

## ESTUDIO DE PATRONES PARA LA LIMA PERSA VII. Caracterización Isoenzimática (2)

Clara González Arencibia

Dpto. de Genética y Evolución. Fac. de Biología  
Universidad de La Habana

Juan A. González Arencibia

Ministerio de la Agricultura

Estación Experimental de Cítricos Sandino

Pinar del Río

### RESUMEN

Se efectuó el análisis electroforético en gel de acrilamida, para las isoenzimas peroxidadas y esterases, a partir de macerados de hojas de la variedad "Persa" de las limas ácidas (Citrus aurantifolia Swingle ), injertadas sobre los patrones Citrus volckameriana Tan. et Pasq., Citrus aurantium L., Citrus macrophylla Wester, Citrus jambhiri Lush., y Citrus reshni Hort. ex Tan.

Los análisis realizados dan información al nivel enzimático, del efecto del patrón sobre la variedad, y se han obtenido los zimogramas (Patrones de Bandas) para los patrones, así como para la variedad injertada sobre cada uno de los patrones.

El análisis de la actividad de las peroxidases, se realizó según el método de Bar Akiva y cols. (1967), comparándose los resultados mediante un Análisis de Varianza del modelo de Dos Variables de Clasificación para efectos fijos, según Dixon y Massey (1965).

#### ABSTRACT

An electrophoresis analysis was made in acrilamide gels for peroxidase and esterase isozymes from macerated leaves of the "Persa Lime" variety, using Citrus volckameriana Tan. et Pasq., Citrus aurantium L., Citrus macrophylla Wester, Citrus jambhiri Lush. and Citrus reshni Hort. ex Tan as scions.

The zimogram of the isozymes was performed for the variety and scions.

Also the study of peroxidase activity was made for all material by the method of Bar Akiva et al (1967) and the results obtained were compared using an analysis of variance for two variables (Dixon and Massey, 1965).

## INTRODUCCIÓN

Los estudios que se vienen realizando sobre la interacción patrón-variedad, revisten una gran importancia desde el punto de vista económico para nuestro país, ya que es necesario encontrar para cada variedad comercial, el mejor patrón de injerto no sólo en lo relacionado a la resistencia a las principales enfermedades que atacan nuestras plantaciones, sino también desde el punto de vista del efecto que le pueden causar a esas variedades sobre los caracteres del rendimiento.

La Lima Persa (Citrus aurantifolia Swingle) representa dentro de las limas ácidas, una de las variedades comerciales más importante por su aceptación en el mercado. La variedad Persa tiene la característica de poseer abundante jugo, no presenta semillas y madura durante casi todo el año (Ziegler y Wolfe, 1961).

En la Estación Experimental de Cítricos de Sandino, se están llevando a cabo diversos estudios con vistas a determinar los mejores patrones para esta variedad, analizándose algunos parámetros de producción y resistencia a enfermedades durante varias cosechas (González y cols, 1977,79,80). Con la finalidad de completar y profundizar más en este trabajo, es que hemos realizado el estudio de la interacción patrón-variedad desde el punto de vista enzimático, utilizando el análisis de patrones isoenzimáticos para la variedad Persa injertada sobre diferentes patrones, ya que cual-

quier alteración ocasionada en la variedad será reflejada a este nivel (González y González, 1977).

El uso de la isoenzimas como fuente de detección de variaciones ha sido ampliamente utilizada en plantas y animales (Brewer, 1970).

La homología electroforética de las proteínas y enzimas basada en la similitud de sus cargas eléctricas y pesos moleculares, proporciona una medida de la relación genética entre los individuos (Johnson, 1965).

En el presente trabajo se amplía el estudio de las isoenzimas peroxidadas, incluyéndose el análisis de la variedad Persa sobre los patrones Naranja Agrio (Citrus aurantium L.) y Mandarina Cleopatra (Citrus reshni Hort ex Tan) así como para estos patrones.

Se realizaron corridas electroforéticas para las isoenzimas esterasas de la Lima Persa sobre cinco patrones: Limón Rugoso (Citrus jambhiri Lush), Citrus volckameriana Tan et Pasq, Citrus macrophylla Wester, Naranja Agrio (Citrus aurantium L.) y Mandarina Cleopatra (Citrus reshni Hort ex Tan) al igual que para los patrones.

La determinación de la actividad peroxidasa se efectuó mediante la técnica de Bar-Akiva y cols (1967), comparándose se la actividad de esta enzima para la Lima Persa sobre los cinco patrones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La técnica utilizada para las corridas electroforéticas en gel de poliacrilamida, así como la tinción para las isoenzimas peroxidadas, se encuentra descrita en el trabajo de Caracterización Isoenzimática (1) (González y González, 1977 ).

Para las isoenzimas esterasas se utilizaron los mismos extractos foliares, con un gel de separación de 8.5%, realizándose las corridas a 50 ma durante 4 horas, en un aparato de corrida de lámina vertical (Chapel et al, 1974).

La tinción se efectuó con una solución que contenía 0,3 g de fast blue RR salt, 2 ml de una solución de 1-naftil-acetato y 2 naftil-acetato, las que fueron preparadas en la proporción de 0,1 g de 1 y 2 naftil-acetato, disueltos en 5 ml de acetona y a completar 10 ml con agua destilada. La tinción se completó a 100 ml con buffer fosfato de pH = 6,4.

El gel permaneció en esta tinción en la oscuridad hasta que aparecieron las bandas características. Posteriormente fue lavado con agua destilada y mantenido en una solución de ácido acético al 10%.

Los patrones de bandas (zimogramas) fueron realizados en papel milimetrado tomando como punto cero, el comienzo del gel de separación.

Para el estudio de la actividad peroxidasa de la Lima

Persa, se seleccionaron 5 g de hojas frescas que fueron maceradas en un mortero. El extracto fue filtrado en tela de gasa y envasado en frascos de cristal. La técnica utilizada para medir la actividad peroxidasa fue la descrita por Bar-Akiva y cols (1967).

Los datos obtenidos de unidades peroxidasa, fueron transformadas a  $\sqrt{x}$  (raíz cuadrada del valor) ya que los mismos no seguían una distribución normal.

Se efectuó un análisis de varianza de clasificación doble, modelo fijo según Dixon y Massey (1965) para comparar los cinco tratamientos. Al encontrarse diferencias altamente significativas para el valor de F calculada, se procedió a realizar la comparación de las medias mediante el test de rangos múltiples de Duncan (Duncan, 1955).

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El patrón de bandas para las isoenzimas peroxidasa de la Lima Persa sobre los patrones Agrio y Cleopatra, así como para el patrón Cleopatra, muestra una sola banda en la posición de 3,0 unidades al igual que el número de bandas y posición semejante que se había obtenido en el trabajo anterior (González y González, 1977). Sin embargo el patrón Agrio es el único que presenta dos bandas muy cercanas en las posiciones de 2,6 y 3,0 unidades. (Fig. 1).

Como se presenta una sola banda con posiciones muy semejantes para la Lima Persa sobre los cinco patrones, se pro-

cedió a realizar el análisis cuantitativo de la actividad enzimática de peroxidasas, el cual sí arrojó diferencias para la variedad sobre los patrones. Los valores promedios de unidades peroxidasas para la Lima Persa aparecen en la tabla 1.

Los resultados del análisis de varianza se recogen en la tabla 2.

El Test de Duncan (Tabla 3) muestra lo siguiente: La Lima Persa sobre el patrón Rugoso presenta el valor medio de actividad mayor, mientras que la Lima Persa sobre el patrón Agrio presenta el valor de actividad menor.

No se presentan diferencias entre las medias de la Lima Persa sobre los patrones Rugoso y C. volckameriana, pero estos dos sí difieren del resto de los tratamientos. La Lima Persa sobre el patrón C. macrophylla no difiere del Persa sobre el patrón Cleopatra, pero sí sobre el patrón Agrio. La Lima Persa sobre los patrones Cleopatra y Agrio no presenta diferencias entre sus medias.

Estos resultados ponen de manifiesto dos aspectos importantes: en primer lugar que para poder dar un criterio definitivo de semejanzas y diferencias entre individuos, es necesario abordar el trabajo desde distintos enfoques, ya que cualitativamente no se presentan diferencias para la Lima Persa sobre los cinco patrones con relación a las isoenzimas Peroxidasas, pero sin embargo sí existen diferencias para la variedad Persa en cuanto a la actividad en-

zimática de esa banda común.

En segundo lugar se detectó que los diferentes patrones provocan cambios en los valores de actividad enzimática para una misma variedad, lo cual nos da una medida de la importancia de la selección de los mismos. En este caso donde se analiza la enzima peroxidasa, se plantea que está relacionada con la maduración en muchos frutos (Sacher, 1973).

Los resultados para las isoenzimas esterases revelan un nivel de polimorfismo no encontrado para las peroxidases (Fig. 2). El patrón de bandas para la Lima Persa sobre los patrones Cleopatra y Rugoso es idéntico, observándose cuatro bandas en las posiciones de 0,1, 1,0, 2,8 y 4,0 unidades.

El patrón de bandas para la variedad Persa sobre los patrones Agrio y C. volckameriana es igual, observándose tres bandas en posiciones de 1,0, 2,8 y 4,0 unidades. La Lima Persa sobre el patrón C. macrophylla presenta cuatro bandas en las posiciones 1,0, 1,8, 2,8 y 4,0 unidades; es de destacar que aquí se presenta una banda no común en la posición de 1,8 unidades. Existen tres bandas comunes para la Lima Persa sobre todos los patrones, en las posiciones 1,0, 2,8 y 4,0 unidades.

En el caso de los patrones estudiados, no se presentan diferencias entre Rugoso y C. volckameriana teniendo ambos cuatro bandas en las posiciones de 0,1, 1,0, 2,8, 4,0 unidades. El patrón C. macrophylla tiene bandas en 0,1,

1,4 y 2,8 unidades, el patrón Cleopatra presenta sólo dos bandas no comunes en las posiciones de 0,5 y 1,7 unidades. Por último el patrón Agrio es el que más se diferencia del resto de los patrones no sólo por la posición de sus bandas en 0,5 , 1,2 , 1,8 , y 3,5 unidades, sino por la coloración y tamaño que presentan las bandas de 1,8 y 3,5 unidades.

La tinción realizada para las esterasas conlleva la revelación conjunta de las bandas alfa y beta por lo que sería necesario determinar a cuál tipo corresponde cada banda utilizándose de forma separada los reactivos 1-naftil-acetato y 2-naftil-acetato.

No existen bandas comunes a todos los patrones.

Comparando la relación patrón-variedad dentro de este sistema isoenzimático se observa que los únicos patrones de bandas iguales son el de la Lima Persa sobre el Rugoso y el Patrón Rugoso. La Lima Persa sobre C. volckameriana presenta tres bandas en común con su patrón; Persa sobre C. macrophylla una banda común con su patrón y el resto no presentan bandas comunes. Debe destacarse la gran diferencia en el zimograma de la Lima Persa sobre Cleopatra y el patrón Cleopatra.

En general las mayores semejanzas patrón variedad para las isoenzimas esterasas se encuentran en la Lima Persa sobre el patrón Rugoso y el patrón C. volckameriana.

## CONCLUSIONES

- 1) En las isoenzimas peroxidadas se presenta una sola banda de posición 3,0 unidades para la Lima Persa sobre los patrones Naranja Agrio (Citrus aurantium L) y Mandarina Cleopatra (Citrus reshni Hort ex Tan).
- 2) El patrón Agrio es el único que presenta dos bandas en posiciones de 2,6 y 3,0 unidades para las isoenzimas peroxidadas.
- 3) Existen diferencias significativas entre las medias de la actividad peroxidasa para la Lima Persa sobre los cinco patrones, presentándose los mayores valores para esta variedad sobre los patrones Rugoso y C. volckameriana (los que no difieren entre sí) y los menores para los patrones Cleopatra y Agrio (los cuales tampoco difieren entre sí).
- 4) El zimograma de esterases revela un mayor polimorfismo para la variedad Persa y para los patrones.
- 5) Las mayores semejanzas entre patrón-variedad se presentan para las isoenzimas esterases en la Lima Persa sobre los patrones Rugoso y C. volckameriana.
- 6) Los resultados en este trabajo para las isoenzimas peroxidadas son coincidentes con los obtenidos anteriormente para el número y posición de la banda en la Lima Persa sobre los patrones estudiados.

## RECOMENDACIONES

- 1) Debe continuarse el estudio isoenzimático para la Lima Persa sobre los diferentes patrones incluyéndose otros sistemas tales como catalasas, fosfatasa y amilasas, con vistas a tener un criterio más objetivo de la influencia de los patrones sobre la variedad a nivel molecular.
- 2) Dentro de los estudios patrón-variedad desde el punto de vista enzimático debe incluirse la zona cercana al injerto, ya que muchas veces determinadas sustancias propias del patrón no difunden a las partes superiores del vegetal. Además esto nos puede dar un criterio de la reacción de incompatibilidad entre el patrón y la variedad.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bar-Akiva, A., M.K. Klapan y R. Savon. 1967. Agrochimica, XI, 3: 283-88.
- Brewer, G.J., 1970. Introduction to Isozyme Technique. Academic Press New York.
- Chapel, T., L. Iglesias, A. Barreto, F. Baisre y J.P. Simon 1974. A simplify apparatus for Vertical Slab Electrophoresis in Polyacrylamide Gel. Laboratory Practice, vol. 23, páginas 311-12.
- Denis, J. B. y J. González. 1980. Estudio de patrones para la Lima Persa. IV. Análisis multivariado (en imprenta)

- Dixon, W.J. y F.J. Massey. 1965. Introducción al análisis estadístico Edic. Rev. Instituto Cubano del Libro. Ministerio de Cultura. La Habana.
- Duncan, D.B., 1955. Multiple range an F test. Biometrics, 11:1-42.
- González, C. y J. González. 1977. Estudio de patrones para la Lima Persa. III. Caracterización Isoenzimática (1) (en imprenta).
- González, J. y N. Hervis. 1979. Estudio de patrones para la Lima Persa. VI. Análisis de la producción de los frutos de la cosecha 1977-78-79 (en imprenta)
- Johnson, B.L. y O. Hall. 1965. Analysis of phylogenetic affinities in the Triticinae by protein electrophoresis. Amer. J. Bot. 52:506-13.
- Sacher, J. A. 1973. Senescence and post-harvest physiology. Ann. Rev. Plant. Phys. 27:197-224.
- Ziegler, L. W. y H. S. Wolfe. 1961. Citrus growing in Florida. University of Florida Press/Gainesville, 51-54

TABLA 1

Valores promedios de actividad peroxidasa para la Lima Persa.

<u>Tratamiento</u>	<u>Unidades de actividad peroxidase</u>
LP/R	15,22 u
LP/V	14,96 u
LP/M	12,85 u
LP/C	12,33 u
LP/A	11,65 u

TABLA 2

Análisis de varianza para la actividad peroxidasa de la Lima Persa.

<u>Fuentes</u>	<u>G.L.</u>	<u>S.C.</u>	<u>C.M.</u>	<u>F</u>
TOTAL	14	36,33	-	
RÉPLICAS	2	2,54	1,27	3,45 NS
ENTRE TRAT.	4	30,85	7,71	20,99 **
DENTRO	8	2,94	0,367	

\*\*  $p < 0,01$

TABLA 3

Test de rangos múltiples de Duncan para la actividad peroxidasa

<u>Tratamiento</u>	<u><math>\bar{X}</math> Transf.</u>	<u><math>\bar{X}</math> original</u>
LP/R	15,22 a	232,91
LP/V	14,96 a	223,90
LP/M	12,85 b	165,37
LP/C	12,33 bc	152,23
LP/A	11,65 c	135,77

$E.S.\bar{x} = 0,34$

## ZIMOGRAMA DE PEROXIDASAS

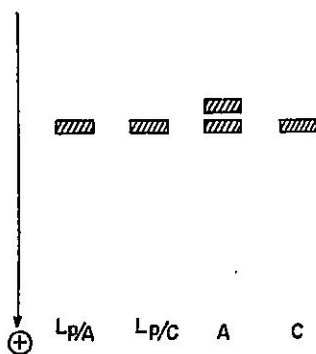


Figura 1. Zimograma de peroxidasas

## ZIMOGRAMA DE ESTERASAS

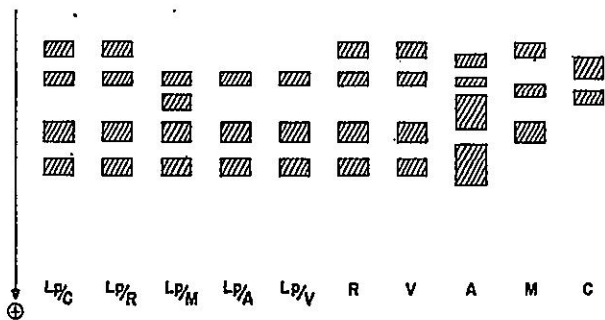


Figura 2. Zimograma de esterasas