

APLICACIÓN DE LA ELECTROFORESIS DE ENZIMAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE PLANTAS:

EL CASO DEL JERGUEN (*CALICOTOME VILLOSA* (POIRET) LINK.) A TRAVÉS DEL ESTRECHO DE GIBRALTAR.

R. Hidalgo / Ldo. en Biología, Universidad de Sevilla.

J. Muñoz / Ldo. en Biología, Universidad de Sevilla.

J. Arroyo / Doctor en Biología, Universidad de Sevilla.

Abstract

*The relatively simple technique of electrophoresis of enzymes was used to estimate the genetic diversity and population structure of 26 populations of the Thorny Broom *Calicotome villosa* on both sides of the Strait of Gibraltar. A higher degree of genetic diversity was found within than between populations.*

There seems to be no correlation between the distance between populations and their genetic differences, with the implication that the Strait do not form a barrier for this species.

Resumen

La aplicación de una técnica relativamente sencilla y asequible como es la electroforesis de enzimas, proporciona una serie de datos poderosos para responder a cuestiones sobre evolución, biogeografía y conservación de las poblaciones y especies. El objetivo principal suele consistir en estimar la diversidad genética y su estructuración dentro de las poblaciones y entre ellas mediante diversos parámetros de amplio uso. En el estudio que se presenta se detallan los procedimientos que usualmente deben seguirse y que son muy dependientes de los objetivos planteados, incluyendo la recolección del material biológico, las técnicas de laboratorio y la elaboración de los datos.

Comunicaciones

*Se utiliza un caso concreto, el Jerguen (*Calicotome villosa*), que ejemplifica los principios generales mencionados, estudiándose la diversidad genética en 24 poblaciones de esta especie repartidas por una amplia zona a ambos lados del Estrecho de Gibraltar. Se ha encontrado una diversidad genética relativamente alta, especialmente dentro de las poblaciones, más que entre ellas. Por otro lado, no parece haber buena correlación entre la distancia que separa las poblaciones y la diferenciación genética de las mismas. Por esa razón no hay una diferenciación genética clara mediada por el Estrecho de Gibraltar, que al menos para esta especie no es una barrera biogeográfica.*

INTRODUCCIÓN.

En la actualidad la preservación de la biodiversidad es un término de uso común en el ámbito de la gestión y conservación de los sistemas naturales. Sin embargo, en la inmensa mayoría de los casos la evaluación de la biodiversidad se hace a nivel de hábitats y de número de especies, no estudiándose apenas a nivel más detallado (infraespecífico, incluyendo la diversidad genética; Solbrig, 1991). No obstante, existen métodos para abordar la cuantificación de la diversidad genética en especies que se pueden considerar clave para determinadas cuestiones. En particular, el uso de isoenzimas como marcadores genéticos para evaluar la diversidad y relaciones genéticas de las poblaciones está muy desarrollado, por su relativo bajo coste, eficiencia y rapidez en relación con técnicas que se dirigen directamente al ADN (Brown, 1990).

Por otra parte los datos que pueden obtenerse son de gran utilidad para abordar cuestiones sobre los procesos microevolutivos, sin que necesariamente haya diferenciación de significado taxonómico, sobre los efectos genéticos de los distintos sistemas reproductivos de las plantas y sobre los procesos biogeográficos implicados: migración, expansión, restricción y extinción (Falk y Holsinger, 1991). En este trabajo se pretende introducir al lector en una técnica relativamente sencilla y de gran utilidad para responder a tales cuestiones y se ejemplifica en un caso particular (*Calicotome villosa*, el Jerguen) en el que estos marcadores genéticos (isoenzimas) han sido usados para analizar una hipótesis biogeográfica: la posible acción del Estrecho de Gibraltar como barrera biogeográfica.

TÉCNICAS Y ANÁLISIS.

La electroforesis puede llevarse a cabo con extractos de una amplia variedad de tejidos. La elección depender de distintas variables que deben ser optimizadas en cada estudio. Normalmente el factor más limitante es la disponibilidad del material, por lo que habitualmente se utilizan tejidos vegetativos tales como limbo o peciolo de las hojas, tallos suculentos, porciones terminales de raíces, semillas germinadas o embriones (Wendel y Weeden, 1989). Con frecuencia los tejidos escogidos son hojas jóvenes metabólicamente muy activas, ya que poseen una alta actividad enzimática. El polen es también muy utilizado debido a su fácil obtención y a que su información genética completa la de los tejidos diploides (Weeden y Gottlieb, 1979). Para el estudio de coníferas se suele utilizar macrogametofitos y embriones (Cheilak y Pitel, 1984). En cambio, en Pteridofitas suele ser el esporofito (Kephart, 1990). Cualquier tejido puede ser elegido para el estudio, si bien hay que tener en cuenta que el tejido debe ser el mismo en todos los individuos ya que la expresión de los isoenzimas puede variar de un tejido a otro dentro del mismo individuo. Además los distintos estados fisiológicos y ontogenéticos de un mismo tejido pueden tener diferentes fenotipos electroforéticos, tanto en su intensidad como en presencia o ausencia de bandas. El material debe ser recogido y almacenado a baja temperatura (0-4°C) para su transporte al laboratorio. El tiempo que puede estar refrigerado sin perder la

actividad metabólica depende de cada especie (Kephart, 1990), pero en general no suele superar varios días por lo que la extracción de los enzimas debe ser lo más inmediata posible.

Cada taxon y tejido posee sus propios problemas de extracción, ya sea por rotura de las células o por poseer taninos, fenoles y otros constituyentes celulares que enmascaran la actividad enzimática (Wendel y Weeden, 1989). El tejido es introducido en morteros con tampón de extracción y triturado para que las células se rompan y liberen los enzimas. En tejidos coriáceos como las hojas de coníferas se utiliza nitrógeno líquido para un mejor pulverizado de la muestra. Para evitar el enmascaramiento de actividad debido a compuestos endógenos se utilizan tampones de extracción más complejos en cuya composición se encuentran productos que se unen a estos y forman compuestos insolubles o bien agentes reductores que inhiben la formación de quinonas producidas por la oxidación de compuestos fenólicos (Kephart, 1990). Lo más importante en este paso es que las células hayan liberado los enzimas en la cantidad necesaria, en el mínimo tiempo posible y a baja temperatura puesto que un aumento de ésta provocaría la desnaturalización de los enzimas. Las muestras deben estar en el volumen adecuado de tampón de extracción para que los extractos tengan una concentración adecuada para la electroforesis.

El extracto es embebido en papel para cromatografía de varias texturas y puede ser ultracongelado entre -65 y -80°C y almacenado, o bien introducirse en el gel y someterse a corriente eléctrica. El gel puede ser de varias sustancias, pero cuando se pretende analizar un elevado número de enzimas, individuos y poblaciones es especialmente útil el gel de almidón. La corriente a la que se somete el gel es continua y de intensidad constante, las proteínas migran normalmente desde el polo negativo hacia el positivo y la distancia que recorren depende del tiempo a la que están sometidas a corriente, el voltaje aplicado y su movilidad electroforética, que está en función del tamaño, forma y carga de la proteína. Un papel muy importante en este último punto lo juega el sistema tampón utilizado. Se trata de un tampón de gel que es usado en la preparación del gel y un tampón de electrodo que consiste en una solución ionizada que conduce la corriente eléctrica a través del gel.

La migración de las proteínas en el campo eléctrico del gel depende del pH del sistema tampón, ya que los distintos enzimas son ionizados a diferentes valores de pH. La elección del sistema tampón y del pH de éste depende de cada taxón. Normalmente suelen utilizarse distintos sistemas para el mismo estudio ya que cada enzima posee sus propios requerimientos en pH y naturaleza del sistema tampón.

Transcurrido el tiempo necesario (determinado empíricamente) se interrumpe la corriente, cuando las moléculas han migrado a diferentes posiciones del gel. Para marcar la localización de los enzimas, debe añadirse el sustrato apropiado para que el enzima actúe y genere un producto, pero tales productos no son directamente visibles, por lo tanto, deben añadirse colorantes específicos a la solución que interactúan con el producto de la actividad enzimática mostrando una coloración definida.

El gel, cuando es de almidón, es cortado en varias láminas. Cada una de ellas será teñida para un enzima específico por lo que podremos obtener información de varios enzimas para el mismo individuo. De otro modo se necesita una gran cantidad de extracto enzimático de cada individuo y dividirlo en alícuotas para probar distintos enzimas. Al introducirse la lámina de gel en la solución con la tinción específica para el enzima pueden aparecer una o más regiones con actividad. El patrón de bandas resultante (zimograma) es el fenotipo electroforético y éste consiste en una o más bandas coloreadas para cada individuo analizado. Este fenotipo varía en su complejidad dependiendo de numerosos factores, incluyendo el organismo, el tejido y el enzima ensayado (Wendel y Weeden, 1989). En algunos casos pueden ser simples y consistir en una única banda en todas las muestras (monomórfico), o bien poseer un complejo fenotipo con numerosas bandas por individuo.

Comunicaciones

Al determinar el número de bandas que se observan en el gel hay que tener en cuenta varios factores como son el número variable de loci, su estado alélico (homocigosis o heterocigosis), la estructura cuaternaria de la proteína (monómero, dímero, tetrámero) y su compartimentación subcelular (citoplasma, mitocondrias, plastos). Los primeros factores (loci y alelos) son fáciles de determinar realizando cruzamientos experimentales y observando los patrones de segregación en las progenies

Una vez obtenidos los datos de las placas electroforéticas como frecuencia de genotipos distintos en cada locus, necesitamos medidas que permitan cuantificar la información. Se usan varios parámetros para describir la variabilidad genética:

Heterocigosidad: se utilizan dos parámetros, heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e). Ambas son muy utilizadas para cuantificar la diversidad genética, siendo H_o la cantidad de heterocigotos que posee una población y se obtiene por conteo directo de los heterocigotos observados para cada población. La heterocigosidad esperada (H_e), se calcula a partir de los valores de frecuencia alélica estimados ($H_e = 1 - \sum p_i^2$); ($p = n^\circ$ de homocigotos para el alelo más común + $2 \times n^\circ$ de heterocigotos / $2 \times n^\circ$ de individuos de la población) y asumiendo que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg..

Número de alelos por locus: se obtiene dividiendo el n total de alelos observados en todos los loci por el número total de loci. Es una medida de riqueza alélica y por lo tanto de la diversidad.

Porcentaje de loci polimórficos: se considera polimórfico un locus cuyo alelo más común tenga una frecuencia inferior al 99%, aunque algunos autores consideran el 95%. Con este parámetro se introducen medidas de riqueza alélica y de uniformidad.

Los valores que pueden tomar los parámetros anteriores sirven para caracterizar y comparar la diversidad genética de conjunto de individuos, sean poblaciones o grupos taxonómicos. Sin embargo, el uso de isoenzimas como marcadores genéticos no sólo se utiliza en estudios sistemáticos, ya que la capacidad para manejar un alto número de muestras de forma comparativa directa y la base genética conocida de los caracteres observados (bandas en los zimogramas) los hace ideales para el estudio de procesos microevolutivos, incluyendo sistema de cruzamiento, migración o hibridación (Brown, 1990). Se puede analizar así no sólo el estatus genético de las poblaciones sino la estructuración de éstas y el origen, el mantenimiento o la pérdida de la variación genética (Hartl, 1988).

Para el estudio de la estructura de las poblaciones Wright (1951) desarrolló una serie de estadísticos que describan la variación genética en poblaciones. Estos consisten en tres diferentes coeficientes F que se utilizan para asignar la variabilidad que corresponde al conjunto de poblaciones, a cada población y a los individuos. Estos tres valores son F_{IT} , F_{ST} y F_{IS} , y se encuentran relacionados matemáticamente: $F_{ST} = F_{IT} - F_{IS} / 1 - F_{IS}$.

Los índices de Wright F_{IS} y F_{IT} son medidas de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de la población (F_{IS}) y en el total de las poblaciones (F_{IT}). Se les conoce como coeficientes de «inbreeding» (F_{IS}) y de «inbreeding» total (F_{IT}). Valores negativos indican un exceso de heterocigotos mientras que los positivos indican una falta de heterocigotos, siendo esto indicativo de una fijación de alelos. F_{ST} es una medida de diferenciación genética de poblaciones, sus valores varían entre 0 y 1, significando 0 una falta de diferenciación y el valor 1 una fijación de alelos distintos en las poblaciones. Este valor teórico no es alcanzado en la naturaleza y Wright (1978) sugiere que a partir del valor 0.25 de F_{ST} existe una diferenciación muy grande

Nei (1972, 1973) desarrolló los índices más utilizados para estimar la diversidad de las poblaciones. Estos estadísticos nos muestran la diversidad genética en el total de las poblaciones (H_t), dentro de las poblaciones (H_s), entre las poblaciones ($D_{st} = H_t - H_s$) y diversidad genética entre poblaciones relativa al total de todas las poblaciones ($G_{st} = D_{st}/H_t$).

La distancia y semejanza genética (Nei, 1972) son parámetros que se usan con frecuencia en algunos estudios cuando se trabaja con un alto número de loci y de especies o poblaciones. Los índices de semejanza y distancia se utilizan para medir la cantidad de diversidad compartida entre los grupos. Estas medidas ayudan a visualizar las relaciones generales entre grupos, en estudios en los que hay gran cantidad de datos (Hedrick, 1985), aunque se pierda información al reducir el volumen de frecuencias a un único valor. Asimismo, los valores de semejanza-distancia genética pueden ser utilizados para la construcción de dendrogramas mediante distintos algoritmos, siendo el más usado el UPGMA (Sneath y Sokal, 1973)

EL CASO DE *CALICOTOME VILLOSA* A TRAVÉS DEL ESTRECHO DE GIBRALTAR.

El Estrecho de Gibraltar está formado por la aproximación de tres placas tectónicas (ibérica, africana y de Alborán). Estas placas han sufrido diversos movimientos a través de las épocas geológicas que han determinado que el Estrecho se haya cerrado en algunas ocasiones (Durand-Delga y Fontboté, 1980; SECEGSA, 1983). Ello ha podido determinar la acción del Estrecho como puente o barrera biogeográfica para las plantas. Por otro lado se trata de una zona de importancia especial para los avances y retrocesos de las plantas ligados a las período glaciares e interglaciares del Pleistoceno, ya que se trata de uno de los escasos pasillos posibles de dirección N-S disponibles en el Mediterráneo Occidental, una zona de elevada diversificación para muchos grupos taxonómicos.

Independientemente de si un grupo de plantas se ha originado en ambos lados del Estrecho antes de la separación de sus márgenes o si por el contrario se ha alcanzado una situación actual de presencia en ambos lados por migración (de N a S o viceversa), puede plantearse la hipótesis de que una separación actual haya determinado una tasa de diferenciación genética distinta en las poblaciones de las márgenes N y S del Estrecho. Para analizar esta cuestión se ha elegido una especie que está ampliamente representada a ambos lados del Estrecho, el Jerguen (*Calicotome villosa*, Leguminosae).

Se seleccionaron 24 poblaciones de esta especie, nueve en el lado africano y 15 en el lado europeo del Estrecho (Fig. 1). Entre Agosto y Noviembre se recolectaron semillas de cada población (40 semillas en cada una de 30 plantas adultas) que se conservaron a 4°C en la oscuridad hasta la realización de los análisis enzimáticos varios meses más tarde. Con el fin de recoger la máxima variabilidad dentro de las poblaciones y no sesgar los resultados producidos por sobremuestreo de las semillas de sólo unos pocos individuos adultos, se seleccionan sólo 1-2 semillas por planta adulta. Por término medio el número de individuos requeridos por población en los análisis enzimáticos fue de treinta.

Dada la extrema dureza de las semillas de esta especie, antes de la extracción de los enzimas se imbibieron las semillas y se les separó la cubierta. Cada semilla de cada población fue triturada con tampón Na_2HPO_4 (pH 7.0) al que se añadió DL-dithiothreitol. El extracto fue colocado directamente en el gel o congelado a -80°C para su análisis posterior. Se probaron los siguientes sistemas enzimáticos ACO, AcPH, ADH, ALD, CAT, DIA, EST, GOT, IDH, ME, MDH, PER, 6PGD, PGM, LAP y PGI con los sistemas tampones histidina citrato, hidróxido de litio y mqrfolina citrato. Sólo los sistemas ADH, 6PGD y PGM ofrecieron una buena resolución (con el tampón de histidina-citrato, pH 6.5), por lo que sólo éstos fueron incluidos en los análisis posteriores.

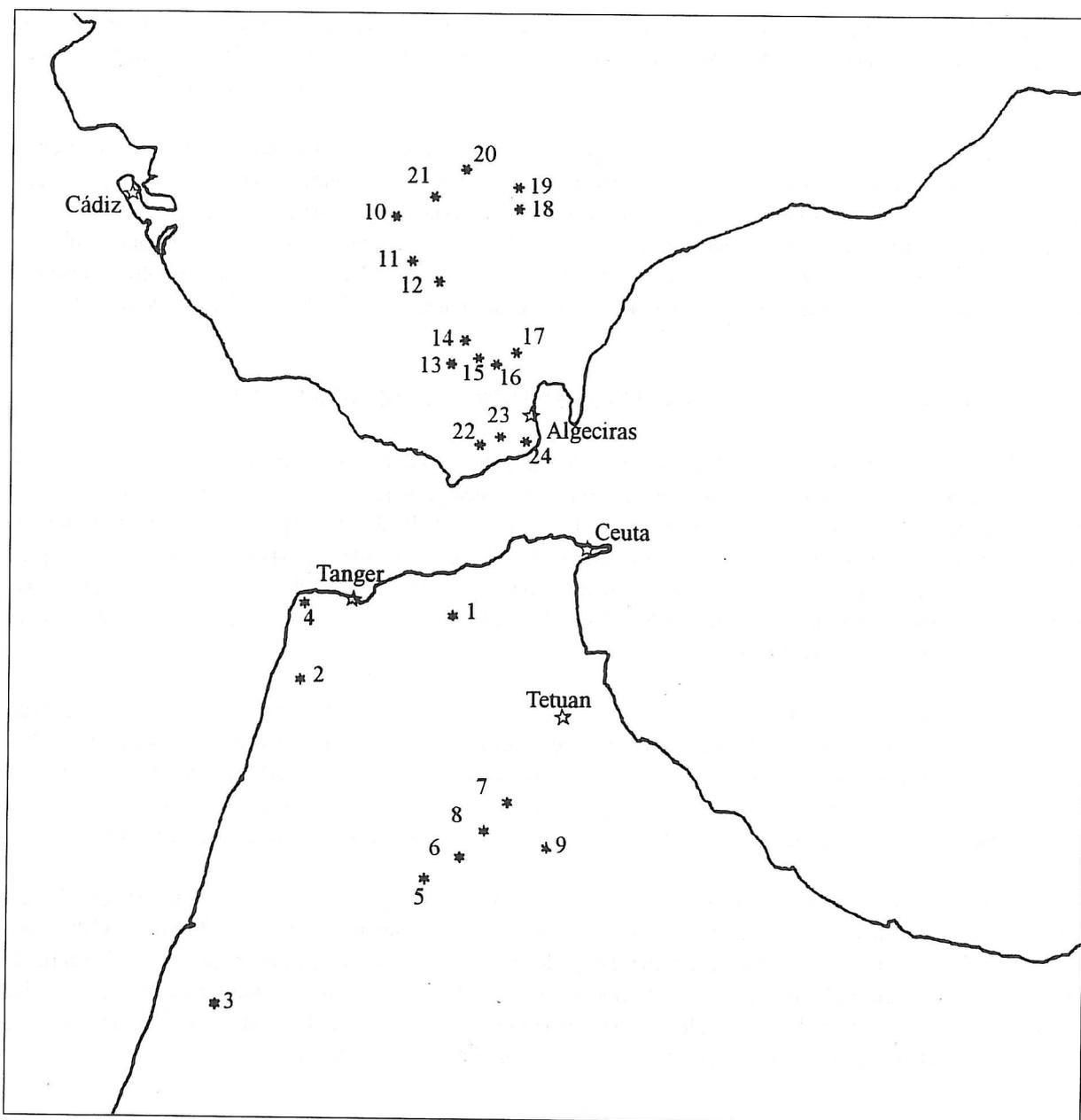


Figura 1. Área de estudio en la que se localizan las 24 poblaciones de *Calicotome villosa* estudiadas.

Se estudió la diversidad de cada una de las poblaciones mediante los siguientes parámetros: número de alelos por locus (A), porcentaje de loci polimórficos (P), heterozigosis observada (H_o) y heterozigosis esperada (H_e). Observándose que los valores medios para España y Marruecos son similares (Tabla 1) no existiendo en diferencias significativas entre ambos lados del Estrecho. (A, $t = 0.22$; $p = 0.82$); (P, $t = 0.23$; $p = 0.82$); (H_o , $t = 0.71$; $p = 0.49$); (H_e , $t = 0.37$, $p = 0.72$).

Poblaciones	A	P	H_o	H_e	N
Marruecos	1,9	64,8	0,270	0,231	9
España	1,8	63,3	0,246	0,223	15
Media Total	1,89	63,92	0,26	0,23	24

Tabla 1. Variabilidad genética media. En poblaciones de *Calicotome villosa* en Marruecos y España. A, número de alelos por locus; P, porcentaje de loci polimórficos; H, heterozigosis observada (o) y esperada (e). N, número de poblaciones.

Al estudiar cómo están estructuradas las poblaciones a ambos lados del Estrecho se observa que tanto la diversidad dentro de las poblaciones (H_s), como entre poblaciones (D_{st}) y en el total de las mismas (H_t) no difiere si se considera un solo conjunto de poblaciones o dos subconjuntos (Norte y Sur del Estrecho) de poblaciones (Tabla 2). En Marruecos la diversidad dentro de las poblaciones es 90.2% del total del subconjunto, mientras que en el subconjunto español es el 92.38%. Este patrón de diversidad puede estar influido por numerosos factores. Según Loveless and Hamrick (1984) la alta variabilidad dentro de las poblaciones, como es el caso de *C. villosa*, se relaciona con plantas perennes de distribución relativamente amplia y fecundación cruzada. A este patrón pueden contribuir también un ciclo biológico relativamente largo y un sistema de dispersión que incluya episodios de larga distancia.

	H_s	H_t	D_{st}	G_{st}
Marruecos Media de 5 loci polimórficos	0,277	0,308	0,031	0,119
España Media de 5 loci polimórficos	0,268	0,290	0,022	0,075

Tabla 2. Estructuración de la diversidad genética para loci polimórficos. H_t , diversidad total; H_s , dentro de las poblaciones; D_{st} , entre las poblaciones; G_{st} , diversidad entre las poblaciones relativa al total.

Los valores para los estadísticos de Wright (F_{IS} y F_{IT}) son distintos de cero (Tabla 3) lo que nos indica que las poblaciones no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los valores tanto para las poblaciones españolas como para las marroquíes son negativos, lo cual es indicativo de un exceso de heterocigotos debido probablemente a la predominancia de fecundación cruzada. En cuanto a F_{ST} , *Calicotome villosa* posee unos valores de 0.075 en España y de 0.1 en Marruecos, lo que indica en ambas partes una diferenciación moderada de sus poblaciones.

	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
Todas las poblaciones	-0,148	-0,040	0,094
Marruecos	-0,099	-0,016	0,119
España	-0,189	-0,071	0,075

Tabla 3. Estadísticos F para las 24 poblaciones. F_{IS} , diferenciación dentro de poblaciones; F_{IT} , diferenciación genética total; F_{ST} , diferenciación entre poblaciones.

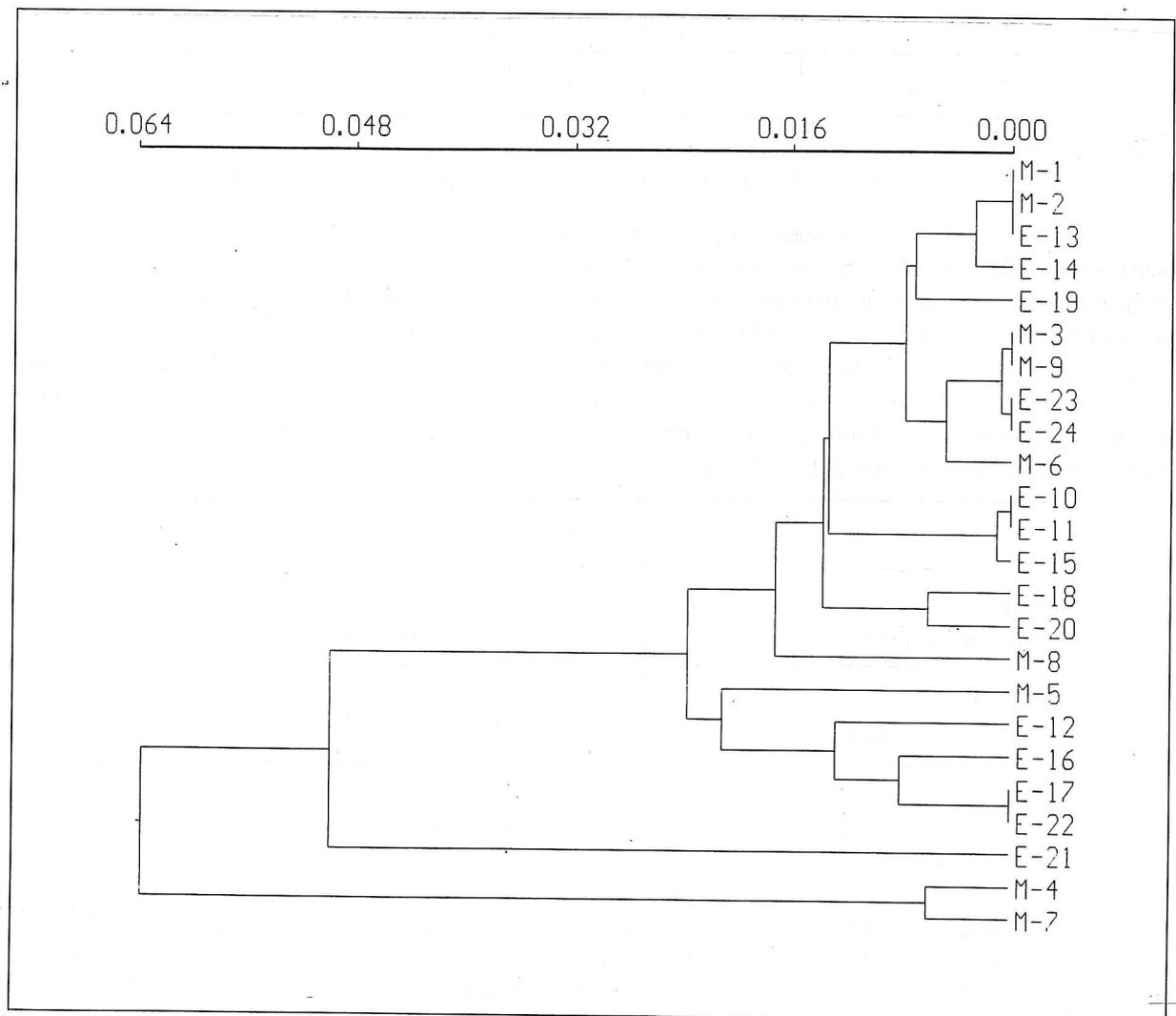


Figura 2. Dendrograma de distancias genéticas entre 24 poblaciones de *Calicotome villosa* de España (E) y Marruecos (M), basado en el método UPGMA.

La distancia genética que existe entre las poblaciones es baja y no existe una correspondencia entre distancia genética y geográfica. Con estos valores de distancia genética entre las poblaciones se elaboró una matriz de distancias genéticas que se sometió a un análisis de clasificación mediante el algoritmo UPGMA que permitió elaborar un dendrograma de semejanza genética (Fig. 2). Es de notar que no existe una agrupación de las poblaciones en función de su presencia en un lado u otro del Estrecho. Dicho de otra forma, el Estrecho no parece actuar como barrera biogeográfica para esta especie. Probablemente existe una migración de diásporas (semillas) entre poblaciones, e incluso a través del Estrecho, suficiente como para evitar una fuerte divergencia genética entre poblaciones. Además, se trata de una especie asociada a zonas de elevada perturbación (Ojeda, 1995), por lo que es probable que esa migración esté ligada a movimientos antrópicos. El síndrome de dispersión de esta especie (fruto dehiscente de apertura explosiva) no parece indicar adaptación a la migración a larga distancia. Por otro lado resulta curioso que los valores de diversidad genética no difieran entre el conjunto de poblaciones europeas y africanas, a pesar de que esta especie es mucho más frecuente y las poblaciones son mayores en el lado Norte del Estrecho. Es decir, si la especie se ha visto mermada en sus poblaciones (tamaño y número) en el norte de África, ello no ha afectado diferencialmente a su diversidad genética, probablemente debido a la facilidad de regeneración por semillas que presenta. Obviamente, este resultado no es generalizable a la totalidad de las especies de la región, dependiendo sobre todo del sistema de reproducción y grado de restricción de hábitats.

Agradecimientos

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación concedida por la DGICYT (proyecto PB091-0894). Fernando Ojeda ayudó en la recolección de semillas. Francisco Crespo colaboró en el análisis de los datos.

Bibliografía

- Brown, A.D.H. 1990 The role of isozymes studies in molecular systematics. *Aust. Syst. Bot.* 3:39-46.
- Cheilak, W. M. y J. A. Pitel 1984. Genetic control of allozyme variants in mature tissues of white spruce trees. *J. Heredity* 75:34-40.
- Falk, A. D. y K. E. Holsinger 1991. *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York.
- Durand-Delga, M. y J.M. Fontbote, 1980. Le cadre structural de la méditerranée occidentale. *Mémoires du Bureau Rech. Geol. Min.* 115: 67-85.
- Hartl, D. L. 1988. *A primer of population genetics*. Sinauer, Sunderland.
- Hedrick, P.W. 1985. *Genetics of populations*. Jones and Bartlett, Boston.
- Kephart, S. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Amer. J. Bot.* 77(5): 693-712.
- Loveless, M.S. y J.L. Harmick 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106:283-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3321-3323.
- Ojeda, F. 1995. *Ecología, biogeografía y diversidad de los brezales del Estrecho de Gibraltar (Sur de España, Norte de Marruecos)*. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Sneath, P.H.A. y R.R.Sokal 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- Solbrig, O.T. 1991. *Biodiversity*. MAB digest 9, UNESCO, París.
- SECEGSA, 1982. *Estudio monográfico sobre la geología del Estrecho de Gibraltar*. Madrid
- Weeden, N. F. y L.D. Gottlieb 1979. Isolation of cytoplasmic enzymes from pollen. *Pl. Physiol.* 66:400-403.
- Wendel, F.J. y N.F. Weeden 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis, D.E. y P.S. Soltis. (eds) *Isozymes in plant biology*. Dioscorides, Portland.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15:323-354.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the genetic of populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press, Chicago.