

# IDENTIFICACION ISOENZIMÁTICA DE PORTAINJERTOS DE PALTO (*Persea americana* Mill.)

María Inés Figueroa R. y Ana Schugurensky  
Facultad de Agronomía y Zootecnia - U. N. T. Avda Roca 1900 - (4000) San Miguel de Tucumán. Argentina. e-mail: marines@manant.unt.edu.ar

Recepción de originales: 17 de abril de 2002.

## ABSTRACT

### **Isoenzymatic identification of avocado rootstock (*Persea americana* Mill.).**

**Key words:** Avocado, peroxidase, isoenzymes.

The technique of micropropagation is currently used in avocado in order to ensure that the material obtained is uniform and resistant to *Phytophthora cinnamomi* Rand. The aim of the present work was to identify, by means of isoenzymes, donor plants to be used as avocado rootstock. The identification was conducted via vertical electrophoresis in polyacrylamide gel using peroxidase isoenzymatic systems. The results demonstrated that the peroxidases give a reference pattern that allows identification of donor material.

## RESUMEN

**Palabras Claves:** aguacate, peroxidasa, variabilidad.

Actualmente se utiliza la técnica de micropropagación en palto (aguacate) para asegurar la uniformidad del material obtenido y asegurar así su resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rand.. El objetivo de la presente investigación fue identificar, por medio de isoenzimas, plantas donantes de portainjertos de palto. Se llevó a cabo por medio de electroforesis vertical en gel de poliacrilamida. Los sistemas isoenzimáticos utilizados fueron los de las peroxidasa. Los resultados indicaron que las peroxidasa dan un patrón de referencia que permite la identificación del material donante.

## INTRODUCCIÓN

El palto (aguacate) es un frutal tropical muy difundido en el mundo y su cultivo ha tenido un gran incremento en las últimas décadas. Muy alejada de las latitudes de origen y difusión, Argentina con 3.000 ton se ubica en el 30° lugar en la producción mundial, siendo las principales provincias productoras Tucumán y Jujuy con el 96% de la fruta comercializada en el país y con amplias posibilidades de exportación. (Foguet *et al.*, 1982).

El hongo *Phytophthora cinnamomi* Rand, responsable de la podredumbre de raíces y tronco ocasiona graves pérdidas a escala mundial (Yasseen, 1993). En Argentina, las áreas productoras, especialmente en la franja pedemontana donde se radicó el cultivo, también han sufrido la pérdida casi total de sus plantaciones, causando serios problemas económicos (Foguet *et al.*, 1982)

Un inconveniente en la propagación vegetativa del palto (aguacate) es la dificultad de la obtención rápida de material en grandes cantidades. En Tucumán, Argentina, la única

práctica comercial empleada hasta la actualidad es la técnica de injertación de púa herbácea sobre portainjertos provenientes de semillas. Los portainjertos utilizados para la multiplicación de plantas de interés económico son variedades de raza mejicana, y entre estas, algunas como Duke 7, resistente a *P. cinnamomi*. Sin embargo, la propagación de portainjertos a partir de semillas presenta inconvenientes originados por la variación en las características morfológicas y la calidad de la producción, como también por la variabilidad genética, incluida la sensibilidad a *P. cinnamomi*. Con este propósito, en los últimos años se ha puesto mucho interés en la multiplicación *in vitro* del palto (aguacate) a través de la micropropagación a fin de asegurar la uniformidad del material obtenido (Bhojwani *et al.*, 1996). Esta técnica no es empleada aún a gran escala en Argentina.

Una desventaja en el uso de esta técnica es la posibilidad de que se produzca un pequeño porcentaje de variaciones somaclonales (10%) en el material micropropagado, lo cual deja sentado que el cultivo *in vitro* en sí es una fuente de variabilidad (Litz Jaiswal, 1991). Sin embargo, la multiplicación de plantas mediante la proliferación de brotes axilares es el método de micropropagación más fiable en términos de estabilidad genética del material obtenido. (Pliego-Alfaro y Barceló-Muñoz, 1999). En el caso del aguacate, el material propagado es leñoso y presenta baja respuesta a la regeneración al utilizar como explante tejidos que no son fisiológicamente jóvenes (Pierik, 1987). El cultivo *in vitro* para esta especie está todavía en sus inicios y es necesario profundizar la investigación en Argentina para establecer un protocolo exitoso, que permita la regeneración y propagación del mismo.

Para lograr la puesta a punto de la técnica de micropropagación de genotipos selectos de portainjertos y obtener plantas tolerantes a *P. cinnamomi*, se debe hacer hincapié en efectuar una minuciosa selección de las plantas donantes con reconocida tolerancia al hongo y en el establecimiento de un banco de estas plantas a partir del material seleccionado (Jiménez G., 1998).

Una herramienta útil para obtener información acerca de la identidad de las plantas donantes es utilizar marcadores moleculares como las isoenzimas. Por medio de la electroforesis se puede revelar su polimorfismo molecular y confeccionar patrones de bandas que corresponden a fenotipos electroforéticos derivados de la conformación genética de las plantas (Arias, 1994). Es decir que el uso de múltiples formas moleculares de las isoenzimas tiene como ventajas brindar una vía posible que facilite la interpretación y el reconocimiento de variedades e híbridos intra e interespecíficos (Feldmann, 1985). En ese sentido la actividad de las peroxidasas juega un papel importante en el palto (aguacate). Sánchez *et al.* (1993) citan que la actividad de las peroxidasas puede estar asociada a la edad ontogénica de las plantas, ya que presentan mayores valores en hojas jóvenes respecto a hojas adultas. Más aún, cuando se somete el material adulto a tratamientos de rejuvenecimiento, los niveles de peroxidasas también aumentan. García *et al.* (1995) demuestran que el enraizamiento de estacas leñosas de este frutal depende de la edad del material, ya que trabajando con microestacas juveniles observan que tienen mejor respuesta que las adultas. Para Margara (1988), las peroxidasas estarían involucradas con los niveles de auxinas, pues evaluando las variaciones del ácido indol acético (IAA) durante el proceso de enraizamiento se observa que éste es una sustancia sensible a los sistemas enzimáticos de degradación (IAA oxidasas y peroxidasas).

El objetivo del presente trabajo fue la identificación de plantas donantes de portainjertos de palto (mejicana y Duke 7) mediante la técnica de electroforesis de las isoenzimas de peroxidasas.

## MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron portainjertos de palto (aguacate) de raza mejicana y Duke 7 cultivadas en invernáculo, bajo condiciones ambientales y fitosanitarias controladas. Este material proviene de plantas de un vivero comercial, de reconocida trayectoria en la provincia de Tucumán, Argentina.

Las electroforesis se realizaron en la Cátedra de Genética de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán.

Se eligieron tres plantas de entre 1 y 3 años en cada portainjerto. Se seleccionaron las hojas situadas inmediatamente por debajo del brote apical en que se conservaron a una temperatura de -15°C en congelador hasta el momento de ser usadas. Se maceraron en mortero enfriado 200 mg de las hojas con 1 ml de sacarosa 20%. Se centrifugó a 4.000 rpm durante 20 min. a 4°C y se sembró el sobrenadante a razón de 40 µl por muestra.

**Cuadro 1:** Composición de los geles, buffers y condiciones de migración usados en la electroforesis de peroxidasas.

**Table 1:** Composition of the gels and buffers, and conditions of migration used in the peroxidase electrophoresis.

GEL	BUFFER DEL GEL	BUFFER ELECTRODOS	VOLTAJE INTENSIDAD DURACION
Poro Grueso (2,5 cm): Acrilamida 2,5 % Bis-Acrilamida 0,625 % Riboflavina $5 \times 10^{-4}$ % Sacarosa 20 %	Tris-HCl 0,0617 M 0,75 % pH = 6,7	Tris : 0,00495 M Glicina : 0,03836 M pH = 8,3	Poro Grueso: 30 mA= Cte (~ 180 V) Duración : 30 min.
Poro Fino (8,5 cm): Acrilamida 9% Bis-Acrilamida 0,157% Persulfato de NH <sub>4</sub> 0,30%	Tris-HCl 0,375 M 4,54% pH=8,9		Poro Fino: 40 mA= Cte (~200V) Duración: 3 - 3,5 h.

Modificada de Feldmann. 1984.

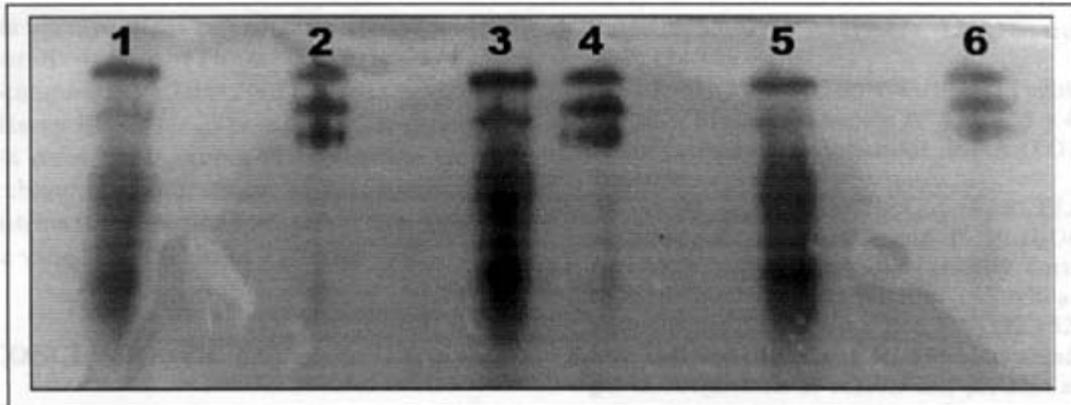
La electroforesis se llevó a cabo en gel de poliacrilamida (Ornstein, 1964; Davis, 1964) en un sistema de buffers discontinuo (Feldmann, 1985) adaptado para electroforesis vertical. En el Cuadro 1 se indican la composición de los geles y de los tampones así como las condiciones y el tiempo de la experiencia. Para el revelado se utilizó o-dianisidina (Brewbaker *et al.*, 1968).

Se hicieron tres repeticiones y los patrones (zimogramas) de las muestras se confeccionaron dando el número 1 a la banda más rápida. Se calcularon sus rf como el valor de la migración de cada banda con relación al frente de la corrida electroforética.

**Cuadro 2:** Valores de rf correspondientes a las bandas electroforéticas de peroxidasas de dos tipos de portainjerto de *P. americana* Mill.

**Table 2:** Reference values corresponding to the peroxidase electrophoresis bands of two types of rootstock of *P. americana* Mill.

Banda	Rf	
	Mejicana	Duke 7
1	4.2	1,6
2	3.9	
3	3.4	
4	3.1	
5	2.6	
6	2.3	
7		1.9
8	1.7	
9		1.6
10	1.2	
	11	1,0



**Figura 1:** Electroforesis de peroxidasas de dos tipos de portainjertos de *P. americana* Mill. 1, 3 y 5 variedad mejicana; 2, 4 y 6 variedad Duke 7.

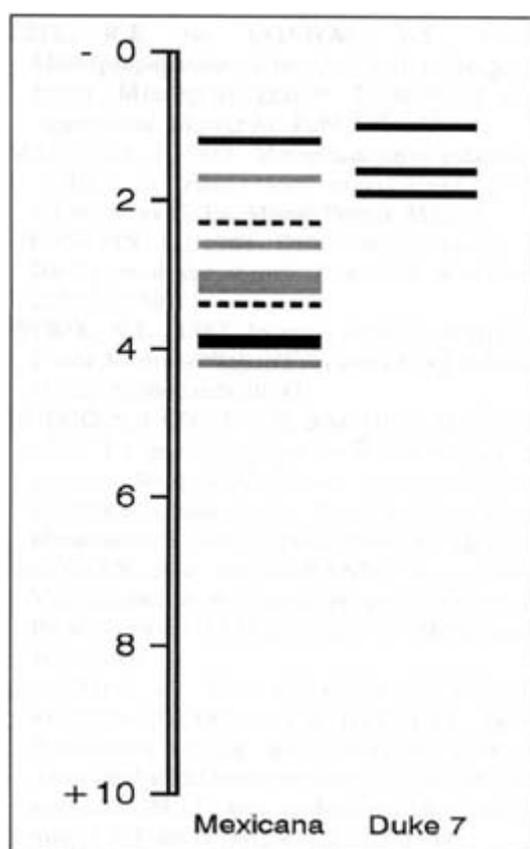
**Figure 1:** Peroxidase electrophoresis of two types of rootstock for *P. americana* Mill. 1, 3 and 5 Mexican variety; 2, 4 and 6 Duke 7 variety.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la utilización de la electroforesis se logró la identificación de los dos portainjertos empleados, por sus diferentes perfiles de las isoenzimas de las peroxidadas.

En la Figura 1 se observa la electroforesis en gel de poliacrilamida de isoenzimas de peroxidadas de las tres plantas seleccionadas de cada variedad de portainjerto.

El análisis de los zimogramas (Figura 2) obtenidos a partir de la electroforesis de las isoperoxidadas (Figura 1) indica la presencia de ocho bandas para la variedad mejicana distribuidas entre las regiones catódica y anódica y tres bandas claras y definidas situadas en la región catódica para Duke 7.



**Figura 2:** Zimograma de isoenzimas de peroxidadas en dos tipos de portainjerto de *P. americana* Mill.  
**Figure 2:** Zymogram of peroxidase isoenzymes of two types of rootstock for *P. americana* Mill.

Los *rf* correspondientes a ambas variedades se muestran en el Cuadro 2.

Numerosos autores han usado la electroforesis de isoenzimas para la identificación taxonómica: Hart y Bhatia (1967) de especies de *Nicotiana*; Saidman y Naranjo (1982) en tres poblaciones de *Prosopis* sp; Iglesias *et al.* (1974) lograron diferenciar en la progenie de *Citrus* provenientes de cultivo *in vitro*, plantines cigóticos de los nucelares

y Thom y Maretzki (1970) identificaron clones de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) por el patrón de sus isoenzimas. En algunos casos es necesario confeccionar el perfil de dos (Thom y Maretzki 1970; Schugurensky y Diaz 2001) o varias isoenzimas (Hart y Bhatia 1967) para identificar genotipos. En otros casos, como el presentado en este trabajo, el polimorfismo característico de un sistema isoenzimático basta para la diferenciación de variedades (Saidman y Naranjo 1982).

## CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados se concluye que los datos aportados por electroforesis de isoenzimas de peroxidasa permiten fijar patrones de identificación varietal a fin de determinar la estabilidad genética del material utilizado como banco de plantas donantes.

Aunque las técnicas del cultivo de tejidos pueden provocar un 10% de variabilidad en las plantas obtenidas por micropropagación, las isoenzimas de las peroxidasa pueden ser empleadas como marcadores bioquímicos fiables que permitirán seleccionar aquellas que no presenten variabilidad.

## BIBLIOGRAFIA

ARIAS, M. DEL C. y DÍAZ, D., 1994. Técnicas de electroforesis para proteínas de reserva e isoenzimas utilizadas en el Instituto de Genética EWALD A. FAVRET. CICA - INTA Castelar.

BHOJWANI, S.S. and M.K. RAZDAN., 1996. Plant Tissue Culture: theory and practice, a revised edition. ELSEVIER. Amsterdam: 483-485.

BREWBAKER, J.L., MAHESH, D.U. and MACDONALD, T., 1968. Isoenzyme polymorphism in flowering plants III. Gel electrophoretic methods and applications. *Physiol. Plant* 21:930-940.

DAVIS, B.J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 121:404-427.

FELDMANN, P., 1984. Analyse du polymorphisme enzymatique de la canne a sucre (*Saccharum* spp.). Utilisation pour la recherche de variabilité après culture "in vitro". Thèse de 3<sup>e</sup>eme cycle. Développement et amélioration des végétaux. Université de Paris-Sud, Orsay.

FELDMANN, P., 1985. «Identification variétale de la canne à sucre (*Saccharum* sp) par l'electrophorèse d'isozymes». *L'Agron.trop.* 40(2):124-128.

FOGUET, J.L., C.A. OSTE., 1981/1982. El cultivo del palto. Manuales Técnicos N° 4, 6, 7, 8 y 48. Revista Avance Agroindustrial. E.E.A.O.O.C. Tucumán.

GARCÍA, M. L., C. SÁNCHEZ, A. BARCELÓ-MUÑOZ, A. HEREDIA and F. PLIEGO-ALFARO., 1995. Peroxidase activity during adventitious root formation in avocado microcuttings. *Canada Jour. Bot.* 73: 1522-1526.

HART, G.E. and BHATIA, C.R., 1967. Acrylamide gel electrophoresis of soluble leaf proteins and enzymes from Nicotian species. *Can. J. Genet. Cytol.* 9: 367-374.

IGLESIAS, L., LIMA, H. and SIMON, J.P., 1974 Isoenzyme identification of zigotic and nucellar seedlings in Citrus. *J. of Heredity* 65: 81-84.

JIMÉNEZ, E., 1998 Generalidades del cultivo in vitro. En: *Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología*. Ed. J.N. Pérez Ponce. Santa Clara. Cuba. Vol. 1, pp 13-24.

LITZ, R.E. and JAISWAL, V.S., 1991. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. *Micropropagation. Technology and Application*. Kluwer Ac. Publ. 247-263

MARGARA, J., 1988 «Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemas y la organogénesis». Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

ORNSTEIN, L., 1964. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 121:321-349.

PIERIK, R.L., 1987. *In vitro Culture of Higher Plants*. Martinns Nighoff Publishers Acad. Publish. Group. Netherlands:89-94.

PLIEGO-ALFARO, F. y A. BARCELÓ-MUÑOZ., 1999. La micropropagación en la mejora de patrones de aguacate (*Persea americana* Mill.): problemas y limitaciones. *Rev. Chapingo. Serie Horticultura* 5. Núm. Especial:239-244. México.

SAIDMAN, B.O. and NARANJO, C.A., 1982. Variaciones de esterases en poblaciones de *Prosopis ruscifolia* (Leguminosae). *Mendeliana* 5(2):61-70.

SÁNCHEZ, C., M.L. GARCÍA-GÓMEZ, F. PLIEGO-ALFARO and A. HEREDIA. 1993. Peroxidase Activities and Isoenzyme Profiles Associated with Development of Avocado (*Persea americana* M.) Leaves at different Ontogenetic Stages. *J. Plant Growth Regul.* 12:95-100.

SCHUGURENSKY, A. y L. DIAZ, 2001. Identificación de clones micropropagados de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) por electroforesis de isoenzimas. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 18: 169-175. Venezuela.

THOM, M. and A. MARETZKI, 1970 Peroxidase and esterase isozymes in Hawaiian sugarcane. *Hawaii Plant. Rec.* 58(6):81-94.

YASSEEN M., 1993. In vitro propagation of avocado (*Persea americana* Mill.). *Calif.Avoc.Soc.Yrbk* Vol. 77:107-111.