira entonces del calor y se cierra el recipiente con un tapón de caucho. La salida lateral del Erlenmeyer que contiene el almidón se conecta a una línea de vacío y se procede a extraer el aire de la suspensión, hasta que las burbujas pequeñas desaparezcan, lo

Cuadro 37.1. Composición de las soluciones tampón para preparar tres tipos de geles, y las enzimas que se ensayan en ellos.

Gel	Depósito (solución)	Enzimas ^a
Base Trizma 0.05M Acido cítrico monohídrico 0.004M	Acido bórico 0.3M; ajustar a pH 7.8 con NaOH 1M	PRX, LAP, EST, ADH, CAT, END, GOT, GDH, FGM
L-histidina 0.065M Acido cítrico monohídrico 0.02M, pH 5.7	L-histidina 0.009M Acido cítrico monohídrico 0.003M (dilución 1:6 de la solución usada en el gel), pH 5.7	MDH, 6-FGD, LAP, FAC, FGI, PRX, SDH
Acido bórico 0.19M Hidróxido de litio 0.04M, pH 8.3	9 partes de (Base Trizma 0.05M, ácido cítrico monohídrico 0.007M, pH 8.3) por 1 parte de la solución usada en el gel	DIA, FAL AAT, PRX GDH, END

a. PRX = peroxidasa, LAP = leucina-amino peptidasa, EST = esterasa; ADH = alcohol deshidrogenasa, CAT = catalasa, END = endopeptidasa; GOT = glutamato-oxalacetato transaminasa, GDH = glutamato deshidrogenasa; FGM = fosfoglucomutasa, MDH = malato deshidrogenasa; FAC = fosfatasa ácida, FAL = fosfatasa alcalina, FGI = fosfoglucoisomerasa; DIA = diaforasa, AAT = aspartato-amino transferasa; 6-FGD = 6-glucosa-fosfato deshidrogenasa, SDH = shikimato deshidrogenasa.

FUENTE: Shields et al., 1983.

que toma menos de un minuto. El tapón debe ser suficientemente grande para que la fuerza de succión no lo arrastre por el cuello del Erlenmeyer. Una vez terminada esta operación, se retira el tapón y se vacía el almidón en los moldes, llenándolos hasta el tope; luego se cubren con una plancha limpia de vidrio, haciendo presión hasta que, al rebosar el almidón, queden bien sellados y no se sequen. Los geles se pueden preparar desde el día anterior y se pueden dejar a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

La concentración de almidón en el gel es otro factor importante; si ésta es muy baja, el tiempo de electroforesis es menor, pero las bandas tienden a difundirse y las tajadas serán demasiado frágiles para manipularlas; generalmente se usa una concentración de 10% a 12%. Cuando se usan los geles de tris-citrato, se coloca una solución tampón de ácido bórico en las cubetas que produce un frente de migración de borato de una coloración marrón; éste avanza en el gel a medida que el tiempo de electroforesis progresa, y sirve de indicador para fijar el momento en que termina el

proceso. Cuando el frente llega a 2 cm del extremo del gel, donde está el ánodo, se desconecta la fuente de poder, y el gel se corta y se ensaya. En los geles de histidina, en cambio, no se ve frente alguno, siendo necesario insertar un papel filtro, como los usados para insertar las muestras, que contiene una solución de azul bromofenol de 0.5 mg/ml. Con ambos tipos de geles la electroforesis dura entre 4 y 5 horas.

Para cortar el gel, se usa una sierra de calar modificada en que se sustituye la hoja aserrada por una cuerda de acero del calibre más fino, como las que se usan en las guitarras. Se puede usar también un trozo de cuerda de nylon para pescar, que se enrolla en los dedos índice de cada mano y se pasa cuidadosamente de un extremo a otro del gel. Para obtener tajadas de igual espesor, es necesario poner a ambos lados del gel unas guías de determinado grosor donde descansa el instrumento cortante; las guías se hacen con varillas de vidrio, o con listones de plástico.

Para la electroforesis de almidón no es necesario purificar las muestras de tejido. Basta con macerar en un mortero el tejido con una gota de solución tampón tris-HCl 0.5 M, pH 7.0, que contenga 1% de glutatión como agente reductor. El líquido resultante se absorbe en un trozo de papel filtro Whatman no. 3 de 10 x 3 mm aproximadamente. Para introducir las muestras en el gel, éste se corta transversalmente a unos 4 cm del extremo que será conectado al cátodo. Los papeles filtro se insertan en el corte cada 3 mm, aproximadamente, se cierra el corte, se colocan las toallas haciendo contacto en cada extremo del gel con las cubetas respectivas, y se activa la fuente de poder a un voltaje inicial de 150 V, durante 10 min. Esta operación resulta en la transferencia de las proteínas de los papeles filtro al gel. Se desconecta la fuente de poder y se retiran los papeles de filtro con la ayuda de unas pinzas; se vuelve a cerrar el corte en el gel, y se procede a hacer la electroforesis a 300 V.

Se ensaya rutinariamente la misma muestra en dos geles a un mismo tiempo, porque se obtiene la máxima información cuando se identifica el mayor número posible de enzimas. Se preparan, por tanto, dos de los papeles filtro antes descritos por cada individuo que se muestree; uno de los papeles va a un gel de tris-citrato y el otro a un gel de histidina. Por ejemplo, para *Brassica* sp., en el primer gel se ensayan peroxidasa anódica, fosfoglucomutasa, glutamato-oxaloacetato transaminasa y esterasa, mientras que en el de histidina se ensayan leucina-amino peptidasa, fosfoglucoisomerasa, fosfatasa ácida y malato deshidrogenasa. Los procedimientos de ensayo para estas enzimas, y para muchas otras más, han sido recopiladas por Vallejos (1983).