

Estudio del polimorfismo isoenzimático en el género *Leucaena*

Hilda B. Wencomo^{1*}, Maykelis Díaz¹, Alba Álvarez², Leonor Mora² y Orlando Coto³

¹ Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Central España Republicana, Perico, Matanzas, Cuba. *Correo electrónico: hilda.wencomo@indio.atenas.inf.cu

² Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear. La Habana, Cuba.

³ Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical. La Habana, Cuba.

RESUMEN

El trabajo se desarrolló con el objetivo de estudiar el polimorfismo isoenzimático de 23 accesiones del género *Leucaena*. También se incluyeron cinco especies de leucaena (*L. leucocephala*, *L. lanceolata*, *L. diversifolia*, *L. macrophylla* y *L. esculenta*), además de los cultivares comerciales *L. leucocephala* cv. Cunningham, *L. leucocephala* cv. Perú, *L. leucocephala* cv. Ipil-Ipil y *L. leucocephala* cv. CNIA-250. Para su desarrollo, se utilizaron los sistemas isoenzimáticos peroxidadas, α - y β - esterases, malato deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasas. Los datos obtenidos fueron procesados a través del análisis estadístico multivariado. Se pudo detectar la existencia de variabilidad genética dentro de la colección. Los sistemas isoenzimáticos (esterasas y peroxidadas) resultaron polimórficos en la muestra estudiada, principalmente las esterases. Por otra parte, el análisis de diversidad genética permitió diferenciar *L. leucocephala* con una mayor claridad con respecto al resto de las especies estudiadas, aunque no se ganó en discriminación dentro de la especie. Los sistemas isoenzimáticos permitieron detectar diferencias entre las accesiones, siendo las esterases las más polimórficas.

Palabras clave: Leucaena, recursos genéticos, variabilidad, isoenzimas

Study of isoenzymatic polymorphism in the *Leucaena* genus

ABSTRACT

This work was carried out with the objective of performing the isoenzymatic characterization of 23 accessions of *Leucaena* spp., which included five species of the *Leucaena* genus (*L. leucocephala*, *L. lanceolata*, *L. diversifolia*, *L. macrophylla* and *L. esculenta*), in addition to the commercial cultivars *L. leucocephala* cv. Cunningham, *L. leucocephala* cv. Perú, *L. leucocephala* cv. Ipil-Ipil, and *L. leucocephala* cv. CNIA-250. For the development of the trial, the isoenzyme analyses of peroxidases, α - and β - esterases, malato dehydrogenases, and alcohol dehydrogenases were made. The data obtained were subject to multivariate statistical analysis. The isoenzymatic systems (esterases and peroxidases) turned out to be polymorphic in the sample studied, mainly esterases, and the analysis of genetic diversity allowed to differentiate *L. leucocephala* with higher clarity than the rest of the species studied, although there was no gain regarding discrimination within the species.

Keywords: *Leucaena*, genetic resources, variability, isoenzymes

INTRODUCCIÓN

En Cuba, los principales estudios de caracterización e identificación del género *Leucaena* especialmente de la especie *L. leucocephala*, se han centrado fundamentalmente en caracteres morfoagronómicos bajo condiciones de campo o en experimentos aislados, incluyendo solamente las cuatro variedades registradas como comerciales (Ipil-Ipil, Perú, Cunningham y CNIA-250) pertenecientes a la especie *L. leucocephala*. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios de caracterización más detallados que incluyan los marcadores isoenzimáticos, así como un mayor número de especies de este género.

La caracterización de la diversidad genética, mediante técnicas bioquímicas como la electroforesis (de proteínas o isoenzimas) juega un papel importante como complemento de la caracterización morfoagronómica, al igual que el análisis directo de ADN (Schmidt *et al.*, 2003). La electroforesis de isoenzimas favorece el empleo de marcadores genéticos más eficientes que los morfológicos en muchas ocasiones, a pesar de estar influidos por la acción ambiental y depender del tejido y estadio de desarrollo de la planta que se evalúa. Esta técnica es relativamente sencilla, poco costosa y codominante y permite distinguir los genotipos homocigóticos y heterocigóticos y desarrollar por tanto estudios de mapeo y ligamiento, de genética poblacional, entre otros.

Atendiendo a lo anteriormente mencionado en el presente trabajo se desarrolló la caracterización isoenzimática de una muestra de 23 accesiones que incluyó cinco especies del género *Leucaena* (*L. leucocephala*, *L. lanceolata*, *L. diversifolia*, *L. macrophylla* y *L. esculenta*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron rebrotes nuevos de las hojas de cada una de las accesiones evaluadas (Cuadro 1). Se maceraron 0,5 g del tejido foliar en nitrógeno líquido y se añadió buffer de extracción 1/1 (m/V). El extracto fue centrifugado a 14.000 rpm durante tres minutos y se colectó el sobrenadante para la electroforesis. Se empleó un buffer tris-citrato pH 8,3 al que se añadió KCl 0,08%, MgCl₂ 0,2%, EDTA 0,04% 0,5 mL de Tritón X100 1%, 2 mL 10% DTT y 25 mg PVP-40 4%. Las corridas se efectuaron en cámaras

de electroforesis vertical (Modelo V16) y geles de poliacrilamida (8,5% para peroxidadas y alcohol deshidrogenasas y 12% para esterasas), a 4°C, 120 V, 20 mA, durante cuatro horas. En todas las corridas se añadieron 30 µL de cada una de las muestras y 10 µL de buffer de carga (BC).

Se realizaron las tinciones específicas para peroxidadas (Prx, EC. 1.11.1.7), α- y β-esterasas (Est, EC. 3.1.1), malato deshidrogenasa (Mdh, EC. 1.1.1.37) y alcohol deshidrogenasas (Adh, EC. 1.1.1.1), según Álvarez *et al.* (2000). Las corridas electroforéticas se repitieron al menos tres veces y solo se registraron las bandas consistentes y reproducibles. Los fenotipos isoenzimáticos de cada accesión se registraron como presencia/ausencia de cada banda (0/1, respectivamente).

La matriz binaria de datos isoenzimáticos (eliminando las bandas redundantes) se utilizó para generar una matriz de distancias genéticas entre todos los pares de genotipos, expresada como el complemento del coeficiente de Dice (Dice, 1945), usando el programa SIMQUAL del paquete estadístico NTSYS-pc versión 2 (NTSYS-pc, 1997). Se desarrolló un análisis de conglomerados, basado en la matriz de distancia de Dice. Para ello, se generó un dendrograma en el programa SHAN, del mismo paquete estadístico. El criterio de agregación utilizado fue el método de la media aritmética de grupos no ponderada UPGMA. Además se determinó la correlación cofenética (r), para determinar la homogeneidad entre la matriz de distancia y el dendrograma y para representar la exactitud de la técnica utilizada (NTSYS-pc, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los cinco sistemas isoenzimáticos analizados, peroxidadas, α- y β-esterasas, malato deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasas, los tres primeros fueron polimórficos, a diferencia de los dos últimos que fueron monomórficos. En la Figura 1 se muestra los perfiles electroforéticos representativos de la muestra analizada para los sistemas Est y Prx.

Como se puede apreciar a partir de estos resultados, las Est resultaron más polimórficas en cuanto a número de bandas polimórficas que permitieron detectar, el número de patrones electroforéticos y la frecuencia de los mismos en la muestra, en correspondencia con lo reportado acerca del alto polimorfismo de este sistema para numerosas

Cuadro 1. Accesiones estudiadas y su procedencia.

No.	Clave	Especies	Accesión	Procedencia
1	5	<i>L. leucocephala</i>	cv. Cunningham	Australia
2	6		cv. Perú	Antigua y Barbudas
3	21		CIAT-9119	Colombia
4	26		CIAT-9438	Colombia
5	38		CIAT-751	Colombia
6	42		CIAT-7988	Colombia
7	50		CIAT-7384	Colombia
8	51		CIAT-7929	Colombia
9	52		CIAT-17480	Colombia
10	94		cv. Ipil-Ipil	-----
11	95		cv. CNIA-250	-----
12	63	<i>L. lanceolata</i>	CIAT-17255	Colombia
13	65		CIAT-17501	Colombia
14	152		CIAT-17253	Colombia
15	166	<i>L. diversifolia</i>	CIAT-17503	Colombia
16	107		CIAT-17270	Colombia
17	109	<i>L. macrophylla</i>	CIAT-17240	Colombia
18	110		CIAT-17233	Colombia
19	111		CIAT-17232	Colombia
20	113		CIAT-17238	Colombia
21	139		CIAT-17231	Colombia
22	124	<i>L. esculenta</i>	CIAT-17225	Colombia
23	130		CIAT-17229	Colombia

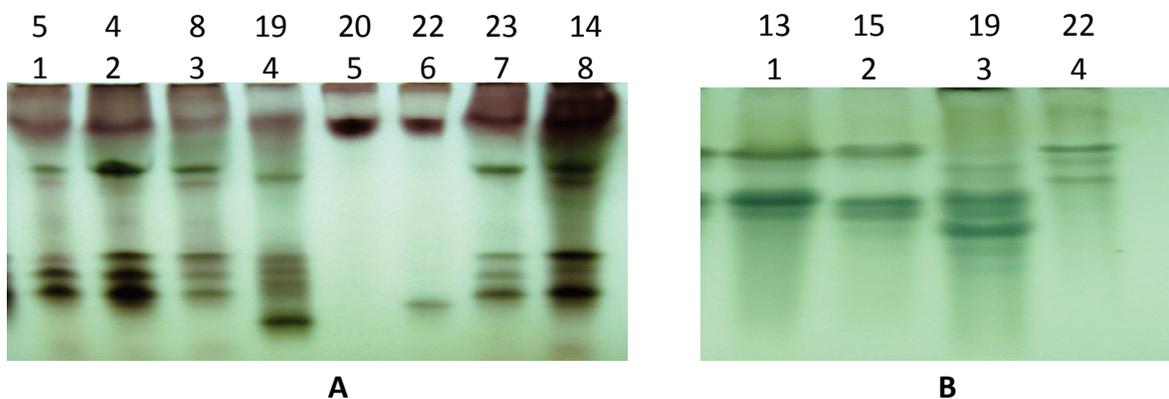


Figura 1. Algunos de los patrones electroforéticos representativos de la muestra estudiada, A) Esterasas, B) Peroxidasas.

especies vegetales (Schmidt *et al.*, 2003). Las Prx también tuvieron un alto nivel de polimorfismo en cuanto a porcentaje de bandas polimórficas, aunque detectaron solamente 4 patrones isoenzimáticos en toda la muestra. Este sistema isoenzimático mostró

dos zonas principales de actividad enzimática (Figura 1B), en correspondencia con lo reportado por Harris *et al.* (1994) para *L. leucocephala* y a diferencia de una sola zona de actividad encontrada para *L. shannonii* por Chamberlain *et al.* (1996).

De igual forma, se pudo constatar que no aparecieron isoformas Adh ni Mdh en el tejido foliar, lo cual está en correspondencia con lo planteado por Menezes *et al.* (1995), quienes informaron que en condiciones normales, la actividad enzimática de estos sistemas desaparece en etapas muy tempranas del desarrollo de las plantas, a pesar de que los mismos pueden inducirse cuando se presentan condiciones de anaerobiosis. Sin embargo, no debe descartarse además, que esto puede deberse a problemas de concentración de las muestras o de sensibilidad de la técnica.

En el dendrograma (Figura 2) se observa la formación de tres grupos (I, II y III). El grupo I estuvo conformado por dos subgrupos (IA y IB). El subgrupo IA incluyó a todas las accesiones de *L. leucocephala*, dos accesiones de *L. lanceolata* (CIAT-17255 y CIAT-17501) y una de *L. diversifolia* (CIAT-17270), mientras que el subgrupo IB resultó heterogéneo, en el cual se incluyeron las especies *L. macrophylla* (3),

L. esculenta (1), *L. lanceolata* (1) y *L. diversifolia* (1). Por su parte, el grupo II estuvo conformado por la accesión *L. macrophylla* CIAT-17232, mientras que en el grupo III se encontraron las accesiones *L. macrophylla* CIAT-17238 y *L. esculenta* CIAT-17225. De manera general, las especies *L. macrophylla*, *L. lanceolata* y principalmente, *L. esculenta* y *L. diversifolia* no formaron grupos bien definidos en el dendrograma.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El análisis de diversidad genética permitió diferenciar a la especie *L. leucocephala* con mayor claridad que el resto, aunque no se ganó en diferenciación dentro de la especie. Los sistemas isoenzimáticos permitieron detectar diferencias entre las accesiones, siendo las esterasas las más polimórficas. Además se comprobó una alta resolución electroforética para ambos sistemas, lo cual indica

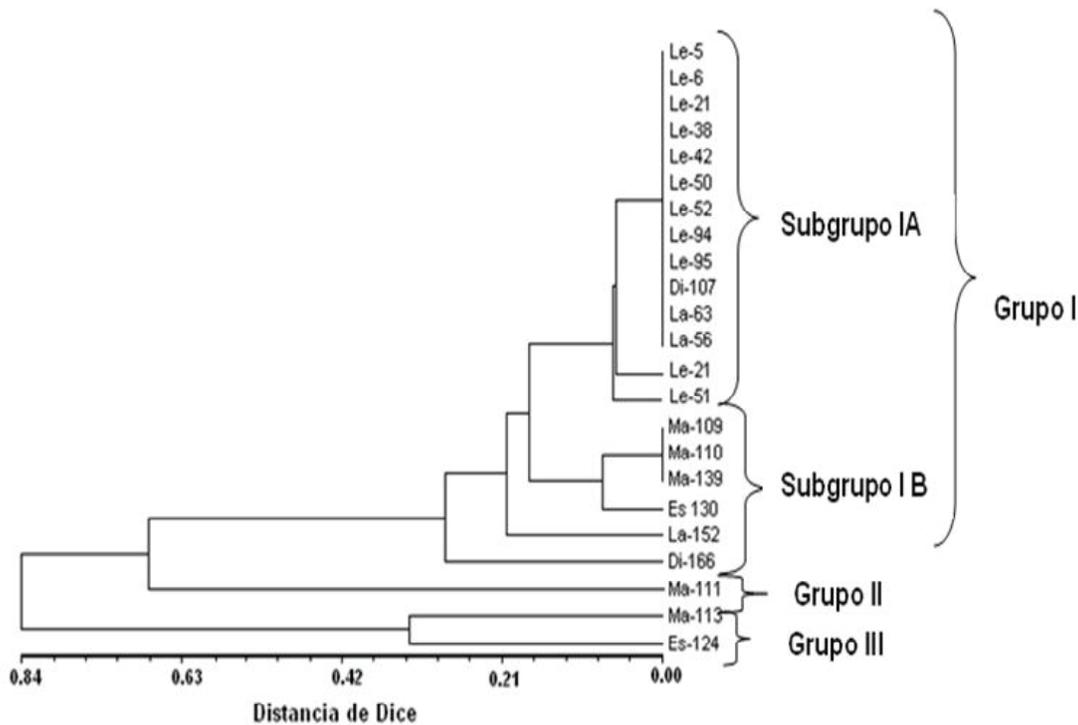


Figura 2. Dendrograma UPGMA basado en el polimorfismo isoenzimático de las 23 accesiones de *Leucaena* estudiadas

su utilidad en la evaluación del polimorfismo de *Leucaena*.

Se recomienda realizar otras investigaciones con las accesiones seleccionadas en las que se relacione el polimorfismo isoenzimático con los marcadores moleculares y con los principales caracteres morfoagronómicos evaluados.

LITERATURA CITADA

Álvarez A., J.L. Fuentes, J.E. Deus, M.C. Duque y M.T. Cornide. 2000. Genetic diversity analysis in rice mutants using isozyme and morphological markers. *Cult. Trop.*, 21(4): 39-44.

Chamberlain J.R., C.E. Hughes y N.W. Galwey. 1996. Patterns of isozyme variation in the *Leucaena shannonii* alliance (Leguminosae: Mimosoidae). *Silvae Gen.*, 45: 1-5.

Dice L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297-302.

Harris S.A., C.E. Hughes, R.J. Abbott y R. Ingram. 1994. Genetic variation in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (Leguminosae: Mimosoidae). *Silvae Gen.*, 43: 2-3.

Menezes M.A., J. Donizeti y L.E. Mota. 1995. Anaerobic metabolism of *Euterpe oleracea* II. Plant tolerance metabolism to anoxia. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 7(1): 47-51.

NTSYS-pc. 1997. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Ver. 2.0. Exeter Software, Setauket, New York, NY.

Schmidt A., F. Fuenmayor y M. Fuchs. 2003. Caracterización de clones de yuca (*Manihot esculenta*) mediante marcadores proteicos e isoenzimáticos. *Interciencia*, 28: 690-698.