

Estudio de la variabilidad isoenzimática en distintas poblaciones de pimiento de Padrón *Capsicum annuum* L. var. *annuum*

F. MERINO DE CÁCERES & A. BERNAL PITA DA VEIGA

*Departamento de Biología Animal y Biología Vegetal. Facultad de Ciencias
Universidad de A Coruña
15071 A Coruña. España*

Resumen

MERINO DE CÁCERES, F. & BERNAL PITA DA VEIGA, A. (1992). Estudio de la variabilidad isoenzimática en distintas poblaciones de pimiento de Padrón *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 3: 77-84

Se ha estudiado el comportamiento de diez sistemas enzimáticos en dieciséis poblaciones de pimiento de Padrón, *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, por medio de electroforesis en gel de almidón. Las enzimas analizadas han sido: IDH, ACON, 6PGDH, MDH, EST, PRX, SKDH, PGI, PGM y GOT, habiéndose establecido las condiciones óptimas para cada una de ellas. Este trabajo ha permitido determinar que, en los sistemas enzimáticos estudiados, no se ha detectado variabilidad genética siendo su comportamiento, en este aspecto, monomórfico. Paralelamente, se ha realizado también este estudio en otras variedades existentes en la provincia de A Coruña, obteniéndose un resultado similar.

Palabras clave: *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, pimiento, electroforesis en gel de almidón, isoenzima.

Abstract

MERINO DE CÁCERES, F. & BERNAL PITA DA VEIGA, A. (1992). Isoenzyme variability in several populations of Padrón pepper *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 3: 77-84

Starch gel electrophoresis was used to study 10 enzyme systems in 16 populations of Padrón pepper, *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. We analysed the enzyme systems IDH, ACON, 6PGDH, MDH, EST, PRX, SKDH, PGI, PGM and GOT establishing the appropriate conditions for them. In all cases these enzyme systems lack genetic variability, being these varieties therefore monomorphic. We have also carried out a similar study with other varieties cultivated in A Coruña region obtaining similar results.

Key words: *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, pepper, starch gel electrophoresis, isoenzyme.

INTRODUCCION

Las isoenzimas, término introducido por MARKERT & MOLLER (1959), son cada una de las múltiples formas moleculares de una enzima con similar o idéntica especificidad de sustrato que

aparecen en un organismo. PRAKASH *et al.* (1969) propusieron el término de alozima para designar aquellas variantes proteicas que son producidas por las distintas formas alélicas de un mismo locus, con el fin de distinguirlas del fenómeno más general de las isoenzimas. Estas diferentes

formas se pueden separar por distintos métodos bioquímicos entre los cuales, la electroforesis en gel es el más versátil y fácil de aplicar a los estudios en plantas.

El medio más comunmente utilizado para los análisis rutinarios es el almidón (SCANDALIOS, 1969; SHAW & PRASAD, 1970; VALLEJOS, 1983) ya que nos permite una buena separación y resolución de las isoenzimas. Pero quizás una de las mayores ventajas sea el que cada gel puede cortarse en varias lonchas, cada una de las cuales puede ser teñida para diferentes enzimas.

Los estudios genéticos de las isoenzimas han sido llevados a cabo en un gran número de especies vegetales. Estos datos han contribuido de una manera significativa al conocimiento de la selección natural (CLEGG, 1983), de la sistemática (CRAWFORD, 1983) y de la estructura de la población (RITLAND, 1983).

Capsicum annuum L. var. *annuum* es un miembro de la familia de las Solanáceas que tiene una importancia económica considerable por tratarse de la especia más utilizada, siendo además, dentro de los pimientos cultivados, el de mayor distribución. El origen de esta especie hay que situarlo en México (ESHBAUGH, 1970), desde donde se distribuyó por todo el mundo a partir del descubrimiento de América.

La mayoría de los estudios realizados por medio de electroforesis en gel de almidón, han estado encaminados al establecimiento del control genético de las isoenzimas con el fin de mejorar la producción de las variedades de pimiento, así como también al conocimiento del origen evolutivo del género y de las formas domésticas (McLEOD *et al.*, 1983).

En la provincia de A Coruña se cultiva la variedad *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, conocida como pimiento de Padrón, cuya explotación se realiza de modo extensivo en el territorio que comprende la parroquia de Herbón y zonas colindantes, si bien también se cultiva en amplias zonas de Cambre, Ferrol, Betanzos y distintos municipios de A Coruña.

Dadas las características peculiares de estas variedades, su mantenimiento y conservación se convierte en un importante problema, ya que estos materiales se encuentran adaptados a las condiciones ambientales de la zona, aunque deba mejorarse su producción (FRANKEL & HAWHES,

1975). De ahí que es importante realizar un estudio previo acerca de la variabilidad genética existente en dicho cultivo.

El motivo de este trabajo es establecer el comportamiento de los distintos sistemas enzimáticos, utilizando técnicas de electroforesis en geles de almidón, y determinar el grado de variabilidad que presentan estos sistemas en las poblaciones de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* de Padrón y otras localidades, así como comparar los resultados obtenidos con otros tipos de pimientos también cultivados en nuestra región.

MATERIAL Y METODOS

Se han analizado 16 poblaciones de *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, con un total de 50 individuos por población, las cuales se reparten en distintas localidades de la provincia de A Coruña. La recogida de material se realizó personalmente, y a la hora del muestreo éste se hacía de modo que sólo se cogía un fruto de cada planta, con lo cual se obtenía una muestra no sesgada del total de la población.

Las semillas se ponían a germinar en el laboratorio, a temperatura ambiente, sobre papel de filtro humedecido. A partir de los 15 días de la germinación se cogían las hojas para obtener el extracto crudo, y se homogeneizaban en tampón de extracción en la proporción 1:2 p/v. Se utilizó como tampón de extracción el de ROOSE & GOTTLIEB (1978) (0.1M Tris ClH, 10mM KCl, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA, 14mM 2-mercaptoetanol, 0.1M ácido ascórbico, pH 7.80), al cual se le añadían 0.2 gr de PVP-P y 0.05 gr de PVP-40 por cada 2 ml de tampón. En los distintos extractos se impregnaban papeles de filtro Watman nº 3 de 3x12 mm que se introducían en el gel de almidón. Una vez depositadas las muestras, se aplicaba un voltaje de 150 V durante 20', pasados los cuales se retiraban los papeles Watman y continuaba la electroforesis al potencial correspondiente según el sistema utilizado.

Se han utilizado tres sistemas de electroforesis (Tabla I) determinándose el sistema idóneo para cada enzima así como la loncha en la cual es mejor la resolución (Tabla II). Las condiciones de electroforesis se especifican en la tabla III.

TABLA I. Sistemas de electroforesis en gel de almidón

Sistema	Tampón Gel	Tampón electrodo	Ref
I	A-Histidina 7mM pH 7.00 Citrato 0.043M	B-Tris 0.135M pH 7.00	1
II	C-Tris 0.015M pH 7.80 Citrato 4mM	D-Borato 0.3M pH 7.80	2
III	E-Tris 0.015M pH 8.00 EDTA 2mM Borato 0.037M	F-Tris 0.2M pH 8.50 EDTA 2mM Borato 0.15M	3

(1) VALLEJOS, 1983. (2) RICK *et al.*, 1977. (3) GURIES & LEDING, 1978.

TABLA II. Sistemas idóneos para cada enzima, nº de loncha y técnica de tinción

Sistema	Enzima	nº de Loncha	Técnica de tinción. Ref.
I	IDH	1	VALLEJOS, 1983
	ACON	2	CONKLE <i>et al.</i> , 1982
	6PGDH	3	VALLEJOS, 1983
	MDH	4	BROW <i>et al.</i> , 1978
II	EST	2	SHAW & PRASAD, 1970
	PRX	3	BREWBAKER <i>et al.</i> , 1968
III	SKDH	1	VALLEJOS, 1983
	PGI	2	VALLEJOS, 1983
	PGM	3	VALLEJOS, 1983
	GOT	4	BREWBAKER <i>et al.</i> , 1968

TABLA III. Condiciones de electroforesis de los diferentes sistemas

Sistema	% Almidón	Gel	Electrodo	Potencial	Tiempo
I	10.5%	A	B	7 W	2h.30'
II	10.5%	C	D	10 W	3h.
III	11%	E	F	12-17 W	3h.30'

Después de teñidos los geles, éstos eran lavados con acético al 1% para detener la reacción, procediéndose a continuación a su fotografiado.

Las enzimas estudiadas han sido las siguientes: IDH (EC 1.1.1.42), ACON (EC 4.1.2.3), 6PGDH (EC 1.1.1.44), MDH (EC 1.1.1.37), EST (EC 3.1.1.1.), PRX (EC 1.1.1.7.), SKDH (EC 1.1.1.25), PGM (EC 2.7.5.1) PGI (EC 5.3.1.9), GOT (EC 2.6.1.1).

Nomenclatura de las enzimas

Las isoenzimas se designan con un número, en función de su movilidad relativa respecto al frente de azul de bromofenol, que acompaña al símbolo de la enzima: la isoenzima con migración más anódica, se designa como 1, la siguiente 2 y así sucesivamente. Para cada isoenzima, el

alelo con mayor movilidad relativa, se denomina a, el siguiente b, etc.

Aislamiento y purificación de cloroplastos

Se ha seguido la técnica de PALMA *et al.* (1986). Las hojas se homogeneizaban en un tampón compuesto de manitol 0.35M, Mops 30 mM (pH 7.5), cisteína 4mM, EDTA 1 mM y 0,2 % de BSA, en una proporción 1:4 p/v. El homogeneizado se filtraba a través de 4 gasas de nylon y se centrifugaba a 7.000 rpm. durante 3 minutos. El precipitado de cloroplastos era resuspendido cuidadosamente en un pequeño volumen del mismo medio, y se purificaba en una posterior centrifugación a 12.000 rpm. durante 30 minutos en un gradiente discontinuo de Percoll. Finalmente se recogía la banda de cloroplastos íntegros por medio de un fraccionador de gradientes.

TABLA IV. Movilidad relativa de las diferentes formas alozímicas, estructura de la proteína y localización subcelular

Isoenzima	Alozima ^I			Estructura Proteína ^{II}	Localización Celular ^{III}
	a	b	c		
IDH 1	0.17	0.15	0.13	D	C
6PGDH 1	0.22			D	O
6PGDH 2	0.13			D	C
MDH 1	0.27			D	-
MDH 2	0.08			M	-
EST 1	0.96			M	-
EST 2	0.83	0.77		M	-
EST 3 ^{IV}	0.25			M	-
PRX 1	0.96	0.93	0.90	M	A
PRX 2	0.85	0.82		M	C
PRX 3 ^{IV}	0.1			M	A
SKDH 1	0.3		0.26	M	O
SKDH 2	0.2		0.15	M	C
PGI 1	0.42			D	O
PGI 2	0.15			D	C
PGM 1	0.41			M	O
PGM 2	0.29	0.22		M	C

(I) Movilidad electroforética relativa respecto al frente de Azul de Bromofenol.

(II) M, Monómera; D, Dímera.

(III) C, Citosol; O, Orgánulo; A, Apoplasto.

(IV) Catódicas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los ensayos realizados en nuestro laboratorio nos han permitido poner a punto las técnicas electroforéticas en gel de almidón para las diferentes enzimas, adaptándolas al pimiento de Padrón. Como consecuencia de ello, podemos determinar cuales son los sistemas idóneos para cada una de las enzimas, así como las condiciones de electroforesis (Tablas II y III).

Hemos analizado 10 sistemas enzimáticos, presentando a continuación el comportamiento de dichas enzimas. La movilidad relativa, el número de subunidades y la localización subcelular de cada isoenzima, se presentan en la tabla IV. La estructura monomérica o dimérica se deduce en base a datos bibliográficos y al número de bandas que se detectan en el heterocigoto, que generalmente es una unidad superior al número de subunidades que componen la enzima. La localización subcelular ha sido determinada según la técnica de PALMA *et al.*, 1986 (Tabla IV).

En las diferentes poblaciones estudiadas hemos observado cómo el patrón de las enzimas no presenta ningún tipo de variación, comportándose todas ellas como sistemas monomórficos, con lo cual podemos afirmar que en *Capsicum annuum* L. var. *annuum* parece no existir variabilidad genética en los sistemas estudiados. (Fig. 1, 2, 3). Esta afirmación coincide con los escasos estudios existentes en *Capsicum annuum* respecto a variabilidad genética. McLEOD *et al.* (1983) muestran como en un taxón individual el número de loci polimórficos está muy reducido y las poblaciones pertenecientes al mismo taxón son, electroforéticamente, muy similares unas a otras (JENSEN *et al.*, 1979).

El bajo nivel de polimorfismo y de heterocigosis es probablemente el resultado de la capacidad del pimiento de comportarse como una planta autógama. JENSEN *et al.* (1979) sugieren que esto provoca la aparición de poblaciones constituidas por una o más subpoblaciones altamente monomórficas, con una pequeña tasa o ausencia completa de alogamia.

PICKERSGILL & HEISER (1976) ya habían mencionado que, en América del Sur, las poblaciones de pimientos eran cultivadas en pequeños jardines familiares en los que sólo se plantaban

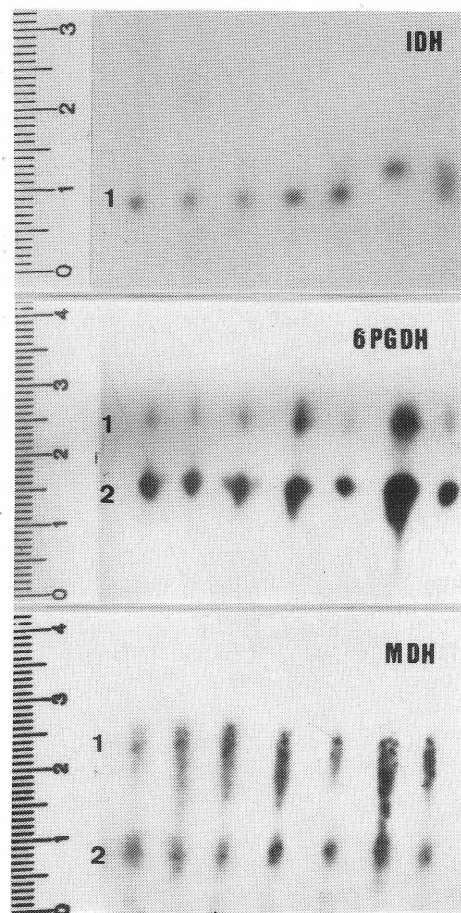


Fig. 1. Patrones isoenzimáticos en gel de almidón utilizando el sistema I. IDH, 6PGDH y MDH.

un pequeño número de individuos. Cada año las plantas eran cultivadas a partir de las semillas del año anterior, con lo cual se estaba contribuyendo al mantenimiento de los bajos niveles de variabilidad. Sin embargo, las formas salvajes que presentan un ligero incremento en el grado de variabilidad (McLEOD *et al.*, 1983) también eran de baja variabilidad genética.

Si consideramos que el pimiento de Padrón es una especie doméstica fuertemente adaptada a la zona de cultivo, Herbón, y en donde los cultivos se mantienen de generación en generación por selección de las mejores semillas, se explica esta notable ausencia de variabilidad

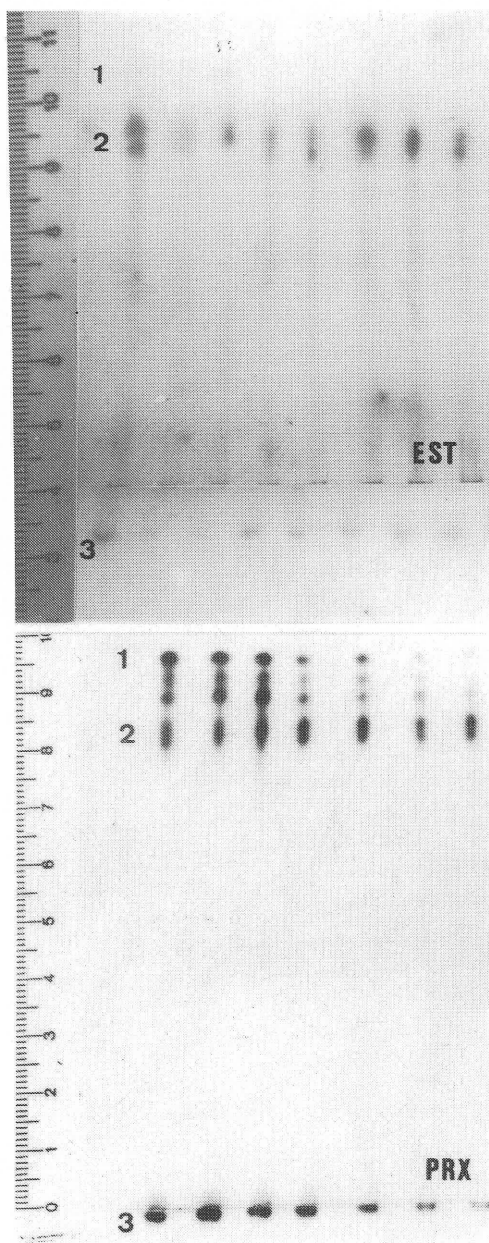


Fig. 2. Patrones isoenzimáticos en gel de almidón utilizando el sistema II. EST y PRX.

genética en los diferentes sistemas enzimáticos estudiados. Es interesante destacar que este tipo de selección, practicada al realizarse sobre líneas homocigóticas que mantienen el genotipo inalterado, es de poca utilidad, ya que el mayor

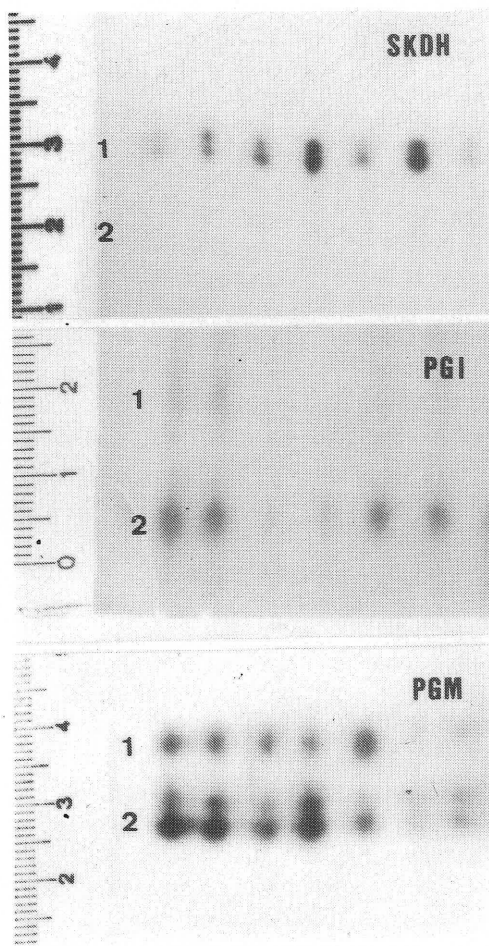


Fig. 3. Patrones isoenzimáticos en gel de almidón utilizando el sistema III. SKDH, PGI, PGM.

tamaño de la semilla seleccionada es debido sólo a efectos ambientales.

Paralelamente a este estudio con diferentes poblaciones de pimiento de Padrón *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, realizamos un estudio con otras variedades de pimiento, entre ellas: pimiento tipo «guindilla», pimiento de Arnoia, y el conocido como pimiento Sonar. Este último, se conoce también como «híbrido Francés».

En estas cuatro variedades se estudiaron las mismas enzimas y pudimos comprobar que el comportamiento de éstas era exactamente el mismo, con la excepción de la enzima IDH. En esta enzima el pimiento de Padrón muestra una única zona de actividad con un Rf de 0.13.

También hemos observado cómo el pimiento de Arnoia presenta el alelo rápido de dicha isoenzima con un Rf de 0.17, y este alelo aparece invariablemente en todos los individuos estudiados. El pimiento Sonar presenta ambos alelos, ya que aparece la isoenzima IDH 1 con un patrón tribandeado, con Rfs. 0.17, 0.15 y 0.13 respectivamente, que se corresponden con las diferentes combinaciones de las dos subunidades que constituyen la isoenzima IDH 1 (Fig. 1).

Si comparamos los datos genéticos con las características morfológicas, observamos cómo estas cuatro variedades, totalmente diferentes, aparecen indistinguibles desde el punto de vista isoenzimático; este hecho ha sido observado en animales y plantas. AVISE *et al.* (1975) y KORNFIELD & KOEHN (1975) establecen grupos de peces que eran morfológicamente diferentes pero no se podían diferenciar por electroforesis en gel. Resultados similares fueron presentados por CARSON *et al.* (1975), que establecen unas similitudes alozímicas elevadas entre dos especies de *Drosophila* morfológica y citológicamente diferentes.

En el género *Capsicum* existe un gran nivel de variación morfológica. Sin embargo, la variabilidad genética a nivel isoenzimático no siempre está relacionada con los patrones de variedad morfológica, como sucede en *Capsicum cardenasii* y *Capsicum eximium* que son fáciles de separar morfológicamente pero no alozímicamente (JENSEN *et al.*, 1979). Lo mismo sucede en *Capsicum annum*, en el que se pueden reconocer distintos taxones en base a fundamentos morfológicos (PICKERSGILL *et al.*, 1978), aunque los datos alozímicos describen estos diferentes taxones como inseparables (MCLEOD *et al.*, 1978).

El estudio que hemos realizado con diferentes poblaciones de *Capsicum annum* L. var. *annuum* viene a confirmar estos resultados, al comportarse los distintos tipos de pimientos, algunos muy diferentes en su aspecto externo, de la misma forma desde el punto de vista isoenzimático. Esta ausencia de variabilidad genética, si bien les resta importancia para estudios poblacionales, los hace especialmente interesantes para investigaciones sobre la localización subcelular, que ya hemos iniciado, así como de desarrollo y de distribución en los

distintos tejidos, que abordaremos en un futuro próximo.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a los agentes de Extensión Agraria Julia Alvarez Lamas, de Cambre, y Julio Martín García, de Padrón, por su valiosa colaboración a la hora de la recogida de las muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AVISE, J.C., SMITH, J.J. & AYALA, F.J. (1975). Adaptive differentiation with little genic change between two native Californian minnows. *Evol.*, **29**: 411-426.
- BREWBAKER, J.L., UPADHYA, M.D., MAKINEN, H. & MACDONALD, T. (1968). Isoenzyme polymorphism in flowering plants. III Gel electrophoretic methods and applications. *Physiol. Plant.*, **21**: 930-940.
- BROWN, A.H.D., ZOHARY, D. & NEVO, E. (1978). Outcrossing rates and heterozygosity in natural populations of *Hordeum spontaneum* Koch in Israel. *Heredity*, **41**: 49-62.
- CARSON, H.L., JOHNSON, W.E., NAIR, P.S. & SENE, F.M. (1975). Allozymic and chromosomal similarity in two *Drosophila* species. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**: 4521-4525.
- CLEGG, M.T. (1983). Detection and measurement of natural selection. In: Tanksley, S.D. & Orton, T.J. (Ed.), *Isozymes in plant genetics and breeding*. Vol A.: 241-256. Elsevier. Amsterdam.
- CONKLE, M.T., HODOSKISS, P.D., NUNNALLY, L.B. & HUNTER, S.C. (1982). Starch gel electrophoresis of conifer seeds: A laboratory manual. *USDA Gen. Tech. Rep.*, PSW-64.
- CRAWFORD, D.J. (1983). Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. In: Tanksley, S.D. & Orton, T.J. (Ed.), *Isozymes in plant genetics and breeding*. Vol A.: 257-288. Elsevier. Amsterdam.
- ESHBAUGH, W.H. (1970). A biosystematic and evolutionary study of *Capsicum baccatum* (Solanaceae). *Brittonia*, **22**: 31-43.
- FRANKEL, O.H. & HAWHES, J.G. (Ed.). (1975). *Crop genetic resources for today and tomorrow*. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- GURIES, R.P. & LEDIG, F.T. (1978). Inheritance of some polymorphic isoenzymes in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). *Heredity*, **40**: 27-32.

- JENSEN, R.J., MCLEOD, M.J., ESHBAUGH, W.H. & GUTTMAN, S.I. (1979). Numerical taxonomic analyses of allozymic variation in *Capsicum* (*Solanaceae*). *Taxon*, **28**: 315-327.
- KORNFIELD, I.L. & KOEHN, R.K. (1975). Genetic variation and speciation in New World cichlids. *Evol.*, **29**: 427-437.
- MARKERT, C.L. & MOLLER, F. (1959). Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic and specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **45**: 753-763.
- MCLEOD, M.J., ESHBAUGH, W.H. & GUTTMAN, S.I. (1978). A preliminary biochemical systematic study of the genus *Capsicum* - *Solanaceae*. In: Hawkes, J.G. & Lester, R.N. (Ed.), *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Acad. Press. New York.
- MCLEOD, M.J., GUTTMAN, S.I., ESHBAUGH, W.H. & RAYLE, R.E. (1983). An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (*Solanaceae*). *Evolution*, **37**(3): 562-574.
- OLIVER, J.L. & MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. (1985). A genetic classification of potato cultivars based on allozyme patterns. *T.A.G.*, **69**: 305-311.
- PALMA, J.M., SANDALIO, L.M. & DEL RÍO, L.A. (1986). Manganese superoxide dismutase and higher plant chloroplasts: A reappraisal of a controverted cellular localization. *J. Plant. Physiol.*, **125**: 427-439.
- PICKERSGILL, B. & HEISER, C.B. JR. (1976). Cytogenetics and evolutionary change under domestication. *Trans. R. Soc. London B.*, **275**: 55-69.
- PICKERSGILL, B. & HEISER, C.B. JR. & MCNEILL, J. (1978). Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. In: Hawkes, J.G. & Lester, R.N. (Ed.), *The biology and taxonomy of the Solanaceae*: 679-700. Acad. Press. New York.
- PRAKASH, S., LEWONTIN, R.C. & HUBBY, J.L. (1969). A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genetic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, **61**: 841-858.
- RICK, C.M., FOBES, J.F. & HOLLE, M. (1977). Genetic variation in *Lycopersicon pimpinellifolium*: evidence of evolutionary change in mating systems. *Plant. Syst. Evol.*, **127**: 139-170.
- RITLAND, K. (1983). Estimation of mating systems. In: Tanksley, S.D. & Orton, T.J. (Ed.), *Isozymes in plant genetics and breeding*. Vol A: 289-302. Elsevier. Amsterdam.
- ROOSE, M.L. & GOTTLIEB, L.D. (1978). Stability of structural gene number in diploid species with different amounts of nuclear DNA and different chromosome numbers. *Heredity*, **40**: 159-163.
- SCANDALIOS, J.G. (1969). Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochem. Genet.*, **3**: 37-79
- SHAW, C.R. & PRASAD, R. (1970). Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, **4**: 297-320.
- TANKSLEY, S.D. (1984). Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme-coding genes in pepper, *Capsicum annuum*. *Chromosoma (Berl.)*, **89**: 352-360.
- VALLEJOS, E. (1983). Enzyme activity staining. In: Tanksley, S.D. & Orton, T.J. *Isoenzymes in Plant Genetics and Breeding*: 469-516. Elsevier Science. Amsterdam.
- WEEDEN, N.F. (1984). Distinguishing among white seeded bean cultivars by means of allozyme genotypes. *Euphytica*, **33**: 199-208.