

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA "EDGAR MUNGUÍA ÁLVAREZ"

**OPTIMIZACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA
ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS EN GELES DE ALMIDÓN EN
MUESTRAS DE *Pachira quinata* (Jacq.) W. S. Alverson
(POCHOTE).**

AUTOR:

GLENDIA ISABEL OVIEDO NÚÑEZ

REQUISITO PREVIO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

TUTORA:

MSc. XIOMARA AVELLÁN SOLÓRZANO

Diciembre 2007

DEDICATORIA

A Dios dador de vida.

A mis queridos Padres Y Hermanos.

*Y a mis queridos Maestros que han contribuido en la parte
fundamental de de mi formación profesional.*

AGRADECIMIENTOS

- A la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) y a la Universidad de Alcalá Henares (UAH) por el soporte financiero al programa Genética Molécula trienio (2003 – 2005), a través de la cooperación Española, que hizo posible realizar este trabajo.
- Al Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales (CMG Y BSF), especialmente a la Lic. Esperanza Toruño y a Raúl Castro por su apoyo.
- A MSc. Xiomara Avellán que con amor, empeño y conocimiento para la realización de nuestro trabajo investigativo.
- A MSc. Lourdes Callejas por habernos brindado sus conocimientos y ayuda para la realización de este trabajo investigativo.
- A mi compañero David Cerda por darme su ayuda en la realización de este trabajo investigativo.

ABREVIATURAS

AAT:	Aspartato aminotransferasa
ADH:	Alcohol deshidrogenasa
CMG YBSF:	Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales.
cm:	Centímetro
DANIDA:	Agencia Danesa para el Desarrollo Internacional.
DAP:	altura sobre el nivel del pecho
g:	gramos
INAFOR:	Instituto Nacional Forestal
M:	Molar
m:	metro
mm:	milímetro
mM:	milimolar
µl:	microlitos
mg:	miligramos

msnm	metros sobre el nivel del mar
MTT:	(3[4,5- Dimetiltiazol-2-2] bromuro 2,5 difeniltretasolium, azul de tiazol)
NAD:	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP:	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PGI:	Fosfoglucosa isomerasa
PMS:	Phenazine methosulfate.
PVP:	Polivinilpirrolidona
PRX:	PEROXIDASA
rpm:	Revoluciones por minutos
V:	voltios

INDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
ABREVIATURAS.....	III
INDICE	V
I. RESUMEN.....	VI
II. INTRODUCCIÓN	- 1 -
III. OBJETIVOS	- 4 -
IV. MARCO TEÓRICO	6
4.1. PACHIRA QUINATA (JACQ.) W. S. ALVERSON.....	7
4.2. DIVERSIDAD GENÉTICA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
4.3. ENZIMAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
4.4. ISOENZIMAS (ISOZIMAS)	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
V. METODOLOGÍA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5.1. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5.2. EXTRACCIÓN DE ENZIMAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5.3. ELECTROFORESIS DE GEL DE ALMIDÓN DE ISOENZIMAS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5.4 VISUALIZACIÓN DE LAS ENZIMAS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5.5. INTERPRETACIÓN DEL GEL	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
6.1 DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN ADH EN PACHIRA QUINATA.	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
6.2 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LOS SISTEMAS PGI, PRX Y AAT	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
VII. CONCLUSIONES	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
VIII. RECOMENDACIONES.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
IX. BIBLIOGRAFIA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
X. ANEXO.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

I. RESUMEN

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular, del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-LEÓN). Se probaron diferentes condiciones con el fin de optimizar la metodología más adecuada, para aplicar la técnica de electroforesis de isoenzimas en geles de almidón en 4 sistemas isoenzimáticos: ADH, PGI, PRX Y AAT, con distintos búferes de gel y electrodo: Histidina – citrato, Tris – citrato (Murillo, 1997), Trizma – HCL (Favret, 1998) y Poulik Sodio – Borato (Weeden- Wendel, 1957).

Se colectaron 3 tipos de material vegetal: hojas tiernas o yemas, plántulas (hipócotilo) y semillas, de árboles de *Pachira quinata*, establecidos en el ensayo de descendencia del CMG y BSF. Sólo para el sistema ADH se probó los tres tipos de material vegetal, cada uno con dos búferes de extracción propuesto por Weeden-Wendel (1957), uno para material vegetal con bajo contenido en fenoles (Buffer 1) y el segundo para muestras con niveles moderados de fenoles (Buffer 2), además, se ensayó para este sistema dos condiciones de migración de electroforesis (180 V y 200 V), dos diferentes cámara de electroforesis (artesanal y de ADN), y dos formas de tinción (superficial e inmersión) . Para los otros sistemas sólo se utilizó como material vegetal hojas tiernas o yemas, migración a 200 V en cámara de ADN y tinción por inmersión.

No se logró optimizar los procedimientos para la resolución electroforética de los 4 sistemas isoenzimáticos ensayadas en este estudio ya que con ninguno se obtuvieron las bandas esperadas que permite diferenciar los homocigotos de los heterocigotos, por lo que no se pudo determinar variantes alélicas con estos resultados. Sólo en el sistema AAT, se dio actividad enzimática en 2 zonas del gel que se pueden interpretar como dos locus. Sin embargo, estas zonas no se diferencian en bandas separadas entre sí, ya que se presentan como complejos de bandas, lo que impide determinar con ellas si son locus polimorficos.

II. INTRODUCCIÓN



La demanda de madera y productos madereros está aumentando conforme se intensifican las presiones de la población humana por toda Centroamérica (Dvorak, 2001). La industria maderera y la expansión de la frontera ganadera han sido los principales responsables de la devastación de bosques tropicales. La deforestación y la reducción de los bosques naturales amenazan la biodiversidad y la extinción de las poblaciones naturales, como ocurre con la población de *P. quinata*.

Debido a la gran reducción en las poblaciones de esta especie tiene gran valor el conocimiento de la diversidad genética. La ventaja de la diversidad genética es que le confiere a las poblaciones la capacidad de adaptarse ante determinadas contingencias, así, es improbable que todos los individuos sean afectados por enfermedades, parásitos o inclemencias meteorológicas.

Ante esta problemática y con propósitos de recuperar las especies forestales a través de programas de reforestación y conservación, se crea en 1992 el Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales (CMG y BSF). La misión del banco de semillas era proporcionar cantidades suficientes de semillas de varias especies forestales, para uso local y mejorar la adaptabilidad y crecimiento de los árboles producidos, gracias al desarrollo de programas de mejoramiento genético forestal (Dvorak, 2001), que implicaron varios ensayos de especies latifoliadas entre ellas *P. quinata*.

Para establecer el ensayo de *P. quinata*, los árboles sólo fueron seleccionados fenotípicamente, es decir, no se usó la información genética, lo que reduce la habilidad de seleccionar con precisión los mejores árboles y lograr mejoras cuantiosas (Dvorak, 2001).

Actualmente este ensayo se quiere convertir como huerto semillero, para ello es necesario evaluar los niveles de heterocigocidad con técnicas moleculares codominantes como las isoenzimas. Una de las ventajas de la isoenzimas es que



permite calcular la heredabilidad de árboles individuales de una familia e incluirlas como ponderaciones genéticas en un índice de selección. El índice de selección ofrece un valor de reproducción para cada familia y el árbol individual. Ello orienta al mejorador genético sobre qué árbol debe escoger para la siguiente generación. Esta técnica además es útil también para determinar el grado de exogamia (entrecruzamiento) en huertos semilleros en especies con sistemas de apareamiento mixto.

En nuestro país no se ha realizado ningún tipo de estudio en la parte enzimática para evaluar la diversidad genética de *Pachira quinata*, por lo que el presente trabajo se propone, poner a punto las condiciones adecuadas para la técnica de Isoenzimas en geles de almidón. La información obtenida una vez que se lleve a cabo este tipo de estudio, contribuirá a hacer más eficiente la selección del material vegetal en los programas de mejora genética, y también permitirá mantener una representación óptima de la variabilidad genética dentro y entre las familias del ensayo en el CMG y BSF, al definir el material que realmente interesa conservar, evitándose así duplicaciones de genotipos y optimizándose los recursos y el espacio físico disponible.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

- Adaptar metodologías para la electroforesis de Isoenzimas en Geles de Almidón en *Pachira quinata* (Jacq.) W. S. Alverson (Pochote).

3.2. Objetivos Específicos:

- Ensayar dos bufferes de extracción de Isoenzimas para la resolución electroforetica en tres tipos de material vegetal: hojas, semillas y plántulas de *Pachira quinata*.
- Establecer las condiciones experimentales en el Laboratorio de Genética Molecular de la UNAN- León para poner a punto la técnica isoenzimática en cuatro distintos sistemas: ADH, PGI, PRX Y AAT.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. *Pachira quinata* (Jacq.) W. S. Alverson

4.1.1. Generalidades

Familia: Bombacaceae.

Especie: *Pachira quinata* (Jacq.) W. S. Alverson.

Sinónimos: *Bombacopsis quinata* (Jacq) Dugand, *Bombax quinatum* Jacq., *Bombax nicoyensi* Pittier, *Pachira fendleri* Seem, *Pochota vulgaris* Ramírez Goyena, *Bombacopsis jaris* Pitt, *Bombacopsis sepium* Pitt.

Nombre Común: Pochote, Cedro espino, Cedro, Ceiba tolua.

Árbol: Mediano a grande alcanzando 30 m de alto y 150 cm. de DAP. Copa redonda o umbelada, follaje denso con abundantes ramas extendida, ascendiendo oblicuamente, follaje verde claro y abierto, troza recta, cilíndrico o acanalada, base con gambas-tabloides grandes (CATIE, 1997; Stevens, et al 2001 y Thirakul, 1998). (Foto 1).

Corteza: Blanquecina-pardusca armada con agujones (Foto 2), lenticelada, fisurada fina y superficialmente, desprendiéndose en escamas papulosas dejando rayas verdes y rojizas-café alternamente en la corteza nueva. Bisel de 3 a 4 cm. de grueso; chaflán rojizo-rosado con color amarilloso-verde bajo el ritidoma, y rayado finamente de rojo, fibrosa, muy suave (CATIE, 1997 y Thirakul, 1998).



Foto.1 Base del árbol con gambas-tabloides grandes.



Foto.2 Izquierda, tronco de *Pachira quinata* con agujijones.

Hojas:

Palmaticompuestas, alternas, 5-folioladas, los folíolos de elípticos a obovados de 3 a 16 cm de largo y 2 a 9 cm de ancho, ápice redondeado a acuminado, base cuneada a obtusa, enteros, membranáceos, glabros; pecíolos articulados con el ápice del pecíolo, pecíolo de 5 a 7 cm de largo, cilíndrico, glabro, levemente pulvinado en ambos extremos (CATIE, 1997; Stevens, et al, 2001 y Thirakul, 1998). (Foto 3 y 4).



Foto.3 Hojas de *Pachira quinata*; se observa posición alterna.



Foto. 4 se observa el tamaño, el número de folíolos y su forma

Flores:

Inflorescencia una cima con pocas flores, naciendo en las axilas de las hojas caídas (Stevens, et al 2001), flores grandes, monoicas, hermafroditas y altamente autoincompatibles, de color blanco rosadas (CATIE, 1997); cáliz perfectamente truncado, 0.5 a 0.8 cm. de largo; pétalos 6 a 9 cm. de largo, densamente café-pubescentes en el exterior; filamentos numerosos, 6 a 8 cm. de largo, formando una columna estaminal de 1.5 a 2 cm. de largo. Flores observadas de enero a febrero (Stevens, et al 2001). Estas se abren desde las siete hasta las 10 de la noche, en condiciones normales, cuando la temperatura baja a menos 25° C. La polinización es realizada por murciélagos y mariposas nocturnas. A la mañana siguiente, las flores pierden los pétalos y estambres, persistiendo el estilo, aún después de formado el fruto. Los vientos fuertes pueden adelantar en media hora la apertura de las flores (CATIE, 1997). (Foto.5).



Foto. 5 *Pachira quinata*, flores de color blancas.



Foto. 6 *Pachira quinata*: fruto verde.

Frutos:

El Pochote es una especie sexualmente precoz. Al año de ser plantada los árboles producen frutos aunque en poca cantidad; por lo general la producción aumenta a partir de los tres años (CATIE, 1997). El fruto es truncadamente obovoide (Foto 6), de 4–9 cm de largo, con las valvas subleñosas; semillas en abundante kapok. Frutos observados de febrero a marzo (Stevens, et al 2001).

Madera : Grano recto; textura suave. Duramen de color rosáceo uniforme pálido o café rosáceo recién cortado, llegando a ser de café rojizo claro a oscuro en exposición; agudamente demarcado de albura amarillenta (Foto 7), sin olor distintivo pero algunas veces con sabor un poco astringente. Posee una densidad de 0.38 a 0.43 g/cm³, es de fácil trabajabilidad, buen acabado, fácil penetración de clavos, buena estabilidad dimensional y durabilidad natural. Su secado es lento y sin defectos; es considerada moderadamente resistente a los hongos que provocan la pudrición. El duramen es considerado como durable en su resistencia a hongos de putrefacción blanca, muy durable en resistencia a putrefacciones café. Susceptible al ataque por termitas de madera seca y subterráneas. Buena resistencia a taladradores marinos reportado en aguas de Panamá (CATIE, 1997 y Chudnoff, 1984).



Foto 7:
Duramen de
color rosáceo

Usos: Mueblería, chapas y plywood, tableros de partículas, productos de pulpa y papel, construcción general, madera aserrada (Thirakul, 1998).

Distribución: Común, en bosques bajos y secos, ocasional en bosques húmedos, zonas pacífica y norcentral de Nicaragua (Stevens, et al, 2001) (Véase Figura 1), su crecimiento es mayor en sitios de baja pendiente, de textura franca, bien drenados, pocos meses de

sequía no muy intensa y precipitación bien distribuida. Esta especie se encuentra del sur de Honduras al norte de Venezuela y Colombia (Vallejos, 1999; CATIE, 1991 y Chudnoff, 1984); En Nicaragua en el año 1991 se identificaron rodales de *Pachira quinata*, ubicados en los siguientes sitios: San Juan (Matagalpa), San Ramón (Chontales), Los Playones (Chinandega), Chacocentes (Carazo), Isla de Ometepe (Las Mercedes) y Cerro Ñambaras (Boaco).



Figura 1: Distribución Natural de *Pachira quinata* en Nicaragua. Tomado y modificado por Vallejos, 1999 y CATIE, 1991.

4.1.2. Ventajas para mejoramiento genético de *Pachira quinata*

Según Nota Técnica del CATIE (1991, 1988), *Pachira quinata* es una especie que presenta las siguientes características que facilita su mejoramiento genético y su uso en plantaciones comerciales:

- ❖ **Precocidad de floración**, lo cual permite obtener semillas en un corto tiempo (en algunos casos los individuos empiezan a producir semillas a la edad de un año).
- ❖ **Alta supervivencia**, la cual facilita el establecimiento de ensayos y plantaciones comerciales.
- ❖ **Resistencia a la sequía**, lo que permite plantar aún en periodo seco.
- ❖ **Fácil de polinizar**, esto facilita el cruce controlado y la producción de materiales para el establecimiento de ensayos de progenie.
- ❖ **Producción regular y abundante de semillas**, lo cual permite establecer ensayos de progenie con menos esfuerzo que los de muchas otras especies.
- ❖ **Autoincompatibilidad**, que asegura que flores de polinización cruzada no estén contaminadas por su mismo polen.
- ❖ **Semillas ortodoxas**, las cuales pueden ser almacenadas por varios años, lo que facilita la producción regular de semilleros para plantación y trabajo experimental.
- ❖ **Fácil de propagarse vegetativamente**, lo que permite la clonación usando métodos relativamente simples, para el uso en ensayos de campo, huertos de semillas y plantación.

4.2. Diversidad Genética

Las diferencias entre organismos individuales tienen dos causas: las variaciones del material genético que todos los organismos poseen y que pasan de generación en generación y las variaciones debidas a la influencia que el medio ambiente ejerce sobre cada individuo. La variación heredable es la materia prima de la evolución y la selección natural y, por tanto, constituye en última instancia el fundamento de toda la biodiversidad observable actualmente. Depende en lo esencial de las variaciones que experimenta la secuencia de los cuatro pares de bases que forman los ácidos nucleicos, entre ellos el ácido desoxirribonucleico o ADN, base del código genético en la inmensa mayoría de los organismos. Los individuos adquieren nuevas variaciones genéticas por mutación de genes y cromosomas; en organismos que se reproducen sexualmente, estos cambios se difunden a la población por recombinación del material genético durante la división celular que antecede a la reproducción sexual. (Villem, 2001.)

4.2.1. Origen de la Diversidad Genética por Mutación

Aunque la replicación del ADN es muy precisa, no es perfecta. Muy rara vez se producen errores, y el ADN nuevo contiene uno o más nucleótidos cambiados. Un error de este tipo, que recibe el nombre de mutación, puede tener lugar en cualquier zona del ADN. Si esto se produce en la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido particular, éste puede presentar un aminoácido cambiado en la cadena polipeptídica. Esta modificación puede alterar seriamente las propiedades de la proteína resultante. Cuando se produce una mutación durante la formación de los gametos, ésta se transmitirá a las siguientes generaciones. (Biblioteca de Consulta Microsoft® Encarta® 2002).

Según Fontdevila y Moya (1999), la variabilidad genética debida a mutaciones se puede clasificar de la siguiente manera:

4.2.1.1. Variabilidad por Cambios Puntuales en el ADN

Se da por la sustitución de una base nucleotídica por otra. Existen doce posibles sustituciones: cuatro denominadas *transiciones*, que sustituyen una purina por otra purina ($A \leftrightarrow G$) o una pirimidina por otra pirimidina ($C \leftrightarrow T$), y ocho, llamadas *transversiones*, que sustituyen una purina por otra pirimidina, o viceversa ($A, G \leftrightarrow C, T$)

4.2.1.2. Variabilidad por Reestructuración en el ADN

La dinámica del ADN genera cambios no puntuales que afectan amplias regiones del genoma. Entre éstos, los más importantes son la multiplicación repetitiva y las inserciones por transposición.

4.2.1.3. Variabilidad por Reestructuración Cromosómica

Los cambios mutacionales pueden deberse a reestructuraciones cromosómicas tales como cambios en la posición, el tamaño o el número de cromosomas. A diferencia de las mutaciones puntuales, la mayoría de estos cambios disminuyen el valor adaptativo de sus portadores.

4.2.2. Detección y Medida de la Variabilidad

Según Fontdevila y Moya (1999) la variedad puede detectarse y medirse a diferentes niveles.

4.2.2.1. A nivel morfológico

La detección de variabilidad en el fenotipo externo (exofenotipo) requiere de técnicas experimentales relativamente sencillas. Sin embargo, la expresión de muchos caracteres del exofenotipo está muy influenciada por el ambiente y la medida de la variabilidad genética subyacente a ellos necesita de técnicas estadísticas bastante elaboradas que permitan separar los efectos ambientales de los genéticos.

Sin embargo, hoy en día se poseen métodos moleculares cada vez más potentes para detectar y medir la variabilidad genética. Estas medidas nos han descubierto una gran cantidad de variabilidad en los seres vivos que, aparentemente, da soporte a la idea de que existe suficiente variabilidad para que las poblaciones puedan evolucionar. Sin embargo, todavía se sabe poco sobre cuánta de esta variabilidad se expresa para constituir variantes fenotípicas de valor adaptativo. Estos métodos moleculares pueden ser tanto a nivel de proteínas como de ADN.

4.2.2.2. A nivel Proteico

Se detecta mediante la separación en un campo eléctrico de las distintas formas proteicas (electromorfos) en un soporte poroso como gel de almidón, de acrilamida, de agarosa, acetato de celulosa, papel, etc. La interpretación de los geles es en muchos casos sencilla, pero a veces resulta complicada cuando la estructura proteica es multimérica.

Cuando los electromorfos son el resultado de la combinación de productos de *loci* distintos, la lectura del zimograma se complica. En este caso pueden aparecer más electromorfos debido a la combinación de monómeros de distintos *loci* y el patrón del doble homocigoto. Otras veces, se producen electromorfos que ocupan la misma zona del gel y están controlados por *loci* distintos aunque son productos de actividad y función parecida. Para clasificar estas situaciones los genéticos insisten en designar como alozimas a los distintos productos enzimáticos que están codificados por el mismo *locus*, para distinguirlos de las

isoenzimas (o isozimas), término bioquímico que designa enzimas cuya función u estructura es muy parecida. Está claro que todas las alozimas son isozimas, pero lo contrario no es cierto. Cuando la lectura de las distintas zonas de migración de un gel plantea dificultades, no hay más remedio que realizar cruzamientos controlados para dilucidar el sistema genético responsable.

La aplicación de técnicas de electroforéticas supuso un gran avance en la detección de variabilidad genética. Dado que las proteínas constituyen el producto directo de la acción genética, la variabilidad proteica debe ser reflejo de la variabilidad genética. Sin embargo, esto no es del todo cierto porque distintas secuencias aminoacídicas pueden plegarse dando proteínas variantes con la misma carga neta superficial y, por tanto, su migración en un campo eléctrico ser la misma.

4.2.2.3. A nivel de ADN

Actualmente el polimorfismo de ADN puede detectarse utilizando una gran variedad de técnicas que van desde estudios de fragmentos de restricción, llamados así porque son generados por enzimas de restricción o restrictasas, unas endonucleasas que cortan el ADN por secuencias nucleotídicas concretas que se denominan lugares o dianas de restricción.

Los fragmentos generados de esta manera pueden separarse por electroforesis y estudiar la variabilidad causante de cambios en la longitud de dichos fragmentos como son RFLP (Polimorfismo de la Longitud del Fragmento de Restricción). La variabilidad de longitud puede deberse a sustituciones nucleotídicas, a inserciones/deleciones o a repeticiones de motivos de pares de bases. Este tipo de variabilidad también puede detectarse por medio de técnicas de amplificación basada en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que usa ADN polimerasa para sintetizar fragmentos de ADN.

Sin embargo, es evidente que la secuenciación del ADN es el último paso para detectar toda la variabilidad genética al nivel más íntimo, pero, aunque actualmente los métodos de secuenciación se hacen cada vez más automáticos, este método es todavía impracticable por el costo y el volumen de trabajo cuando se precisan estimaciones de la variabilidad de todo el genoma en muestreos poblacionales.

4.2.2.4. Parámetros de Medida: Polimorfismo y Heterocigosis

En los estudios de polimorfismo alozímico (o de otros polimorfismos mendelianos) se ha utilizado la heterocigosis poblacional (H) como una medida práctica de la diversidad genética. H se define como la proporción de individuos heterocigóticos por *locus* o, lo que es lo mismo de *loci* heterocigóticos por individuo. Este parámetro es ciertamente indicativo de la diversidad génica en poblaciones de individuos diploides con apareamiento al azar, pero no lo es en poblaciones con otro tipo de apareamiento y, desde luego, no es aplicable en las poblaciones de organismos haploides.

4.3. Enzimas

4.3.1. Introducción

En 1876, el fisiólogo alemán Wilhelm Kühne (1837-1900) acuñó la palabra enzima, que deriva de la frase griega *en zyme* y literalmente significa “en la levadura”, ya que observó que el zumo de levadura producía fermentación. Las enzimas son proteínas simples o conjugadas que actúan como catalizadores biológicos (Jones y Morris, 1999). Un catalizador es una sustancia que aumenta la rapidez o velocidad de una reacción química, sin verse alterada ella misma en el proceso global (Mathews y van Holde, 1999).

El nombre de las enzimas suele ser el de la sustancia sobre la cual actúan, seguido por el sufijo –asa (Jones y Morris, 1999; Vilee, 2001 y Hein, 1992). A la

sustancia sobre la cual actúa una enzima se le llama sustrato y a la sustancia resultante de la reacción se le llama producto (Hein, 1992). Por ejemplo, la sacarosa es desdoblada por la enzima sacarosa para dar glucosa y fructosa (Villem, 2001).

4.3.2. Clasificación de las Enzimas

Existe una enorme cantidad de proteínas diferentes que actúan como enzimas. Muchas de estas enzimas recibieron nombres comunes, en especial durante los primeros años de la enzimología – ciencia que estudia a las enzimas.

Con objeto de reducir la confusión, la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) ha diseñado un sistema lógico de denominación y numeración. Las enzimas se dividen en seis grandes clases con subgrupos y sub-subgrupos que definen sus funciones con mayor precisión. Las principales clases son las siguientes (Mathews y van Holde, 1999):

A. Oxidorreductasas. Catalizan reacciones de oxidación-reducción.

B. Transferasas. Catalizan transferencias de grupos funcionales de una molécula a otra. $AB + C \rightarrow A + BC$.

C. Hidrolasas. Catalizan rupturas hidrolíticas. $AB + H_2O \rightarrow AH + BOH$.

D. Liasas. Catalizan eliminaciones de un grupo o adiciones de un grupo a un doble enlace, u otras rupturas que implican un reordenamiento electrónico.
 $AB \rightarrow A + B$.

E. Isomerasas. Catalizan reordenamientos intramoleculares. $ABC \rightarrow ACB$.

F. Ligasas. Catalizan reacciones en las que se unen dos moléculas con energía obtenida del ATP. $A + B + ATP \rightarrow AB + ADP + P$.

4.3.3. Propiedades de las Enzimas

Según Jones y Morris (1999), las propiedades de las enzimas son las siguientes:

A. Las enzimas tienen una elevada eficacia catalítica puesto que aumentan la velocidad de las reacciones sin ser consumidas; sin ellas las reacciones metabólicas serían demasiado lentas para mantener la vida. Cantidades pequeñas de una enzima pueden realizar a bajas temperaturas lo que podría requerir reactivos violentos y altas temperaturas con métodos químicos ordinarios.

B. Las enzimas son reutilizables porque no se consumen en las reacciones que catalizan: pueden ser usadas de nuevo; sin embargo, al contrario que los catalizadores inorgánicos, no son estables, por lo que no pueden ser usadas indefinidamente y deben ser constantemente reemplazadas.

C. Las enzimas funcionan en ambas direcciones. La dirección en la que se desplaza una reacción química depende de las cantidades presentes de sustratos y productos. La enzima acelera la reacción en cualquier dirección hasta que se alcanza el equilibrio. El punto de equilibrio y el intercambio de energía de la reacción no se alteran.

D. Las enzimas son altamente específicas, catalizando un solo tipo de reacción, actuando sobre un isómero óptico en particular o sobre un grupo químico aislado. Las enzimas intracelulares tienen normalmente un solo

sustrato, mientras que las enzimas extracelulares actúan habitualmente sobre un grupo de sustratos relacionados.

E. Algunas enzimas contienen cofactores no proteicos, necesarios para la actividad de la enzima y son generalmente iones metálicos (p. ej., Zn^{2+} , Fe^{2+}) o derivados vitamínicos (p. ej., el dinucleótido de nicotinamida y adenina [NAD] y el dinucleótido de flavina y adenina [FAD]).

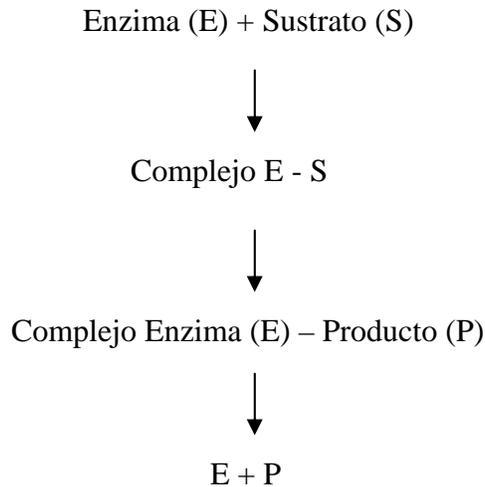
F. La actividad enzimática está regulada, en cada célula tienen lugar muchas reacciones y es necesario que todas ellas estén organizadas. La especificidad de las enzimas constituye un método de regulación; otros métodos son su activación o inhibición por modificadores alostéricos o la modificación covalente de la propia enzima.

4.3.4. Estructura de la Enzima

Más del 90% de las enzimas son proteínas globulares y el resto se encuentran conjugadas a un grupo prostético. Estudios recientes con difracción de rayos X y otras técnicas han permitido un mejor conocimiento de la estructura de las enzimas y han proporcionado cierta evidencia de las hipótesis de “la llave y la cerradura” y del “ajuste inducido” (Jones y Morris, 1999).

A. Hipótesis de “La Llave y La Cerradura”

Esta hipótesis fue propuesta por Emil Fischer en 1894, para explicar cómo actúan las enzimas. Expone que la enzima y el sustrato se combinan para formar un complejo enzima-sustrato, en el que las moléculas del sustrato están mantenidas de tal forma que se forman nuevas uniones (complejo enzima-producto); finalmente, la enzima se disocia del producto y puede usarse nuevamente:



El punto activo es donde la enzima se une al sustrato; su forma y sus grupos químicos significan que sólo podrán combinarse los sustratos con estructura complementaria, de forma análoga a una llave y una cerradura (Jones y Morris, 1999). Aunque el modelo de “la llave y la cerradura” explicaba la especificidad enzimática, no permitía aumentar nuestra comprensión de la catálisis en sí, ya que una cerradura no hace nada a su llave (Mathews y van Holde, 1999).

B. Hipótesis de “Ajuste Inducido”

Un modelo sugerido más recientemente del sitio activo enzima-sustrato se llama modelo de “ajuste inducido”. Propuesto en 1958 por Daniel Koshland, en este modelo, el sitio de fijación de la enzima con el sustrato es flexible, induciendo este último un cambio en la forma de la enzima que entonces ajusta en la forma del sustrato. Esta teoría permite la posibilidad de que en algunos casos la enzima se enrolle sobre el sustrato tomando la forma correcta de llave y cerradura. Así, la enzima no necesita tener un sitio activo catalítico exacto que coincida con el sustrato (Hein, 1992). Esta teoría continúa siendo el modelo más aceptado para la catálisis enzimática (Mathews y van Holde, 1999).

4.3.5. Factores que Afectan la Actividad Enzimática

Según Ville (2001), los factores que afectan la actividad enzimática son:

A. Temperatura

Las enzimas, como todas las proteínas, funcionan a una temperatura óptima. Las enzimas son inactivadas por el calor, las temperaturas de 50 a 60° C inactivan rápidamente la mayor parte de las enzimas. Esta inactivación si afecta la estructura primara de la enzima es irreversible, de tal modo que al enfriarlo no se obtiene actividad otra vez.

Las enzimas no son inactivadas por la congelación; las reacciones que producen tienen lugar muy lentamente a temperaturas bajas, o se detienen, pero la actividad catalítica reaparece si la temperatura vuelve a la normalidad.

B. pH

Las enzimas son además, sensibles a los cambios de pH, o sea de acidez o alcalinidad del medio. La mayor parte de enzimas intracelulares tienen óptimos pH cerca de la neutralidad, por lo que no actúan en medios ácidos ni alcalinos; los ácidos y bases energéticos las inactivan irreversiblemente.

C. Concentración de Enzima, Sustrato y Cofactor

Si el pH y la temperatura de un sistema enzimático se mantienen constantes, pero hay exceso de sustrato, la intensidad de la reacción es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente. Si el sistema enzimático requiere una coenzima o un ión activador específico, la concentración de dicha sustancia en algunos casos será la que determine la intensidad global de la reacción.

D. Venenos Enzimáticos

Algunas enzimas resultan muy sensibles a ciertos venenos (cianuro, ácido yodoacético, fluoruro, lewisita, etc). Resultan inactivadas aún frente a concentraciones bajas de estos venenos.

4.4. Isoenzimas (Isozimas)

4.4.1. Generalidades

Muchas enzimas están distribuidas ampliamente entre las distintas células del organismo y aunque catalizan las mismas reacciones químicas específicas, suelen presentar características físicas, bioquímicas e inmunológicas distintas, dependiendo de su procedencia. De hecho, aunque la estructura del sitio activo de enzimas con la misma especificidad sea igual (o muy similar) de unas a otras, no son proteínas idénticas, sino que dependiendo de su origen, es probable que la frecuencia de aminoácidos de fragmentos de sus cadenas polipeptídicas difieran considerablemente. A esta variantes de enzimas que realizan la misma acción catalítica, pero que presentan diferentes formas moleculares dentro de un misma especie, se les denomina isoenzimas o isozimas.

En algunos casos, dichas isoenzimas se deben a la modificación por factores que cambian la carga iónica o la conformación de enzimas codificadas por el mismo gen, dependiendo de la célula de procedencia. No obstante, pueden formarse también a partir de más de un gen (Herrera, 1993).

4.4.2. Descripción de la técnica de isoenzimas

El origen de la electroforesis en 1930 acompañado con la técnica del zimograma ha sido la herramienta de elección para estudios de variación genética por genetistas, sistemáticos y biólogos de población. Ha llegado a ser uno de los tres métodos más comunes para el fraccionamiento de mezclas moleculares junto con la cromatografía líquida y la ultracentrifugación. Entre las técnicas para

proteínas, el análisis de isoenzimas es ampliamente usado por su eficiencia relativa y eficacia de costo, particularmente en estudios de variabilidad intraespecífica (Kephart, 1990 , Hunter y Markert, 1957 y Quíros, R.. 1975).

Para estos estudios se han utilizado varias estructuras de la planta, tales como hojas, raíces o botones florales, de las cuales se obtiene un extracto crudo proteico. La técnica consiste en la separación de las enzimas del extracto crudo, en un soporte permeable (almidón o poliacrilamida) bajo la acción de un campo eléctrico y seguido de un teñido histoquímico. La separación se realiza mediante la carga eléctrica neta, peso molecular, punto isoeléctrico y/o combinación de estos criterios (separación multidimensional). De este modo se separan enzimas codificadas por genes diferentes o productos de diferentes alélos de un mismo gen (Becerra y Paredes, 2000). El gel se tiñe empleando un colorante que permite hacer visible sólo una enzima específica y sus formas moleculares múltiples, dejando las otras proteínas separadas (y enzimas) sin teñir (Kephart 1990) (Quíros, R.. 1975).

Las isoenzimas han sido a menudo usadas para investigar problemas de sistemática, evolución o para medir los niveles de variación genética entre y dentro de las poblaciones, en la identificación de cultivares. Varios estudios de diversidad genética se han realizado en diferentes especies de cultivos anuales y perennes, tales como lentejas (*Lens culinaris*), frijoles (*Phaseolus vulgaris*), nogal (*Junqlans regia*) y vid (*Vitis sp.*) (Becerra y Paredes, 2000). También se puede establecer relaciones y diferenciaciones filogenéticas entre y dentro poblaciones como se ha hecho en *Chaenomeles* (Bartish et al., 2000); y construir mapas de ligamiento genético de especies forestales, como en eucaliptos (Byrne et al., 1995), *Quercus robur* L. (Barreneche et al., 1998).

Ventajas

Las principales ventajas de las isoenzimas incluyen la simplicidad, mínima cantidad del material en estudio, bajo costo y una cobertura del genoma de 10-20 loci por especie. La expresión alélica es de tipo codominante, lo que permite

diferenciar homocigotos de heterocigotos, para establecer comparaciones entre especies, dentro de poblaciones de una misma especie, y detectar la presencia de híbridos e introgresión de genes (Becerra y Paredes, 2000, y Quíros, R.. 1975).

Desventajas

Entre sus desventajas se incluye un nivel bajo de polimorfismo al presentar pocos alelos por locus, especialmente cuando la base genética es estrecha. Otro aspecto a considerar es que las proteínas, siendo un producto del ADN, pueden ser afectadas cualitativa y cuantitativamente en su nivel de expresión por factores ambientales.

Para aumentar la eficiencia de la técnica ante este factor, deben ser identificados los estados de desarrollo de la planta durante los cuales la proteína es estable. Al igual que con las proteínas de reserva, las isoenzimas pueden o no reflejar los cambios genéticos que ocurren en el ADN, además sólo un set de genes estructurales están representados en estas proteínas, vale decir, sólo parte del genoma se puede evaluar (Becerra y Paredes, 2000).

4.4.3 Sistemas isoenzimáticos como marcadores genéticos

Los organismos diploides, que se reproducen sexualmente, reciben un juego completo de cromosomas de cada progenitor. Consecuentemente, tienen cada gen por duplicado; los genes homólogos se denominan alelos. Si existe más de un alelo en el locus de un gen estructural, las diversas enzimas determinadas por ellos pueden presentarse, ya sea en un organismo diploide simple (heterocigótico) o en distintos miembros (homocigóticos) de una especie.

El número de alelos en un locus dado depende de la especie y del propio locus. Los genes se caracterizan como polimórficos si comprenden dos o más alelos. Si dos variantes alélicas de una enzima difieren en el número de aminoácidos provistos de carga, sus diferentes cargas netas se pueden emplear para

detectarlas como marcadores genéticos. Los genes invariantes (monomórficos) no son adecuados para estudios genéticos.

Los genes que codifican isoenzimas, se identifican mediante una abreviatura del nombre de la enzima, p.ej. "AAT"-para aspartato amino transferasa. Si un gen comprende más de un locus (el lugar de la molécula de ADN definido con precisión) estos loci se indican mediante una letra mayúscula (o un número) ligado al nombre del gen como un sufijo, p.ej. AAT-A o AAT -B (o AAT-1 o AAT-2). Los alelos correspondientes pueden indicarse mediante números consecutivos como AAT-A1, AAT-A2, etc. (o AAT-1₁, AAT-1₂)

Las Isoenzimas se pueden emplear en estudios genéticos si se cumplen las siguientes condiciones:

- El genotipo está expresado fenotípicamente mediante patrones de enzimas dados, que pueden observarse en el laboratorio. Un requisito previo para ello es que las formas enzimáticas de interés segreguen en forma mendeliana.
- Por lo menos un locus por enzima es polimórfico (Rothe, G. M. s.f.).

4.5. Mecanismo de Detección Común de las Isoenzimas

NAD (P) H/ MMT/ PMS: NADH O NADPH puede reducir químicamente la actividad del tinte. MMT (usando PMS como un intermediario) se produce el componente morado o púrpura insoluble.

NAD: las áreas conteniendo NAD no son fluorescentes y aparecen como cintas oscuras, atravesando un camino de NADH fluorescentes sobre la luz ultravioleta.

Metil umbeliferil: se ve sobre la luz fluorescente de ultravioleta.

Napthol/ diazo tinte rápido o oxaloacetate/ tinte rapido diazo, un numero de sales diazonium pueden químicamente reactuar con varios componentes (α napthol, β

naphthol y oxaloacetate son usados aquí y forman un color precipitado o encendido.

Enzimas (reducidas) MTT/PMS, las enzimas AO, GOX, XO cada uno contiene un grupo altamente de usos que pueden ser intercambiados entre los estados reducidos y oxidados. Las formas reducidas de estas enzimas pueden químicamente reducir MMT via MPS sin la necesidad por un NAD o NADP.

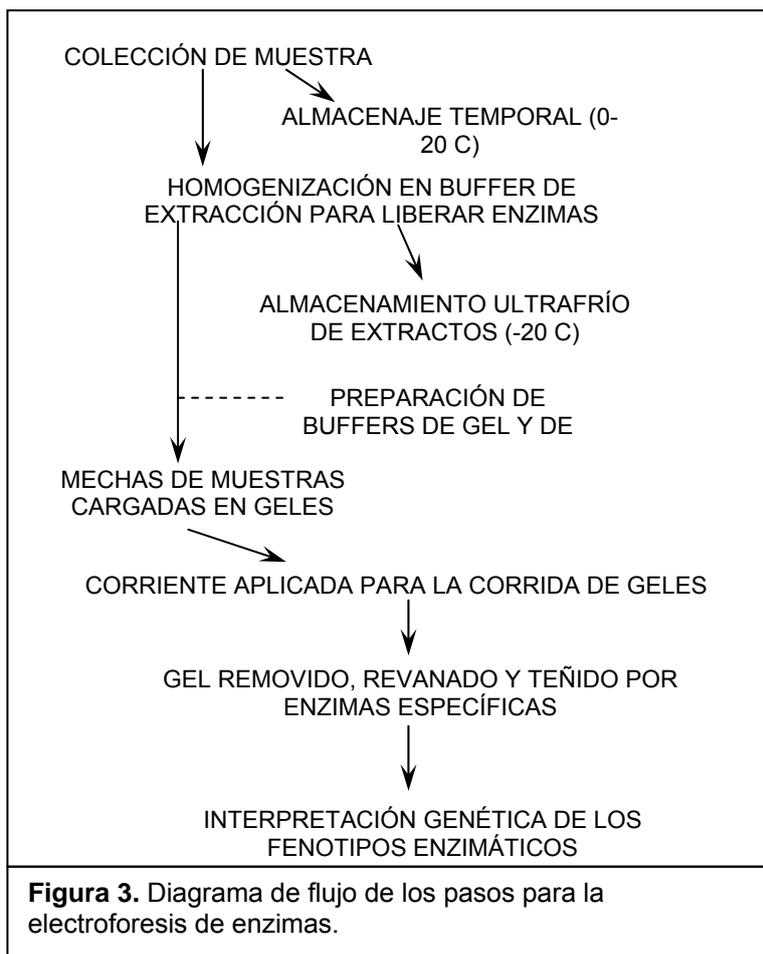
DCIPH/ MMT: Las formas reducidas de DCIP químicamente reducen los tintes MMT o producen el componente morado insoluble formazan sin la necesidad de un intermediario PMS.

O₂/ O – Dianisidine di HCL: La forma oxidada de de O – Dianisidine di HCL y 3-amonio – 9 ethyl – carbazole) es un castaño o café insoluble precipitado.

V. METODOLOGÍA

En el presente estudio, se trató de adaptar la técnica de Electroforesis de Isoenzimas en Geles de Almidón en cuatro sistemas isoenzimáticos (ADH, PGI, PRX y AAT) utilizando muestras de *Pachira quinata*, en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-LEÓN) en el período de Octubre del 2004 a Diciembre del 2005.

Para resolver electroforéticamente cada sistema isoenzimático es necesario primero la extracción de las isoenzimas a partir del material vegetal, a las cuales se les aplica la técnica de electroforesis en geles de almidón y posteriormente se visualiza cada sistema isoenzimático analizado por tinción del gel con un sustrato específico. En la Figura 2 se puede observar detalles de los pasos principales requeridos para la extracción y movilización de enzimas para la electroforesis y para sus subsecuentes detección vía tinción histoquímica (Kephart, 1990).



5.1. Obtención y Tratamiento del Material Vegetal

El material vegetal fue colectado de árboles del ensayo de 60 descendencias de *Pachira quinata*, en el Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales (CMG y BSF), (El Caguano -La Leona- León), el cual fue establecido en 1992 a una latitud 12° 21´ norte, longitud 86ª 39´ oeste, altitud 100 msnm y con una precipitación anual 1350mm. (Figura 3).

El diseño cubre un área de 1.7 hectáreas (Figura 4) que consta de 6 bloques completos al azar con parcelas lineales de 10 plantas cada una; entre cada planta tiene un espaciamiento de 2 x 2 m, y presenta 2 líneas de borde (Ampié, 1992).

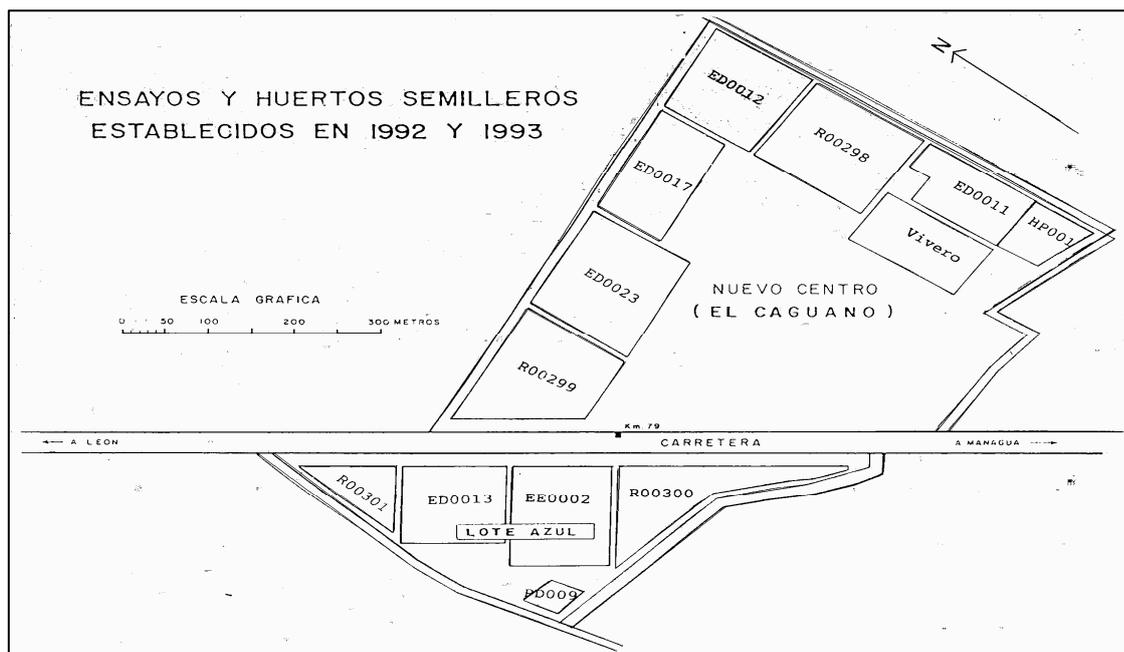


Figura 3. Mapa del Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales, en donde se encuentra varios ensayos de parcelas experimentales de distintas especies forestales.

Ensayo de Descendencia *Pachira quinata*
Cuaguano-La Leona-León

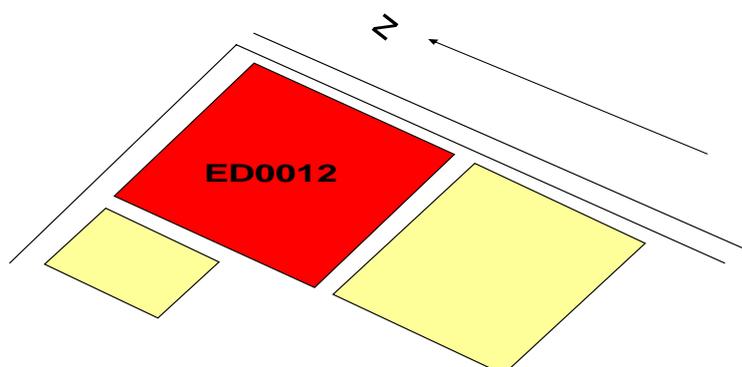


Figura 4. Ensayo de descendencia *Pachira quinata* Cuaguano – La Leona- León, con el código ED0012 es el que representa la parcela de Pochote.

Se colectaron 60 muestras al azar, una muestra por cada línea del ensayo en dirección de norte a sur. Posteriormente al reactivarse el CMG y BSF y contar con el diseño del ensayo se detectó que se tenían muestras de 35 distintas familias a analizar (Anexo tabla 1).

Las muestras colectadas consistieron en yemas de hojas u hojas tiernas y frutos (para obtener las semillas) se colocaron en bolsas plásticas debidamente rotuladas y en el caso de las yemas y hojas tiernas se trasladaron en un termo con hielo al laboratorio de Genética Molecular donde se almacenaron a -20°C para luego extraer las enzimas.

Para obtener las plántulas, las semillas se sembraron en platos Petri usando un 80% de arena y el 20% de tierra, a una profundidad de un centímetro. La germinación se da entre 8 - 15 días. También se realizó la siembra en plato Petri con algodón y agua, y luego se hizo la extracción de isoenzimas el hipocotilo de la plántula germinada.

5.2. Extracción de Enzimas



Foto 8 Hojas tiernas y retoño de hojas
Pachira quinata

El material vegetal (semilla, retoño de hojas u hojas tiernas e hipocótilo de plántula) es colocado en el buffer de extracción en una proporción 1:2, es decir, un gramo de tejido por cada 2 ml de buffer (Foto 8). Se tritura o macera utilizando un mortero mecánico (Foto 9). Después de la homogenización se centrifuga el extracto a 10,000 rpm por 15 minutos y luego se guarda a -20 C.



Foto 9. Maceración del
tejido vegetal usando un
mortero mecánico

Para tratar de adaptar un procedimiento de extracción, se probaron dos búferes de extracción propuestos por Weeden y Wendel (1989), para las tres tipos de material vegetal, los que se denominaron 1 y 2.

1. Buffer de extracción 1. Para tejidos con niveles bajos en fenoles o sustancias interferentes.

Concentración	Reactivo
50 mM	Buffer Fosfato o Buffer Tris-HCl
5 %	Sacarosa (w/v)
5 %	PVP – 40 (w/v)
14 mM	Mercaptoetanol (0.1 % v/v)

2. Buffer de extracción 2. Buffer para tejidos con niveles moderados en fenoles o sustancias interferentes

Concentración	Reactivo
75 mM	Buffer Fosfato o Buffer Tris-HCl
5 %	Sacarosa (w/v)
5 %	PVP – 40 (w/v)
14 mM	Mercaptoetanol (0.1 % v/v)
50 mM	Ácido ascórbico, sal Na
0.1 %	Suero de albúmina bovina (w/v)
50 mM	Dietilditiocarbamato de sodio

5.3. Electroforesis de Gel de Almidón de Isoenzimas

Las muestras extraídas con ambos búferes se someten a electroforesis en geles de almidón, utilizando cuatro sistemas isoenzimáticos ADH (alcohol deshidrogenasa), PGI (fosfoglucoisomerasa), PRX (peroxidasa), AAT (aspartato aminotrasferasa). Para realizar la electroforesis con cada sistema isoenzimático, se prepara el gel de almidón y se realiza la migración de las muestras en determinados búferes de gel y de electrodos respectivamente ensayando diferentes condiciones de migración.

5.3.1. Preparación de los Búferes de Gel y Electrodo

Cada sistema isoenzimático se probó con un determinado sistema de buffer de gel y buffer de electrodo y algunas variaciones de pH como se muestra a continuación en la tabla 2. (Weeden y Wendel,1989; Murillo,1997 y Favret ,1998).

Tabla 2. Búferes electrodos y de gel probados para los distintos sistemas isoenzimáticos estudiados. En el caso de Tris- citrato y Trizma HCL se probó con dos variantes de pH.

Sistema de isoenzimas	Buffer Electroodos	Buffer Gel
PGI	<i>L-Histidina-citrato (Murillo, 1997)</i> 0.065 L. Histidina 10.09 g/l 0.019 ácido cítrico 2.8 g/l pH 5.7	L. Histidina - citrato 0.009 L. Histidina 1.4 g/l 0.006 ácido cítrico 1.8 g/l P H 5.7
PGI	<i>Sistema Tris-citrato (Murillo, 1997)</i> Tris 16.35 g Acido citrico 12.65g pH 7, 7.5,	Tris- citrato Dilución 1:14 Buffer electroodos 71ml. H ₂ O 929 ml pH 7, 7.5
PRX,	<i>Trizma-HCL (Favret, 1998)</i> Trizma HCL 7.9g/1000 H ₂ O pH 7.0, 7.5	Trizma-HCL Dilución 1:7 Buffer electroodos 150ml H ₂ O 900ml pH 7.0, 7.5
AAT, ADH	<i>Sistema poulik Sodio-Borato (Weeden y Wendel, 1957)</i> 0.300M Acido bórico 18.55g/l pH 8.0	Tris- citrato Dilución 1:6 Tris 0.076M 9.20g/l 0.005M acido cítrico 1.42g/l pH 8.6

5.3.2 Preparación del Gel de Almidón

El gel de almidón se prepara diluyendo en el buffer gel necesario para cada sistema enzimático a analizar. El procedimiento para la preparación del gel de almidón se realizó según Weeden y Wendel (1989). (Foto 10).

- 1- almidón 10% (w/v)
- 2- sacarosa 4% (w/v)



Foto 10. Preparación del gel de almidón

Aproximadamente tres cuartos del buffer requerido para un solo gel se mezclan con agua hasta alcanzar la dilución apropiada. Se calienta hasta ebullición y la otra parte del buffer es usada para diluir la sacarosa y el almidón a temperatura ambiente. El buffer hervido se vierte en la suspensión de

almidón-sacarosa, mezclando vigorosamente por unos pocos segundos hasta alcanzar una mezcla uniforme. Se calienta de nuevo hasta que empiece a hervir (Foto 11). La solución es luego desgaseada con un aspirador y vertida en la cubeta de electroforesis (Foto 12). El gel es enfriado a temperatura ambiente aproximadamente por 30 minutos cubierto con una película de polietileno, luego se deja a 4 °C hasta realizar la electroforesis.



Foto 11. Mezcla del gel de almidón



Foto 12. Desgaseando el gel de almidón

5.3.3. Aplicación de la Muestra al Gel de Almidón

Una vez enfriado el gel, la cubierta de polietileno es retirada de la orilla catódica del gel y se hace una ranura perpendicular a la superficie del mismo aproximadamente a 3 cm. de la orilla para depositar la muestra.

Las muestras son aplicadas al gel como extractos absorbidos en tiras de papel que son cortadas de papel filtro Whatman 3MM con un tamaño de 3 mm (amplitud) x 10 mm (longitud) dependiendo de las dimensiones del molde del gel y del número de muestras a depositar en el. Las tiras de papel son sumergidas en la muestra homogenizada y luego son secadas con papel toalla para prevenir la contaminación de carriles vecinos. Se procede a introducir las tiras de papel en la ranura del gel (Foto 13 y 14). En la primera ranura se introduce una tira de papel con azul de bromofenol esto es para visualizar como avanza la corrida de las muestras durante la electroforesis.



Foto 13. Gel de almidón con las muestras

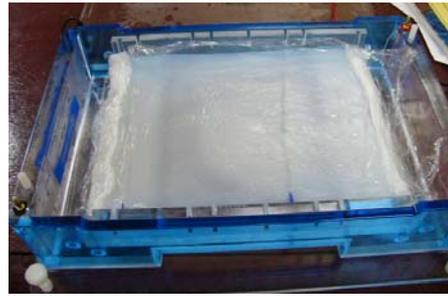


Foto 14. Gel de almidón listo para electroforesis

5.3.4. Migración de las Muestras

Debido a que no se comercializan cubetas de electroforesis para isoenzimas, se fabricó una de manera artesanal utilizando las dimensiones propuestas por Hills, et al (1996). Por otra parte, también se utilizó una cámara de electroforesis para migración de ADN, con el fin de determinar cuál de estas dos cámaras funcionaba mejor al momento de aplicar la técnica.

La migración o “corrida” propiamente dicha se realiza de la siguiente manera:

1. Se introduce la cubeta con el gel dentro de la cámara de electroforesis.
2. Se vierte en ambos reservorios de la cámara de electroforesis el buffer de electrodo, el cual no debe de tocar el gel de almidón.
3. El contacto entre el gel y el buffer de electrodo es establecido utilizando papel toalla o algodón que sirven como puentes entre los reservorios de electrodo y los extremos del gel.
4. Se coloca la cámara de electroforesis en una incubadora a 4° C con el fin de realizar la migración en frío (Foto 15).

Basados a lo que reporta Gamboa (1997), que el voltaje se puede aplicar multiplicando la longitud del gel por 18 – 20 V X cm y dado que la medida de

1. cada gel es de 10 cm se probó un mínimo y un máximo de estos voltajes para la migración. Se utilizó un mínimo de 180 y un máximo de 200 voltios.



Foto 15. Proceso de electroforesis en la incubadora a 4°C

5.4 Visualización de las Enzimas

Terminada la migración, se procede a remover el gel de la cámara de electroforesis y es cortado en forma de un bloque rectangular para eliminar el exceso de almidón de los lados del gel, incluyendo la cinta catódica. Una esquina predeterminada del gel es cortada en alguna forma de modo que permita la identificación apropiada de las muestras en manipulaciones posteriores.

Para visualizar cada tipo de isoenzimas en el gel se usan tintes con actividad específica. Los reactivos contenidos en el tinte se pueden aplicar de dos maneras:

- ❖ Por Inmersión
- ❖ Por aplicación del tinte de manera superficial en el gel (Foto 16)



Foto 16. Tinción del gel de almidón de manera superficial

La preparación de los tintes para cada sistema isoenzimático ensayados se realiza de la siguiente manera:

1. PGI (Fosfoglucosa isomerasa). Según Favret 1998 y Weeden, Wendel 1989.

50 mM TRIS- HCL, Ph: 8.0	50 ml
12.08 mM MTT	500 µl
FRUCTOSA- 6 – FOSFATO, Na ₂ salt	20mg
	500µl
7.29 mM NAD	
GLUCOSA-6 -FOSFATO	20 U
DESHIDROGENASA	
17 mM PMS	500 µl

Tinción: Bandas azules en un fondo blanquecino.

.....

2. PRX (Peroxidasa). (Favret 1998)

METODO I

Yoduro de potasio 5%	5 ml
Agua destilada	95 ml

METODO II

Agua Oxigenada 20 vol	1 ml
Agua Destilada	99 ml
Se deja el gel en cada paso 3min	

Tinción: Bandas azules sobre un fondo blanquecino, el dato se debe de tomar inmediatamente por no ser una coloracion estable.

3. ADH (Alcohol deshidrogenasa). (Favret 1998).

Etanol 95 %	2 ml
12.08 mM MTT	500 µl
7.29 mM NAD	500 µl

17mM PMS	500 µl
BUFFER TRIS – HCL PH 8.6	100 ml
AGAR 1.5%	1.5 gr.

Tinción: Bandas azules sobre un fondo blanquecino.

4. AAT (Aspartato aminotransferasa). (Favret 1998).

AAT SOLUCIÓN SUSTRATO	50 ml
120 mM Sal Fast Blue BB	1 ml
AAT SOLUCION SUSTRATO: pH 7.4	
H2O	800 ml
Ácido α - Cetoglutárico	292 mg
Ácido L- Aspártico	1.07g
PVP- 40	4.00g
EDTA, Na ₂ sal	400 mg
Fosfato de Sodio Dibásico	11.36 g

Tinción: Se debe incubar a temperatura ambiente en la oscuridad hasta que aparezcan bandas azules sobre un fondo blanquecino.

5.5. Interpretación del Gel

Una vez teñido el gel, se obtiene un patrón de bandas (electromorfos) lo cual se interpreta de la siguiente manera: (Figura 5). Si la enzima es monómera, en un *locus* los homocigotos muestran una banda y los heterocigotos dos. Pero en un *locus* de una enzima dimérica, los homocigotos muestran cada uno una sola banda, electromorfo que corresponde a los homodímeros, pero el heterocigoto muestra tres electromorfos, dos homodímeros y un heterodímero, este último generalmente de movilidad intermedia. A medida que aumenta la complejidad de la enzima, aumenta a su vez el número de electromorfos del heterocigoto, siendo igual a $n + 1$, donde n es el número de cadenas de la molécula proteica. El número de electromorfos totales observables en un zimograma depende del número de alelos presentes en la población estudiada (Fontdevila y Moya, 1999).

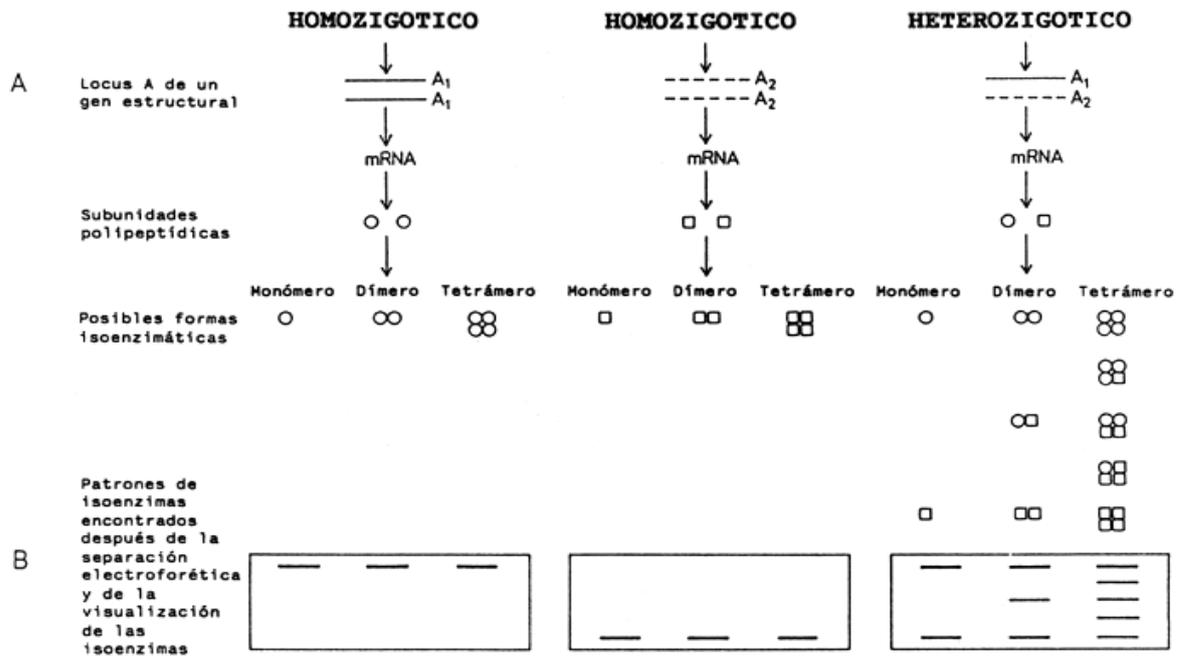


Figura 5. Monómero, Dímero y Tetrámero
<http://www.fao.org/docrep/006>.

Los sistemas isoenzimáticos pueden presentar más de un *locus* y estas se pueden separar en dos o más zonas la que se representan por letras mayúsculas. La zona más anódica se denomina como el *locus* A, el siguiente como *locus* B, y así sucesivamente. Para cada *locus* la banda más rápida (más anódica) es el alelo 1 y los siguientes como el alelo 2, 3, etc., correspondiente a su movilidad relativa en el gel (Murillo, 1997).

De los 4 sistemas isoenzimáticos a probar en este estudio primero se ensayo con ADH, para poder determinar el material vegetal, los búferes de extracción, la forma de la tinción, el tipo de cámara de electroforesis a usar y condiciones de migración en este sistema. Para ello, se siguió el siguiente cronograma de pruebas: para cada tipo de material vegetal de *Pachira quinata*. (Tabla 3).

Nº de prueba	Material vegetal	Buffer de extracción	Condiciones de migración	Cámara de electroforesis	Forma de tinción
1	Yemas y retoño de hojas	1	180V	Artesanal	Inmersión
					superficial
				De ADN	superficial
					Inmersión
2	Yemas y retoño de hojas	1	200V	Artesanal	Inmersión
					superficial
				De ADN	superficial
					Inmersión
3	Yemas y retoño de hojas	2	180V	Artesanal	Inmersión
					superficial
				De ADN.	superficial
					Inmersión
4	Yemas y retoño de hojas	2	200V	Artesanal	Inmersión
					superficial
				De ADN.	superficial
					Inmersión
5	Semillas	1	180v	Artesanal	Inmersión
					superficial
				De ADN.	superficial
					Inmersión
6	Semillas	1	200v	Artesanal	Inmersión
					superficial
				De ADN.	superficial

					Inmersión
7	Semillas	2	180v	Artesanal	Inmersión
					superficial
				De ADN.	superficial
					Inmersión
8	Semillas	2	200v	Artesanal	Inmersión
					superficial
				De ADN.	superficial
					Inmersión
9	Plántulas	1	180v	Artesanal	Inmersión
					superficial
				De ADN.	superficial
					Inmersión
10	Plántulas	1	200v	Artesanal	Inmersión
					superficial
				De ADN.	superficial
					Inmersión
11	Plántulas	2	180v	Artesanal	Inmersión
					superficial
				De ADN.	superficial
					Inmersión
12	Plántulas	2	200v	Artesanal	Inmersión
					superficial
				De ADN.	superficial

					Inmersión
--	--	--	--	--	-----------

Para cada electroforesis en la cámara artesanal y la cámara de ADN se realizó un gel de grosor de 4 mm para luego finalizada la migración cortarlo en 2 tajadas y así teñir de dos diferentes maneras por inmersión y superficial.

Una vez realizada la metodología de electroforesis en el gel de almidón con ADH, se procedió a utilizar ésta con otros sistemas isoenzimáticos como PGI, PRX y AAT.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Detección de actividad enzimática en ADH en *Pachira quinata*.

6.1.1 Buffer de Extracción para Tejidos con Niveles Bajos de Fenoles o Sustancias Interferentes. (Buffer 1)

Con este buffer se extrajeron las isoenzimas de 20 muestras de hojas, semillas y plántulas. Al realizar la electroforesis con las muestras de hojas con el sistema ADH aparecía un arrastre de coloración verde que iba desde el origen de inserción de la muestra hasta el otro extremo del gel, donde termina la corrida. Una vez teñido el gel, no se observaban bandas de color azules que es la coloración de bandas esperada con este sistema.

En cambio en la electroforesis en semillas y plántulas aunque no aparecía el arrastre de coloración verde, tampoco se observaban bandas azules después de la tinción. En base a esto, se puede concluir que no hubo actividad enzimática en los tres tipos de material vegetal ensayados con este buffer.

6.1.2. Buffer de Extracción para Tejidos con niveles Moderados de Sustancias Interferentes. (Buffer 2)

Este buffer contiene aditivos que mejoran la calidad del extracto, en caso de que el material vegetal contenga un mayor contenido de fenoles o sustancias interferentes, los que se unen con las isoenzimas trayendo como consecuencia la pérdida de la actividad enzimática y/o la generación de otro tipo de sustancias.

(Soltis y Soltis, 1989)

Con este buffer se probaron las mismas 20 muestras anteriores de hojas semillas y plántulas (hipocótilo). Una vez realizada la electroforesis no se observaba el arrastre de color verde que se presentaba con el primer buffer. Una vez teñido el gel no se observaron bandas con las muestras de semillas y plántulas, es posible que ya se habían degradado las enzimas por lo que a la hora que se llegó a probar tenían mucho tiempo de estar guardadas, otra razón por la falta de resultado con semillas podría ser que la ADH no se exprese en semillas (Rothe, G. M. s.f.).

En plántula ha sido reportada su expresión en esta especie (Fuchs, 2000) En cambio, en las muestra de hojas, luego de la tinción se coloreaba todo gel de color azul. El color con que se tiño todo el gel coincide con la coloración esperada para el sistema ADH, pero no se observaron bandas que indiquen que hubo actividad enzimática. En este estudio no se pudo determinar cual de los tipos de material vegetal genera o no buena resolución electroforética en *Pachira quinata* con el sistema ADH.

En la tabla 4 se reflejan los resultados mencionados anteriormente

Tabla 4. Pruebas para el sistema ADH. Las pruebas realizadas se hicieron en distintos tiempos; las pruebas de hojas y yemas extraídas en noviembre 2004, las de semillas y plántulas germinadas en abril del 2005

Material vegetal	Buffer de extracción	Condiciones de migración	Cámara de electroforesis	Forma de tinción	Resultado de tinción
Yemas o retoños de hojas	Se probó el 1 y el 2	180V y 200 V	Artesanal/ ADN	Superficial e inmersión	Con el buffer 2, Se tiño todo el gel en azul.
Semillas	Se probó el 1 y el 2	180V y 200 V	Artesanal / ADN	Superficial e inmersión	No hubo resultado en ninguna de las condiciones
Plántulas	Se probó el 1 y el 2	180 V y 200V	Artesanal / ADN	Superficial e inmersión	No hubo resultado en ninguna de las condiciones

Con el uso de la cámara artesanal tanto a 180 V como a 200 V no se obtuvo ningún resultado ya que se presentaron varios inconvenientes, como recalentamiento de la caja lo cual deshidrató el gel y posiblemente desnaturó las proteínas; además los altos voltajes provocaban la separación de las partes de la cámara por lo que se descartó su uso y se mantuvo sólo el uso de la cámara de ADN para los ensayos con los otros sistemas.

6.2 Detección de la actividad enzimática para los sistemas PGI, PRX Y AAT

Al realizar estos sistemas, los árboles de pochote con las primeras lluvias del 2005 ya estaban retoñando, por lo que se procedió a utilizar como material vegetal retoño de hojas u hojas tiernas para la extracción de isoenzimas con el buffer denominado 2. Realizada la electroforesis a 200V por 3.5 horas para los sistemas isoenzimáticos PGI, PRX Y AAT con sus respectivos buffer gel y electrodos se obtuvieron los siguientes resultados que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la electroforesis en gel de almidón de los sistemas PGI, PRX Y AAT. LA PGI se realizó con dos tipos de buffer gel y electrodos.

Sistema de Enzimas	Buffer Electrodo	Buffer Gel	Visualización de los sistema
PGI	L. Histidina- citrato pH 5.7	L.Histidina- citrato pH 5.7	No presentaron bandas
PGI	Tris- citrato pH 7, 7.5,	Tris- citrato Dilución 1.14 pH 7, 7.5	No presentaron bandas
PRX	Trizma-HCL pH 7.0, 7.5	Trizma-HCL Dilución 1.7 pH 7.0, 7.5	Se tiñó todo el gel en azul violeta, pero no se presentaron bandas.
AAT	Sodio- Borato pH 8.0	Tris- citrato Dilución 1.6 pH 8.6	Se presentaron complejos de bandas observables.

De los sistemas ensayados PGI, PRX Y AAT, con el sistema AAT se logro observar en el gel después de su tinción, dos zonas de bandas engrosadas a las que Richardson et al. (1986) las denomina como complejo de bandas. Foto 16 y Figura 5.

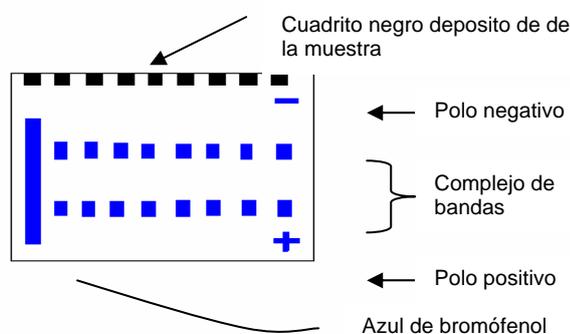
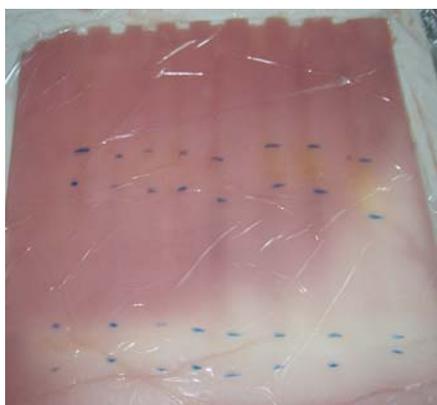


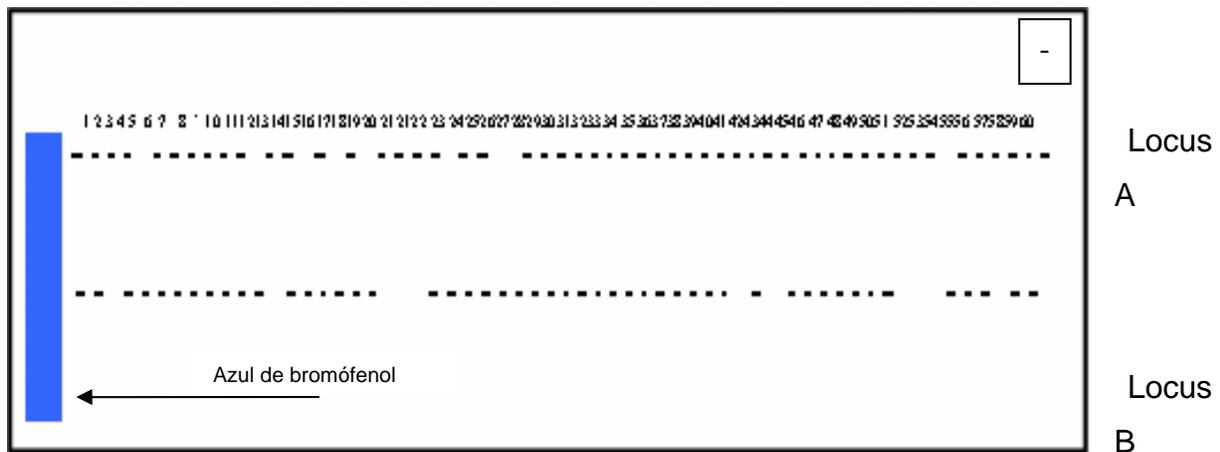
Foto 17. Gel de AAT, presenta complejos de bandas en dos zonas del gel, cuyo grosor se señala marcado con azul ya que el color de los complejos de bandas había desaparecido al momento de tomar la foto.

Figura 6. Esquema de representación de los complejos de bandas de color azul que se observaron en el gel de la foto 17.

En la foto 17 se observa un ejemplar del gel de almidón obtenido para el sistema AAT, en el cual se corrieron 10 muestras que presenta dos *locus* o zonas de bandas, una región anódica en la parte inferior del gel (*locus A*) y otra región catódica que abarca la parte central del gel (*locus B*); en ambas zonas la AAT resolvió como un complejo de bandas de modo que no se puede detectar si las bandas son homocigotos o heterocigotos, por lo que no se puede determinar variantes alélicas con este resultado. Existe un estudio por Fuchs (2000), en donde encontró un *locus* polimórfico para la AAT con 4 variantes alélicas en muestra del hipocótilo de *Pachira quinata*.

Posteriormente al aplicar el sistema de AAT para las 60 muestras, se obtuvieron idénticos resultados a los mencionados anteriormente, según se muestra en la figura 7 y en figura 8 en Anexos.

60 muestras de *Pachira quinata* con el sistema AAT.



Usualmente cada enzima tiene un número contaste de subunidades no importando cuantos *loci* codifican las enzimas o que formas de vida esta siendo examinada. En el caso de AAT, este es un dímero de 2 subunidades, por lo que se esperaría observar en cada zona o *locus* un total de 3 bandas en las muestras que fueran heterocigotos y una sola banda de los homocigotos (Hoelzel, 1998). No se encontró reportado en la literatura de especies que expresen dos *loci* y que en los geles solo puede aparecer un *locus* como sucedió en algunas muestras del gel representada en la figura 7, lo que pudo haber sucedido estas muestra dieron problema a la hora de la extracción de las enzimas o en la tinción.

En el estudio realizado por Fuchs (2000), se reporta que de 16 sistemas enzimáticos ensayados en *Pachira quinata*: Diasforasa (DIA), Fosfatasa ácida (ACP), Fosfoglucomutasa (PGM), 6 Fosofogluconato deshidrogenada (6 PGDH), Glucosa 6 fosfato deshidrogenada (G6PDH), Glutamato deshidrogenada (GDH), Hexoquinasa (HK), Isocitrato deshidrogenada (IDH), Malato deshidrogenada (MDH), Meladiona reductasa (MR), Xiquimato deshidrogenada (SKDH), Leucina aminopeptidasa (LAP), Alcohol deshidrogenada (ADH), Aspartato aminotransferasa (AAT), Esterasa (EST) Y Fosfoglucosa isomerasa (PGI),

solamente con los 6 últimos mencionado se obtuvo resolución electroforética, siguiendo las recomendaciones propuesta por Weeden y Wendel (1986). En este estudio Fuchs, reporta los *loci* polimórficos obtenidos, señalando dos para la PGI (*Locus A y B*) con 2 variantes alélicas cada uno, uno para la AAT, con 4 variantes alélicas y uno para la ADH con dos variantes alélicas.

En nuestro estudio siguiendo los procedimientos de estos autores en las condiciones del Laboratorio de Genética Molecular, no se pudieron obtener los resultados esperados para los ensayos ADH y AAT. En el caso de la PGI, la falta de algunos reactivos en el laboratorio no permitió poder realizar los sistemas isoenzimáticos de PGI con los búferes gel y electrodos utilizados por Fuchs, (2000) que en ambos caso son Litio – Borato (8.0-8.6) por lo que se procedió a utilizar dos sistemas de búferes propuesto por otro autor (Murillo, 1997). En cambio, por contar con reactivos para la Peroxidasa se probó los sistemas de búferes descrito por Fatver (1998). Al realizar la tinción para el sistema PGI después de la migración en el gel con los búferes antes mencionados no se obtuvo ningún resultado ya que no se observaron las bandas esperadas, lo mismo sucedió con el sistema PRX ya que a la hora de la tinción en vez de colorearse en bandas azul-violeta, esta coloración apareció en todo el gel.

Otra causa de no obtener resultados con los sistemas isoenzimático detectados por Fuchs (2000), puede ser la falta de una adecuada cocción del gel, el cual se consigue realizándolo en un microondas. Según Soltis y Soltis (1989), el método de cocción empleado para preparar el gel es un factor importante a tener en cuenta para obtener bandas claras y bien separadas de las isoenzimas al igual que el aparato electroforético donde se da la migración de las muestras.

VII. CONCLUSIONES

1. De los tres tipos materiales vegetales utilizados solo se obtuvo actividad enzimática en hojas tiernas utilizando el buffer 2 con el sistema isoenzimático de AAT. Con estas mismas condiciones no se obtuvo ningún resultado con la PGI, PRX y ADH.
2. Con el sistema AAT, se logró resolver actividad enzimática como complejos de bandas en dos zonas una anódica y la otra catódica, que se puede interpretar como dos *loci* (*Locus A* y *B*), pero como estas zonas no se diferencian en bandas separadas entre sí, no se pudo determinar si son o no locus polimorficos.
3. No se logró poner a punto los procedimientos para la resolución electroforética óptima de los 4 sistemas isoenzimáticos ensayadas en este estudio.

VIII. RECOMENDACIONES

Para mejorar este trabajo que contribuye al conocimiento de la variabilidad genética de *Pachira quinata*, debemos de considerar lo siguiente:

1. Tomar en cuenta, la selección apropiada del material vegetal ya que si se escoge semillas se estará conociendo el genotipo de una generación, sucederá de la misma manera si se escogen plántulas, en cambio, con las hojas o yemas se estará analizando el genotipo del árbol sujeto de estudio.
2. Probar otros sistemas como Esterasa, SKDH, LAP reportado en el trabajo de *Pachira quinata* realizado por Fuchs (2000), usando el hipocotilo de la plántula.
3. Darle un buen manejo de almacenamiento a -4°C al tipo de tejido que se desea trabajar para así garantizar su viabilidad.
4. Determinar el tejido vegetal donde se expresa el sistema isoenzimático a detectar.
5. Realizar las corridas electroforéticas con extractos proteicos, extraídos lo más recientemente posible.
6. Probar los diferentes sistemas con mayor tiempo de corrida, para confirmar si esto influye en el no poder detectar bandas bien definidas.
7. Ajustar los búferes de extracción propuesto por Weeden-Wendel (1957), para cada sistema isoenzimático.
8. No utilizar reactivos vencidos o que tenga más de un año de haberse usado.

9. Utilizar cubeta de electroforesis especialmente para isoenzimas.
10. Tener mejor horno de microondas para la preparación del gel de almidón para que se homogenice.
11. utilizar los materiales necesarios para el corte del gel a la hora de la tinción.
12. Hacer el mismo día los bufferes para la tinción.
13. Tener una cubeta adecuada grande para la inmersión del gel de almidón a la hora de la tinción.

IX. BIBLIOGRAFIA

Ampié Bustos, E.1992. Ensayo de descendencia de *Bombacopsis quinata* s.1.sección de mejoramiento genético y conservación forestal .12p.

Barreneche, T; Bodenes, T; Lexer, C.; Trontin, J.-F. ; Fluch, S.; Streiff, R. ; Plomion, C. ; Roussel, G. ; Steinkellner, H. ; Burg, K.; Favre, J.-M.; Glössl, J. and Kremer, A. 1998. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theor Appl Genet* 97: 1090–1103.

Bartish, J.V.; Garkava, I. P.; Rumpunen, K. and Nybom, H. 2000. Phylogenetic relationships and differentiation among and within populations of *Chaenomeles* Lindl. (Rosaceae) estimated with RAPDs and isozymes. *Theor Appl Genet* 101: 554–563.

Becerra, V. y Paredes, M. C. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agric. Téc.* 60 (3).

Bernatzky, R. and Tanksley, S. 1986. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics* 112: 887–898.

Byrne, M.; Murrell, J. C.; Allen, B. and Moran, G. F. 1995. An integrated genetic linkage map for eucalypts using RFLP, RAPD and isozyme markers. *Theor Appl Genet* 91: 896–875.

CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) 1988. Relación Factores de Sitio y Crecimiento de *Bombacopsis quinatum* en Costa Rica. *Silvoenergía* N° 26.

- CATIE. 1997. *Bombacopsis quinata* (Jacq) Dugand. Nota Técnica sobre Manejo de Semillas Forestales N° 17.
- CATIE. 1991. Mejoramiento Genético y Semillas Forestales para América Central. Nota Técnica N° 6.
- Chudnoff, M. 1984. *Tropical Timbers of the World*. USDA Forest Service. Ag. Handbook N° 607.
- Hillis, D. M. Moritz, C., Mable, B. 1996. *Molecular Systematics 2ª Edition*. Sinauer Associates, Inc. Publ. Sunderland Massachusetts, USA. 655 pp.
- Dvorak, W. S. 2001. Situación del Programa de Mejoramiento Genético Forestal en el Banco Nicaragüense de Semillas y Oportunidades de Desarrollo Futuro. Asistencia Técnica del USDA. 40 p.
- Favret; 1998. Técnicas de Electroforesis para Proteínas de Reserva e Isoenzimas utilizadas en el Instituto de Genética Ewald. A. FAVRET. 35 p
- Fontdevila, Antonio y Moya, Andrés. 1999. *Introducción a la Genética de Poblaciones*. Editorial Síntesis, S. A. Madrid, España. 349 p.
- Fuchs Castillo, Eric. 2000. Efecto del aislamiento espacial y fenológico sobre el flujo genético y el éxito reproductivo de *Pachira quinata* (Bombacaceae). Universidad de Costa Rica. Tesis para optar al grado de *Magister Scientiae*.
- Morris H. 1992. *Química*. Grupo Editorial Iberoamérica, México. 705 p.
- Herrera, E. 1993. *Elementos de Bioquímica*. McGraw-Hill Interamericana. México. 1076 p.

- Hoelzel, A. R. 1998. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A practical Approach*. 2a ed. Oxford University Press Inc., New York. 445 p.
- Jones, E. y Morris, A. 1999. *Lo Esencial en Célula y Genética*. Ediciones Harcourt España, S. A. Madrid, España. 201 p.
- Kephart, S. 1990. Stach gel electroforesis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Amer. J. Bot.* 77(5): 693–712.
- Mathews, C. K. y Van H., K. E. 1999. *Bioquímica*. 2a ed. McGraw-Hill Interamericana. España. 1283 p.
- Biblioteca de Consulta Microsoft® Encarta® 2002. © 1993-2001 Microsoft Corporation. Todos los derechos reservados.
- Murillo Gamboa, O. 1997. Genetic investigations in natural populations of *Agnus acuminata ssp arguta* (Schlectendal) Furlow from central America.-1. Aufl. Göttinger: Cuvillier, 1997. (9-21)
- Parker, P.; Snow, A. A.; Schug, M. D.; Booton, G. C. and Fuerst, P. A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79(2): 361–382.
- Quiros, R. 1975. Isoenzimas como marcadores genéticos para identificar híbridos en el cultivo de tejidos. Department. of vegetable crops university of California, Davis, California E.U. cap. 1 y 2.
- Richardson, BJ; Baverstock, PR; and Adams, M. 1986. *Allozyme Electrophoresis: A Handbook for Animal Systematics and Population Studies*. NY, US, Academic Press, New York. 410 p.

Roberto L. R., 2002/3 Ecosistema (en línea). Brasil Universidad Estadual de Feira do Santana, Departamento de Ciencias Biológicas. Av. Universitaria s/n, 44031-060, Feira de Santana -BA, Disponible en www.aeet.org/ecosistemas/investigacion5.htm

Rothe, G. M. s.f. Eficacia y limitaciones de los estudios de isoenzimas en la genética de árboles forestales (en línea). Alemania, Johannes Gutenberg-Universität. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/006>

Soltis, D. and Soltis P. 1989. Isozymes in Plant Biology. Dioscorides Press. Portland, Oregon.

Stevens, W. D.; Ulloa, C.C.; Pool, A. y Montiel, O. M. 2001. Flora de Nicaragua. St. Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden Press. Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/nicaragua/welcome.shtml>

Thirakul, S. 1998. Manual de Dendrología para 146 especies forestales del litoral atlántico de Honduras. 2 ed. Escuela Nacional de Ciencias Forestales: AFE/COHDEFOR. Siguatepeque, Honduras. 502 p.

Vallejos, A. 1999. Genetic improvement of *Bombacopsis quinata* at Monterrey Forestal (en línea). Colombia, The Central America and Mexico Coniferous Resources Cooperative (CAMCORE) based at the College of Forest Resources, North Carolina State University, USA. Disponible en: <http://www.fao.org/forestry/FOR/FORM/FOGENRES/GENRESBU/web27-en/colo-e.stm>

Villee, C.e A. 2001. Biología. 8ª ed. McGraw-Hill Interamericana Editores, México. 944 p.

Weeden, N. F. y J. F. Wendel.; 1989. Genetics of plant isozymes. In Soltis, D. and Soltis P. 1989. Isozymes in Plant Biology. Dioscorides Press. Portland, Oregon.

X. ANEXO

Tabla 1. Muestreo aleatorio simple en el ensayo de *Pachira quinata* establecido en el Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales, de las 60 muestras colectadas al azar tanto para semillas, hojas, y plántulas.

Nº de líneas	Nº aleatorio	Familia		Nº de líneas	Nº aleatorio	Familia	
1	4	60	1-60 son	31	1	42	
2	5	61	Nambar-	32	2	57	
3	1	15	Boaco	33	1	50	
4	12	24		34	4	43	
5	2	21		35	2	52	
6	4	11		36	2	30	
7	1	25		37	3	57	
8	11	2		38	3	12	
9	1	25		39	1	10	
10	14	23		40	3	5	
11	3	13		41	1	61	
12	6	34		42	3	20	
13	6	50		43	1	59	
14	3	59		44	2	20	
15	12	52		45	5	53	
16	7	53		46	2	7	
17	5	35		47	4	22	
18	13	58		48	3	20	
19	5	53		49	3	53	
20	6	5		50	1	55	
21	7	20		51	1	11	
22	3	14		52	2	4	
23	8	50		53	5	47	
24	6	50		54	2	4	
25	9	12		55	1	6	
26	4	40		56	5	60	
27	1	58		57	2	11	
28	2	37		58	4	60	
29	3	10		59	1	13	
30	3	14		60	1	58	

FIGURA 8. Diagramas de los complejos de bandas obtenidos en gel de almidón con el sistema AAT.

INTERPRETACIÓN GENÉTICA DE LOS FENOTIPOS ENZIMÁTICOS

