

ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGIA PARA EL ANALISIS
ELECTROFORETICO DE ISOENZIMAS Y ESTUDIO DE LAS RELACIONES
ENTRE 5 RAZAS DE Bactris gasipaes Kunth.

TESIS SOMETIDA A LA CONSIDERACION DE LA COMISION DEL PROGRAMA
DE ESTUDIOS DE POSGRADO EN BIOLOGIA PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE

SONIA MARIA ROJAS VARGAS

Ciudad Universitaria " Rodrigo Facio" Costa Rica

1993

A DIOS MI MEJOR AMIGO

A MI PADRE MI PRIMER MAESTRO

A CARLOS CON TODO MI AMOR, Y

A MIS MAESTROS POR SUS ENSEÑANZAS...

Agradezco al Dr. Jorge Mora-Urpí el conocimiento otorgado sobre el pejibaye, el acceso a los materiales del Banco de Germoplasma, el aporte de reactivos y todos los sabios consejos que me brindó. Gracias por ser una persona que siempre apoyó mis iniciativas de trabajo con entusiasmo, permitiéndome realizar esta investigación con libertad de ideas. También hago extensiva mi gratitud al equipo de trabajo del proyecto de pejibaye en Guápiles, especialmente a Gregorio Ramírez y Carlos Arroyo quienes facilitaron la recolección de muestras.

Mi gratitud a Jorge Arce quien me abrió las puertas del laboratorio de electroforesis de CATIE, y me introdujo en el uso de la técnica de electroforesis de isoenzimas.

Mi agradecimiento profundo a la Dra. Pilar Ramírez por el conocimiento teórico-práctico aportado sobre electroforesis y el estudio de genomas de plantas, por facilitarme el uso de las instalaciones del CIBCM, sus equipos y reactivos químicos que permitieron la realización exitosa de esta investigación. Muchas gracias por darme una mano cuando más la necesitaba, por sus valiosos consejos, por estimar el trabajo de cada estudiante de manera tan positiva y por ser una forjadora de nuevos investigadores en la Universidad de Costa Rica.

Mi sincera gratitud : A Ramiro Barrantes y equipo de trabajo en INISA por el aporte desinteresado de reactivos químicos y comentarios prácticos.

 A Rafael Aguilar y Gina Durán por sus horas de trabajo y dedicación. A mis amigos Edgar Bolaños, Lisela Moreira y Ethel Sánchez por su colaboración generosa con la toma, revelado e impresión fotográfica. A M. Valdéz y Dr. Jorge León por sus consejos; a Federico Albertazzi, William Villalobos y Helena Molina por su colaboración desinteresada y su amistad.

 Al Dr. Daniel Crawford y Dr. Claire Lannaud por su asesoría en la evaluación de zimogramas.

 Mi agradecimiento para mi esposo, por su apoyo, paciencia y comprensión y para todos mis amigos y amigas que de una u otra manera me brindaron una mano o una palabra de aliento para llevar adelante mi investigación a pesar de todos los problemas propios del tercer mundo...

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae.

Dr. Jorge Mora Urpi.
Director de tesis.

Jorge Mora Urpi

Dra. Pilar Ramírez Fonseca.
Miembro comité de tesis.

Pilar Ramírez Fonseca

Dr. Jorge León Arguedas.
Miembro comité de tesis.

Jorge León Arguedas

Dra. Julieta Carranza Velázquez.
Directora SEP Biología.

Julieta Carranza Velázquez

Dr. Luis Camacho Naranjo.
Decano.

Luis Camacho Naranjo

Sistema Estudios de Posgrado.

Sonia María Rojas Vargas.
Candidata

Sonia María Rojas Vargas

INDICE

| | | |
|--------------------|-------|------|
| Presentación | _____ | i |
| Dedicatoria | _____ | ii |
| Agradecimientos | _____ | iii |
| Aprobación | _____ | v |
| Indice | _____ | vi |
| Resumen | _____ | vii |
| Lista Cuadros | _____ | viii |
| Lista Figuras | _____ | ix |
| Abreviaturas | _____ | xi |
| Prefacio | _____ | xii |
| Capítulo primero | _____ | xiii |
| INTRODUCCION | _____ | 1 |
| MATERIAL Y METODOS | _____ | 15 |
| RESULTADOS | _____ | 24 |
| DISCUSION | _____ | 57 |
| CONCLUSIONES | _____ | 66 |
| REFERENCIAS | _____ | 69 |
| APENDICES | _____ | 76 |

RESUMEN

Se estandarizó un sistema de análisis electroforético en geles de poliacrilamida, para la evaluación de isoenzimas polimórficas en Bactris gasipaes. Se estudiaron las siguientes enzimas: ADH, GOT, ME, G6PDH, PRX, EST, DIA, ACP, MDH, SOD, PGI, PGM en 5 tejidos con 5 razas de pejibaye provenientes de Brasil, Costa Rica, Panamá, Bolivia y Perú.

Por ser los tejidos de pejibaye muy fibrosos, el proceso de hogeneización de la muestra resultó laborioso. Se maceró 1.5 g de muestra en morteros preenfriados con solución de extracción fosfato 0.1 M pH 7.5 (Modificación Baaziz & Saaidi 1988), se centrifugaron por 20 minutos a 15,000 g a 4°C; el tejido que dió mejor resultado fue la hoja y la mejor temperatura de almacenamiento fue -70 °C. Para cada enzima se encontraron diferentes condiciones de concentración del gel, solución tampón del tanque y carga por pozo. Las enzimas G6PDH, PRX, PGI, PGM mostraron alta resolución; ADH y GOT no funcionaron con el sistema de análisis electroforético y de revelado estandarizado en este estudio. Se observó polimorfismo en el 80% de las enzimas estudiadas. En el análisis de conglomerados se establecieron relaciones de grupo entre las razas de Costa Rica y Panamá, las razas de Brasil y Bolivia, mientras la raza de Perú se ubicó independientemente.

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Lista de razas según procedencia y ubicación en el banco de germoplasma en Guápiles, C.R. _____ 16

CUADRO 2. Métodos de electroforesis obtenidos para 10 enzimas con extractos foliares de pejíbaye. _____ 30

CUADRO 3. Actividad, resolución y polimorfismo obtenido con 12 enzimas con extractos de hoja de pejíbaye. _____ 33

CUADRO 4. Evaluación de zimogramas isoenzimáticos obtenidos con extractos de hoja de pejíbaye _____ 37

LISTA DE FIGURAS.

| | |
|---|----|
| Fig. 1. Mapa de distribución actual del pejibaye en América Tropical. | 3 |
| Fig. 2A. Zimograma sintético PRX | 36 |
| B. Zimograma gel 1 revelado con PRX | 36 |
| Fig. 3A. Zimograma sintético EST | 38 |
| B. Zimograma gel 2 revelado con EST | 38 |
| Fig. 4A. Zimograma sintético ACP | 40 |
| B. Zimograma gel 1 revelado con ACP | 40 |
| Fig. 5A. Zimograma sintético DIA | 42 |
| B. Zimograma gel 1 revelado con DIA | 42 |
| Fig. 6A. Zimograma sintético MDH | 43 |
| B. Zimograma gel 3 revelado con MDH | 43 |
| Fig. 7A. Zimograma sintético G6PDH | 45 |
| B. Zimograma gel 3 revelado con G6PDH | 45 |
| Fig. 8A. Zimograma sintético PGI | 47 |
| B. Zimograma gel 3 revelado con PGI | 47 |
| Fig. 9A. Zimograma sintético SOD | 48 |
| B. Zimograma gel 2 revelado con SOD | 48 |
| Fig. 10A. Zimograma sintético PGM | 50 |
| B. Zimograma gel 2 revelado con PGM | 50 |

| | |
|---|----|
| Fig. 11. Relaciones de similitud fenotípica con PRX entre las 5 razas de pejibaye estudiadas | 51 |
| Fig. 12. Relaciones de similitud fenotípica con EST entre las 5 razas de pejibaye estudiadas | 52 |
| Fig. 13. Relaciones de similitud fenotípica con ACP entre las 5 razas de pejibaye estudiadas | 52 |
| Fig. 14. Relaciones de similitud fenotípica con G6PDH entre las 5 razas de pejibaye estudiadas | 53 |
| Fig. 15. Relaciones de similitud fenotípica con MDH entre las 5 razas de pejibaye estudiadas | 53 |
| Fig. 16. Relaciones de similitud fenotípica con DIA entre las 5 razas de pejibaye estudiadas | 54 |
| Fig. 17. Relaciones de similitud fenotípica con PGI entre las 5 razas de pejibaye estudiadas | 54 |
| Fig. 18. Relaciones de similitud fenotípica con SOD entre las 5 razas de pejibaye estudiadas | 55 |
| Fig. 19. Relaciones de similitud fenotípica con PGM entre las 5 razas de pejibaye estudiadas | 55 |
| Fig. 20. Relaciones de similitud fenotípica entre las 5 razas de pejibaye establecida con base en el total de isoenzimas estudiadas | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| BSA | = Albumina suero de bovino |
| DTT | = DL- ditioneitol |
| DMSO | = Dimetil sulfoxido |
| G6PDH | = Glucosa 6- fosfato deshidrogenasa |
| NAD | = Nicotinamida adenina dinucleotido |
| NADP | = Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato |
| NADH | = Nicotinamida adenina dinucleotido (reducida) |
| MTT | = 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio-bromuro) |
| MgCl ₂ | = Cloruro de magnesio |
| PMS | = Fenacina metasulfato. |
| PVP-40 | = Polivinil pirrolidona |
| Triton X 100 | = detergente aniónico |
| TEMED | = N,N,N'- tetrametilenodiamina |
| BO | = Bolivia |
| BR | = Brasil |
| CR | = Costa Rica |
| PA | = Panamá |
| PE | = Perú |
| kg | = gravedades |

PREFACIO

La presente tesis para optar al grado de Magister Scientiae está escrita en capítulos divididos según las normas del reglamento de tesis del Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica.

El capítulo primero fue escrito de acuerdo con el formato de publicación empleado por la Revista de Biología Tropical de la Universidad de Costa Rica.

CAPITULO PRIMERO

El pejibaye, cachipay o pijibay (Bactris (Guilielma) gasipaes Kunth.) pertenece a la Familia Palmas o, Arecaceae y parece ser el único grupo de palmas domesticadas de América con potencial económico (Lleras & Coradin 1983). Es una planta que ha tenido gran relevancia para diversas civilizaciones precolombinas del Trópico Húmedo Americano, ya que constituyó uno de los alimentos básicos de su dieta y para algunos representaba un símbolo religioso (Mora- Urpí 1984).

De esta palmera se emplea actualmente el fruto y el palmito. El fruto de pejibaye es rico en vitamina A, almidones, aceites insaturados y proteínas y se utiliza para el consumo humano y animal (Blanco et al 1990; Cooz 1984; Murillo et al 1983). El palmito o corazón de palmera se obtiene de la sección apical del tallo y la base de las hojas embrionarias. Posee un alto contenido de fibra y constituye un platillo de "gourmets" de amplia aceptación en el mercado nacional e internacional (Mora - Urpí 1990; Amaya et al 1984).

Hoy en día, Costa Rica cuenta con el mayor banco de germoplasma de pejibaye en el mundo. Para explotar la riqueza de los recursos genéticos disponibles en el banco de germoplasma de Bactris gasipaes, se requiere desarrollar marcadores bioquímicos y moleculares que permitan un análisis genético completo de este banco, como complemento de aquellos marcadores morfológicos tradicionalmente utilizados.

1.1 DISTRIBUCION.

El pejibaye es una planta propia del Trópico Húmedo Americano; se encuentra desde el nivel del mar hasta los 1000 msnm y se distribuye de manera natural de Darién en Panamá hasta la Provincia de Santa Cruz en Bolivia y el Estado de Rondonia y posiblemente Matto Grosso en Brasil. Su aparición natural más al norte de Centro América aún no ha sido confirmada, aunque se le cultiva desde hace posiblemente varios milenios hasta el Noreste de Honduras (Fig. 1) (Mora-Urpí 1992).

Los límites de esta distribución están marcados por varios aspectos: 1 - los extremos de las rutas migratorias de aquellos indígenas que practicaron su cultivo; 2 - una precipitación menor de 2500 mm anuales; 3 - períodos estacionales secos mayores de 3 meses; 4 - temperaturas anuales menores de 24°C para las poblaciones naturales y 20°C para aquellas cultivadas; 5 - y por zonas pantanosas (Mora-Urpí 1984; Camacho 1976).

La distribución natural de las semillas es llevada a cabo a cortas distancias por aves, roedores y otros mamíferos y quizá sean transportadas a distancias un poco mayores por el agua (Mora-Urpí 1992).

El pejibaye parece adaptarse a una amplia gama de condiciones ecológicas dentro de la zona tropical (Camacho 1976). En Costa Rica las principales áreas de producción del cultivo de pejibaye son San Isidro del General, Buenos Aires,



Fig 1. DISTRIBUCION ACTUAL DE *Bactris gasipaes* EN AMERICA TROPICAL. FUENTE: Mora - Urpí, 1993. En prensa.

La Cuesta, Upala, Guápiles, Tucurrique y Horquetas (Mora-Urpí 1990; Arroyo 1990).

1.2 ORIGEN Y DOMESTICACION

El origen del pejibaye ha sido un tema controversial. Varios autores han propuesto diversas teorías sobre el origen de esta especie, por ejemplo: Bates (1962) y Wallace (1853) comentan que el pejibaye no es originario del Amazonas.

Vavilov (1951) propone la región de Los Andes como el centro de origen de esta especie; Prance (1982) señala que es el Amazonas y que la expansión hacia Centroamérica se dió en la época precolombina a través de los Andes.

Moore (1973) sugiere que el Noroeste de Sur América pudo haber sido el centro de origen de las Palmas y que el pejibaye obedeció ese patrón de distribución, y que luego la especie se extendió a lo largo de las faldas de los Andes de Bolivia a Panamá.

LLeras y Coradin (1983), proponen que Bactris gasipaes muestra 3 regiones de especiación : 1 - Región Atlántica Norte y Suroeste de Costa Rica - Noroeste de Panamá; 2 - límite Oeste del Amazonas, Venezuela, Sur de Colombia, Noroeste de Perú y Ecuador y 3 - Delta del Amazonas.

Mora - Urpí (1992) sugiere que el pejibaye es una planta nativa de una extensa región del Trópico Húmedo Americano, que

fue domesticada por diversas tribus a partir de varias especies silvestres; su posterior difusión indujo hibridaciones que contribuyeron al aumento de su diversidad. El pejibaye cultivado se considera una " especie sintética", cuyo origen obedece a un producto de selección artificial e hibridación entre razas o especies hermanas (Mora-Urpí 1984).

1.4 TAXONOMIA

Las palmeras son un grupo taxonómico poco conocido y entre aquellas cultivadas las de crecimiento cespitoso como el pejibaye requieren mayor investigación (Mora - Urpí 1992).

Dada la gran diversidad morfológica que presenta, el pejibaye se convierte en una planta de clasificación taxonómica difícil.

Los pejibayes se han clasificado bajo dos nombres genéricos Bactris Jacquin y Guilielma Martius. La descripción de pejibaye como Bactris, se basó en un grupo de plantas encontradas en la ribera del río Magdalena en Colombia (Mora-Urpí 1984). Posteriormente, en 1824 Martius lo describe bajo Guilielma, basado en una muestra encontrada en Maranhao, Brasil (Mora-Urpí 1984).

La controversia taxonómica persiste y algunos autores reúnen todas las especies descritas bajo el género Bactris (Glassman 1972; Mora - Urpí & Clement 1981). Tomlinson (1961)

los considera géneros diferentes con base en que las especies de Bactris examinadas poseen fibras esclerenquimáticas largas que se ramifican en la lámina mientras que en Guilielma no se presentan.

Se han descrito 239 especies dentro del género Bactris, de las cuales 14 se sitúan dentro de Guilielma. Sin embargo, algunas de las especies referidas como Guilielma posiblemente son sinónimos, por ejemplo utilis, gasipaes y speciosa; y otras no deben incluirse en este taxón (Mora-Urpí 1984).

Por lo tanto, mientras no se tenga un criterio de clasificación o nomenclatura coherente, se emplea el término " raza " en sustitución de variedad o subespecie. Donde el término raza designa aquellas poblaciones o grupos de poblaciones que presentan similitudes morfológicas, las cuales comparten una región geográfica y poseen un origen común (Mora-Urpí 1984).

Las poblaciones de pejibayes cultivadas en la región Noroccidental de los Andes, de Ecuador y Colombia, así como en Panamá, Costa Rica y Nicaragua se conocen como **Razas Occidentales**; y aquellas que crecen en la región oriental de los Andes y cuenca amazónica se conocen como las **Razas Orientales o Amazónicas** (Mora-Urpí 1984).

Esta diferenciación racial se inicia con los diferentes orígenes de las poblaciones y se acentúa posteriormente por el proceso evolutivo natural primero y luego con la participación

humana (Mora-Urpí 1984).

El estudio de la diversidad es de suma importancia para el mejoramiento genético de esta palmera, de aquí la necesidad de emplear nuevos enfoques que faciliten su estudio. Una de las herramientas que responde a esta necesidad es la electroforesis de isoenzimas.

2. ANALISIS ELECTROFORETICO DE ISOENZIMAS

2.1 ELECTROFORESIS

La electroforesis de proteínas se ha convertido en una poderosa herramienta de investigación en múltiples disciplinas de la biología, entre ellas son de nuestro interés la sistemática, la evolución y la genética (Wendel et al 1989). La técnica se basa en el hecho de que las moléculas de proteína poseen carga eléctrica, y por tanto son capaces de moverse cuando se colocan en un campo eléctrico (Hames y Rickwood 1987). La separación, dirección y velocidad de migración electroforética de estas proteínas depende de : 1 - su carga eléctrica, tamaño y forma; 2 - del medio de soporte y 3 - cantidad de corriente eléctrica a través del campo de separación (Hames y Rickwood 1987).

La separación de mezclas complejas de enzimas puede ser llevada a cabo en los siguientes medios de soporte, poliacrilamida, almidón, agarosa y acetato de celulosa. Los dos

últimos medios poseen poco poder de resolución, por esta razón no se usan en estudios de polimorfismo; mientras que los de almidón y poliacrilamida son medios inertes con la propiedad de regular el tamaño del poro en el gel y obtener un mejor tamizaje de las moléculas (Hames & Rickwood 1987; Harris & Hopkinson 1976; Wendel & Weenden 1989).

En investigaciones que se requieren altos poderes de resolución, se usa electroforesis de poliacrilamida (PAGE). La poliacrilamida es un polímero sintético a partir del monómero acrilamida; la polimerización es realizada por la adición de persulfato de amonio o riboflavina y temed. El temed cataliza la formación de radicales libres a partir del persulfato y éste a su vez inicia la polimerización (Hames & Rickwood 1987). Su propiedad más valiosa es su capacidad de tamizaje, pues es posible variar las concentraciones de acrilamida ampliamente.

Otras ventajas son la uniformidad del gel, transparencia, resolución, estabilidad en un amplio rango de pH, temperatura, fuerza iónica; además, sus componentes inertes permiten gran variedad de ensayos, aunado a la ventaja de que la proteína se concentra en una zona angosta y definida en el gel espaciador y disminuye la difusión de la muestra (Hames & Rickwood 1987, Harris & Hopkinson 1976). Por estas razones se consideró más conveniente el gel de poliacrilamida para realizar el proceso de estandarización electroforética en pejibaye.

En PAGE se pueden analizar exitosamente una amplia gama de

tejidos de plantas. La elección apropiada depende de los objetivos del estudio y de la disponibilidad de material (Wendel 1989). Usualmente el tejido vegetativo es el más usado por la facilidad de colectarlo, tales como hojas, peciolo, tallos, porciones terminales de raíces, plántulas e incluso muestras de herbario, etc. Otros tejidos ensayados con esta técnica son semilla y polen (Wendel & Weeden 1989; Stuber et al 1983; Weeden & Gottlieb 1980; Torres et al 1974).

Los tejidos ensayados en PAGE deben tener la misma condición fisiológica y ontogénica, pues se sabe que el espectro de enzimas varía con el tipo de tejido y estado fisiológico (Kay & Basile 1987; Tanksley 1983; Tyson et al 1985). Para obtener los extractos de enzimas en PAGE no se requieren procesos elaborados de purificación o de concentración de las proteínas.

Los tejidos se homogeneizan con soluciones amortiguadoras, la solución adecuada requiere pruebas empíricas de extracción, por lo que el trabajo es laborioso y puede consumir mucho tiempo (Kelley & Adams 1977; Pitel & Cheliak 1984; Soltis & Soltis 1980).

Cada una de estas labores corresponden a las necesidades del taxón y tipo de tejido, pues cada uno posee un grupo de problemas por considerar, por ejemplo, dificultad en el rompimiento celular, interferencia de fenoles, taninos, fenoloxidasas, proteinasas y otros constituyentes celulares que interfieren con la actividad óptima de las enzimas y que

generan artificios en los geles (Loomis 1974; Anderson 1968).

Para resolver estos problemas se utilizan una serie de aditivos en la solución de extracción, algunos de estos son el PVP, BSA, DIECA, 2-Mercaptoetanol, ditiotreitól, sacarosa, glicerol, Tritón X-100 y Tween-80 (Loomis 1974; Anderson & Beardall 1990; Anderson 1968; King 1971; Wendel & Weeden 1989; Pitel & Cheliak 1985).

Luego de que los extractos son corridos por electroforesis, las enzimas son reveladas "in situ" de manera específica. El proceso de revelado permite localizar la posición relativa de la enzima en el gel, y se basa en la producción de un precipitado cromogénico no difundible en el sitio de actividad de la enzima, como producto de una reacción o un conjunto de reacciones físicas o químicas (Vallejos 1983).

Los productos de reacción pueden ser detectados mediante los siguientes sistemas :

a - mecanismo de detección primaria: uno de los productos es visible debido a la adquisición de una propiedad física o química;

b - acoplamiento químico: un producto primario no es detectable, se debe agregar otro reactivo que al reaccionar forma un complejo con uno de los productos, este segundo producto si es visible;

c - acoplamiento enzimático: se usa cuando en la reacción ninguno de los productos puede acoplarse químicamente de manera

inmediata, pero si es transformado al agregar al medio enzimas específicas, a veces requiere 2 o 3 pasos enzimáticos para obtener un producto cromogénico no difundible;

d - mecanismo de acoplamiento de las oxidoreductasas: el producto reducido es por lo general NADP(H), el cual causa reducción no enzimática de otro reactivo y cambia sus propiedades (sales de tetrazolio) y produce un precipitado cromogénico no difundible llamado formazán.

Con estos mecanismos de revelado se obtienen dos tipos de tinción, conocidas como tinción negativa (SOD) y tinción positiva (ADH, GOT, PRX, MDH, DIA, EST, PGI, PGM, ME) (Vallejos 1983).

La zona discreta de bandas o de actividad enzimática obtenida se designa zimograma. Aquellas bandas que presentan fuerte actividad se denominan bandas características y corresponden a los alelos, bandas de intensidad débil o presencia irregular se conocen como isoenzimas secundarias, éstas son el resultado de modificaciones post-transcripcionales de los genes (Ghuesquiere 1983; Hussain *et al* 1988; Gottlieb 1977; Crawford 1989; Bennanceur *et al* 1991).

La electroforesis es la técnica más conveniente para separar isoenzimas porque el equipo es simple, la matriz es inerte, se requieren pequeñas cantidades de tejido y se lleva a cabo en períodos muy cortos comparados con los sistemas de evaluación genéticos tradicionales (Simpson & Whitters 1986;

Hussain, Ramírez & Roca 1989). Otras ventajas son que se analizan muchos individuos a la vez, se estudian muchos loci y se trabaja con materiales jóvenes, o sea que no es necesario esperar a que la planta alcance su madurez para evaluarla (Weeden 1989).

2.2 ISOENZIMAS

Las isoenzimas son marcadores bioquímicos de gran importancia en el estudio de la variabilidad genética de muchas plantas de interés económico. El término isoenzima fue acuñado por Market y Moller en 1959 y se definen como formas moleculares múltiples de una enzima que aparecen en un miembro individual, o en un determinado número de miembros de una especie. Todas tienen la misma función catalítica, pero difieren en su cinética y en su carga eléctrica, por lo que es posible separarlas en un campo eléctrico (Ramírez & Roca 1989; Gottlieb 1983; Scandalios 1969; Weeden 1989; Hussain, Bushuk, Ramírez & Roca 1988).

Las isoenzimas son el producto primario de la expresión génica (Harris & Hopkinson 1976; Hussain, Bushuk, Ramírez & Roca 1988). Son el producto de cambios en la secuencia del ADN, originados por mutaciones génicas que causan sustitución, delección o adición de aminoácidos dentro de la estructura de una enzima y estos cambios afectan la migración

electroforética, condición que permite el uso de las isoenzimas como marcadores genéticos (Simpson & Withers 1986).

Las isoenzimas se consideran excelentes marcadores porque tienen una base genética simple, se heredan en forma mendeliana, su expresión es codominante, y sus propiedades catalíticas (fenotipo) se visualizan mediante un patrón de bandas y con este patrón se puede determinar el polimorfismo que posee la especie (Kohn, Zera & Hall 1983).

Las isoenzimas presentan varios orígenes: pueden ser producto de genes múltiples que codifican diferentes cadenas polipeptídicas, o producto de alelismo múltiple, donde un solo locus determina versiones estructuralmente distintas de una cadena polipeptídica, también se piensa que son formadas mediante modificaciones en la traducción o que son producto de isomerismo conformacional (Harris & Hopkinson 1976).

Su estudio permite caracterizar la colección de un banco de germoplasma, **detectar** duplicaciones en las introducciones, conocer la estructura de las poblaciones a través de las frecuencias génicas, establecer relaciones filogenéticas y evolutivas, detectar híbridos en cruces normales y distantes y además detectar características de interés agronómico ligadas a estos marcadores isoenzimáticos (Weeden 1989).

Pocos estudios sobre isoenzimas se han realizado en palmeras (Baaziz & Saaidi 1988; Bennaceur et al 1991; Ghesquiere 1984, 1985; Ghesquiere et al 1987; Santos 1990; Santos & Mestriner 1989; Torres & Tiserat 1980) y ningún estudio se ha llevado a

cabo específicamente en Bactris gasipaes.

Puesto que esta palmera posee un gran potencial económico, se consideró de vital importancia llevar a cabo el presente estudio.

El objetivo de esta investigación consistió en establecer un sistema de análisis electroforético en geles de poliacrilamida en pejibaye Bactris gasipaes Kunth, que permitiera el análisis de isoenzimas y la determinación de su potencial polimórfico con el fin de establecer relaciones fenotípicas entre las 5 razas estudiadas

MATERIAL Y METODOS

1. FUENTE DEL MATERIAL VEGETAL.

1.1. Selección de la muestra. El presente estudio se llevó a cabo con materiales del banco de germoplasma de pejibaye (Bactris gasipaes Kunth.) ubicado en la Estación Experimental "Los Diamantes" del Ministerio de Agricultura y Ganadería, Guápiles, provincia de Limón, Costa Rica. Se seleccionaron 5 razas de pejibaye: Chapare (Bolivia), Belem (Brasil), Guápiles (Costa Rica), Darién (Panamá) y Yurimaguas (Perú) (Cuadro 1).

Mediante un programa de números aleatorios, se eligieron 5 árboles con hijos laterales de cada raza. De cada árbol se obtuvo tejido de hojas, raíces adventicias, inflorescencias, frutos maduros y espinas.

1.2. Recolección de las muestras. El tejido recolectado en el campo se introdujo individualmente en cámaras húmedas, que inmediatamente se colocaron en hielo, para evitar la acción de las proteasas durante el transporte del material al laboratorio. Las muestras se mantuvieron a 4°C antes de preparar los extractos (Loomis 1974).

CUADRO 1. Lista de las razas según su procedencia y ubicación en el banco de germoplasma de pejibaye, Guápiles, Costa Rica.

| RAZA | PROCEDENCIA | CODIGO * |
|------------|-------------|-------------|
| Yurimaguas | Perú | A-P15-A2. |
| Yurimaguas | Perú | A-P30-A2. |
| Yurimaguas | Perú | A-P71-A2. |
| Yurimaguas | Perú | A-P44-A5. |
| Yurimaguas | Perú | A-P57-A9. |
| Belem | Brasil | C-P419-A5. |
| Belem | Brasil | C-P418-A5. |
| Belem | Brasil | C-P434-A7. |
| Belem | Brasil | C-P436-A6. |
| Belem | Brasil | C-P449-A9. |
| Chapare | Bolivia | E-P1121-A9. |
| Chapare | Bolivia | E-P1137-A6. |
| Chapare | Bolivia | E-P1139-A5. |
| Chapare | Bolivia | E-P1138-A9. |
| Chapare | Bolivia | E-P1144-A2. |
| Darién | Panamá | L-P6046-A2. |
| Darién | Panamá | L-P6041-A1. |
| Darién | Panamá | L-P6043-A5. |
| Darién | Panamá | L-P6060-A2. |
| Darién | Panamá | L-P6061-A8. |
| Guápiles | Costa Rica | Z-P5004-A2. |
| Guápiles | Costa Rica | Z-P5006-A1. |
| Guápiles | Costa Rica | Z-P5007-A3. |
| Guápiles | Costa Rica | A-P7800-A7. |
| Guápiles | Costa Rica | Z-P5001-A1. |

* CODIGO = Sección - # de parcela - # de árbol.

2. PREPARACION DE LA MUESTRA.

2.1. Homogeneización de la muestra y extracción de proteínas.

Cada tejido fue lavado con agua destilada y secado con papel absorbente para eliminar posibles contaminantes en la muestra. En una balanza analítica " Sartorius 2842 " Alemania, se pesaron 2, 1.5, 1 y 0.5 g de cada tejido por muestra, estos fueron posteriormente homogeneizados mediante 4 métodos:

1. tejido macerado manualmente en morteros y pistilos preenfriados, a su vez los morteros se colocaron sobre un baño de hielo;
2. tejido macerado con nitrógeno líquido en morteros preenfriados por 30 minutos a $- 20^{\circ}\text{C}$;
3. sistema de homogeneización Sorvall Omnimixer (Norwalk, CT);
4. mini sistema de homogenización Wheaton (0.1 ml);

Los protocolos de las soluciones de extracción ensayados con sus respectivas relaciones volumen : cantidad de muestra fueron los siguientes :

- A. 0.1M tris HCl pH 7.5 , 10mM DL-ditriothreitol (DTT), 0.1% (v/v) tritón X-100, 10% sacarosa, 5% (w/v) PVP-40.

La relación volumen : cantidad de muestra fue de 3:1 (Jarret & Litz 1986);

- B. 0.05M buffer fosfato pH 7.0, 1.5% BSA, 12% PVP-40 (w/w) 0.1M 2-mercaptoetanol. La relación entre volumen de solución de extracción y la muestra fue de 2:1 (Baaziz &

Saaidi 1988);

C. Agua destilada, la relación del volumen y cantidad de muestra fue de 10:1 (Azofeifa 1990).

Después de una completa homogeneización de los tejidos con la solución de extracción, las muestras fueron filtradas con fragmentos de gasa (Macaya 1990). Se recolectó el extracto resultante en tubos de 1.5 ml (Eppendorf) y se procedió a centrifugarlos.

2.2. Clarificación de la muestra por centrifugación. Se ensayaron diferentes combinaciones de tiempo y velocidad de centrifugación, con temperatura constante a 4°C ; el proceso se realizó en una microcentrífuga con refrigeración " modelo Himac CR 15T", Hitachi (Japón).

Se evaluaron tiempos de centrifugación de 5, 10, 15, 20 y 25 minutos y velocidades de 10,000 xg, 15,000 xg, 20,000 xg y 25,000 xg en todos los tejidos.

2.3. Conservación de la muestra. Se extrajeron los sobrenadantes y se hicieron alicuotas de 250 ul, las cuales se almacenaron a diferentes temperaturas: 4, -20, -70°C. El objetivo fue encontrar la temperatura óptima de almacenamiento para extractos crudos de pejibaye en la cual las muestras no se degradaran.

3. ANALISIS ELECTROFORETICO DE ISOENZIMAS.

3.1. Separación de proteínas. La metodología empleada consistió en un sistema de corrida nativo y discontinuo ejecutado sobre una matriz de separación de poliacrilamida. La concentración de los geles de poliacrilamida varió entre 7 a 10 % de acrilamida, mientras el espaciador consistió invariablemente de una concentración de 5% de acrilamida (Hames & Rickwood 1987).

El equipo utilizado para llevar a cabo la electroforesis fue el " Mini Protean II serie # 149BR de la casa Bio - Rad ". Este equipo provee un sistema de corrida vertical, con dimensiones del gel de 7cm x 10cm x 0.75mm; cada gel tiene capacidad para cargar 10 muestras.

Las soluciones tampón del gel separador y espaciador fueron las siguientes: Tris HCl 1 M pH 6.8 y Tris HCl 1.5 M pH 8.7 (Baaziz & Saaïdi 1988; CIAT 1990; Hames & Rickwood 1987); estas soluciones se conservaron a una temperatura de 4 °C.

Con cada enzima se ensayaron 3 soluciones tampón de los electrodos :

- A. tris glicina pH 8.3 0.025M / 0.192M (Jarret & Litz 1986);
- B. tris borato pH 9.0 0.820M / 0.077M (CIAT 1990);
- C. tris glicina pH 8.3 0.025M / 0.020M (Valdéz 1991).

Cada amortiguador de los electrodos fue preparado el mismo día de la corrida y enfriado inmediatamente a 4°C.

3.2. Optimización de la cantidad de muestra en el gel. La mezcla empleada para cargar los pozos del gel se preparó de la siguiente manera: 50 ul del extracto crudo, 5 ul de azul de bromofenol (tinte empleado para seguir el frente de corrida) y 5 ul de glicerol al 100% (aceite usado para darle peso a la muestra). Se homogeneizó la mezcla y se realizó la gradiente de carga para encontrar las cantidades óptimas de muestra en el gel por enzima, la gradiente contempló cantidades entre 0.5 ul a 15 ul (Ramírez, comunicación personal 1990).

3.3. Condiciones de corrida. La electroforesis fue llevada a cabo dentro de un refrigerador a 5°C con una Fuente de Poder "Modelo 1000/500 , AC voltaje 100/120v, casa Bio-Rad".

Las muestras fueron corridas bajo una gradiente de potencial eléctrico con una variación de 50 v hasta alcanzar 200 v como límite (máximo 75 mA). Se dió por concluida la corrida cuando el azul de bromofenol llegó al borde del gel.

4. REVELADO.

Las enzimas evaluadas fueron los siguientes: peroxidasa (PRX), esterasa (EST), fosfatasa ácida (ACP), diaforasa (DIA), fosfoglucoisomerasa (PGI), superóxido dismutasa (SOD), glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), enzima málica (ME) y malato deshidrogenasa (MDH), glutamato oxalato transaminasa (GOT),

alcohol deshidrogenasa (ADH).

Los procedimientos de revelado empleados fueron ligeras modificaciones de los protocolos de Vallejos (1983); Harris & Hopkinson (1976) y CIAT (1990).

Los geles se tiñeron con una mezcla de reactivos que permitió revelar la actividad específica de cada enzima. Los patrones enzimáticos fueron revelados a 37°C por 1, 2, o 3 horas o por toda la noche en un incubador " Modelo EG2, de la casa Fisher" (USA). Cuando los sitios de actividad enzimática estuvieron revelados, se desechó la mezcla de tinción y se lavaron los geles con agua destilada; se les agregó posteriormente una solución fijadora de proteínas que consistió de 6 partes de metanol, 1 parte de ácido acético y 14 partes de agua (CIAT 1990).

5. CONSERVACION DE LOS ZIMOGRAMAS.

5.1. Fotografía. Una vez revelados los patrones de bandas, los geles fueron fotografiados con película blanco y negro Tímax-100 Kodak, 35mm y revelados con los protocolos y procedimientos empleados en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (Bolaños 1992).

5.2. Secado de los geles. El principio básico del proceso de secado de geles es la deshidratación. Se sumergió el gel en una solución de alcohol al 80% por 20 minutos y en otro recipiente con agua destilada se colocaron dos láminas de papel celofán transparente por 20 minutos. Sobre un vidrio limpio se colocó una capa de papel celofán y sobre ésta el gel; luego otra lámina de papel celofán y sobre ésta otro vidrio; por último se procedió a sellar los bordes con prensas metálicas. Los geles permanecieron a temperatura ambiente hasta que estuvieron secos (CIAT 1990).

6. EVALUACION DE LOS ZIMOGRAMAS.

La evaluación de los zimogramas se basa en el hecho que cada zona horizontal de bandas representa un locus y que la posición de cada banda corresponde a un alelo (Hussain *et al* 1988; Bennanceur *et al* 1991; Wendel & Weeden 1989) de esta manera se obtendrá un patrón sintético de los alelos, la organización molecular de la enzima y del número de posibles fenotipos encontrados para las enzimas estudiadas con extractos de hoja de pejibaye.

Para efectos de nomenclatura los loci se dan en términos de letras de A...Z, donde A es el más cercano al origen y Z el más lejano. A su vez los alelos se catalogan de 0...n donde 0 es la

banda más cercana al punto de origen de la muestra y n la más distante (Ghesquiere 1984, Sánchez 1988, Lannaud⁸ 1992).

Mediante un análisis jerárquico de conglomerados " cluster analysis " (SPSS) se establecerán relaciones de similaridad de fenotipos electroforéticos por enzima entre las razas estudiadas.

RESULTADOS

1 - . PREPARACION DE LA MUESTRA.

1 - 1. Homogeneización de la muestra. El proceso de homogeneización resultó laborioso debido a la naturaleza altamente fibrosa de los tejidos de pejibaye. Fue especialmente difícil homogeneizar los tejidos de raíz adventicia e inflorescencia y del todo imposible, el tejido de espinas. Los tejidos de hoja y fruto presentaron menor dificultad para triturarlos apropiadamente, debido a que la lámina y el mesocarpo poseen menos fibras que los otros tejidos mencionados.

De los tres métodos experimentados, el sistema de homogeneización con pistilos y morteros preenfriados fue el más práctico. Las ventajas de este método radicaron en que se mantuvo frío el sistema durante todo el proceso de maceración y se controló el tiempo y grado de homogeneización de las muestras.

Los métodos Wheaton, Sorvall y con nitrógeno líquido resultaron ineficientes e imprácticos para la homogeneización de los tejidos de pejibaye.

Con el método Wheaton, el proceso de maceración fue lento e ineficiente; el sistema resultó demasiado pequeño y débil para soportar las cantidades y tipos de tejidos probados.

Con el sistema Sorvall, las muestras de inflorescencia y raíces no se homogeneizaron completamente y especialmente el tejido de fruto quedó adherido a las paredes del equipo, lo que alteró las cantidades de muestra bajo estudio.

Al agregar el nitrógeno líquido conjuntamente con la solución de extracción, las muestras se congelaron a tal punto que no se pudo macerar el tejido de inmediato y la homogeneización se realizó después de que se descongelaron, situación que produjo deterioro de las enzimas.

Después de muchos ensayos, la cantidad de muestra óptima para el análisis electroforético de isoenzimas en pejibaye fue 1.5 g. Cantidades menores de tejido fueron insuficientes para obtener patrones de bandas definidos en tejidos de inflorescencias y raíces adventicias, cantidades mayores produjeron patrones de bandas sobrecargados con los extractos de hojas, mientras que el resto de tejidos no mostraron incremento en la definición de los zimogramas con respecto a los obtenidos con 1.5 g.

1 - 2. Extracción de las proteínas. De las tres soluciones ensayadas para extracción de proteínas en tejidos de pejibaye, la que proporcionó mejor resolución de los zimogramas fue la solución de extracción de Baaziz & Saaidi (1988), con modificación de la concentración de la solución amortiguadora de fosfato 0.05 M a 0.1 M.

El método de extracción de Azofeifa (1990) produjo patrones de bandas débiles, pero el principal problema con este método de extracción fue que las muestras sufrieron oxidación fenólica rápidamente. Se considera que esto se debió a la acción del complejo fenoloxidasas como consecuencia de la ausencia de antioxidantes como el Beta - mercaptoetanol y otros protectores de la estabilidad de las moléculas como: BSA, PVP- 40, DMSO en la solución de extracción.

1 - 3. Clarificación de la muestra por centrifugación. Se clarificaron los tejidos de hoja, inflorescencia y raíces adventicias de manera óptima con 15,000 xg con un tiempo de centrifugación de 20 minutos a 4°C. Tiempos o velocidades de centrifugación menores no clarificaron los sobrenadantes, y quedaron restos de partículas de tejido como fibras, clorofila, grasa y almidón en los sobrenadantes.

Con el fruto, el proceso de centrifugación tuvo que realizarse de manera diferente, dado que en los sobrenadantes quedó gran cantidad de grasa y almidón; para clarificarlos se requirieron 3 tiempos de centrifugación de 20 minutos cada uno a 25,000 xg.

1 - 4. Conservación de las muestras. La temperatura de almacenamiento óptima para conservar los extractos de tejidos de pejibaye fue -70 °C. Ensayos de electroforesis realizados

con extractos almacenados durante 4 meses a esta temperatura, no mostraron deterioro en los zimogramas, cuando se compararon con los producidos con extractos frescos.

Las muestras almacenadas a 4°C no se conservaron en buen estado por mucho tiempo. A los 5 días de llevarse a cabo la extracción, las muestras a esta temperatura mostraron procesos de oxidación. Estos procesos de oxidación se evidenciaron mediante un cambio de color del tejido original a un café oscuro.

Este fenómeno se mostró con mayor intensidad en los tejidos de hoja, donde la cantidad de compuestos fenólicos es mayor que en el resto de tejidos. Las muestras a - 20°C, tampoco se mantuvieron en buen estado por más de 15 días posterior a este período todas sufrieron oxidación.

En ambos casos, las muestras conservadas a 4°C y - 20°C, mostraron zimogramas distorsionados, con bandas difusas y mucho oscurecimiento en el gel, producto de la degradación de las proteínas.

2 - . ANALISIS ELECTROFORETICO DE ISOENZIMAS.

El Método de electroforesis nativo y discontinuo estandarizado utilizado en este estudio (apéndice 1), resultó adecuado para la visualización de 10 de las 12 isoenzimas evaluadas con los tejidos de pejibaye (Cuadro 2).

Cada enzima fue separada mediante una serie de condiciones de electroforesis particulares. El Cuadro 2, muestra las condiciones óptimas de electroforesis obtenidas para las enzimas que mostraron actividad. En general, para cada una varió la concentración de poliacrilamida en el gel de separación, las soluciones amortiguadoras del tanque y las cantidades de muestra por pozo.

Las condiciones de corrida fueron las mismas para todos los sistemas enzimáticos (gradiente de 50, 100, 150 y 200 v).

Este método de electroforesis no resultó adecuado para el análisis de la alcohol deshidrogenasa y la glutamato oxalato transaminasa pues ninguna mostró actividad enzimática.

3 - . TEJIDO OPTIMO.

El tejido de hoja mostró los mejores resultados con los procesos de homogeneización, extracción, centrifugación, corrida y revelado y también presentó patrones de bandas más claros y definidos que los otros tejidos ensayados.

Ninguno de los métodos de homogeneización probados resultaron adecuados para el tejido de espigas, debido a lo compacto y resistente de este tejido, por esta razón se eliminó del estudio.

El fruto fue el tejido más fácil de homogeneizar; es suave y con menor contenido de fibras; sin embargo, el proceso de

eliminación de grasa y almidón de los sobrenadantes resultó ineficiente e impráctico. Cuando se realizaron electroforesis con estos extractos impuros, los residuos de grasa en ellos aumentaron la resistencia del sistema de corrida, lo cual creó un aumento de la temperatura. Este calor degradó las enzimas y como resultado se obtuvo una severa distorsión de los patrones de bandas; ésta fue la razón particular por la cual también se eliminó este tejido del estudio.

Los tejidos de inflorescencia y raíz adventicia mostraron patrones de bandas débiles, difíciles de analizar. Se considera que el método de homogeneización resultó inadecuado para extraer de manera efectiva las proteínas presentes en estos tejidos tan resistentes a homogeneización.

Por los problemas encontrados para trabajar con las muestras de espinas, inflorescencia, raíces adventicias y fruto, se consideró que con el método de electroforesis empleado, el tejido óptimo para el estudio y análisis de isoenzimas en pejibaye, fue la hoja.

CUADRO 2. Métodos de electroforesis obtenidos para 10 enzimas con extractos foliares de pejibaye.

| Enzima | [] gel Separador* | Sol. tampón Electrodo | Muestra gel (ul) |
|--------|--------------------|--|------------------|
| PRX | 7 % | Tris Borato pH 9.0 0.077 M / 0.820 M | 2 |
| EST | 10 % | | 14 |
| ACP | 12 % | | 12 |
| DIA | 10 % | | 20 |
| MDH | 7 % | | 4 |
| G6PDH | 7 % | | 1.5 |
| PGI | 8 % | Tris Glicina pH 8.3 0.020 M / 0.025 M | 10 |
| SOD | 10 % | | 20 |
| PGM | 8 % | | 10 |
| ME | 7 % | Tris Glicina pH 8.3 0.192 M / 0.025 M | 19 |

*. Ver los protocolos en Apéndice 1.

4 - . REVELADO, ACTIVIDAD ENZIMATICA Y RESOLUCION.

Después de numerosos experimentos concernientes al método de revelado óptimo, se obtuvieron zimogramas con DIA, PRX, EST, G6PDH, MDH, ME, SOD, PGI, PGM y ACP (Cuadro 3).

El primer problema que se presentó en el proceso de revelado fue que las cantidades de reactivos dadas en los protocolos de Vallejos (1983), Harris *et al* (1976) y CIAT (1990) no se ajustaron a las necesidades de las enzimas en un gel con las dimensiones del obtenido con el equipo Mini Protean II (7 cm x 10 cm). El exceso de reactivos produjo sobretinción de los geles y bloqueó la observación de bandas (PRX, SOD); en la mayoría de los casos se inhibió la actividad de las enzimas (EST, ACP, ME, MDH, G6PDH, PGI, PGM, DIA, AAT, GOT), y por tanto no se visualizaron patrones de bandas. Por esta razón se redujo la cantidad de los mismos al mínimo que permitiera la reacción de tinción y observación de zimogramas.

Otro de los problemas encontrados fue el ajuste del pH en la mezcla de tinción - gel. En un inicio el pH obtenido no fue el óptimo para que las enzimas mostraran actividad. Bajo estas condiciones se obtuvieron zimogramas muy distorsionados y con mucho ruido de fondo. Este problema se resolvió mediante pre-incubación de los geles con la solución amortiguadora de la mezcla de revelado por 10 minutos. De esta manera se le proporcionó a la enzima su pH de trabajo óptimo y se obtuvieron

patrones de bandas nítidos.

Se encontró que al incubar los geles por toda una noche a 4°C, se revelaron con mayor intensidad patrones de bandas muy débiles. Las bandas en los geles se definieron mejor sin que se produjera oscurecimiento del gel; este fue el caso particular para SOD y G6PDH, pero en general este patrón se ajustó a todas las enzimas ensayadas.

La resolución de los zimogramas varió con cada enzima. El Cuadro 3 muestra los diferentes niveles de resolución obtenidos con las 10 enzimas que mostraron actividad.

Los mejores patrones de bandas se obtuvieron con PRX, G6PDH, PGI y PGM. Sin embargo, ADH y GOT no mostraron actividad, es probable que factores como el método de extracción, electroforesis y revelado no fueron óptimos para la actividad de estas enzimas. Las enzimas ME, EST y ACP mostraron fuerte actividad en los geles pero requieren afinamiento del método de revelado para obtener mayor nitidez en los zimogramas.

CUADRO 3. Actividad, Resolución y polimorfismo obtenido con el método de electroforesis estandarizado para 12 enzimas con extractos de hojas de Bactris gasipaes

| Enzima | Actividad | Resolución | Polimorfismo |
|--------|-----------|------------|--------------|
| PRX | + | +++ | +++ |
| EST* | + | + | +++ |
| ACP* | + | + | ++ |
| ME * | + | -+ | ? |
| DIA | + | ++ | +++ |
| MDH | + | ++ | ++ |
| G6PDH | + | +++ | ++ |
| PGI | + | +++ | ++ |
| SOD | + | ++ | +++ |
| PGM | + | +++ | + |
| ADH | - | - | - |
| GOT | - | - | - |

Actividad:

- + = Patrones con fuerte actividad enzimática.
- = No se observaron patrones de bandas.

Resolución:

- +++ = Muy Buena
- ++ = Buena
- +
- + = Regular
- = Pobre
- = Ninguna
- * = Sistemas enzimáticos que requieren mejorar la técnica de migración y visualización.

Polimorfismo:

- +++ = 10 o más fenotipos
- ++ = 5 - 9 fenotipos
- +
- ? = Menos de 5 fenotipos
- ? = No se estudió.

5 - . CONSERVACION DE LOS ZIMOGRAMAS.

El método de secado resultó muy conveniente para mantener un doble registro de los geles, con la ventaja de que los geles secos se pueden archivar y eliminar el inconveniente de almacenarlos frescos en las cámaras frías.

Sin embargo, se considera que este sistema de secado no se adecuó a geles pequeños, como los producidos por el Mini Protean II. La razón es que cuando se deshidratan, se reducen significativamente de tamaño y bandas distintas que se encuentran muy próximas, después del secado quedan juntas y parecen una sola; esto introduce error en la interpretación de los resultados sino se cuenta con la evidencia fotográfica.

Esta técnica de conservación de zimogramas posiblemente se ajusta a geles con dimensiones superiores a las que se usó en este experimento; en los cuales aunque el gel se reduzca de tamaño, el espacio entre bandas conserva las dimensiones originales del gel.

6 -. EVALUACION DE ZIMOGRAMAS.

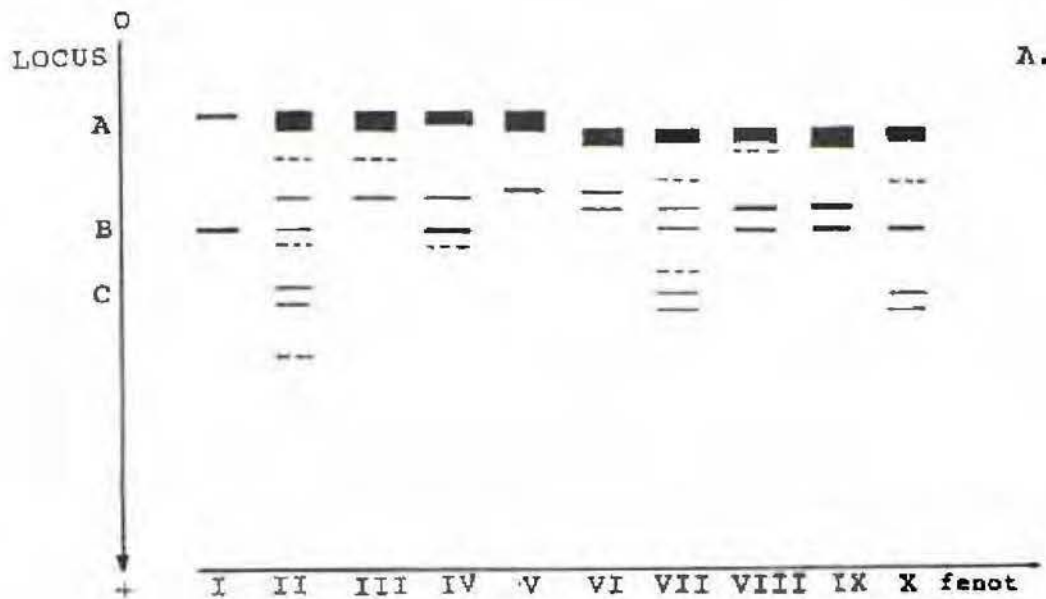
Peroxidasa: La peroxidasa fue la enzima más fácil de visualizar con tejidos de hoja de pejibaye; mostró patrones de bandas bastante claros (Fig. 2). Se observaron 3 zonas de bandas consideradas como locus A, B, C (Cuadro 4). El locus C se

presentó solamente en la raza Guápiles (Costa Rica), por esta razón constituye un excelente marcador discriminatorio para esta raza.

Un total de 12 fenotipos presentes en los zimogramas nos da la idea que esta enzima es polimórfica y que puede usarse en estudios de variabilidad genética en pejibaye (Cuadro 4). Esta enzima presenta zimogramas con isoenzimas secundarias (Cuadro 4)

Esterasa: La esterasa mostró patrones de bandas más débiles y complejos que con respecto al resto de enzimas ensayadas (Cuadro 2). Se observaron 4 zonas de bandas que se consideradas 4 loci activos donde los loci A, B y C son complejos, con isoenzimas secundarias, por tanto no se puede concluir sobre la estructura de las isoenzimas; el locus D muestra una estructura monómerica definida (Fig.3). Al evaluar las bandas características se encontraron 12 fenotipos los cuales indican que esta enzima es polimórfica y puede utilizarse en estudios futuros (Cuadro 4). Sin embargo, se debe considerar la complejidad de los zimogramas (3-15 genes), la inespecificidad y como consecuencia la gran cantidad de isoenzimas secundarias que caracterizan esta enzima, de modo que si se quiere conocer su genética se deben realizar estudios de progenie.

PEROXIDASA (PRX)



LOCUS A : A1A1 (I-V)
 A2A2 (V-X)

LOCUS B : B1B1 (V)
 B2B2 (III)
 B3B3 (I, IX, X)
 B1B2 (VII)

LOCUS C : C1C2 (II, VII, IX)

 B2B3 (II, IV, VII, VIII)

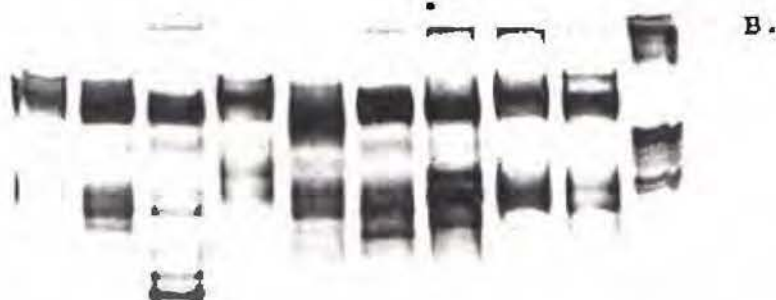


Fig.2 A. Zimograma sintético obtenido para PRX.
B. Zimograma del gel 1 revelado con PRX.

CUADRO 4. Evaluación de zimogramas obtenidos con tejidos de hoja de Bactris gasipaes

| Enzima | Zona band | # Loci observ. | #alelos/ locus | Estr. enz. | Fenot /gel | Isoz. sec. |
|---------|-----------|----------------|--------------------------|-----------------------|------------|------------|
| PRX* | 3 | 3 (A, B, C) | A-2 B-3 C-2 | Monom. Monom. - | 12 | + |
| EST* | 4 | 4 (A, B, C, D) | A-2 B-2 C-2 D-2 | - - - Monom. | 12 | + |
| ACP* | 2 | 2 (A, B) | A-2 B-4 | Monom. Dimer. | 9 | + |
| ME* | 2 | 2 (A, B) | A-1 B-Cp | - - | - | + |
| DIA* | 4* | 3 (A, B, C) | A-Cp B-2 C-2 | - Monom. Monom. | 14 | + |
| MDH | 1 | 1 (A) | A-2-3? | - | 8 | - |
| G6PDH | 2 | 2 (A, B) | A-3 B-2 | Monom. Monom. | 7 | - |
| PGI (.) | 3* | 2 (A, B) | A-3 B-2 | Dimer. Monom. | 9 | + |
| SOD (.) | 3 | 3 (A, B, C) | A-Cp B-3 C-2 | - Dimer. Monom. | 10 | + |
| PGM | 1 | 1 (A) | A-2 | - | 3 | - |

NOTA:

* = Enzimas no específicas.

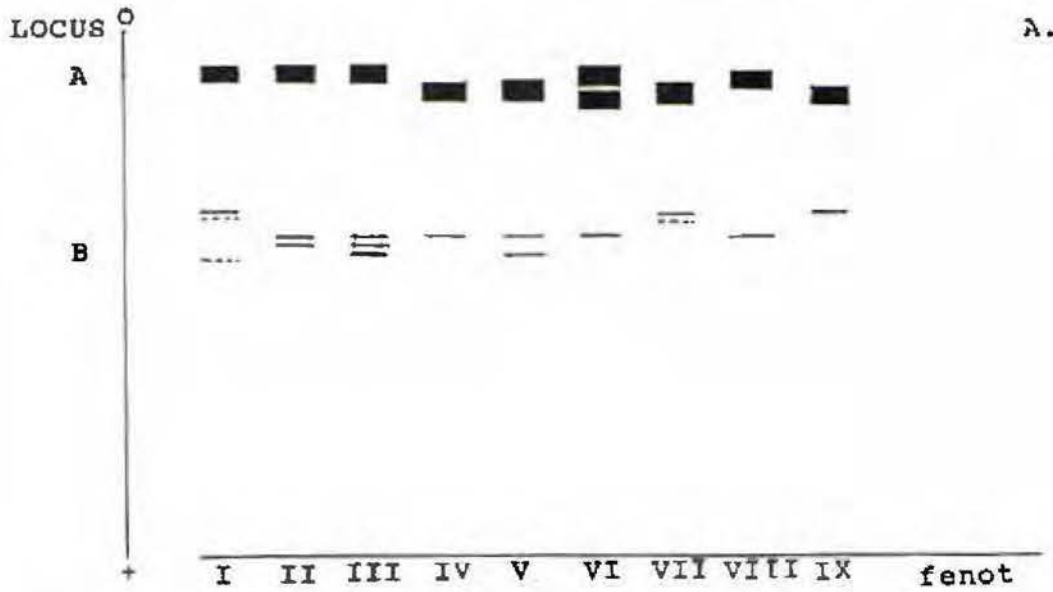
Cp = Patrones de bandas complejos de interpretar.

(.) = Isoenzimas específicas con isoenzimas secundarias.

Fosfatasa Acida: Al igual que la esterasa, los patrones son menos fuertes, la resolución obtenida con esta enzima no es la óptima (Cuadro 3) aún cuando su actividad es evidente, deben realizarse ajustes a nivel de condiciones de corrida y de tinción. Se revelaron 2 zonas de actividad, una cercana al origen, denominada como locus A que presenta 2 alelos y por esto se considera monomérica; la siguiente zona de bandas es más débil en actividad, es la zona rápida y se designó locus B, aparentemente es un dímero (Fig. 4). En ambos loci se observó variabilidad; se encontraron 9 fenotipos, esto la convierte en una enzima útil como marcador polimórfico (Cuadro 4). Al igual que PRX y EST esta es una enzima inespecífica con patrones complicados en la mayoría de plantas y poco estudiada su genética.

Enzima Máfica: No se pudo interpretar por la acumulación de muestra y efecto "sonrisa". Las condiciones de electroforesis y revelado utilizadas con ME en este experimento requieren una nueva evaluación. Esta es una enzima que ha dado problemas de revelado en otras investigaciones, de tal modo que el sistema óptimo no se ha encontrado aún para otras plantas de interés económico. Hasta que no se obtenga el sistema de análisis electroforético apropiado no se puede decir nada sobre su valor polimórfico en estudios de variabilidad entre razas de pejibaye (Cuadros 3 y 4).

POSFATASA ACIDA (ACP)



LOCUS A : A1A1 (I,II,III,IX)
 A2A2 (IV,V,VIII,X)
 A1A2 (VII)

LOCUS B : B1B1 (I,VIII,X)
 B2B2 (IV,VII,IX)
 B2B3 (II)
 B2B4 (VI)
 B2B5 (III)

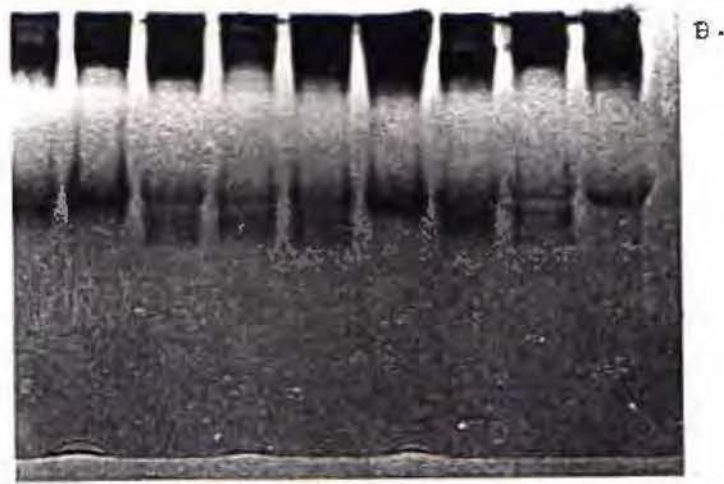


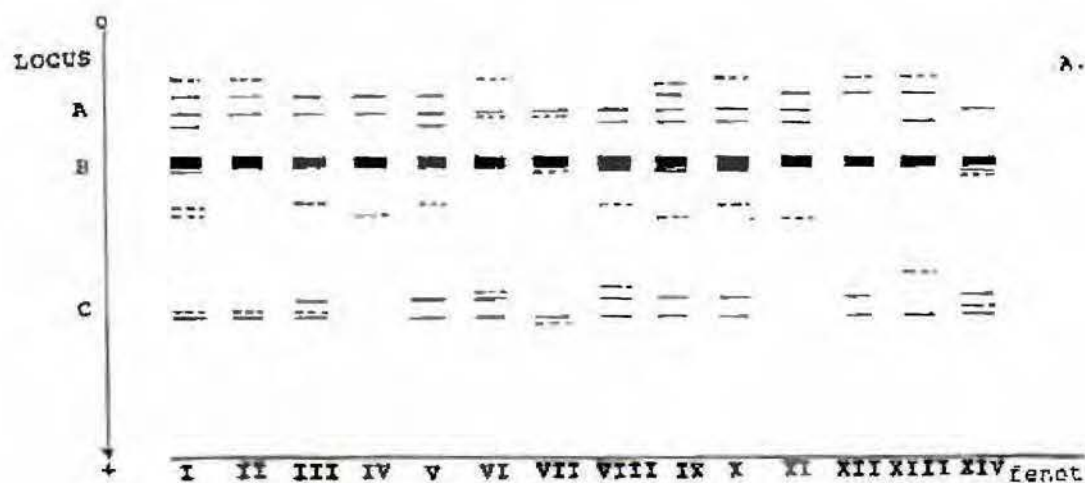
Fig.4A. Zimograma sintético obtenido para ACP.
4B. Zimograma del gel 1 revelado con ACP.

Diaforasa: Su actividad es bastante fuerte (Fig.5) y se considera una enzima con buena resolución (Cuadro 3). Sin embargo, el problema que muestra es la presencia de sombras de tinción alrededor de las bandas características, las razones pueden ser: a - muestra degradada; b - largos períodos de revelado; c - isoenzimas secundarias; d - inespecificidad de la enzima.

Se observaron 4 zonas de bandas, la zona 1 o locus A no se tomó en cuenta por ser un área compleja; las zonas 2 y 4 o loci B y D aparentemente son codificadas por enzimas monoméricas, mientras la región 3 o locus C corresponde a bandas poco definidas, débiles, catalogadas como bandas secundarias (Fig.5); para aclarar la situación se debe recurrir a evidencia genética existente y a estudios de pro genie en cruces controlados. Se encontraron 14 fenotipos (Cuadro 4), lo cual indica que esta enzima es polimórfica y que puede ser empleada para estudios posteriores de variabilidad en pejibaye (Cuadro 3).

Malato Deshidrogenasa: Se reveló solo una zona de bandas que se denominó locus A (Fig.6). No fue posible evaluar con propiedad la estructura de la enzima porque parte de la muestra quedó acumulada en una densa banda seguida por 2 bandas relativamente claras (Fig.6).

DIAFORASA (DIA)



LOCUS A : A1A1 (XII)
 A2A2 (VI, VII, XIV)
 A3A3 (XIII)

LOCUS B : B1B1 (II, III, IV, V, VI, VII)
 B1B2 (I, IX, X, XIV)

A1A3 (I, IV, V, XI)
 A1A2 (II, III, IX)
 A2A3 (VIII, X)

LOCUS C : C2C2 (I, II, XIII, VII)
 C1C2 (III, V, VI, VIII, IX)
 X, XII, XIII, XIV)

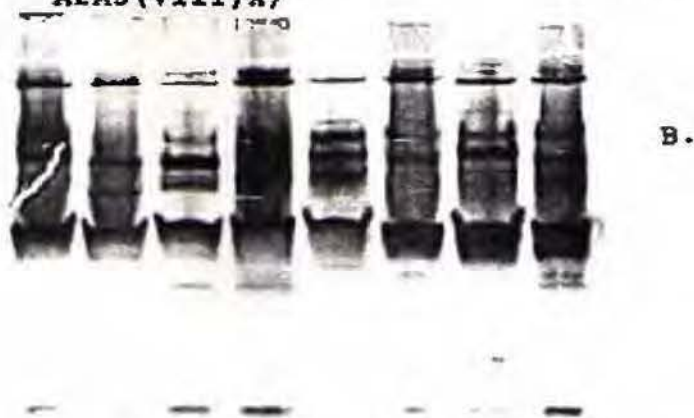
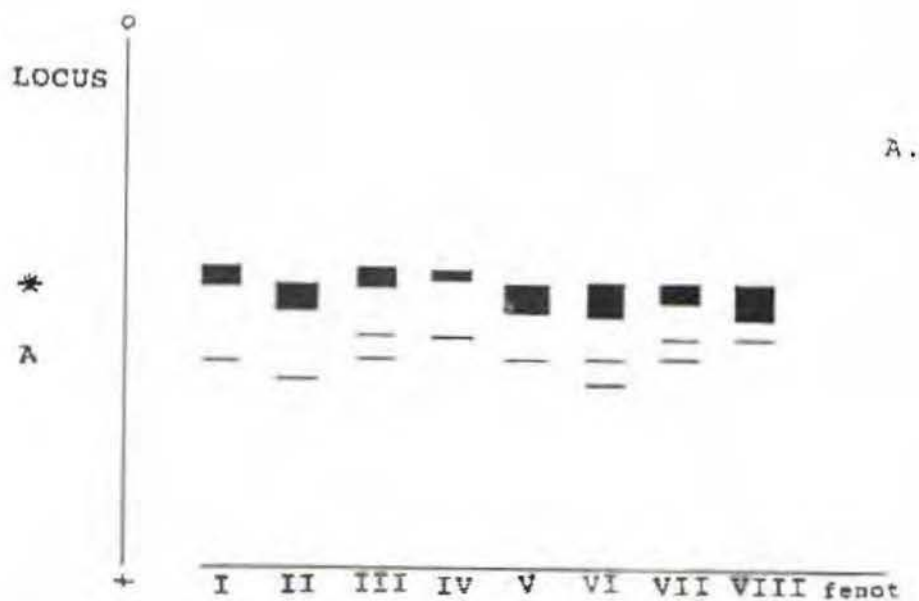


Fig. 5A. Zimograma sintético obtenido para DIA.
 B. Zimograma del gel 1 revelado con DIA.

MALATO DESHIDROGENASA (MDH)



LOCUS A : A1A1 (IV)
 A2A2 (I, V)
 A3A3 (II)
 A1A2 (III, VII)
 A2A3 (VI)

*. Sección Compleja.

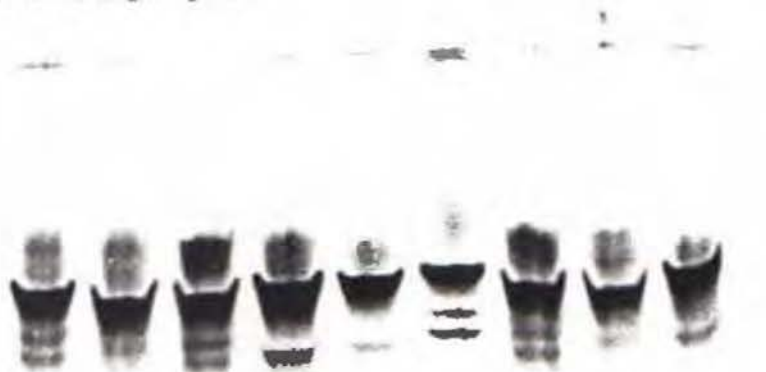
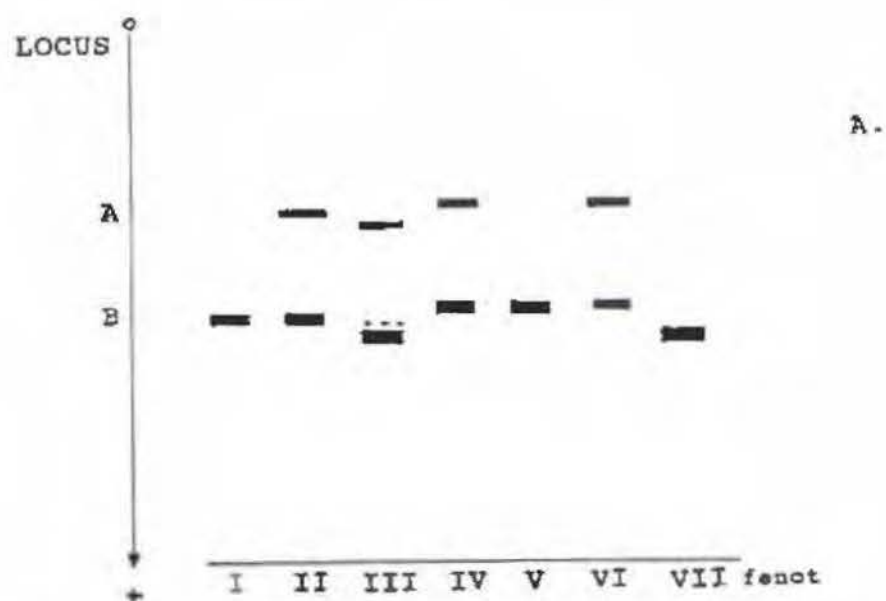


Fig. 6A. Zimograma sintético obtenido para MDH.
 B. Zimograma del gel 3 revelado con MDH.

Esta enzima se ha encontrado en otras plantas como un dímero (Apéndice 3), pero hasta que no se verifique la información obtenida, en el presente estudio no se catalogará el potencial polimórfico de la misma, aunque diferencias encontradas en las secciones claras del gel hacen pensar que si es una enzima polimórfica y por tanto conveniente para realizar estudios de variabilidad genética en pejibaye (Cuadro 4). Para resolver el problema es necesario reevaluar la cantidad de muestra por pozo en el gel (Cuadro 3).

Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa: Esta es una enzima específica que muestra polimorfismo moderado con respecto a DIA, EST, PRX (Cuadro 3). Se observan 2 zonas de actividad correspondientes al locus A y B los cuales parecen ser homocigotas con estructura monomérica (Fig.7). Un total de 7 fenotipos se encontraron por lo cual se le considera una enzima polimórfica (Cuadro 4). La resolución del gel fue excelente (Cuadro 3), bandas definidas sin sombras y ausencia de isoenzimas secundarias. Por tanto se cree que los métodos de extracción, corrida y revelado fueron los óptimos (Cuadro 2).

Fosfoglucosa Isomerasa: Se evidenciaron 2 zonas de bandas o loci; el locus A o zona 1 mostró 3 bandas por lo cual se piensa que la enzima es un dímero (Apéndice 3), mientras la zona 2 o locus B presenta 2 bandas que lo catalogan como un monómero (Fig.8).

GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH)

LOCUS A : A1A1 (IV, VI)
 A2A2 (II)
 A3A3 (III)

LOCUS B : B1B1 (IV, X)
 B2B2 (I, II, VI)
 B3B3 (III, VII)

B.

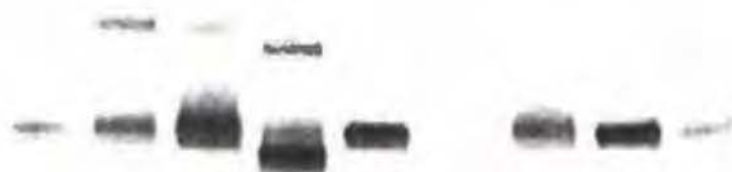


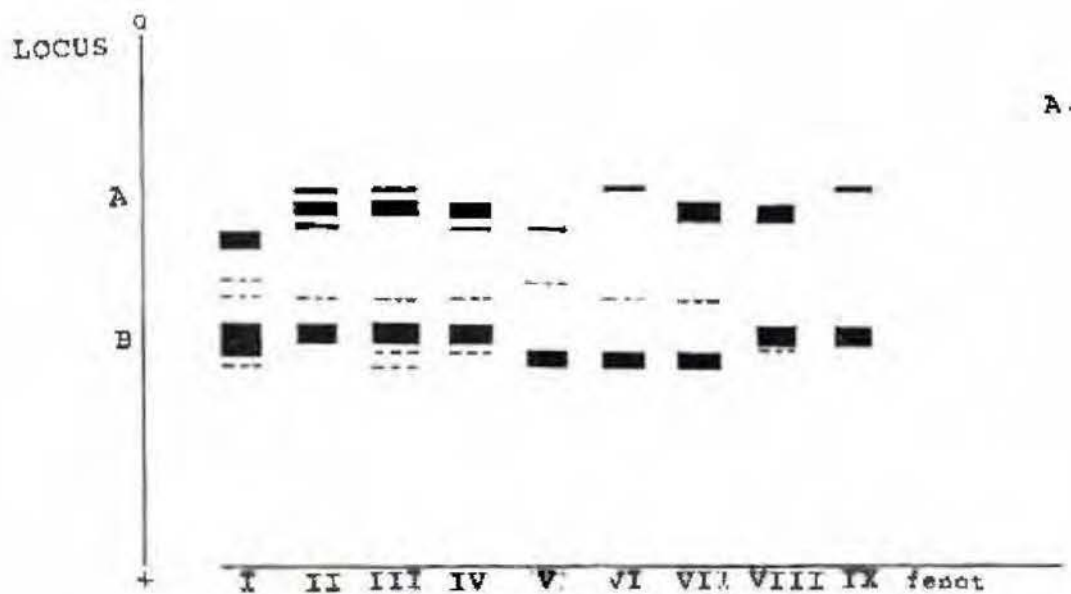
Fig. 7A. Zimograma sintético obtenido con G6PDH.
 B. Zimograma del gel 3 revelado con G6PDH.

Un total de 9 fenotipos fueron obtenidos con esta enzima (Cuadro 4). Se considera que esta es una enzima polimórfica para pejibaye y que puede emplearse en estudios posteriores de variabilidad genética.

PGI es una enzima específica, con una buena resolución del gel (Cuadro 3); sin embargo, se observaron una serie de bandas "fantasma" en la región media del gel, se presume que las causas pueden ser largos períodos de revelado o ligera degradación de la muestra.

Superóxido Dismutasa: Esta enzima resultó ser un marcador bastante polimórfico, recomendable para usar en estudios futuros con pejibaye. Presenta 3 zonas de bandeo correspondientes a 3 loci, el locus A corresponde a una gran área de actividad de la cual se puede decir poco sobre su composición. El locus B, presenta 3 bandas esto sugiere que esta isoenzima posee estructura dimerica (Fig.9). El locus C posee 2 bandas definidas que corresponden a una estructura monomérica. Un total de 10 fenotipos se encontraron para las razas estudiadas (Cuadro 4); este hecho y la buena resolución obtenida capacitan a esta enzima para ser utilizada como marcador polimórfico en pejibaye (Cuadro 3 y 4).

FOSFOGLUCOSA ISOMERASA (PGI)



LOCUS A : A1A1 (VI, IX) LOCUS B : B1B1 (I, II, III, IV, VIII, IX)
 A2A2 (VII, VIII) B2B2 (V, VI, VII)
 A3A3 (I)
 A1A3 (II)
 A1A2 (III)
 A2A3 (IV)

B.

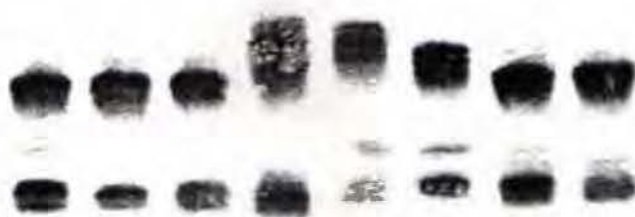
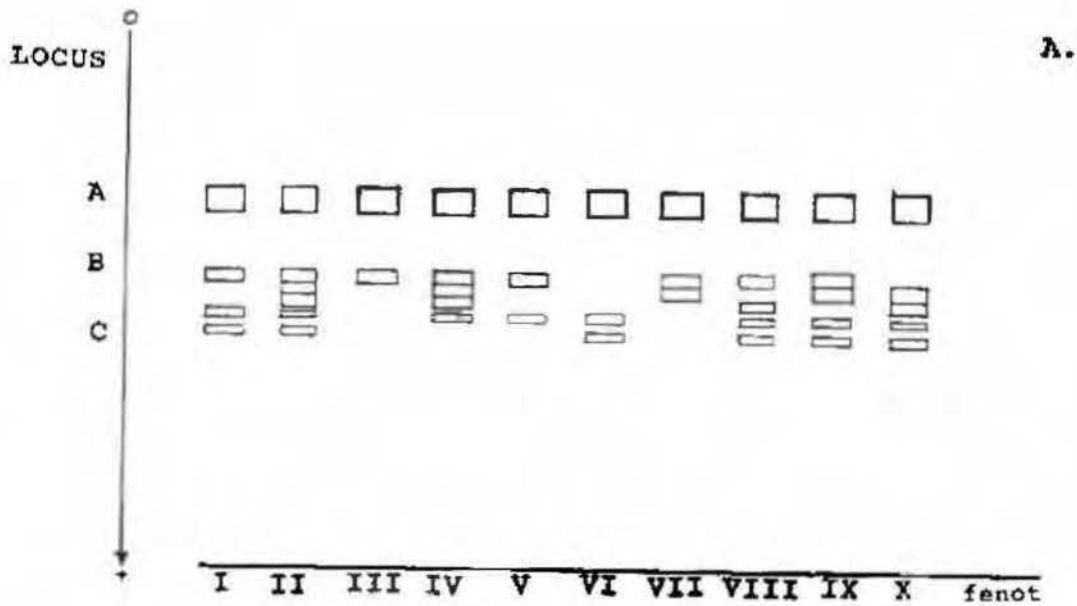


Fig. 8A. Zimograma sintético obtenido con PGI.
 B. Zimograma del gel 3 revelado con PGI.

SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD)

LOCUS A : NO SE ESTUDIO

LOCUS B : B1B1 (I, V, III)

B1B2 (VII, IX)

B1B3 (VIII, II, IV)

B2B3 (X)

LOCUS C : C1C1 (IV, V)

C1C2 (I, II, III, VI, X)

VII, VIII, IX,)



Fig. 9A. Zimograma sintético obtenido con SOD.

B. Zimograma revelado para el gel 3 con SOD.

Fosfoglucomutasa: Es una enzima específica conveniente para estudios de variabilidad genética y se conoce mucho acerca de ella. La resolución de los zimogramas fue muy buena (Cuadro 2). En este caso, con pejíbaye aparece solo 1 zona de bandeó, la estructura de la enzima corresponde a un monómero (Fig.10). Si bien esta información genera discriminación entre las razas, es la enzima con menor número de fenotipos variables de las 10 enzimas reveladas, mostró solo 3 fenotipos (Cuadro 4).

FOSFOGLUCOMUTASA (PGM)



LOCUS A : A1A1 (I)
 A2A2 (III)
 A3A3 (II)

B.



Fig. 10A. Zimograma sintético obtenido para PGM.

B. Zimograma revelado para el gel 2 con PGM.

6. Análisis de conglomerados: Mediante el análisis estadístico de conglomerados se obtuvieron 2 grupos de razas con fenotipos distintos, estos grupos fueron los de Bolivia - Brasil y Costa Rica - Panamá. Yurimaguas se presentó distante de estos dos grupos (Figuras 11 - 20).

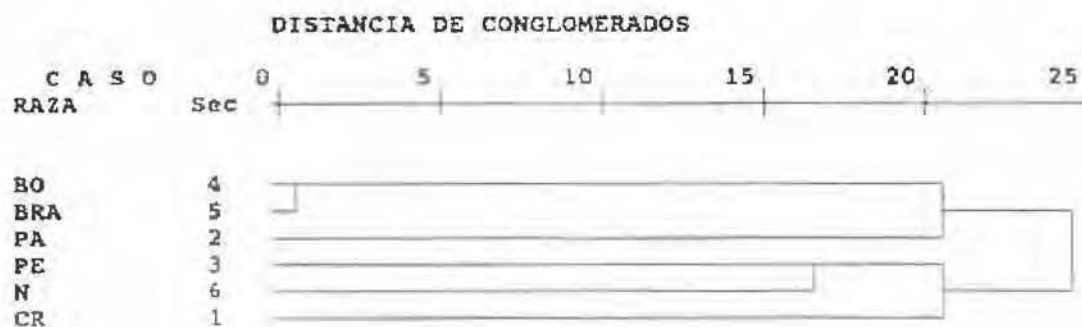


Fig.11. Relaciones de similitud fenotípica con PRX entre las 5 razas de peñibaye estudiadas.

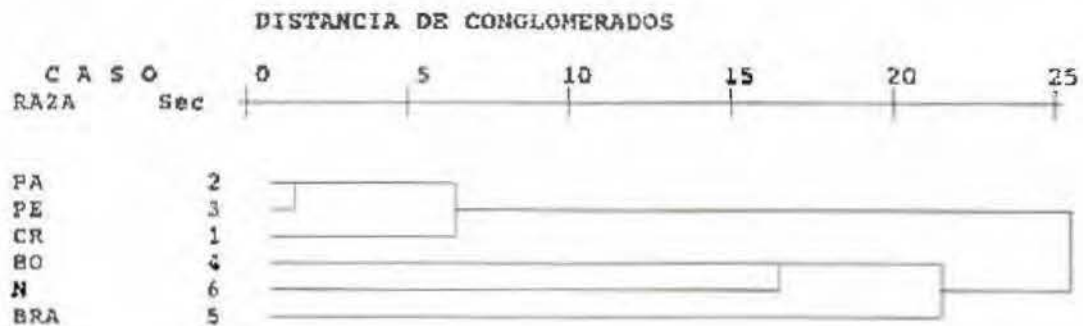


Fig 12. Relaciones de similitud fenotípica con EST entre las 5 razas de peji-baye estudiadas.

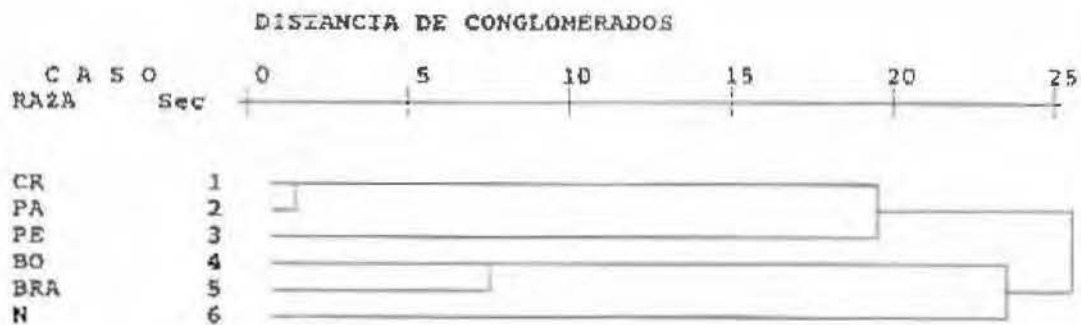


Fig 13. Relaciones de similitud fenotípica con ACP entre las 5 razas de peji-baye estudiadas.

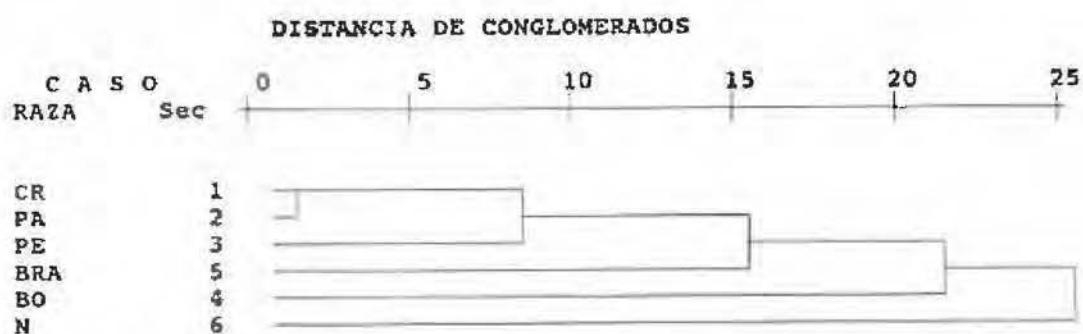


Fig 14. Relaciones de similitud fenotípica con G6PDH entre las 5 razas de peji-baye estudiadas.

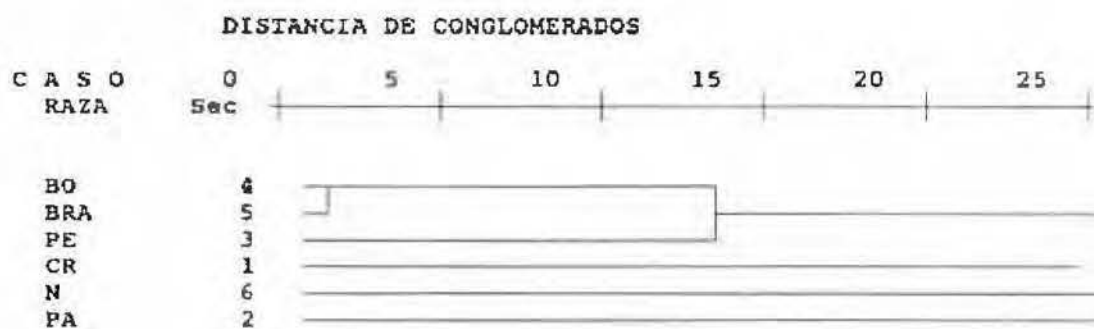


Fig 15. Relaciones de similitud fenotípica con MDH entre las 5 razas de peji-baye estudiadas.

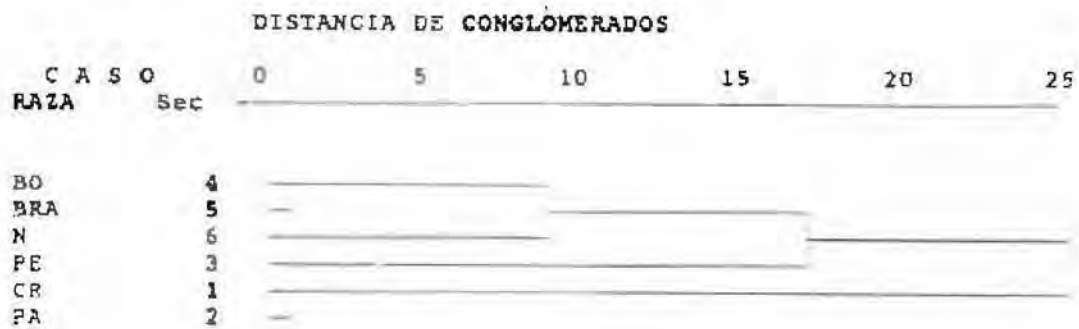


Fig 16. Relaciones de similitud fenotípica con DIA entre las 5 razas de peji-baye estudiadas.

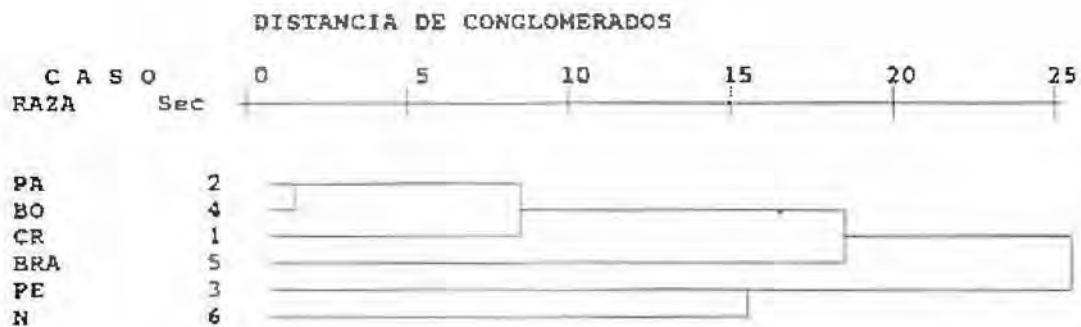


Fig 17. Relaciones de similitud fenotípica con PGI entre las 5 razas de peji-baye estudiadas.

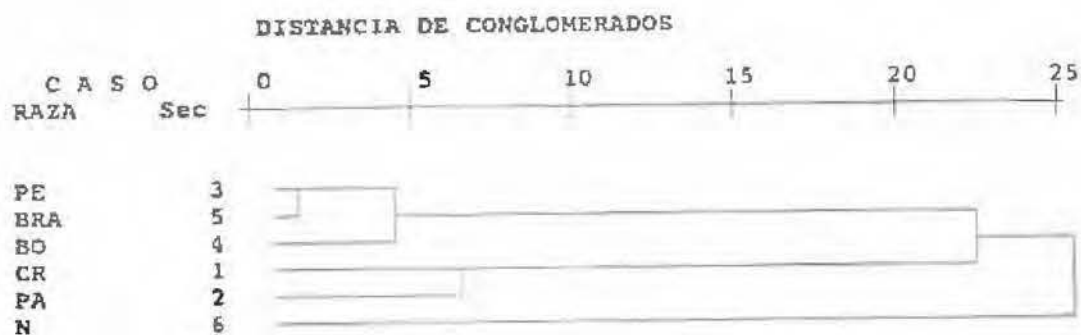


Fig 18. Relaciones de similitud fenotípica con SOD entre las 5 razas de peji-baye estudiadas.

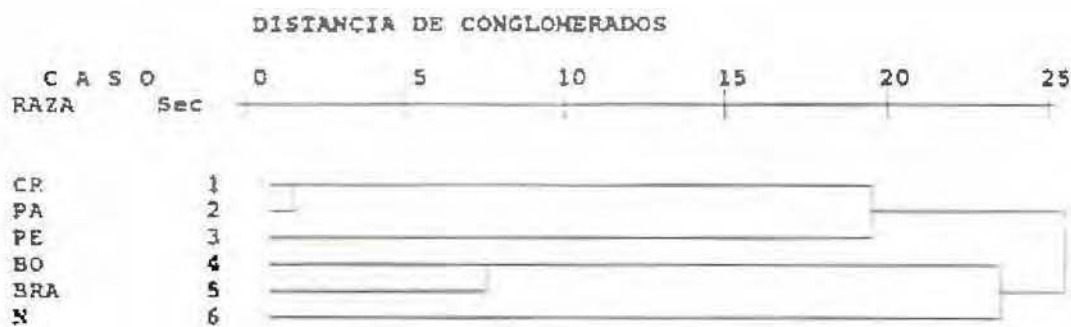


Fig 19. Relaciones de similitud fenotípica con PGM entre las 5 razas de peji-baye estudiadas.

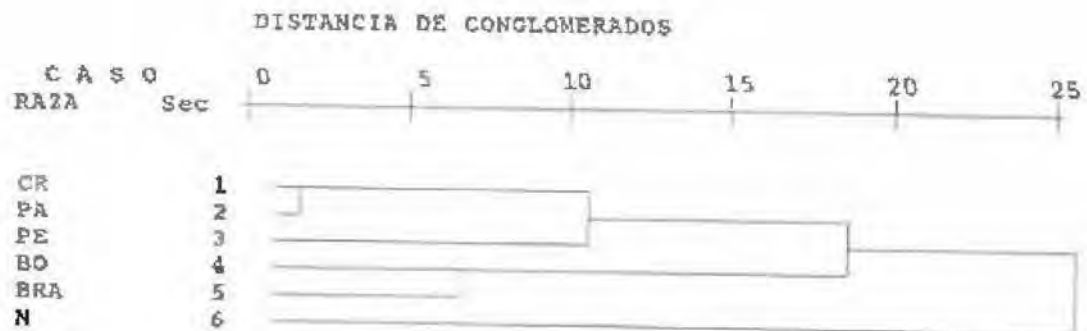


Fig 20. Relaciones de similitud fenotípica entre las 5 razas de pejibayé establecidas con base en el total de isoenzimas evaluadas en la presente investigación.

DISCUSION

La homogeneización de tejidos de pejibaye resultó una labor ardua debido a la dificultad de rompimiento de estos tejidos por su alto contenido de fibras y sílice (Mora-Urpí 1990). Esta situación representó un inconveniente para liberar las enzimas de las células y las membranas de las organelas, ya que el mecanismo de homogeneización es crucial para mantener la actividad de las enzimas (Loomis 1974). Cada taxón y tejido poseen una serie de problemas propios a considerar, entre ellos: el rompimiento de células, la conservación de la estructura cuaternaria de las enzimas y la exposición a complejos fenoloxidasas (Anderson 1968, Loomis 1974, Miranda et al 1989, Kephart 1990).

Las estadísticas revelan que el método de homogeneización más utilizado para el análisis de tejidos de plantas es el de los morteros y pistilos preenfriados (Kephart 1990, Wendel & Weeden 1989, Gottlieb 1977). En el presente estudio, resultó ser el más práctico y efectivo de los métodos evaluados, especialmente con tejidos de hojas y frutos. Sin embargo, se considera que no es 100% eficiente para extraer proteínas de tejidos como raíces adventicias, espinas e inflorescencias.

Torres y Tisserat (1980) recomiendan un sistema de homogeneización más poderoso para extraer proteínas de tejidos provenientes de palmeras, por ejemplo un molino eléctrico. Las ventajas de este equipo alternativo es que facilita la labor de

homogeneización, reduce la exposición de las muestras a complejos fenoloxidasas y minimiza los tiempos entre homogeneización - electroforesis y entre homogeneización - almacenamiento de los extractos. Dado que la degradación de las proteínas empieza con el rompimiento celular, es inherente reducir el tiempo de maceración por muestra, el tiempo de exposición a calentamiento y el tiempo de corrida, si se trabaja con extractos frescos (Loomis 1974, Anderson 1968, King 1971, Torres & Tisserat 1980, Miranda et al 1989).

Los tejidos animales pueden ser extraídos con soluciones tampón relativamente simples, pero las plantas requieren soluciones más complejas (Kephart 1990). Los componentes de estas soluciones reducen la interacción entre fenoles y proteínas o sus productos de reacción (King 1971).

El factor más importante que afecta la resolución de las enzimas en el gel es la solución de extracción, aún cuando muchas otras variables pueden contribuir con la pérdida de resolución en los geles, a menudo es difícil aislar el factor con certeza (Kephart 1990, Crawford 1992, Wendel & Weeden 1989, Harris & Hopkinson 1976, Anderson 1968, Loomis 1974, King 1971). La solución de extracción utilizada en este experimento proveyó una adecuada liberalización de las enzimas solubles y protección contra inhibidores de la actividad enzimática. La evidencia de este hecho la proporcionan patrones de bandas definidos para 9 de las 12 isoenzimas ensayadas.

Se considera que también la relación volumen : muestra fue adecuada, pues se produjo alta actividad enzimática con 10 de las isoenzimas estudiadas. Se ha encontrado que volúmenes pequeños de solución de extracción no aglomeran todos los fenoles presentes en los extractos, lo que genera patrones de bandeado degradados, mientras que excesos de solución producen geles con bandas débiles (Kephart 1990).

La solución de extracción dada por Azofeifa (1990), no fue apropiada para extraer proteínas de plantas porque carece de protectores contra los complejos fenólicos. Se observó que la carencia de estos protectores causa degradación de las muestras, la cual se evidencia mediante oscurecimiento de los extractos; como producto de la acción de las fenoloxidasas, las cuales reaccionan con el grupo NH_2 y SH de las proteínas (Loomis 1974).

Los zimogramas de EST, PRX, ACP, DIA, ME, PGI presentaron patrones de bandeado con enzimas secundarias; estudios realizados con Elaeis guinensis, Elaeis oleífera y Phoenix dactylífera (Ghesquiere et al 1984, 1985, 1987; Miranda et al 1989; Torres & Tisserat 1986; Bannanceur et al 1991) mencionan la existencia de isoenzimas secundarias en palmeras. La razón exacta de su presencia nadie la conoce con certeza, pero pueden resultar de aspectos tales como: preparación inadecuada de la muestra, congelamiento, solución de extracción inapropiada, uso de tejido viejo, calentamiento de la muestra

o del gel durante la corrida o simplemente producto de inespecificidad enzimática (PRX, ME, EST, ACP, DIA), su presencia y frecuencia son un peligro para la determinación de las duplicaciones génicas (Kephart 1990, Harris y Hopkinson 1976, Jarret & Litz 1986, Stuber 1991, Simpson & Whitters 1986, Crawford 1992, Wendel & Weeden 1989).

El tejido de hoja resultó ser el mejor de todos los tejidos evaluados, se homogeneizó con menor dificultad que el resto y mostró zimogramas más definidos y claros. Posee las siguientes ventajas: disponibilidad del tejido durante todo el año, fácil de coleccionar, muchos sistemas enzimáticos se pueden evaluar y es un tejido diploide (Kephart 1990, Crawford 1989, Atkinson *et al* 1986, Weeden 1989, Weeden & Gottlieb 1980).

En plantas, son pocos los estudios electroforéticos que se han realizado con tejidos de frutos, ya que los almidones y las grasas interfieren con la corrida y los contenidos proteicos son menores con respecto a la hoja (Kephart 1990).

Ghesquiere (1984) realizó estudios electroforéticos en palma africana y encontró más actividad en tejidos de polen que en tejidos de hojas. Es importante señalar que en este tejido de polen sólo 1 de los alelos está contenido (Crawford 1989); mientras, con los extractos de hojas el problema son las altas concentraciones de fenoles, taninos y pigmentos carotenoides que afectan la actividad de las enzimas; por lo que se debe recurrir al uso de soluciones tampón con alta protección contra

inhibidores enzimáticos para resolver el problema (Kephart 1990, Weeden & Wendel 1989, Loomis 1974, Anderson 1968).

La temperatura de almacenamiento óptima fue -70°C . Los presentes resultados concuerdan con Kephart (1990), quien informa que muestras de plantas almacenadas por 2 años a -70°C mostraron reproducibilidad de zimogramas, lo que indicó que las muestras no se degradaron. Asimismo Wendel y Weeden (1989) agregan que muestras conservadas a -70°C por unos pocos años retuvieron altos niveles de actividad enzimática. Atkinson *et al* (1986) encontraron que los patrones de bandas fueron modificados por congelamiento por varios días a -20°C , al igual que en este experimento.

El método de análisis electroforético discontinuo y nativo en geles de poliacrilamida realizado con el equipo Mini Protean II proporcionó buena resolución para 9 marcadores enzimáticos, es un método útil o conveniente para realizar una evaluación preliminar de marcadores polimórficos con extractos animales o vegetales (Davis 1964). La conveniencia de este método electroforético radicó en la alta resolución de bandas que ofrecen los geles de poliacrilamida, las dimensiones del equipo permiten un ahorro de reactivos de electroforesis y tinción y las corridas fueron más rápidas, no más de una hora. Sin embargo, si desea realizar un estudio de variabilidad genética de mayores proporciones, se recomienda el uso de equipo más grande, que permita una amplia separación de bandas con el fin

de discriminarlas con propiedad, aunque esto ocasione incrementos en los costos de la investigación.

La principal propiedad de los estudios de electroforesis de isoenzimas se basa en el hecho que las bandas pueden ser igualadas con los diferentes alelos de un locus génico o con alelos provenientes de diferentes loci (Crawford 1985, 1989). Estos datos alélicos son utilizados para evaluar la variación genética a nivel de poblaciones y facilita la cuantificación de similitud genética y diferencias entre poblaciones y taxones (Nei 1973). Esta información se torna más valiosa cuando los datos alélicos se comparan con descriptores morfológicos, estudios de citogenética y distribución geográfica (Crawford 1984, 1985, 1989).

En este estudio se encontraron 9 loci polimórficos (PRX, EST, ACP, DIA, MDH, G6PDH, PGI, SOD, PGM) y en especial un locus adicional en los zimogramas de PRX con la raza Guápiles, lo que se considera un marcador discriminatorio para esta raza de Costa Rica, es posible que éste sea producto de duplicación génica, aunque es necesario estudiar mayor número de muestras de esta raza para comprobar su existencia.

Un 80% de los loci revelados mostraron diferentes grados de polimorfismo y algunos de los zimogramas resultaron complejos. La naturaleza del polimorfismo en pejibaye es incierta dada la amplia variabilidad genética mostrada a través de características biológicas y su amplia distribución geográfica.

Estudios realizados en otras palmeras han mostrado evidencia de un polimorfismo elevado, lo que corrobora la existencia del que se visualiza a través de características morfológicas.

Torres y Tisserat (1980) encontraron un 88% de loci polimórficos en Phoenix datylifera para un total de 14 alelos en 8 loci. Ghesquiere (1987) estudió a Elaeis oleifera y encontró 11 enzimas con 14 loci polimórficos y un total de 31 alelos. Bennanceur et al (1991) estudiaron esta misma palmera y encontraron 7 enzimas con alto porcentaje de loci polimórficos (71.4%), alta heterocigosidad (0.436) y una considerable diversidad genética mostrada por 29 genotipos en 31 cultivares.

Hamrick et al (1979) proponen que plantas perennes, alógamas con alta fertilidad y amplia distribución geográfica como las palmeras, por lo general presentan altos niveles de polimorfismo. Kimura (1982) comenta que las palmeras presentan un modelo infinito de alelos y que en estas plantas se han encontrado muchos alelos por locus, donde uno de los cuales se encuentra con mayor frecuencia. Este alto polimorfismo puede obedecer a la naturaleza dioica de estas plantas y su reproducción alógama, o puede ser producto de diferentes condiciones ambientales o la coexistencia de clones genéticamente diferentes (Bennanceur et al 1991).

Se observó variación de fenotipos electroforéticos dentro de plantas de la misma raza y entre plantas de diferente raza;

pero es muy probable que no todo el polimorfismo se revelara si se considera el número de plantas estudiadas por raza. Para obtener diferencias reales de variabilidad genética entre palmeras del mismo origen, se debe muestrear mayor cantidad de plantas, con el fin de reunir la mayoría de alelos, especialmente los alelos raros. Resultados similares a los encontrados para pejibaye fueron comunicados por Ghesquiere (1984) en Elaeis guinensis, donde existe mucha variabilidad entre palmeras del mismo origen geográfico.

El conjunto de información obtenida con el análisis de conglomerados mostró que existen 2 grupos de razas con fenotipos electroforéticos muy diferentes, estos grupos son Guápiles - Darién (PA - C.R.) y Chapare - Belem (BO - BRA) y deja a Yurimaguas (PE) algo distante de ambos grupos, esta raza presentó una relación de distancia intermedia con respecto a los otros dos grupos.

La relación de distancia entre grupos está claramente definida en el dendrograma (Fig.16) mostrado con la enzima diaforasa (DIA), esta condición la convierte en una enzima relevante en estudios isoenzimáticos de pejibaye. Además, esta enzima agrupó las razas Chapare (BO) y Belem (BRA) las cuales poseen similitud morfológica. Mora - Urpi (1993) considera que la raza Belem (BRA) es una subpoblación de Chapare (BO) con base en la similitud morfológica que poseen.

Las isoenzimas PRX, ACP, MDH, DIA (Figs.11, 13, 15 y 16)

presentaron estrechas relaciones de fenotipos electroforéticos entre las razas Chapare (BO) y Belem (BRA). En otras plantas se han encontrado similitudes alozímicas entre razas geográficas, taxonómicamente reconocidas como subespecies o variedades (Doebley *et al* 1984). Se ha sugerido que en algunos casos la falta de divergencia genética entre subespecies puede resultar de factores como: la reproducción cruzada, las grandes distancias de dispersión de polen y semillas, la reciente separación de las subespecies y el flujo génico continuo (Crawford 1985).

Las isoenzimas que agruparon estrechamente las razas Guápiles (C.R) y Darién (PA) fueron MDH, G6PDH, DIA, PGI, SOD y PGM (Figs. 14, 15, 16, 17, 18, 19), aún cuando la morfología entre estas razas es algo disímil. Mora - Urpí (1993) comenta que esta relaciones de similitud fenotípica obedecen a que la raza Guápiles es posiblemente un híbrido entre las razas Darién y Chinamato (Colombia). En los dendrogramas obtenidos con las enzimas PRX y SOD (Figs.11 y 18) la raza Yurimaguas (PE) se presentó como el grupo más alejado; mientras que con las enzimas EST, G6PDH, MDH y PGI (Figs. 12, 14, 15, 17). Yurimaguas comparte alguna relación de similitud con las razas de PA - C.R. (Figs. 13, 16 y 19) y además comparte relación de similitud con las razas BRA - BO. Mora - Urpí (1993) comenta que esta situación coincide con el hecho de que la raza Yurimaguas es posiblemente un híbrido.

CONCLUSIONES

1 -. La mejor homogeneización de muestras se obtuvo con el uso de morteros y pistilos, aunque el método no es 100% eficiente con el total de tejidos estudiados.

2 -. La solución de extracción de proteínas Fosfato 0.1M pH 7.0, 12% PVP-40(w/w), 0.1 M 2- mercaptoetanol, 1.5% BSA con una relación volumen:muestra de 2:1 (3ml:1,5 g) logró aglomerar los fenoles y otros productos de interferencia enzimática de manera adecuada y proveyó zimogramas con bandas definidas.

3 -. El tejido de hoja a pesar de sus altos contenidos fenólicos, de taninos y pigmentos carotenoides, resultó ser el tejido óptimo porque se homogeneizó y clarificó fácilmente, posee mucha actividad enzimática y es un tejido diploide que se puede coleccionar durante todo el año. La cantidad óptima de muestra fue 1.5 g.

4 -. El equipo Mini-Protean II es un sistema conveniente para evaluar polimorfismo isoenzimático de manera preliminar, ya que por sus dimensiones reducidas permite bajar los costos de investigación.

5 - . Diez de los 12 marcadores isoenzimáticos estudiados fueron revelados con el sistema de electroforesis discontinuo

estandarizado en geles de poliacrilamida. Este sistema brindó excelentes resoluciones para SOD, PGI, PGM, G6PDH, MDH, mediana resolución para DIA, PRX, EST, mientras para sistemas como ME Y ACP no se obtuvo la resolución óptima. Con ADH y GOT no se obtuvieron patrones de bandas, lo cual indica que la metodología desarrollada es inapropiada para estas enzimas.

6 -. Un 80% de los marcadores isoenzimáticos evaluados son polimórficos con tejidos de hojas de pejibaye. Los marcadores polimórficos útiles para futuros estudios de variabilidad genética en pejibaye con el presente sistema de electroforesis son: SOD, PGI, PGM, G6PDH y MDH. Otros marcadores polimórficos encontrados fueron: PRX, EST, ACP y DIA, estos presentan patrones de bandas complejos, isoenzimas secundarias y sombras de degradación de la muestra. Si se desean estudiar los polimorfismos de estos marcadores se deben realizar cruces de progenies controlados, para dilucidar con propiedad la constitución genética de estas isoenzimas inespecíficas. Se recomienda el estudio de otros marcadores isoenzimáticos específicos como: GOT, SKDH, GDH, IDH y TPI.

7 -. Se encontró variabilidad fenotípica entre razas y dentro de las razas de los 5 orígenes geográficos y un locus adicional en la raza Guápiles (Costa Rica) con el marcador PRX, la cual se considera un marcador discriminante para la raza; sin embargo, la hipótesis requiere comprobación.

8 - . El análisis de conglomerados reveló que existen dos grupos con fenotipos diferentes, estos son Guápilés (CR) - Darién (PA) y Belem (BRA) - Chapare (BO). La raza Yurimaguas (PE) quedó alejada de ambos grupos.

9 - . Aunque este estudio es ciertamente incompleto, proporcionó un método para el análisis de marcadores isoenzimáticos polimórficos en pejibaye, permitió conocer cuales de estos marcadores fueron polimórficos y cual fue su potencial discriminatorio y además facilitó la comparación de individuos con diferente origen geográfico en cuanto a su fenotipo y expresión de genes. Esta es una herramienta básica preliminar para mejorar el entendimiento y organización de la variabilidad genética en pejibaye o simplemente permite obtener un mejor entendimiento de la estructura y funcionamiento de los genes de plantas.

REFERENCIAS

- Amaya, A.C; D.González & M. Lang. 1984. Agroindustria del pejibaye en Costa Rica. Tesis de grado. Escuela de Ingeniería Industrial. U.C.R. 172p.
- Anderson, J.W. 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry* 7:1973-1988.
- Anderson, J.W. & J. Bernadall 1991. Molecular activities of plant cells. Blackwell Scientific Pub. U.S.A. 357 p.
- Arroyo, L.A. 1990. Zonificación agroecológica del cultivo de palmito de pejibaye. SEPSA (en prensa).
- Atkinson, M.D & L.A. Withers 1986. Characterization of cacao germoplasm using marker I. A preliminary survey of diversity using starch gel electrophoresis and standarization of the procedure. *Euphytica* 35: 741-750.
- Azofeifa, J. 1990. Comunicación personal.
- Baaziz, M. & M.Saaidi. 1988. Preliminary identification of date palm cultivars by esterase isoenzymes and peroxidase activities. *Can. J. Bot.* 66:89-93.
- Bates, H.W. 1962. A naturalist on the river Amazon. University of California Press. Berkeley USA, 465 p.
- Blanco, A; L. Muñoz & V.Garita. 1990. Disponibilidad biológica de los carotenos de pejibaye. Bactris gasipaes como fuente de vitamina A. (En prensa).
- Bolaños, E. 1991. Comunicación personal.
- Benannneur, M; C. Lanaud; M. Chevalier & N.Bounaga. 1991. Genetic diversity of the date palm Phoenix dactylifera L from Algeria revealed by enzyme markers. *Plant Breeding* 107: 56-69.
- Mc Bride, J.F. 1960. Flora of Perú I (2). Field Museum of Natural History Botany, Chicago, USA 2: 1-13.
- Camacho, V.E. 1976. El pejibaye Guilielma gasipaes. In: Simposio Internacional sobre plantas de interés económico de la flora amazónica. 1972. Belem, Brasil. Informes IICA conferencias, reuniones y cursos # 93. pp. 101-106.

- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1988. Reporte Anual 1988. Unidad de Biotecnología. Cali, Colombia, 25 p.
- Clement, Ch. 1985. Descriptores mínimos para el pejibaye (Bactris gasipaes) y sus implicaciones filogenéticas. Tesis Magister Scientiae. Universidad de Costa Rica. 35 p.
- Clement, Ch. 1988. Domestication of the pejibaye palm (Bactris gasipaes): Past and present. *Advances in Economic Botany* 6:155-174.
- Cooz, A. 1984. Efecto de la sustitución de maíz de harina de pejibaye en dietas para pollas de reemplazo durante la etapa de iniciación. Tesis de Licenciatura de la Escuela de Zootecnia. Facultad de Agronomía. San José, Costa Rica. pp. 15-24.
- Crawford, D. 1985. Electroforetic data and plant speciation. *Syst. Bot.* 10: 10-45.
- Crawford, D.J. 1983. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. *In*. Tanksley, S.D. & T.J. Orton (eds). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A*. Elsevier Publ. Amsterdam. pp. 257-287.
- Crawford, D.J. 1989. Enzyme electrophoresis and plant systematics. *In*. Soltis, D.E. & P.S. Soltis. *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press, Oregon USA. pp. 268.
- Crawford, D.J. 1992. Comunicación personal.
- Enzyme Nomenclature. 1984. Recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica. Academic Press. Orlando, USA. sp.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and applications to human serum proteins. *Ann. N. Y Acad. Sci.* 121: 404-427.
- Glassman, S.F. 1972. A review of B.E. Dahlgren's Index of American Palms Phanerogamarum. *Monographiae VI*. pp 36 - 37.
- Ghesquiere, M. 1983. Contribution a l'étude de la variabilité génétique du palmier a huile (Elaeis guinensis Jacq.): Le polimorphisme enzymatique. These. Docteur Ingenieur. Université de Paris-Sud. France. 43 p.
- Ghesquiere, M. 1984. Polymorphisme enzymatique chez le palmier a huile. Control génétique de neuf systemes enzymatiques. *Oleagineux* 39(12):562-574.

- Ghesquiere, M. 1985. Polimorfisme enzimatiq   chez le palmier a huile. Variabilité et structure geneti   de sept origines de palmiers. *Oleagineux* 40(11):529-540.
- Ghesquiere, M. 1987. Polimorfisme enzimatiq   chez Elaeis oleifera H.B.K. Analysé des populations du Bassin amazonien. *Oleagineux* 42(4):145-153.
- Gottlieb, L.D. 1977. Evidence for duplication and divergence of the structural gene for phosphoglucoisomerase in diploid Clarkia franciscana *Genetics* 86: 289 - 307.
- Glottlieb, L.D. 1982. Conservation and duplication of isozyme in plants. *Science* 216:373-380.
- Glottlieb, L.D. 1983. Isozyme numbers and phylogeny. In: *Proteins and nucleic acids in plant systematics*. Springer - Verlag Press, Berlin, Alemania. 38 p.
- Hames, B.D. & D.Rickwood 1987. Gel electrophoresis in human genetics. North Holland Publishing Co. Amsterdam. pp. 1-15.
- Hamrick, J.L; Y.B. Lenhart & J.B. Mitton. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol.Syst.* 10: 173 - 200.
- Harris, H. & D.A. Hopkinson. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland Publishing Co. Amsterdam. pp 35- 57.
- Huber, J. 1906. A origen da Pupunha. *Boletim do Museum Goeldi* 4: 474-476.
- Hussain, A., H. Ramírez & W.M. Roca. 1986. Manual práctico para la detección electroforética de isoenzimas y otras proteínas. CIAT. Cali, Colombia. 53 p.
- Hussain, A; W.Bushuk; H. Ramírez & W Roca. 1988. A practical guide for electrophoresis analysis of isoenzymes and proteins in cassava, field beans and forage legumes. Working document # 40 Jul-Jun 1988. CIAT. Cali, Colombia. 51 p.
- Jarret, R.L. & R.E. Litz. 1986. Enzyme polymorphism in Musa acuminata . *The Journal of Heredity* 77: pp. 183-188.
- Kay, L.E. & D.R. Basile. 1987. Specific prx isozymes are correlated with organogenesis. *Pl. Physiol.* 84: 99-105.

- Kelley, W.A. & R.P. Adams. 1977. Preparation of extracts from juniper leaves for electrophoresis. *Phytochemistry* 16:513-516.
- Kephart, S.R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: A comparative analysis of techniques. *Amer. J. Bot.* 77(5): 693-712.
- Kimura M. 1982. The neutral theory as a basis for understanding the mechanism of evolution and variation at the molecular level. In: *Molecular evolution, protein polymorphism and the neutral theory*. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg. New York. 363 p.
- King, E.C. 1971. Extration of cotton leaf enzymes with borate. *Phytochemistry* 10: 2337-2341.
- Koehn, R.K., A.J. Zera & J.G. Hall. 1983. Enzyme polymorphism and natural selection. In: *Evolution of genes and proteins*. Masatoshi N. & R.K. Koehn (eds). Sinauer Associates Inc. USA. 331 p.
- Lannaud, M.H. 1992. Comunicación personal.
- Lleras, E.D. & D. Coradin 1983. Critical areas of palm distribution in the Americas, for collection, evaluation and conservation. EMBRAPA, Brasil. sp. Mimeografiado.
- Loomis, W.D. 1974. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods in Enzymology* 31: 528 - 545.
- Macaya, G. 1991. Comunicación personal.
- Market, C.L. & F. Moller 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, autogene and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 45: 753 - 763.
- Miranda, S.M. & M.A. Mastrinier 1989. Isozyme extraction from nature oil palm (*Elaeis guineensis*) leaves for electrophoretic studies. *Rev. Bras. Genet.* 12(3): 655 - 657.
- Moore, H.E. 1973. The major groups of palms and their distribution. L.H. Baley Hortorium. USA. 115 p.
- Mora-Urpí, J. 1981. Aspectos taxonómicos relativos al pejibaye (*Bactris gasipaes*). *Rev. Biol. Trop. (CR)* 29(1):139 - 142.
- Mora-Urpí, J. 1982. Composición química del aceite de pejibaye. *ASBANA* 6(18):19 - 20.

- Mora-Urpí, J. 1984. El pejibaye (Bactris gasipaes): Origen, biología floral y manejo agronómico. In: Palmeras poco utilizadas de América Tropical. FAO-CATIE Imprenta Lil S.A. Turrialba, Costa Rica pp. 61.
- Mora-Urpí, J. 1990. El pejibaye una visión integral. Seminario de cultivos tropicales. Escuela de Biología U.C.R. sp.
- Mora-Urpí, J. 1992. Pejibaye. (En prensa).
- Mora-Urpí, J. 1993. Comunicación personal.
- Murillo, R & M.A. Kronenberg. 1983. Estudio de la harina de pejibaye (Guilielma gasipaes) como sustituto en la alimentación animal. *Agronomía y Ciencia* 1 (2):24-27.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 70: 3321-3323.
- Nevo, E. 1987. Plant genetics resources: Prediction by isozyme markers and ecology isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research 16: 247-267.
- Pasteur, N.G. & T.L. Pasteur. 1988. Practical isozyme genetics. Ellis Horwood Ltd. England. 214 p.
- Pitel, J.A. & W.M. Cheliak. 1985. Effectiveness of protective agents for increase activity of five enzymes from vegetative tissues of white spruce. *Can. J. Bot* 64: 39-44.
- Prance, G.T. 1982. Migrations and uses of Carica papaya and Guilielma gasipaes. 44th Congress Americ. Manchester. sp.
- Ramírez, P. 1990. Comunicación personal.
- Sánchez, I. 1988. Etude de la variabilité genétique de Terminalia superba Engler & Diels ARBRE forestier d'Afrique Tropicale. These. Université Paris VII. France pp. 128.
- Simpson, M.J. & L.A. Whitters. 1986. Characterization of plant genetic resources using isozymes electrophoresis. Internatonal Board for Plant Genetics resources. Roma. pp.101.
- Soltis, D.E. & P.S. Soltis 1989. Isozymes in plant biology. Dioscorides Press. USA. pp. 259
- Stuber, Ch. 1991. Isozyme markers and their significance in crop improvement. In: Biochemical aspects of crop improvement. Khanna, K.R. CRC Press. USA pp. 60-75.

- Tomlinson, P.B. 1961. Anatomy of the monocotyledons III Palmae. Clarendon Press. Oxford. 453 p
- Torres, A.M. 1974. Genetics of sunflower alcohol dehydrogenase: Adh2, nonlinkage to Adh2 and adh1 early alleles. *Biochem. Genet.* 12: 385-392.
- Torres, A.M. & B.Tisserat. 1980. Leaf isozyme as genetic markers in date palms. *Amer. J. Bot* 67:162-167.
- Uhl, N.W. & J. Dransfield. 1987. A clasification of palms based on the work of H.E. Moore Jr. Allen Press. Kansas. USA. p 607.
- Valdez, M.F. 1991. Comunicación personal.
- Vavilov, N.I. 1951. The origin, variation, inmunity and breeding of cultivated plants. *Chronica Botanica* 13:1-364.
- Vallejos, C.E. 1983. Enzyme activity staining. In: Tankley, S.D. & T.J. Orton (eds). *Isozymes in plant breeding. Part A.* Elsevier Science Pub.B.V. Amsterdam. pp 482-507.
- Wallace, A.R. 1853. Palm trees of amazon and their uses. Londres. Van Voorst 129 p.
- Weeden, N.F. 1989. Applications of isozymes in plant breeding. *Plant Breeding Reviews* vol 6. pp. 54.
- Weeden, N.F. & L.D. Gottlieb. 1980. The genetics of chloroplast enzymes. *Jour. Hered.* 71: 392-396.
- Wendel. F.J. & N.F. Weeden. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis, D.E. & P.S. Soltis. *Isozymes in plant biology.* Dioscorides Press.USA. 259 p.
- Wyn, C.H. 1974. The structure and function of enzymes. The Institute of Biology's Studies in Biology. Vol 42. pp. 32-38.

APENDICES

APENDICE 1. Protocolos de los geles nativos usados para el análisis de isoenzimas en Bactris gasipaes.
Modificaciones de los protocolos dados por Hames & Rickwood (1987).

| Componentes del gel | Gel espaciador Vf = 5 ml | | Gel separador Vf = 6 ml | |
|---|-----------------------------|--------|----------------------------|-------|
| | 5% | 7% | 8% | 10% |
| Agua destilada | 2.9ml | 3.7ml | 3.33ml | 2.3ml |
| Sol. Tampón del gel Tris Hcl 1M pH 6.8 | 1.25ml | | | |
| Sol. Tampón del gel Tris Hcl 1.5M pH 8.7 | | 0.91ml | 1.04ml | 1.3ml |
| Acilamida 30 % ** | 813ul | 1.4ml | 1.6ml | 2.0ml |
| Temed* | 6ul | 5.6ul | 6.4ul | 8ul |
| Persulfato 10 % ** | 23ul | 22.4ul | 25.6ul | 32ul |

* El temed se encuentra en una relación de 1:4 con respecto al persulfato.

** El persulfato al 10 % y la acilamida al 30 % se prepararon con anticipación, se hicieron alicuotas de 5 y 10 ml respectivamente y se almacenaron a - 20°C hasta que se usaron.

APENDICE 2. Protocolos de tinción de 12 isoenzimas ensayadas con extractos de hojas de pejobaye.

PEROXIDASA (PRX).(E.C.1.11.1.7) CIAT 1990.

| | |
|---|---------|
| Acetato de sodio 0.2 M pH 5.0 | 50 ml |
| 3-Amino 9-etil carbazol (disueltos en 5 ml de NN dimetil formamida) | 40 mg |
| Peróxido de hidrógeno al 3% | 7 gotas |

Función: Vías oxidativas (oxidación de IAA, destoxificación de peróxidos orgánicos), procesos de senescencia.

ESTERASA (EST).(E.C.3.1.1.2) CIAT 1990.

| | |
|--|------------------------|
| Solución fosfato de sodio 0.2M pH 6.8: | |
| Disodio hidrógeno ortofosfato 0.15 M | 30 ml |
| Sodio hidrógeno ortofosfato 0.15 M | 20 ml |
| Alfa- naftil acetato | 0.04gr/3ml acetona. |
| Beta- naftil acetato | 0.04gr/3ml acetona. |
| Fast Garnet GBC sal | 0.02 grs. |

Función: Hidrólisis de ésteres.

FOSFATASA ACIDA (ACP).(E.C.3.1.3.2) Harris & Hopkinson 1976.

| | |
|-----------------------------------|------|
| Tampón Citrato 0.05 M pH 4.5 | 50ml |
| Alfa - Sodio naftil fosfato ácido | 50mg |
| Beta - Sodio naftil fosfato ácido | 50mg |
| Fast garnet GBC sal (colorante) | 50mg |

Función: Hidrólisis de ésteres fosfatos

ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH).(E.C.1.1.1.1) Harris & Hopkinson.1976.

| | |
|------------------------|----------|
| Tris HCl 0.05 M pH 8.6 | 25ml |
| Etanol absoluto | 3ml |
| NAD | 20mg |
| MTT | 10mg/2ml |
| agua PMS | |
| 4mg/0.8ml agua | |

Función: Fermentación alcohólica, oxidación de alcoholes, reducción de acetaldehídos a etanol.

MALATO DESHIDROGENASA (MDH).(E.C.1.1.1.37) CIAT 1990.

| | |
|-------------------------|---------|
| Tris malato 0.1M pH 5.0 | 50ml |
| L- ácido málico | 20mg |
| NAD | 20mg |
| MTT | 8 mg |
| PMS | trazas. |

Función: Ciclo del ácido tricarbóxico, oxidación de malato a acetato, fotorespiración.

ENZIMA MALICA (ME).(E.C.1.1.1.40) CIAT 1990.

| | |
|-------------------------|--------|
| Tris malato 0.1M pH 7.2 | 45ml |
| Mgcl ₂ | 5 ml |
| L- ácido málico | 20mg |
| NADP | 10mg |
| MTT | 6 mg |
| PMS | trazas |

Función: Ciclo del ácido cítrico (cataliza la formación de ácidos dicarbóxicos de CO₂ y precursores de 3 carbonos.

**GLUTAMATO OXALATO TRANSAMINASA (GOT).(C.E 2.6.1.1) Vallejos
1983.**

| | |
|--------------------------|-------|
| A. Tris Hcl 0.1 M pH 8.5 | 100ml |
| Alfa-Cetogluturato | 100mg |
| Acido aspártico | 200mg |
| B. Pyridoxal-5-p | 10 mg |
| Fast blue BB sal | 150mg |

Función: Metabolismo de los aminoácidos.

DIAFORASA (DIA).(E.C.1.6.4.3) CIAT 1990.

| | |
|----------------------------|--------|
| Tris Hcl 1M pH 8.5 | 5 ml |
| Agua | 45 ml |
| NADH | 20 mg |
| MTT | 10 mg |
| 2,6 diclorofenol indofenol | trazas |

Función: Participa en catálisis de la vía oxidativa.

**GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA(G6PDH).(E.C.1.1.1.49) CIAT
1990.**

| | |
|------------------------------|--------|
| Tris Hcl 1M pH 7.5 | 5 ml |
| Agua | 45 ml |
| MgCl2 0.1 M | 0.5ml |
| Glucosa 6-fosfato (mono-sal) | 20 mg |
| NADP | 10 mg |
| MTT | 10 mg |
| PMS | trazas |

Función: Ciclo de Calvin, Ciclo Pentosa Fosfato.

**SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD).(E.C.1.15.1.1) Harris y Hopkinson
1976.**

| | |
|-----------------------|--------|
| Tris Hcl 0,05M pH 8.0 | 50 ml |
| NADP | 10 mg |
| MTT | 10 mg |
| MgCl ₂ | 50 ul |
| PMS | trazas |

Función: Inactivación de radicales superóxido.

FOSFOGLUCOISOMERASA (PGI).(E.C.5.3.1.9) CIAT 1990.

| | |
|------------------------------------|--------|
| Tris Hcl 1M pH 8.0 | 5 ml |
| Agua | 40ml |
| MgCl ₂ 0.1M | 1 ml |
| G-6PDH | 4 ul |
| Fructuosa 6 fosfato deshidrogenasa | 10mg |
| NADP | 6 mg |
| MTT | 6 mg |
| PMS | trazas |

Función: Glicólisis, síntesis de almidón.

FOSFOGLUCOMUTASA (PGM).(E.C.2.7.5.1) CIAT 1990.

| | |
|----------------------------------|--------|
| Tris HCL 1M pH 8.0 | 5 ml |
| Agua | 45ml |
| Cloruro de Magnesio 0.1 M | 1 ml |
| Glucosa-1-fosfato | 25mg |
| Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa | 8 ul |
| Glucosa 1,6 difosfato | trazas |
| NADP | 6 mg |
| MTT | 6 mg |
| PMS | Trazas |

Función: Cataliza la interconversión de glucosa 1-P y glucosa 6-P en la reacción que une el metabolismo del Ciclo de Calvin con el metabolismo de carbohidratos en el cloroplasto y con el metabolismo de la sacarosa en el citosol.

APENDICE 3. Estructura, distribución subcelular y número de isoenzimas encontradas en otras plantas de interés económico.

| Enzima | Isoenzimas | Localización | Estructura |
|--------|------------|--------------|------------|
| ACP | 2-4 | Varias | M,D. |
| ADH | 1-3 | C | M,D. |
| DIA | 1-4 | C,P,MT | M,D. |
| EST | 2-20 | C | M,D. |
| G6PDH | 2 | C,P | D. |
| PGI | 2 | C,P | D. |
| MDH | 3 | C,MT,MB | D. |
| ME | 1 | C | T. |
| PRX | 2-13 | C,Pc | M,D. |
| PGM | 2 | C,P | M,D. |
| SOD | 3 | C,P,MT | D,T. |
| GOT | 4 | C,P,MT,Mc | D |

Fuente de información: Soltis & Soltis 1989.

Localización:

C = Cloroplasto
 P = Plastidos
 MT= Mitocondria
 Pc= Pared celular
 Mc= microcuerpos

Estructura:

M = Monómero
 D = Dímero
 T = tetrámero

APENDICE 4. Ordenamiento cualitativo de razas según su fenotipo.

| Fenotipos | Razas |
|-------------|---------------------------------------|
| PRX. | |
| 1 | PA, BO |
| 2 | CR, PE, CR |
| 3 | CR, CR |
| 4 | BRA, BO, BRA |
| 5 | BO, PA |
| 6 | PE |
| 7 | PA, BRA |
| 8 | PE, PE |
| 9 | BO, BRA, BO, BRA |
| 10 | CR* |
| 11 | PA, PA |
| 12 | PE |
| EST. | |
| 1 | CR, PE |
| 2 | PA |
| 3 | BO |
| 4 | BO |
| 5 | CR, PA, BO, PA |
| 6 | BRA, BO |
| 7 | BRA, BO |
| 8 | CR, BRA, BRA |
| 9 | BRA |
| 10 | PE, PA, CR, PE, CR |
| 11 | PE, PE |
| 12 | PA |
| ACP. | |
| 1 | BO, PE, PE, BRA, BO, BRA, BO, BRA, BO |
| 2 | PA, PE |
| 3 | CR, CR |
| 4 | BO, CR |
| 5 | PA, BO |
| 6 | PE, PA |
| 7 | BRA, BRA |
| 8 | PE, PA |
| 9 | CR, CR |

DIA.

| | |
|----|-------------|
| 1 | PA, BRA |
| 2 | CR, PA |
| 3 | CR, PE, PA |
| 4 | BRA, PE |
| 5 | BO, CR |
| 6 | PE, PA |
| 7 | CR |
| 8 | PE |
| 9 | BRA |
| 10 | BRA, PE, BO |
| 11 | BO, PA, CR |
| 12 | BRA |
| 13 | BO |
| 14 | BO |

MDH.

| | |
|---|-------------------------------------|
| 1 | CR |
| 2 | PE |
| 3 | BO, BRA, BO, BRA, BRA, BO |
| 4 | BO |
| 5 | CR, PA, PA, PA, CR, PA, CR, BRA, PE |
| 6 | PE, PE, PA, PE, BO |
| 7 | CR |
| 8 | BRA |

GGPDH.

| | |
|---|---|
| 1 | BO, PA, PE, PA, CR, BRA, PE, CR, PE, PA, PA, CR, CR, BRA. |
| 2 | BRA, PA |
| 3 | BO, BO |
| 4 | CR, PE |
| 5 | BO, BRA |
| 6 | BO |
| 7 | BRA, PE |

PGI.

| | |
|---|----------------------------|
| 1 | CR, PE, PA, CR |
| 2 | BO, BR, BO, BO, BO |
| 3 | BRA, BRA |
| 4 | PA, CR, CR, PA, PE, PA, PE |
| 5 | BRA |
| 6 | CR, PE, PA |
| 7 | BO |
| 8 | BRA |
| 9 | PE |

SOD.

| | |
|----|------------------------------|
| 1 | PE, BRA, BRA |
| 2 | PE |
| 3 | PE |
| 4 | CR |
| 5 | PA, CR, BO, BRA, BRA, PA, PA |
| 6 | BO, PA, CR, BO, PA, CR |
| 7 | PE |
| 8 | CR |
| 9 | BO, BRA |
| 10 | PE, BO |

PGM.

| | |
|---|---|
| 1 | PA, CR, PA, CR, PA |
| 2 | PA, CR, PE, BRA, BRA, PE, PA, PE, BRA, BO, CR |
| 3 | CR, BRA, BO, PE, PE, BO, BRA, BO, BO |