

**EMPLEO DE LAS ISOENZIMAS Y PROTEÍNAS TOTALES EN LA
CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES SILVESTRES DEL GÉNERO *NICOTIANA*.**
Autores: Marlyn Valdés¹, Regla M. Lara ², Clara González¹, Reina M. Hernández³, María
Isabel Román⁴, Xonia Xiqués¹, Mileidys Cabrera⁵, Gilberto Torrecilla⁵,
¹*Facultad de Biología. Universidad de la Habana*
²*Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.(INCA).*
³*Universidad Isla de la Juventud.*
⁴*Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales. (INIVIT).*
⁵*Estación Experimental de Tabaco de Cabaiguan.*
Correo: marlyn@fbio.uh.cu

RESUMEN

La caracterización de especies silvestres del género *Nicotiana* resulta de gran interés en los programas de mejoramiento genético de la especie *Nicotiana tabacum* L. ya que permite introducir genes de resistencia a plagas y enfermedades, a la vez que se incrementa la variabilidad genética en la única especie comercial del género.

El presente trabajo tiene como objetivo: caracterizar la variabilidad genética en 11 especies del banco de germoplasma del género *Nicotiana* en Cuba, para lo cual se emplearon los sistemas isoenzimáticos peroxidasas, polifenoloxidasas, esterasas, anhidrasa carbónica, superóxido dismutasa, diaforasa, fosfatasas ácidas, fosfatasas alcalinas, enzima málica, así como las proteínas totales. Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en lámina vertical mediante un sistema de buffer discontinuo tris-glicina 0.04M pH 8.3 y la intensidad de la corriente de 25mA, se aplicó la tinción específica para cada sistema y se confeccionaron los zimogramas, se construyó una matriz de presencia-ausencia de bandas que se procesó por el paquete de programas estadísticos NTSYS pc versión 2.1; en el que se empleó el método UPGMA y el índice de Dice para obtener el dendrograma mediante el cual se representaron las relaciones fenéticas entre los materiales estudiados. Se determinó que el grado de polimorfismo total entre las especies para los sistemas estudiados es elevado, de un 92.7%, siendo los sistemas peroxidasas, fosfatasas ácidas y enzima málica los más polimórficos con un 100%. El dendrograma obtenido muestra la formación de cuatro grupos de afinidad los que no se pueden relacionar con los caracteres morfológicos, ni con la resistencia o susceptibilidad al moho azul del tabaco (*Peronospora hyoscyami* F. sp. tabacina) . Este resultado constituye el primer estudio isoenzimático en especies silvestres del banco de germoplasma del género *Nicotiana* en nuestro país y pone de manifiesto la variabilidad presente en el mismo.

Palabras claves: isoenzimas, electroforesis, especies silvestres, *Nicotiana*.

**EMPLEO DE LAS ISOENZIMAS Y PROTEÍNAS TOTALES EN LA
CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES SILVESTRES DEL GÉNERO *NICOTIANA*.**
**Autores: Marlyn Valdés¹, Regla M. Lara², Clara González¹, Reina M. Hernández³, María
Isabel Román⁴, Xonia Xiqués¹, Mileidys Cabrera⁵, Gilberto Torrecilla⁵.**

¹Facultad de Biología. Universidad de la Habana

²Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.(INCA).

³Universidad Isla de la Juventud.

⁴Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales. (INIVIT).

⁵Estación Experimental de Tabaco de Cabaiguan.

Correo: marlyn@fbio.uh.cu

Introducción

El género *Nicotiana* consta de más de 60 especies consideradas en su mayoría especies silvestres que aunque no tienen importancia económica directamente son de gran utilidad por constituir reservorios naturales de genes de resistencia a una gran variedad de plagas y enfermedades, los que pueden emplear en los programas de mejoramiento genético para ser introducidos por diferentes métodos en las variedades comerciales de la única especie de importancia económica del género *Nicotiana tabacum* L, la que se utiliza en la fabricación de puros y cigarrillos de fama mundial como los Habanos considerados productos de lujo (Espino, 2002), ello contribuye además a incrementar la variabilidad genética de dichas variedades pues estudios isoenzimáticos y de marcadores moleculares de ADN evidencian una considerable reducción de la misma (Ren y Tinko, 2001; Fernández y *et. al* , 2005).

Para lograr hacer una utilización eficiente y racional de dichas especies en los programas de mejoramiento genético basados en métodos científicos es necesario hacer un estudio de la variabilidad genética de dicho material (González, 2002), por lo que nos proponemos como objetivo del presente trabajo:

Caracterizar la variabilidad genética en 11 especies del banco de germoplasma del género *Nicotiana* en Cuba, mediante el análisis de nueve sistemas isoenzimáticos y las proteínas totales.

Materiales y Métodos.

El material vegetal pertenece al Banco de Germoplasma de la Estación Experimental de Tabaco de Cabaiguán en la provincia de Sancti Spíritus.

Las especies estudiadas, la numeración utilizada y su grado de resistencia al moho azul (*Peronospora hyoscyami* F. sp tabacina) se presentan en la Tabla 1:

Tabla 1: Especies del género *Nicotiana*, la numeración utilizada y grado de resistencia al moho azul (*Peronospora hyoscyami* F. sp tabacina) especificándose si es altamente resistente (RR), resistente (R) o susceptible (S)

Especies	Número	Grado de resistencia al Moho azul
<i>Nicotiana longiflora</i>	94	Resistente
<i>Nicotiana landorfi</i>	96	Susceptible
<i>Nicotiana alata</i>	98	Susceptible
<i>Nicotiana glutinosa</i>	99	Susceptible
<i>Nicotiana debneyi</i>	102	Altamente Resistente
<i>Nicotiana ingulba</i>	109	Resistente
<i>Nicotiana trigonofila</i>	113	Susceptible
<i>Nicotiana suaveolens</i>	117	Resistente
<i>Nicotiana knightiana</i>	120	Susceptible
<i>Nicotiana velutina</i>	124	Resistente
<i>Nicotiana megalosiphon</i>	127	Altamente Resistente

Los extractos vegetales se obtuvieron a partir de 5 g de hojas sanas de cada material macerados con 10 gotas de una solución de sacarosa al 20% y fueron conservados a -15°C hasta su utilización.

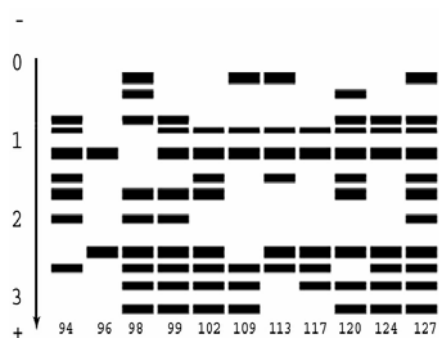
Las corridas electroforéticas se realizaron en gel de poliacrilamida (PAGE) con una concentración del 8.5% para los sistemas peroxidadas, polifenoloxidasas, superóxido dismutasa, diaforasa, fosfatasas ácidas, fosfatasas alcalinas, enzima málica y del 10% para esterasas, anhidrasa carbónica y proteínas totales, utilizando un aparato de corrida en lámina vertical y sistema de buffer discontinuo de Tris –glicina 0.04M pH 8.3 y la intensidad de la corriente de 50mA. Las tinciones se realizaron para los sistemas peroxidadas según Iglesias (1986), polifenoloxidasas según Guedes y Rodríguez (1974), esterasas según González y González (1981), anhidrasa carbónica según Brewer y Singh (1971), superóxido dismutasa, diaforasa, fosfatasas ácidas, fosfatasas alcalinas, enzima málica según Wendel y Weeden (1989) y proteínas totales según Leammli (1970).

A partir de los resultados obtenidos en los electroforetogramas se construyó una matriz de presencia-ausencia de bandas, con la selección de las bandas polimórficas. La matriz se procesó por el paquete de programas estadísticos NTSYS pc (versión 2.1; Rohlf, 2001), en el que se empleó el índice de Dice y se aplicó el método UPGMA (Hair, *et. al.*, 1992), mediante el cual se representaron las relaciones fenéticas entre el material estudiado.

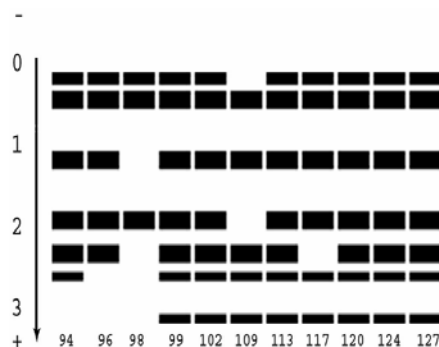
Resultados y Discusión.

Tabla 2: Total de bandas, bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo para cada uno de los zimogramas y el proteinograma.

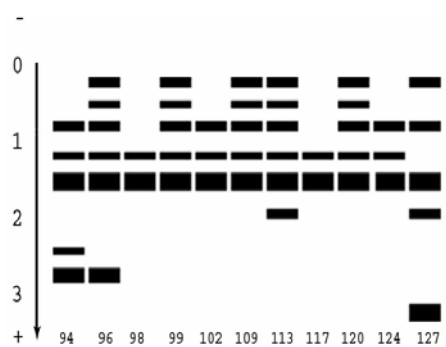
Sistemas Isoenzimáticos	Total de bandas	Total de bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo	Figura
Peroxidasas	12	12	100	A
Polifenoloxidasas	7	6	85.7	B
Esterasas	9	8	88.8	C
Anhidrasa Carbónica	9	8	88.8	D
Superóxido Dismutasa	7	6	85.7	E
Diaforasas	9	8	88.8	F
Fosfatasas ácidas	9	9	100	G
Fosfatasas Alcalinas	11	10	90.9	H
Enzima málica	13	13	100	I
Proteínas Totales	24	22	91.6	J
Total	110	102	92.7	



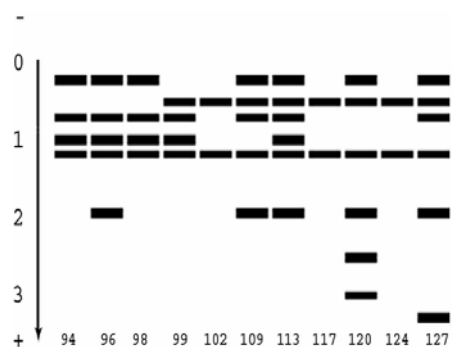
A



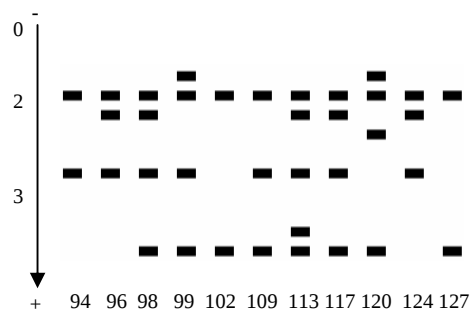
B



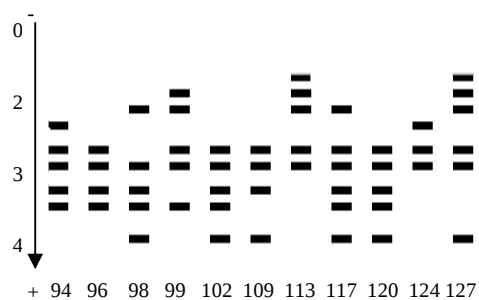
C



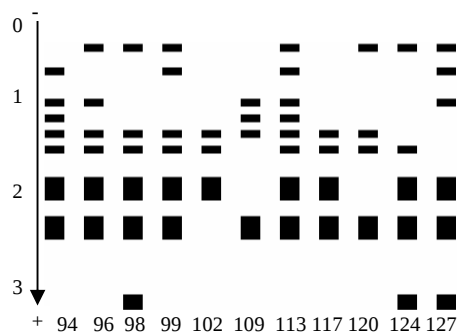
D



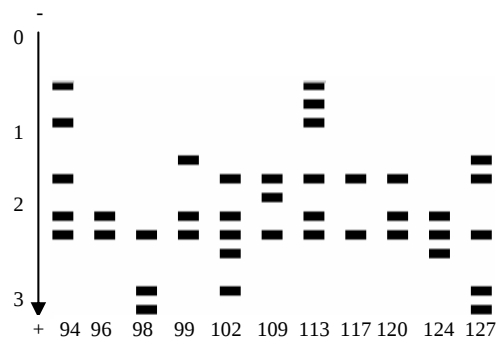
E



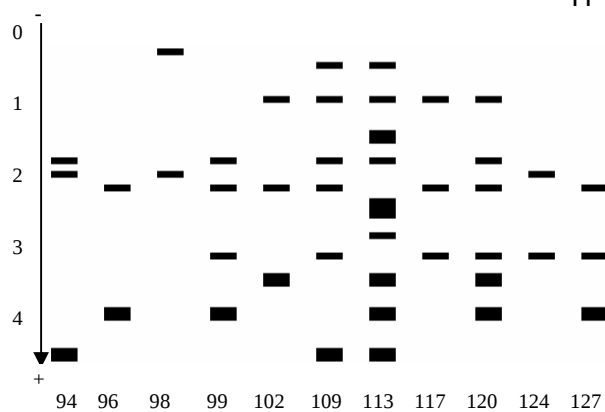
F



G



H



I

Figura 1: Zimograma para los sistemas isoenzimáticos peroxidasas (A), polifenoloxidasas (B), esterazas (C), anhidrasa carbónica (D), superóxido dismutasa (E), diáforasa (F), fosfatasa ácida (G), fosfatasa alcalina (H), enzima málica (I), de las 11 especies de *Nicotiana*.

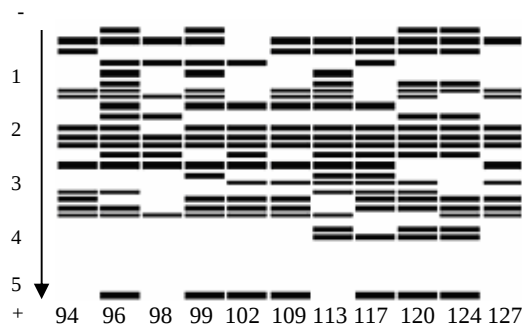


Figura 2: Proteinograma de las 11 especies de *Nicotiana*.

Estos resultados coinciden en relación al polimorfismo, con los obtenidos por González *et al* (2001) en la colección de arroz (*Oryza sativa* L.) y Román *et al* (2003) en el estudio de bancos de germoplasma del género *Musa*. Pero no coinciden con los obtenidos por Valdés *et al* (2004) para la colección de mango (*Mangifera indica* L.), donde el sistema más polimórfico fue el de polifenoloxidasas. Por el contrario, estudios realizados por Pinares *et al*. (2001) en dieciséis accesiones del banco de germoplasma de *Clitoria ternatea*, L., el sistema peroxidasa y polifenoloxidasas resultaron ser monomórficos y anhidrasa carbónica poco polimórfico.

En la Figura 3 se muestra el dendrograma que representa las afinidades fenéticas entre las 11 especies estudiadas, se aprecia la formación de cuatro grupos a partir de un índice de similitud de 0.62, en el grupo 1 se encuentran las especies *N. longiflora* (94), *N. landorfi* (96), *N. glutinosa* (99) y *N. trigonofila* (113), en el grupo 2 las especies *N. ingulba* (109), *N. megalosiphon* (127), en el grupo 3 las especies *N. debneyi* (102), *N. suaveolens* (117), *N. knightiana* (120), *N. velutina* (124) y en el grupo 4 se incluye solo la especie *N. alata* (98), pero no fue posible relacionarlos con ninguno de los caracteres morfológicos, ni con la resistencia o susceptibilidad al moho azul del tabaco.

Esta investigación tiene gran importancia, ya que por primera vez en Cuba se realiza un estudio isoenzimático de la colección del género *Nicotiana* que incluye especies silvestres, lo que permitió la caracterización de este material y la formación de grupos con afinidades genéticas, de gran utilidad para diseñar programas de mejoramiento efectivos.

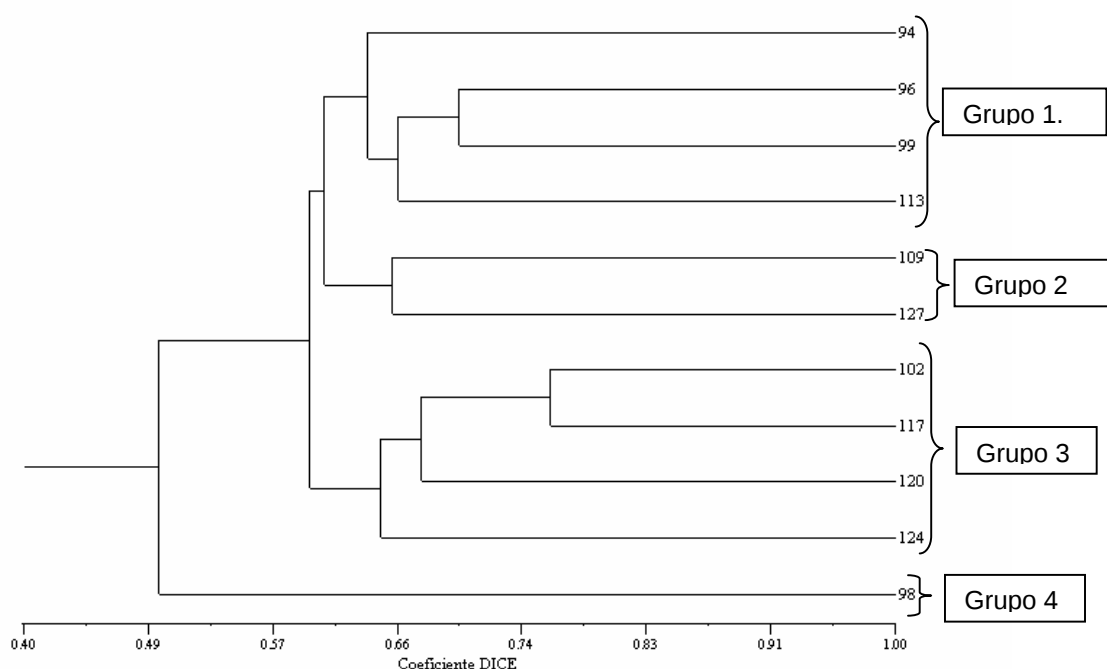


Figura 3: Dendrograma que representa las afinidades fenéticas entre las 11 accesiones del banco de germoplasma del género *Nicotiana*, utilizando el índice de Dice y el algoritmo SAHN, aplicando el método UPGMA del Programa NTSYSpc versión 2.1.

Conclusiones.

- Se presenta un 92.7% de polimorfismo total para las especies estudiadas, considerando los nueve sistemas isoenzimáticos y las proteínas totales, siendo los sistemas peroxidasas, fosfatasas ácidas y enzima málica los más polimórfico.
- El dendrograma muestra la formación de cuatro grupos de afinidad, los que no se pueden relacionar con caracteres morfológicos, ni con la resistencia o susceptibilidad al moho azul del tabaco.
- Este resultado constituye el primer estudio isoenzimático en especies del banco de germoplasma del género *Nicotiana* en nuestro país y pone de manifiesto la variabilidad presente en el mismo.

Referencias

- Brewer, G y Singh CF. Introduction to isozymes techniques. Acad. Pres. New York, pp. 186, 1971.
- Espino, E. Manual práctico del supervisor agrícola del tabaco. Instituto de Investigaciones del Tabaco. AGRINFOR. La Habana. 55pp, 2002.
- Fernández G A, L Afanador, N Jaramillo, E Márquez , J D. Tinocco and S Orduz. Molecular characterization of three anther tissue culture varieties Revista Colombiana de Biotecnología, Vol 4 No. 1. 2002.
- González, CA. Detección del polimorfismo genético mediante marcadores bioquímicos en plantas. En: MT. Cornide *et al.* (eds) Marcadores moleculares. Nuevos Horizontes en la Genética y la Selección en Plantas, Capítulo 2, La Habana, pp. 36-66, 2002.
- González, C. y J. González. Estudio de patrones para la Lima Persa III; caracterización isoenzimática. Ciencia y Técnica Agrícola, 4(2): 102-108, 1981.

- González, CA, Díaz S, Román MI, Xiques X, Florido M, Lara RM, Pérez L. Análisis de diecinueve accesiones de arroz (*Oriza sativa* L.) mediante electroforesis de isoenzimas y proteínas totales. *Revista Jardín Botánico Nacional*, 22(2): 271-178, 2001.
- Guedes, ME y Rodríguez CI. Disc electrophoresis patterns of phenoloxidase from leaves of *coffee* cultivars. *Dep. de Portugal Acta Biológica. Serie A* 13: 169-177, 1974.
- Hair, J.F.; Anderson, R.E.; Tatham, R.L. y Black, W.C. 1992. *Multivariate data analysis*. Macmillan Publ. Co. Nueva York. 544 p, 2001.
- Iglesias, L. Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*Glycine max* L. Merrill). Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agronómicas). INCA. La Habana.-232p, 1986.
- Laemmli, V.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- Pinares A, Ramos Y, González C, Xiques X, Román MI. Caracterización genético-bioquímica de dieciséis accesiones de *Clitoria ternatea* L. *Revista Jardín Botánico Nacional*, 22(2): 285-292, 2001.
- Ren N, MP Timko. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome*, 2001.
- Rohlf, F.J. NTSYS-PC, numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York, <http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc.html> 2001.
- Román MI, Alonso M, Barrios A. Marcadores de variabilidad genética en el género *Musa*. Sitio Web de la Representación de la FAO en Cuba. fao.cubasi.cu. 2003.
- Valdés M, C. González, M.I. Román, X. Xiqués, M. Capote, J. Valdés-Infante, O. Coto, E. Thermidor. Determinación de las afinidades genéticas de 30 variedades de la colección cubana de mango (*Mangifera indica* L.). ISBN 959 7167 02 6:30-31, 2004.