

La Electroforesis de Isoenzimas: principios y aplicaciones en el cultivo de la yuca

Alexandra V. Schmidt H., Morela Fuchs y Francia Fuenmayor.
CENIAP/INIA, Maracay, Venezuela
aschmidt@inia.gob.ve, mfuchs@inia.gob.ve,
ffuenmayor@inia.gob.ve

Revisores: Efraín Salazar (esalazar@inia.gob.ve)
Yusely Zambrano (azambrano@inia.gob.ve)

Sumario

Introducción

La técnica de electroforesis

1. Definición, principio y utilidad
2. Principios básicos físico-químicos
3. Extracción. Selección del tejido y de la solución tampón

Moléculas objeto de estudio: proteínas e isoenzimas

- a. Conceptos generales
- b. Localización subcelular de las enzimas
- c. Control genético de las moléculas proteicas

Componentes y funciones de las soluciones tamponadoras en el proceso electroforético

Selección de la matriz electroforética adecuada

Electroforesis tipo en sistemas de geles de poliacrilamida

Desnaturalización de proteínas con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)

Principios de la tinción proteica y enzimática

Lectura de los zimogramas

Limitaciones de las técnicas de electroforesis enzimática para caracterización de genotipos

Glosario

Introducción

El incremento de nuevos cultivares desarrollados por mejoramiento genético demanda de nuevas tecnologías para una identificación objetiva, eficiente, práctica y rápida de los mismos. Hasta mediados de los sesenta, la información más cercana acerca de la constitución genética de cualquier cultivo se obtenía sólo analizando sus caracteres morfológicos, basados en el uso de descriptores. Para mejorar la precisión en la caracterización genética de los individuos, surgen las técnicas de electroforesis, ganando popularidad para su uso en muchos cultivos. Dentro de las técnicas electroforéticas, los marcadores isoenzimáticos ofrecen ampliar la información genética disponible para diversas aplicaciones, con la ventaja de ser técnicas de relativo bajo costo y accesibles para la evaluación molecular. A pesar de que es limitado el número de isoenzimas para la caracterización de genotipos, distintos loci enzimáticos pueden ser analizados rápida y simultáneamente.

Específicamente para el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), existen experiencias tales como las de Hussain y col. (1987), De Oliveira y col. (1992) y Lefèvre y Charrier (1993 a y b) quienes han caracterizado enzimáticamente cultivares mediante el uso del sistema -esterasas. En estudios de caracterización de bancos de germoplasmas de yuca mediante los sistemas peroxidadas, -esterasas y proteínas totales (Schmidt, 2000). Han detectado variabilidad genética mediante el estudio electroforético de esterasas, peroxidadas y proteínas totales, evaluado variación somaclonal inducida mediante cultivo *in vitro* (González y col., 2002). También han desarrollado estudios de tolerancia al estrés hídrico haciendo uso de electroforesis de esterasas para conocer su base molecular (Lokko y col., 2007).

El objetivo de este trabajo radica en poner a la disposición de los usuarios un documento de fácil acceso y comprensión sobre la técnica de electroforesis de isoenzimas haciendo énfasis en el cultivo de la yuca.

La técnica de electroforesis

Definición, principio y utilidad

El término electroforesis fue creado por Michaelis en el 1909, para describir la migración de los iones por la influencia de un campo eléctrico, ya que se cumple con un principio simple "las moléculas con carga negativa migran para el polo positivo, y las de carga positiva al polo negativo" (Brune y Alfenas, 1998a).

La electroforesis es una técnica relativamente simple, rápida y de alto valor informativo. Su aplicación en la identificación de proteínas ha sido aplicada en estudios de taxonomía, fisiología y genética de plantas, animales y

microorganismos. La electrofóresis también puede ser empleada en la determinación de pesos moleculares de proteínas y en la caracterización de moléculas como los ácidos nucleicos DNA y RNA (Alfenas y col., 1991).

En el caso de las isoenzimas de plantas, la técnica es una herramienta analítica, que consiste en colocar un extracto proteico de tejido de en un medio de soporte (papel, almidón, poliacrilamida, etc.) sometido a un campo eléctrico durante varias horas; el campo eléctrico provoca que las diferentes isoenzimas migren en el medio según sus cargas eléctricas. Después de esta operación, el gel se incubaba en una solución que contiene tanto el sustrato, sobre el cual actúa la enzima que se desea separar, como los cofactores necesarios, más un tinte que se acopla al producto de la reacción. La isoenzima se visualizan como bandas de color que aparecen en el gel (Quiroz, 1991).

Principios básicos físicos-químicos

La intensidad del campo eléctrico depende de la diferencia de potencial entre los polos negativo y positivo del campo, diferencia que se genera por la aplicación de un voltaje determinado al sistema, teniéndose que a mayor voltaje, existirá una mayor diferencia de potencial, y por ende, una mayor intensidad del campo eléctrico (leyes fundamentales de electricidad).

En forma general se ha establecido la convención de que la primera magnitud de la fuerza de migración va a ser establecida por la corriente eléctrica medida en voltaje. De forma tal que, manteniendo todas las condiciones, a mayor voltaje mayor fuerza eléctrica, por ende mayor velocidad de migración de las partículas (Salazar, s.f.). Al acoplar esta información con la electroforesis de proteínas, algunos aminoácidos que la constituyen pueden estar ionizados (cargas positivas o negativas), dependiendo de la suma de cargas parciales de los aminoácidos presentes en ella (carga eléctrica bruta o carga total) y del pH del medio donde se encuentran (Lehninger, 1972; Gontijo y Césare, 1995). Durante la electroforesis se deben tomar en cuenta otros tipos de factores, tales como la densidad o concentración del gel y el tamaño de la partícula o sustancia migratoria (Salazar, s.f.).

La electroforesis puede ser desarrollada con un voltaje (V), en la mayoría de los casos es constante, una intensidad de corriente (mA) y/o una potencia (W) constantes, facilitado por una fuente de poder adecuada (Gontijo y Césare, 1995).

Ya que el calor es un factor de suma importancia para el desarrollo de la electroforesis, se debe tener en cuenta la definición de formas eficientes de disiparlo, sin provocar cambios térmicos desiguales en la matriz de migración.

Específicamente para el caso de yuca se han utilizado las siguientes condiciones eléctricas 50 V durante los primeros 20 minutos de corrida, con libre intensidad y poder; y luego 15 mA por gel con corriente de 10 a 30 V y poder libre 0,2 a 2 W. Variando el tiempo de corrida entre 5 y 6 horas (Fuenmayor y col., 2001).

Extracción: Selección del tejido y de la solución tampón

a. El tejido

Una de las principales características que permite el uso de las isoenzimas para evaluación de materiales genéticos, son las múltiples formas de enzimas detectadas con especificidad por tejido o por célula. La abundancia de isoenzimas es diferente para las distintas células, según el estado de diferenciación (Markert, 1977). Así, que se debe garantizar que la molécula se encuentre en concentración adecuada para que sea detectada por la electroforesis. El sistema de aislamiento de la muestra debe ser efectivo, se debe escoger el tejido y la solución de extracción adecuada, para aislar la sustancia deseada y evitar su descomposición (Salazar, s.f). La mayoría de los tejidos vivos de las plantas pueden ser usados para el análisis de proteínas e isoenzimas; sin embargo, tejidos tales como hojas, polen, raíces y semillas han sido preferidos por su facilidad de obtención y extracción. El tejido es preferiblemente que esté fresco, sean muestras de campo o invernadero (Wendel y Weeden, 1989). Cualquiera que sea el tejido, es fundamental que se encuentre en la misma condición fisiológica y ontogénica, para lograr comparaciones valederas. La selección del material siempre dependerá de los objetivos de estudio y de la facilidad de obtención, maceración y extracción de las proteínas, para lograr actividad enzimática detectable (Alfenas y col., 1998; Peters, 1998).

Entre los problemas durante la extracción de proteínas y enzimas se cuenta la presencia de compuestos fenólicos, los cuales son oxidados a quinonas por enzimas de las plantas (polifenoloxidasas y peroxidadas). En yuca se han utilizado tejido foliar y raíces de plantas jóvenes (Hussain y col., 1987, Ramírez y col., 1987, Schmidt, 2000) y también se han realizado análisis de tejido foliar de plantas adultas y raíces reservantes (Polanco, 1998).

b. La solución tampón de extracción

El objetivo principal de la extracción es la ruptura de la célula en la menor cantidad de tiempo posible, sin deterioro excesivo. La preparación de una muestra proteica es delicada, debido a todas las interacciones que existen entre las proteínas y los constituyentes

celulares (Díaz, 1997). Durante el proceso de extracción, el rompimiento de las células y de sus compartimientos impone a las enzimas a ambientes físico-químicos capaces de inactivarlas, tales como variaciones de pH, oxidaciones y formaciones de complejos con otros compuestos celulares, estos factores deben ser controlados mediante el uso de soluciones tampones, existiendo una gran gama de soluciones estudiadas (Peters, 1998).

Son frecuentes las soluciones tamponadoras (por ejemplo Tris HCl, Tris Borato, etc.) que evitan cambios violentos de pH, junto con estabilizadores osmóticos (por ejemplo, sacarosa, manitol,), antioxidantes (p.ej. -mercaptoetanol, polivinil pirrolidona) y cualquier otra sustancia que mantenga estable a las moléculas (p.ej., glutatión). Algunas veces se requiere ruptura de enlaces lipoproteicos o enlaces proteína-proteína, para ello se usan detergentes no iónicos (p.ej. Tween-20 o Tritón X-100) (Salazar, s.f.). Para evitar la oxidación se usan compuestos antioxidantes en la solución de extracción como polivinil pirrolidona 40.000 o -mercaptoetanol (Alfenas y col. 1998; Anderson, 1968; Kephart, 1990; Díaz, 1997).

Otros aspectos importantes a considerar en el proceso de extracción son:

- a) La temperatura del procesamiento, generalmente deben mantenerse por debajo de los 4°C, para evitar la desnaturalización de proteínas y pérdida de actividad enzimática;
- b) La proporción de solución de extracción:tejido, la cual debe garantizar la actividad enzimática, empleando un máximo de solución de extracción por un mínimo de tejido.
- c) La composición de la solución de extracción puede variar con la especie y el tipo de tejido, la cual sólo puede ser determinada experimentalmente (Alfenas y col., 1998).
- d) La centrifugación del extracto para evitar sedimentos que puedan taponar la matriz de migración (Salazar, s.f).

En el caso de yuca se han probado diferentes soluciones tampón para la extracción de proteínas e isoenzimas tal como el Tris (1,125M)-Borato (0,019M) a pH 8,3 (Husain y col.,1987) Tris HCl 0,05M pH8,3 modificado (Husain y col.,1987), Tris (1,125M)-Borato (0,019M) (Polanco, 1998), Tris Base pH 8,3 (Schmidt, 2000), de los cuales Tris HCl pH 8,3 da las mejores resoluciones de bandas cuando se utilizan muestras de hojas y raíces de plantas jóvenes (Hussain y col., 1987; Schmidt, 2000)

Localización subcelular de las enzimas

En la especificidad de las isoenzimas está implícito el aspecto de que cada isoenzima tiene una particular y muy diferente función metabólica en la

fisiología de la célula. Tal función es obvia cuando las isoenzimas ocupan diferentes localizaciones topográficas dentro de la célula. Un ejemplo que se presenta es la malato-deshidrogenasa (MDH), la cual posee una isoenzima ubicada en la mitocondria y otra en el citosol. Aunque estas isoenzimas catalizan la misma reacción, obviamente, están en diferentes localizaciones, participando en diferentes vías metabólicas (Markert, 1977).

Weeden y Wendel (1989) comentan que las dos características más importantes de todo sistema isoenzimático son la estabilidad en el número de locus que intervienen en su presencia y la localización subcelular del sistema. Resaltan el aspecto de que para enzimas con funciones bioquímicas bien definidas, y en especial las que actúan en las vías del metabolismo primario, como por ejemplo Embden-Meyerhof y la vía de la pentosa fosfatasa, los ciclos de Krebs y Calvin, y las biosíntesis de aminoácidos, presentan aspectos tales como número de locis predecible, conservación de la localización subcelular y de la subunidad estructural. Mientras que sistemas tales como la fosfatasa ácida, NAD(P)H, diaforasa, esterasa, peptidasa y peroxidasa muestran una considerable variación en el número total de enzimas que se expresan, en el número de enzimas por compartimiento subcelular y el número de subunidades por enzima.

Los sistemas enzimáticos se clasifican según el nivel de variabilidad genética presente en ellos en: las enzimas del grupo I, las cuales actúan sobre un sustrato fisiológico único, son enzimas reguladoras, y la mayoría están relacionadas con el metabolismo intermediario, en la glicólisis o en el ciclo de Krebs; mientras que las del grupo II, como las esterasas, fosfatasas, peroxidases, alcohol-deshidrogenasa y aldehído-deshidrogenasa, son enzimas que utilizan sustratos múltiples, frecuentemente de origen externo, y que responden directamente a la variabilidad ambiental, y son menos numerosas que las del grupo I, porque tienen funciones más generalizadas en las células (Peters, 1998). La variabilidad genética en el grupo I es más baja y los sustratos utilizados son, generalmente, producidos dentro de la célula, mantenidos más estables y equitativamente por los procesos que controlan la homeostasis* en el organismo.

En el caso de yuca se han estudiado diferentes sistemas isoenzimáticos, tales como los que se muestran en el Cuadro 1. Trabajos publicados por Hussain y col., 1987, Schmidt, 2000 y González, 2002, donde coinciden en que las esterasas y las peroxidases son los sistemas más adecuados para detectar variabilidad entre los clones de este cultivo.

Además, dicho efecto no necesariamente sería uniforme para cada sustancia, por consiguiente surge la necesidad de emplearse soluciones

* Ver definición en glosario.

tampones entre los electrodos para evitar variaciones bruscas en el pH del medio electroforético (Salazar, s.f). De todo ello, Alfenas y Brune (1998) recomiendan que la única manera de seleccionar la solución tampón y el respectivo valor de pH, es de forma experimental.

La combinación de la solución tamponadora gel-electrodo utilizada para la corrida electroforética de extractos de hojas y raíces de plantas jóvenes es la recomendada por Alfenas y Brune (1998), la cual es Tris HCl pH 8,3 para el gel y Tris Glicina pH 8,3 para el electrodo (Polanco, 1998; Schmidt, 2000).

Componentes y funciones de las soluciones tamponadoras en el proceso electroforético

Durante esta fase es de suma importancia contar con unas condiciones equilibradas del campo eléctrico a fin de garantizar la uniformidad en la separación de las distintas moléculas estudiadas, porque la movilidad de las partículas podría verse afectada seriamente mediante cambios bruscos en la acidez de la matriz, debido a que la mayoría de las moléculas al separarse, contienen grupos aniónicos y catiónicos en su estructura, cuyas cargas eléctricas pueden alterarse por variaciones del pH del medio (Hoffman y Chalkley, 1976).

Selección de la matriz electroforética adecuada

El soporte de corrida debe ser de condición química y física inerte, para no interferir en la movilidad de las moléculas (Sargent y George, 1975). Ahora bien, como la electroforesis se refiere al simple movimiento de iones a través de un campo eléctrico, la misma puede realizarse tanto en soluciones libres, como en medios sólidos. Estos últimos han representado una gran ventaja, sobre todo a la hora de almacenar por algún tiempo la información, o con fines de fotografía, para facilitar el registro de la información.

En tal sentido se han preferido los medios gelatinosos, de poca o ninguna interacción iónica con las moléculas que migran a través de ellos, como por ejemplo los geles de agarosa, almidón, poliacrilamida, etc. (Gontijo y Césare, 1995).

La selección de la matriz adecuada va a depender del tipo de molécula a separar (Salazar,s.f), del investigador y de los objetivos de estudio (Gontijo y Césare, 1995). Para tal fin, es conveniente conocer que el gel de agarosa presenta poros de mayor tamaño que los geles de almidón, y estos a su vez poros mayores que los de poliacrilamida. Por lo tanto, los dos primeros son recomendados para separar moléculas de elevado peso molecular.

Cuadro 1. Localización subcelular, número de isoenzimas y estructura cuaternaria de los 21 sistemas isoenzimáticos seleccionados.

Sistema	Número de Isoenzimas	Distribución Subcelular	Estructura Cuaternaria
Fosfatasa Acida E.C. 3.1.3.2. ACP	2-4	varia	m,d
Aconitato Hidratasa E.C. 4.2.1.3 ACO	1-3	c,mt	M
Alcohol Deshidrogenasa E.C. 1.1.1.1. ADH	1-3	c	D
Catalasa E.C. 1.11.1.6 CAT	1	mc	T
Formaldehido Deshidrogenasa E.C. 1.2.1.1 FDH	1	desconocido	D
Esterasas C.E. 3.1.1.1 EST	2-10	c	m,d
Glutamato Deshidrogenasa-NADP E.C. 1.4.1.2-4 GDH	1	c	H
Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa E.C. 1.1.1.49 G6PDH	2	c,p	D
Glutamato Oxaloacetato Transaminasa E.C. 2.6.1.1 GOT	4	c,p,mt,mc	D
Isocitrato Deshidrogenasa E.C. 1.1.1.42 IDH	1	c	D
Lactato Deshidrogenasa E.C. 1.1.1.27 LDH	1	c	D
Malato Deshidrogenasa -NADP E.C. 1.1.1.40 ME	1	c	T
Malato Deshidrogenasa-NAD E.C. 1.1.1.37 MDH	3	c.mt,mc	D
Fosfogluconato Deshidrogenasa E.C. 1.1.1.44 PGD	2	c,p	D
Fosfoglucoisomerasa E.C. 5.3.1.9 PGI	2	c,p	D
Fosfoglucomutasa E.C. 5.4.2.2 PGM	2	c,p	M
Peroxidasa E.C. 1.11.1.7 PRX	2-13	c,pc	m,d
Shikimato Deshidrogenasa E.C. 1.1.1.25 SDH	1-2	p,c	M
Superóxido Dismutasa E.C. 1.15.1.1 SOD	3	c,p,mt	d,t

Abreviaciones de localización subcelular: c=citosol, p=plastidio, mt=mitocondria, mc=microcuerpo, pc=pared celular. De estructura cuaternaria: m=monomera, d=dímera, t=tetrámera, h=hexámera.

Fuente: Weeden y Wendel, 1989.

Otro factor a considerar es la repetibilidad de los resultados, en función de la matriz utilizada. En este sentido, las propiedades de los geles de almidón van a depender del tipo y a veces del lote de almidón utilizado, lo que puede disminuir, en algunos casos, la posibilidad de repetir los resultados.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Esta técnica se basa en el uso de geles de poliacrilamida, cuya matriz es un soporte tridimensional que consta de polímeros de acrilamida entrecruzados a manera de red por un segundo agente, generalmente el denominado "bis" (N,N-metilen-bisacrilamida). Los geles de poliacrilamida se forman por la copolimerización de la acrilamida y la bis-acrilamida en presencia de persulfato de amonio y tetrametiletildiamina (TEMED), siendo este último un catalizador* de la liberación de radicales libres del persulfato, e iniciador de la polimerización (Alfenas y Brune, 1998). La combinación adecuada de acrilamida y bis-acrilamida, permitirá determinar características tales como densidad, elasticidad, resistencia mecánica y tamaño de los poros. Estas cualidades permiten definir el tamaño de las moléculas que migraran a través del gel (Ramírez y col., 1991).

En general, se puede decir que las cualidades más atractivas para hacer uso de la poliacrilamida son la presencia de mayor poder de resolución, amplia variación en el diámetro de los poros, cuantificación de la concentración protéica y de la actividad enzimática, a través de las técnicas de densitometría (Gontijo y Césare, 1995). Sin embargo, estos monómeros son compuestos extremadamente tóxicos en solución, y requieren de un manejo muy cuidadoso por parte del usuario (Salazar, s.f.).

La electroforesis tipo DISCPAGE

Los geles de poliacrilamida de porosidad uniforme manifiestan un inconveniente, que fácilmente altera la distinción entre varias especies proteicas del extracto en análisis. Esto se debe a la concentración de la faja de partida y a la difusión de los componentes de la muestra. Frecuentemente las bandas se tornan largas, poco nítidas, lo que provoca sobreposición de bandas vecinas. Es así como surge la electroforesis discontinua, comúnmente abreviada discelectroforesis o DISCPAGE, la cual fue desarrollada con el propósito de disminuir dicho efecto (Davis, 1964; Onrnstein, 1964) (Brune y Alfenas, 1998a). Corresponde al sistema de análisis protéico más aplicado en la mayoría de los análisis electroforéticos, y en muchas oportunidades sus componentes son aniónicos a pH 8.9. Éste consiste de geles formados por diferentes fases de porosidad y valores de pH.

* ver glosario.

En la electroforesis discontinua, el gel de poliacrilamida consiste de dos fases físicas: la fase de apilación (gel apilador) próxima al cátodo, originalmente de pH 6.9, de alta porosidad y baja concentración de monómeros, y la fase de separación de pH 8.9, de baja porosidad y alta concentración de monómeros, encontrándose variaciones en la literatura (Brune y Alfenas, 1998a).

En este tipo de geles, la solución tampón del gel (Tris HCl) es distinta a la de los electrodos (Tris Glicina). En el sistema discontinuo, la muestra protéica es aplicada en las cavidades del gel apilador. Es así como durante la electroforesis, las moléculas migran de la parte más porosa (gel apilador) a la menos porosa (gel separador). Consecuentemente, las moléculas de proteína se concentran en una faja estrecha, entre el gel apilador y el separador, produciendo mejor resolución que el sistema continuo, por el apilamiento, rindiendo elevada concentración de las proteínas en el análisis (Alfenas y Brune, 1998).

En este tipo de geles la migración en dirección al ánodo será mayormente en función del pH del medio, de los pesos moleculares y de las conformaciones de las proteínas. Es así como cuanto menos electronegativa es una molécula proteica, mayor es su peso molecular y más alargada su conformación, siendo menor su movilidad en el gel. Además, tenemos que este sistema permite la aplicación de volúmenes grandes de muestras sin reducir el grado de resolución, debido a la focalización de las proteínas en la interacción de los dos geles.

En yuca, los sistemas DISCPAGE dan mejor resultados en resolución que los PAGE (Alfenas y Brune, 1998; Polanco, 1998; Schmidt, 2000)

La desnaturalización de proteínas con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)

La electroforesis en geles de poliacrilamida y empleando SDS (dodecil sulfato de sodio) es la más usada cuando se analizan mezclas de proteínas, su abundancia relativa, y cuando se requiere determinar el peso molecular. El SDS es un detergente anionico que reacciona con las proteínas antes de la electroforesis, aplicando calentamiento a 100°C, en presencia de -mercaptoetanol (Alfenas y Brune, 1998); después de esa reacción, la proteína adopta una carga negativa uniforme y una estructura alargada. El complejo SDS-proteína es soluble, y bajo condiciones de electroforesis viaja, a través del gel, hacia el ánodo (Ramírez y col., 1991).

Para las proteínas desnaturalizadas se emplea comúnmente geles con gradientes de concentración, cuya concentración se escogen de acuerdo con el peso molecular de las proteínas en estudio. En la práctica, se confeccionan geles con gradientes entre 7% y 16% de acrilamida. En

electroforesis de proteínas desnaturalizadas, el SDS y β -mercaptoetanol eliminan el efecto de las cargas proteicas negativas. En este caso las separaciones se dan según los pesos moleculares, y la migración es consecuencia de las cargas negativas del SDS. En estos sistemas la movilidad de la cadena polipeptídica es, dentro de los límites, función lineal del logaritmo de sus pesos moleculares y dicha función es de elevado valor analítico (Alfenas y Brune, 1998).

La técnica SDS en yuca, se utilizó para proteínas hidrosolubles con un sistema DISC-PAGE 6-15% (Schmidt, 2000) y 6-12% (Polanco, 1998).

Principios de la tinción proteica y enzimática

En Proteínas

La revelación de las proteínas en los geles es hecha frecuentemente, sobre la base del azul de coomassie; este reactivo presenta una serie de características que lo hacen el colorante más apreciado para teñir proteínas debido a su alta capacidad de coloración, distinción entre proteínas y aminoácidos, facilidad de manejo, elevada solubilidad en geles de poliacilamida y agarosa, estabilidad en forma sólida, y precio módico. En virtud de todas estas características, coomassie es apreciado también como reactivo para evaluaciones cuantitativas de proteínas en solución. Además, la absorbancia molar varía con la estructura de las proteínas (Brune y Alfenas, 1998b).

La coloración azul es el resultado de la reacción entre radicales sulfona de coomassie con la función amonios cuaternarios de las proteínas, donde su carácter anfótilo y su solubilidad en medio acuoso no presenta rangos de pHs amplios. Los aminoácidos libres, péptidos de bajo peso molecular y anfólinas (usado en enfoque isoelectrico) no son coloreados por coomassie. En consecuencia, la revelación de las proteínas no requiere de la separación previa de los aminoácidos. Y otra característica importante es que el complejo coomassie/proteína es insoluble.

En Isoenzimas

Muchas de las proteínas obtenidas de los extractos crudos de semillas o tejidos son enzimas que catalizan reacciones bioquímicas específicas. Una vez separadas estas enzimas por medio de electroforesis, se puede localizar una enzima específica colocando el gel en una bandeja que contenga el sustrato, junto con cofactores y colorantes adecuados. Los productos de esa reacción enzimática reaccionan a su vez con la solución de tinción formando complejos coloreados; éstos dan lugar a una banda visible en el sitio donde se hallan dentro del gel. El conjunto de bandas generadas en la tinción se

denomina zimograma* (Ramírez y col., 1991; Peters, 1998). Con respecto a la visualización de las enzimas en los geles Brune y col. (1998) comentan que su identificación se debe a los siguiente factores:

A la ocurrencia de una reacción específica que permite distinguir una enzima de los demás componentes del gel, en especial de cualquier otra enzima.

A la obtención de productos evidenciados por la simple observación.

A un producto insoluble.

Ahora bien, las revelaciones de los geles reflejan virtualmente resultados cualitativos, para las consideraciones cuantitativas se requiere de la codificación de una gama de factores que acarrear, conjuntamente, un elevado error experimental (Brune y col., 1998), pero que adecuadamente manipulados son solventados en gran medida.

Lectura de los zimogramas

Hunter y Markert en el año de 1957 propusieron el término zimograma para denominar al patrón de bandas isoenzimáticas en los geles derivados de procesos electroforéticos donde se compararon materiales genéticos diferentes. Así, cuando es necesario diferenciar individuos o clones entre sí, los zimogramas pueden proporcionar suficiente información (Ramírez y col., 1991; Quiroz, 1991). Este proceso es lo que denominan "fingerprinting" en inglés, donde el conjunto de isoenzimas representa un fenotipo en particular. Mas aún, cuando se desea examinar los procesos evolutivos que toman lugar en una población*, los marcadores son los locus y los respectivos alelos identificados por la interpretación de los zimogramas (Peters, 1998).

Luego de realizado el proceso de tinción, surge la necesidad de realizar la lectura de los geles, a fin de caracterizar la electroforesis de un determinado grupo de genotipos. Esta se logra a través de la determinación de la Movilidad Electroforética (ME) de la sustancia o Movilidad Relativa (MR), o la distancia d , que en un tiempo t una partícula o sustancia recorre bajo la influencia de un gradiente de potencial E . De tal manera que la distancia migrada es proporcional a la movilidad electroforética del compuesto, pudiendo establecerse comparaciones entre compuestos, siempre y cuando el tiempo y el gradiente de potencial sean constantes (Salazar, s.f.). Así Ramírez y col. (1991) muestra la relación matemática para determinar la Movilidad Electroforética Relativa (MER) de cada banda en el zimograma, mediante la siguiente relación:

* Ver definición en glosario.

* ver glosario.

$$MER = \frac{ME_i}{ME_r} \times 100$$

Donde: MER = Movilidad Electroforetica Relativa.

ME_i = Movilidad electroforetica de la banda i (en mm)

ME_r = Movilidad electroforetica de la banda de referencia (en mm)

100 = valor relativo de la banda de referencia

Aunque la metodología general para la detección de patrones electroforéticos de isoenzimas está bien desarrollada y es relativamente sencilla, la interpretación de dichos patrones requiere de conocimientos básicos tanto de bioquímica como de genética, y de la especie o cultivo con que se está trabajando. Esos patrones dependen del modo de herencia, información tal como número de locus y alelos envueltos, de la estructura cuaternaria de la enzima, es decir si es monomérica, dimérica, etc. (Ramírez y col., 1991; Peters, 1998), además de la localización subcelular de la enzima.

La variación genética de bandas rápidas y lentas en el patrón de bandas es típica de las enzimas monoméricas; en el caso más simple, la proteína que expresa cada alelo de un locus dado se aprecia como una banda que se caracteriza porque tiene una distancia de migración fija en el gel. Si se tiene un individuo heterocigoto, su fenotipo se expresa como un zimograma constituido por dos bandas (una rápida y otra lenta) que representa al genotipo del individuo; la progenie resultante de la autofecundación de un individuo heterocigoto segregará conforme a la relación mendeliana 1:2:1 (Quiroz, 1991).

En los casos más sencillos de interpretación del zimograma, un heterocigota presentaría dos bandas si la enzima es monómera, tres si es dímera, cinco si es tetrámera, etc.; pero la presencia de bandas secundarias tiende a complicar aún mas la interpretación de los zimogramas, ya que modifican los patrones teóricos esperados para una enzima en particular. La formación de las mismas es muy uniforme y se pueden reconocer por la producción de una serie de bandas para cada alelo (Micales y col., 1986), tendiendo a ser mas tenues, de desarrollo mas lento y de covarianza típica "tandem", y en proximidad a las bandas primarias asociadas (Kephart, 1990). Las bandas secundarias o fantasmas, pueden provenir de enzimas secundarias, las cuales son frecuentemente, modificaciones de las enzimas originales mediante desaminaciones, oxidación de grupos sulfhídricos, adición y remoción de carbohidratos y fosfatos, rompimiento de la enzima por proteasas, así como agregación y/o polimerización de la molécula (Micales y col., 1986). De igual forma, aspectos técnicos, tales como el congelamiento, tampones de extracción inadecuados (por ejemplo ausencia de PVP y -mercaptoetanol), condiciones de extracción no fisiológicas, tejido viejo o

sobrecalentamiento del gel durante la corrida, parecen favorecer la presencia de dichas bandas (Kephart, 1990; Díaz, 1997).

Limitaciones de las técnicas de electroforesis enzimática para caracterización de genotipos

Murphy y col. (1990) explican que la principal limitación de la técnica es que el número de sistemas isoenzimáticos polimorficos, generalmente, varia entre apenas 10 y 20 enzimas, para cada especie. Lógicamente, con una cobertura apenas parcial del genoma, se estaría comprometiendo la capacidad de encontrarse asociaciones significativas entre las isoenzimas y los genes que controlan características de importancia agronómica, inclusive limitando el mapeo de caracteres cuantitativos. A pesar de que las enzimas son consideradas marcadores selectivamente neutros, los niveles de polimorfismo enzimático poseen un límite cuando estas enzimas tienen función metabólica. Otras limitaciones de la técnica enzimática para ser empleada como marcadores bioquímicos las detallan Murphy y col. (1990), Ramírez y col. (1991) y Peters (1998), las que se muestran a continuación:

Modificaciones postraduccionales de las enzimas, las cuales producen a las llamadas "isoenzimas conformacionales" o formas múltiples del producto de un único gen, las cuales difieren en estructura secundaria y terciaria.

Polimorfismo isoenzimático en respuesta a condiciones ambientales.

Dificultad en la interpretación de los zimogramas cuando las isoenzimas con movilidades electroforéticas idénticas representan productos de los locus distintos en un mismo sistema enzimático. Al existir variación alélica entre estos "isolocus", puede ser muy difícil o imposible determinar cual de estos alelos pertenece a cada locus.

La técnica de tinción de isoenzimas no detecta las siguientes especies protéicas: enzimas que están por debajo del límite de su detección; proteínas estructurales; enzimas que están presentes en el extracto, pero que no pueden detectarse porque aún se desconoce la forma de tinción de sus productos; enzimas que intervienen en muchas vías metabólicas, y que aún se desconocen.

Las isoenzimas que están influenciadas por la edad de la planta, ya que los genes que las codifican sólo se expresan en estadios específicos del desarrollo, y en órganos o tejidos específicos.

Referencias bibliográficas

- ALFENAS, A.C. y W. BRUNE. 1998. Eletroforese em gel de poliacrilamida. En: Alfenas, A.C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Edit. Universidade Federal de Viçosa. pp: 150 –151.

- ALFENAS, A.C., W. BRUNE, J. R. DE OLIVERA, S. K. DE ALONSO y M. SCORTICHINI. 1998. Extração de proteínas para electroforese. En: Alfenas, C.A. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Edit. Universidade Federal de Viçosa. Pp. 87 – 114.
- ANDERSON, J. 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissue. *Phytochemistry*. 7:1973-1988.
- BRUNE, W., A.C. ALFENAS y T. GÓES. 1998. Identificações específicas de enzimas em géis. En: Alfenas, A.C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Edit. Universidade Federal de Viçosa. pp. 201 –317.
- BRUNE, W. y A.C. ALFENAS. 1998a. Modalidades da eletroforese. En: Alfenas, A.C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Edit. Universidade Federal de Viçosa. Pp. 25 – 84.
- BRUNE, W. y A.C. ALFENAS. 1998b. Identificação de proteínas em géis. En: Alfenas, A.C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Edit. Universidade Federal de Viçosa. pp. 182 –199.
- CRAWFORD, D. 1989a. *Plant Molecular Systematics*. John Wiley & Sons. Ohio. 388p.
- DELWICHE, CH. 1998. Rubisco phylogeny and the evolution of carbon fixation. delwiche@umd5.umd.edu.
- DE OLIVEIRA E SILVA, S., M. TEXEIRA y R. PEREIRA. 1992. Diferenciação de clones de *Manihot esculenta* Crantz mediante emprego de características botânico – agronômicas e zimograma de e -esterase. *Rev. Bras. Mand.*, Crus das Almas, Brasil. 11(1): 79 – 88.
- DÍAZ, A.J. 1997. Metodología electroforética, interpretación genética y diversidad en el ajonjolí (*Sesamun indicum* L.). Trabajo de grado para optar al título de *Magister Scientiarum*. Facultad de Agronomía. Estudios de Postgrado. Maracay. 162p.
- FERREIRA, M. y D. GRATTAPAGLIA. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. 219p.
- FUCHS, M. 1997. Separación electroforética de proteínas. En: manual de teoría y práctica del curso sobre técnicas moleculares aplicadas a la investigación agrícola. Salazar, E., A. Vegas y M. Fuchs. Departamento de Biotecnología. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay, Edo. Aragua.
- FUENMAYOR, F., A. SCHMIDT y M. FUCHS. 2001. Electroforesis de proteínas hidrosolubles e isoenzimas para caracterización de clones de yuca *Agronomía Tropical* 51(4): 485-499.
- GONTIJO, J. y T. CÉSARE. 1995. Técnicas eletroforéticas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária–EMBRAPA. Ministerio de Agricultura, do Abastecimento e de Reforma Agraria. Centro Nacional de Pesquisa de Soja – CNPSo Londrina, PR. 34p.
- GOTTLIEB, L.D. 1971. Gel electrophoresis: A new approach to the study of evolution. *BioSci*. 21: 939-944.
- GOTTLIEB, L.D. 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216: 373 – 380.
- GONZALEZ, C. Y. BEOVIDES, M. ROMAN, X. XIQUES, M. FLORIO, R. M. LARA y R.

- ACOSTA. 2002. Detección de variabilidad genética en el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mediante estudios isoenzimáticos y de proteínas totales. *Revista Biológica*, vol. 16, n° 1
- HOFFMANN, P.J. y R.A. CHALKLEY. 1976. A neutral pH acrylamide gel electrophoretic system for histones and other basic proteins. *Anal.Biochem.*, 76: 539-546.
- HUSSAIN, A., W. BUSHUK, H. RAMÍREZ y W. ROCA. 1987. Identification of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars by electrophoretic patterns of esterase isozymes. *Seed Sci. & Technol.* 15: 19-22.
- KEPHART, S. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Amer. J. Bot.* 77:693-712.
- LEFÈVRE, F. y A. CHARRIER. 1993a. Isozyme diversity within African *Manihot* germplasm. *Euphytica* 66: 73-80.
- LEFÈVRE, F. y A. CHARRIER. 1993b. Heredity of seventeen isozyme diversity loci in cassava (*Manihot esculenta*). *Euphytica* 66: 171-178.
- LOKKO, Y., J. V. ANDERSON, S. RUDD, A. RAJI, D. HORVATH, M. A. MIKEL, R. KIM, L. LIU, A. HERNANDEZ, A. G. O. DIXON y I. L. INGELBRECHT. 2007. Characterization of an 18,166 EST dataset for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) enriched for drought-responsive genes. *Plant Cell Reports*. Vol 26, N° 9.
- MARKERT, C. 1977. Isozymes: The Development of a Concept and its Application. *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research* 1:1-17.
- MICALES, J., M. BONDE y G. PETERSON. 1986. The use isozyme analysis in fungal taxonomi and genetics. *Mycotaxon*, 27: 405-449.
- MURPHY, R.W., J.W.JR. SITES, D.G. BUTH y C.H. HAUFLE. 1990. Proteins I: isozyme electrophoresis. In: *Molecular Systematics*. Hill, D.M. y C. Moritz (editores). Sinauer Associates. Sunderland MA. pp: 45-126.
- PIERCE, L. y J. BREWBAKER. 1973. Applications of isozyme analysis in Horticultural Science. *Hortscience* 8(1): 17-22.
- PETERS, I. 1998. Aloenzimas na genética populações de plantas. En: Alfenas, A.C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Edit. Universidade Federal de Viçosa. pp: 329 – 380.
- POLANCO, D. 1998. Caracterización morfológica, isoenzimática, contenido de cianuro y almidón en el Banco de Germoplasma *in vivo* de yuca (*Manihot esculenta* C.) de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Trabajo de Ascenso para optar a la categoría de Profesor Asistente. 99p.
- QUIROZ, C. 1991. Isoenzimas como marcadores genéticos para identificar híbridos en el cultivo de tejidos. En: Roca, W. y L. Mroginski. *Cultivo de Tejidos Vegetales en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Pp: 857 – 876.
- RAMÍREZ, H., A. CALDERON y W. ROCA. 1991. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. En: Roca, W. y L. Mroginski. *Cultivo de Tejidos Vegetales en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). pp. 825 – 855.
- SARGENT, R. y S. GEORGE. 1975. *Methods in zone electrophoresis*. BDH. England. 219p.
- SALAZAR, E. (s.f). Aspectos básicos sobre la electroforesis. (mimeografiado). 8p.

- SCHMIDT, A. 2000. Uso de isonezimas y proteínas totales en la caracterización de clones del banco de germoplasma de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) del CENIAP – FONAIAP, Maracay. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía. Postgrado de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 133p.
- WEEDEN, N., y WENDEL, J. 1989. Genetics of plant isozymes. En: Isozymes in plant biology. D. Soltis y P. Soltis (Eds). Dioscorides Press. pp. 46-71

Glosario

- Ambiente.** Conjunto de factores físicos, químicos y biológicos que rodean a un ser vivo. Todas las circunstancias no genéticas que influyen en el valor fenotípico.
- Biotecnología.** Rama de la genética que se encarga de la manipulación de genes, cuyas premisas se basan en el supuesto de que cada rasgo está codificado en uno a algunos genes estables específicos, cuya transferencia hacia otro organismo tiene como resultado la transferencia de un rasgo determinado. Según el Convenio sobre Diversidad Biológica de 1992, es toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.
- Catalizador.** Sustancia que no participa en una determinada reacción química, pero su inclusión origina un aumento de la velocidad de reacción; sustancia que posee la propiedad de acelerar una reacción química.
- Codon.** Unidad de códigos de nucleótidos que corresponde a un aminoácido específico. Tripleta de bases de la molécula de ADN y ARN que codifica para un aminoácido específico durante la síntesis de proteínas.
- Codominancia.** Cuando ambos alelos se expresan en el heterocigoto. Fenómeno que se presenta cuando los dos alelos presentes en el heterocigoto concurren igualmente para la formación de sus productos directos, produciendo así un mosaico bioquímico.
- Control genético.** Sistema de supresión que presentan algunos genes en la determinación de la organización molecular de las proteínas (control genético cualitativo) y de la cantidad de producción de enzima y proteínas (control genético cuantitativo), mecanismos útiles de control de síntesis de las proteínas.
- Depresión endogámica.** Cambio de frecuencias genotípicas que resultan del proceso disperso, favoreciendo el incremento de homocigotas a expensas de los heterocigotas.
- Deriva genética.** Variación al azar de las frecuencias génicas. Mecanismo mediante el cual pueden desaparecer mutaciones, cuyo tiempo de acción dependerá del tamaño efectivo de la población. En poblaciones pequeñas la Deriva Genética es más importante que la Selección Natural, pudiendo tomar direcciones contrarias a la adaptación.
- Disomia.** Conjunto de dos cromosomas de la misma clase, faltantes en un organismo diploide.
- Enzima.** Sustancia orgánica de naturaleza proteica, producida por células vivas, que presentan una acción específica sobre ciertos sustratos; proteína con propiedades catalíticas.
- Enzimas, especificidad de las.** Aunque casi todas las reacción del metabolismo intermediario son catalizados por sus enzimas propias, solo algunas de estas son absolutamente específicas para la constitución de sus sustratos, siendo que la mayoría puede actuar sobre estructuras muy semejantes a las de los

sustratos fisiológicos, si bien con intensidad mucho menor y un grupo de ellos puede atacar un grupo relativamente grande de sustratos por lo que no se conocen reglas de validez enteramente general para la especificidad de las enzimas.

Enzimas, mecanismos. Aunque ningún mecanismo enzimático ha podido ser explicado en su totalidad se han propuesto numerosas teorías para interpretar su funcionamiento, siendo las más aceptadas aquellas que se refieren a la formación de complejos de enzima-sustrato ligados por covalencia, en los cuales el ataque nucleofílico o electrofílico del sustrato será facilitado por la enzima.

Enzima, nomenclatura. Actualmente las enzimas se clasifican de acuerdo a un catálogo en la que cada enzima corresponde a un número de orden, para un total de cuatro, cuyo principio es el siguiente: la primera cifra indica la categoría, la segunda y tercera el tipo función catalizada, y la cuarta señala la naturaleza exacta del sustrato esencial.

Epistasis. Supresión de la acción de un gen o genes por otro gen o genes no alélicos de los suprimidos.

Exon. Parte de la cadena del ADN que se desdobra para formar el ARN y que se expresa en la codificación final. Porción de una molécula de ADN que produce el codon para la determinación del ARN. Región informativa para la síntesis proteica del ADN.

Genética molecular. Ciencia que nació de los conocimientos de la genética bioquímica, y que consiste en el almacenamiento, modificación y recuperación de la información macromolecular con profundas raíces en la transmisión y recombinación génica.

Genética bioquímica. Rama de la química utilizada para desentrañar los mecanismos del control genético del fenotipo de los organismos. Rama de la genética que estudia la estructura química, la función, replicación y mutación de las moléculas que intervienen en la transmisión de la información genética (ADN y ARN), y que se ocupa del análisis de la disposición de los genes en el ADN y su replicación, además de la transcripción y traducción o síntesis de las proteínas.

Homeostasis. Es la característica de un sistema abierto o de un sistema cerrado, especialmente en un organismo vivo, que regula su ambiente interno para mantener una condición estable y constante. Proceso asociado al mantenimiento de un estado de equilibrio.

Intron. Secuencia de pares de bases en el ADN que interrumpe la continuación de la información genética. Región no informativa para la síntesis proteica del ADN. Secuencia de intervención.

Isoenzima. Forma molecular diferente en las cuales la misma enzima puede existir dentro de un organismo. Heterogeneidad enzimática con formas moleculares múltiples del mismo órgano o tejido y con una misma actividad catalítica.

Isoenzima, origen de la. Loci génico múltiple codificando cadenas polipeptídicas estructuralmente distintas de una proteína; alelos múltiples para un mismo locus; modificaciones secundarias de proteínas estructurales.

Isoenzima secundaria. Producto de las alteraciones estructurales, pudiéndose formar por: pérdida en el grupo amida de restos de glutamina y asparagina; por adición de cadenas de carbohidratos a residuos reactivos de la enzima primaria; por diversos grados de acetilación o fosforilación de una enzima; por

separación de una cadena polipeptídica por una enzima proteolítica; por reacciones de los grupos sulfídricos (-SH) de residuos de cisteína en una enzima proteica con otras; por distorsión en el arreglo tridimensional de la enzima.

Pleiotrópico. Gen o conjunto de ellos que influyen sobre varias estructuras que no parecen relacionadas, ni anatómica ni funcionalmente.

Pleiotropía. Acción de un único gen que presenta la particularidad de afectar dos o más caracteres individuales, no significando que sea único responsable; efectos múltiples producidos u ocasionados por uno, o un par de genes.

Población. Grupo de individuos, organismos o plantas que se cruzan entre sí y se caracterizan por su continuidad genética a lo largo de varias generaciones. Conjunto de organismos adaptados y de forma semejante. Conjunto cualquiera de elementos. Una población para existir necesita estar constantemente adaptada a su hábitat. Toda población es finita.

Poligen. Gen menor involucrado en una variación poligénica, que presenta un efecto pequeño sobre un determinado carácter o que se pueda suplir con otros para producir cambios cuantitativos observables. Gen cuyo efecto sobre la adaptación es relativamente pequeño (no es letal, ni semi letal). Componente del sistema poligénico dotado individualmente de una acción mínima.

Presión selectiva. Efectividad del ambiente en la modificación de la frecuencia de los alelos en una población.

Sistema poligénico. Conjunto de genes capaces, en interacción, de regular el desarrollo de una determinada característica.

Sistema monomórfico. Caracterizado por presentar en una población dada apenas un alelo monomórfico o un monomorfo asociado con un ideomorfo.

Sustitución génica. Cambio paulatino de un alelo por otro en la población; dicha sustitución es una de las características básicas de la evolución, y generalmente comienza debido a un cambio ambiental que altera la dirección de la selección existente.

Valor adaptativo. Aporte individual del genotipo de un organismo o bien promedio de un determinado alelo en la población, con relación a su capacidad de donar genes a las futuras generaciones. Dicho valor puede expresar una adaptación a largo plazo y su importancia aparece cuando es comparado con el comportamiento reproductivo de los demás miembros de la población. Representa a una combinación de todos los caracteres que influyen en la adaptación, y solamente pueden obtenerse valores completos de los valores adaptativos con observaciones continuas de las alteraciones sufridas por la frecuencia génica, en una secuencia de generaciones.

Zimograma. Representación gráfica o esquemática de los diferentes modelos de bandas obtenidos por la electroforesis.