

## VARIABILIDAD INTER E INTRAESPECÍFICA DE ISOENZIMAS EN *QUERCUS* L.

José Antonio ELENA-ROSSELLÓ<sup>1</sup>  
M.<sup>a</sup> Ángeles GONZÁLEZ ZAPATERO<sup>1</sup>  
Luis CLAVERO CLAVERO<sup>1</sup>

**RESUMEN.**—Hemos estudiado la variación isoenzimática de tres especies espontáneas del género *Quercus*: *Q. suber*, *Q. rotundifolia* y *Q. faginea*. Los isoenzimas varían tanto entre los diferentes órganos como entre los diferentes árboles. Además, todas las especies pueden diferenciarse entre sí por la presencia o ausencia de una o más bandas enzimáticas.

**SUMMARY.**—Using techniques of polyacrylamide gel electrophoresis, EST., G.O.T. and POX. isoenzyme variation was studied in three native oak species: *Q. suber*, *Q. rotundifolia* and *Q. faginea*. The isoenzymes have been shown to vary between organs and between trees. All species could be tentatively differentiated from one another based on the presence or absence of one or more isoenzyme bands.

Las especies de *Quercus* L. estudiadas (*Q. suber* L., *Q. rotundifolia* Lam. y *Q. faginea* Lam.) están ubicadas en bosques naturales pertenecientes al Orden *Quercetalia ilicis*. Se trata de especies con una gran plasticidad fenotípica, anemófilas, alógamas y de "generación larga". La hibridación introgresiva es un hecho generalmente aceptado en el género, donde las poblaciones complejas de origen mixto, clara evidencia de un flujo de genes entre especies afines, son bien conocidas (GRANT, 1981; STEBBINS, 1950).

El valor de los híbridos naturales no podrá ser dilucidado más que por análisis genéticos, ya que los citológicos se han revelado impotentes: todas las especies de *Quercus*, así como los híbridos investigados hasta ahora, tienen el mismo n.<sup>o</sup> cromosómico (n=12).

---

<sup>1</sup> Departamento de Biología Vegetal (Biología General), Facultad de Biología, Universidad de Salamanca. SALAMANCA.

La variación genética entre y dentro de las poblaciones de especies forestales se ha enfocado tradicionalmente estudiando aspectos cuantitativos de la herencia y variación natural de caracteres morfológicos, anatómicos y fisiológicos (LIBBY & col., 1969).

La aplicación de técnicas electroforéticas presenta claras ventajas respecto a los métodos tradicionales: por un lado, permite detectar las variantes alélicas de los genes, al hallarse la variación enzimática directamente relacionada con el estado de heterocigosis y homocigosis de un solo locus (HUBBY & LEWONTIN, 1969). Los enzimas son casi siempre codominantes, de forma que es posible hacer corresponder un genotipo a cada fenotipo observado. Por otro lado, con los datos proporcionados por este método —frecuencia génicas y alélicas— es teóricamente posible estimar con gran aproximación la variación génica entre y dentro de las poblaciones.

Considerando el potencial que ofrecen las técnicas electroforéticas en la investigación de especies arbóreas, al permitir un análisis genético tanto en individuos como en poblaciones naturales, se ha iniciado en el Departamento Biología Vegetal (Biología General) un programa encaminado a evaluar la variabilidad y estructura genética de las poblaciones de *Quercus*.

En el presente artículo, ofrecemos los resultados del análisis electroforético efectuado sobre tres especies de *Quercus* representadas en la región Castellano-Leonesa.

Hemos caracterizado, en primer lugar, cada una de las especies atendiendo a su contenido enzimático, estableciendo así patrones isoenzimáticos específicos; posteriormente, hemos intentado establecer posibles diferencias enzimáticas entre las especies citadas.

Aunque todavía son escasos los estudios bioquímicos en *Quercus*, la aplicación de las técnicas electroforéticas ha puesto en evidencia un marcado polimorfismo entre y dentro de las especies (OLSSON, 1975; MANOS & FAIRBROTHERS, 1987, y YACINE, 1987).

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de material vegetal han sido recogidas en poblaciones naturales de *Q. suber*, *Q. rotundifolia* y *Q. faginea*. La presencia de isoenzimas se ha comprobado sobre diferentes órganos: hojas, cotiledones, hipocótilos y epicótilos.

La extracción de proteínas se ha realizado según la técnica de ELENA-ROSSELÓ (1976), a la que se han introducido algunas modificaciones. El homogeneizado se centrifugó a 40.000 x g, 15', conservándose el extracto enzimático a -80°C. Se realizó la electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida (ORNSTEIN, 1964 y DAVIS, 1964) —gel de separación al 12% y gel concentrante al 6%—. La migración tiene lugar a una tensión de 200-400 V con intensidad constante por placa de 40 mA.

En la caracterización de sistemas enzimáticos, seguimos la técnica de SCANDALIOS (1969) para las esterasas (EST.); la de BROWN & ALLARD (1960) para peroxidasas (POX.), y la de SHAW & PRASAD (1970) para las glutamato-oxalacetato-transaminasas (G.O.T.), con modificaciones para adaptarlas a nuestro material.

La identificación fenotípica de cada individuo se ha efectuado mediante el análisis de los enzimogramas, identificando para ello cada isoenzima por su movilidad relativa (Rf) con respecto al frente de migración.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al no existir estudios previos relacionados con la variabilidad isoenzimática en las tres especies estudiadas, hemos tenido que efectuar una prospección, que afecta, por

un lado a los órganos sobre los que se realizará las extracciones enzimáticas, y por otro a los sistemas enzimáticos.

En cuanto a los sistemas enzimáticos, hemos retenido aquéllos que representaban bandas bien diferenciadas, lo suficientemente intensas y variables en los diversos individuos. Entre ellos, hemos retenido una hidrolasa (EST.), una transferasa (G.O.T.) y una oxidorreductasa (POX.).

Los análisis llevados a cabo sobre individuos pertenecientes a las tres especies de *Quercus* nos han permitido observar una marcada variabilidad isoenzimática (en EST., G.O.T. y POX.). La variación puesta en evidencia debe atribuirse a (1) los órganos, (2) los individuos y (3) las especies.

- 1) Entre los órganos –cotiledones, hipocótilos, epicótilos y hojas– de un solo individuo, se observan patrones isoenzimáticos muy variables. Los órganos difieren, tanto en el número total de isoenzimas, como en la movilidad relativa de éstos.
- 2) Los resultados obtenidos en cada especie y para cada sistema enzimático se recogen de forma esquemática en la fig. 1; el total de bandas (isoenzimas) observado ha sido dividido en zonas de actividad, suponiendo que cada zona corresponde a un *locus* diferente (L=zonas de actividad migración lenta, M=intermedia y R=rápida). Se han agrupado los enzimogramas por sistemas enzimáticos (A-EST., B-G.O.T. y C-POX.), con el fin de apreciar las diferencias y similitudes entre las tres especies.

En *Q. suber*, han sido identificadas un total de 14 bandas isoesterásicas, 5 bandas iso-G.O.T. y 7 bandas iso-POX, siendo el número de isoenzimas/individuo algo menor (cf. tabla I).

En *Q. rotundifolia*, se han identificado un total de 10 bandas iso-EST., 4 iso-G.O.T. y 3 iso-POX. (c. tabla I).

En *Q. faginea*, se identificaron 10 bandas iso-EST., de las que fueron de dudosa identificación, 3 bandas iso-G.O.T. y una sola iso-POX en todos los individuos (cf. tabla I).

- 3) El total de isoenzimas identificados en cada sistema se distribuyen de forma desigual en cada especie, tal y como queda reflejado en la tabla I, resumen de nuestros resultados. Podemos concluir, respecto a tales resultados, que las tres especies muestran considerables diferencias en cuanto al número de isoenzimas y a la movilidad relativa de éstos.

#### BIBLIOGRAFÍA

- BROWN, A. D. H. & ALLARD, R. V. (1969). Inheritance of isoenzyme differences among in-breed parents of a reciprocal recurrent selection population of maize. *Crop. Sci.*, 9: 72-75.
- DAVIS, B. J. (1964). Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins, *Ann. New York Acad. Sci.*, 121: 404-427.
- ELENA-ROSELLÓ, J. A. (1976). *Projet d'une étude de taxinomie expérimentale du genre Thymus*. Thèse Doc: U. S. T. L., Montpellier.
- GRANT, V. (1981). *Plant speciation*. Columbia University Press. New York.
- MANOS, P. S. & FAIRBROTHERS, D. E. (1987). Allozyme variation in populations of six Northeastern American red oaks (*Fagaceae: Quercus* subg. *Erythobalanus*). *Systematic Botany*, 12(3): 365-373.

- OLSSON, V. (1975). Peroxidase isozymes in *Quercus petraea* & *Q. robur*, *Botaniska notiser*, vol. 128: 408-411.
- ORNSTEIN, B. J. (1964). Disc electrophoresis, I. Background and theory. *Ann. New York Acad. Sci.*, 121: 321-349.
- SCANDALIOS, J. G. (1969). Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. *Biochem. Genet.*, 3: 37-39.
- SHAW, C. R. & PRASAD, R. (1970). Starch gel electrophoresis of enzymes, A compilation of recipes. *Biochem. Genetics*, 4: 297-320.
- STEBBINS, G. L. (1950). *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, New York.
- YACINE, A. (1987). *Une étude d'organisation de la diversité génétique inter et intra-population chez le chêne vert: Quercus ilex L.* Thèse Doct. U. S. T. L. Montpellier.

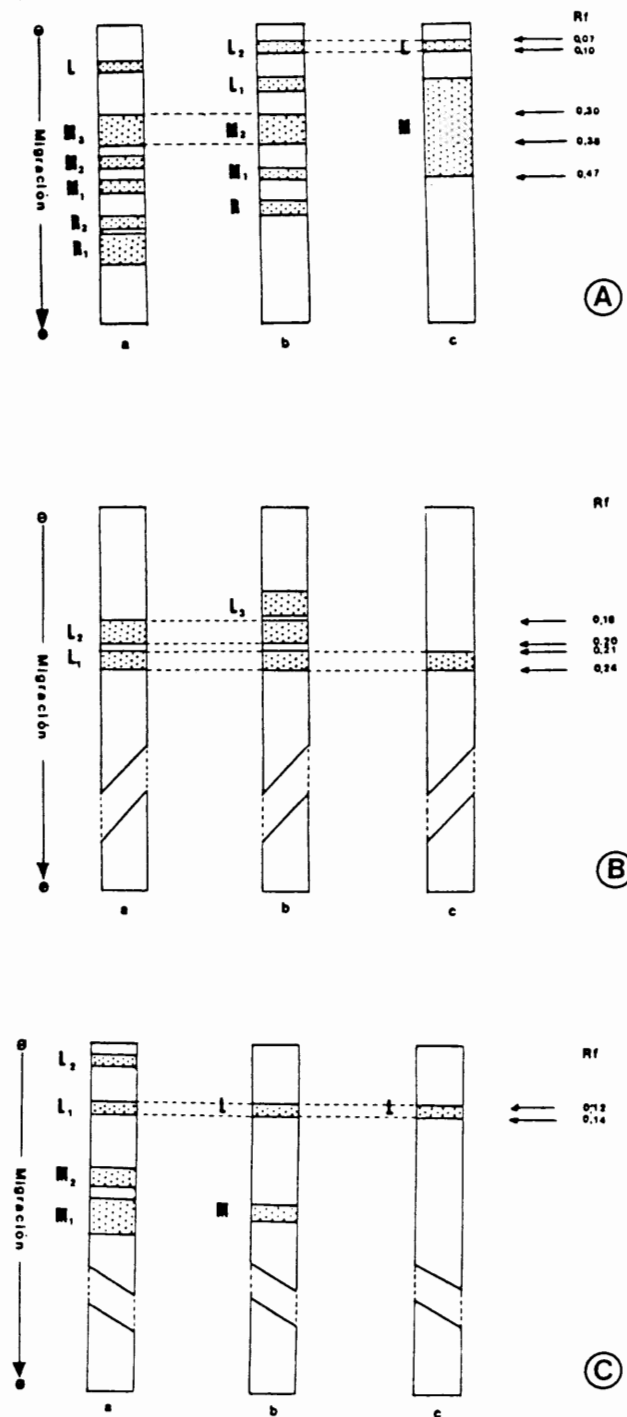


Fig. I. Zonas de actividad EST. (A), G.O.T. (B) y POX. (C) en a) *Q. suber*, b) *Q. rotundifolia* y c) *Q. faginea*. Las líneas discontinuas relacionan zonas comunes.

Tabla I.

Iso-EST.	Q. suber	Q. rotundifolia	Q. faginea
0.07		•	•
0.10		•	•
0.13	•		
0.15	•		
0.19		•	•
0.21		•	•
0.30	•	•	•
0.33	•	•	•
0.36	•	•	•
0.38	•		•
0.41	•		•
0.43	•		•
0.47		•	
0.49	•		
0.51	•		
0.57		•	
0.59		•	
0.60	•		
0.64	•		
0.66	•		
0.74	•		
N.º TOTAL EST	14	10	10
N.º isoenz/indv.	6-12	5-9	—

Iso-G.O.T.	Q. suber	Q. rotundifolia	Q. faginea
0.13		•	
0.17		•	
0.18	•		
0.20	•	•	
0.21	•	•	•
0.22	•		•
0.24	•		•
N.º TOTAL G.O.T.	5	4	3
N.º isoenz/indv.	2-4	3-4	1-2

Iso-POX.	Q. suber	Q. rotundifolia	Q. faginea
0.04	•		
0.13	•		
0.30	•	•	•
0.34	•		
0.38	•		
0.39		•	
0.40		•	
0.42	•		
0.45	•		
N.º TOTAL POX.	7	3	1
N.º isoenz/indv.	4-6	2-3	1