ISOENZIMAS

NIDIA PÉREZ NASSER Y DANIEL PIÑERO

Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, México.

Resumen. Este trabajo presenta un análisis sobre el uso de las isoenzimas como marcadores moleculares para estudios evolutivos, en particular de la genética de poblaciones. Primero se expone la metodología de la técnica de electroforesis en geles de almidón, que representa una herramienta útil para detectar los niveles de variación dentro —y entre— las poblaciones, mediante la interpretación genética de las isoenzimas. Posteriormente se presentan algunas aplicaciones de biología evolutiva. En plantas, estos marcadores han sido utilizados para: 1] analizar los sistemas reproductivos, 2] hacer estudios taxonómicos y filogenéticos 3] estudiar componentes de la selección natural, 4] correlacionar los parámetros genéticos de las poblaciones de las especies con sus características de historia de vida y 5] entender el origen y evolución de las plantas cultivadas y el parentesco con sus ancestros silvestres.

Palabras clave: Isoenzimas, plantas.

Abstract. This work presents a review of the use of enzymes as molecular markers for evolutionary studies, in particular population genetics. First, the methodology of starch electrophoresis is shown as a useful tool to detect variation within and among populations. Second, applications to evolutionary biology are presented. In plants these markers have been used for 1] to study mating systems, 2] do phylogenetics and taxonomy, 3] study natural selection components, 4] to correlate genetics and life history characters and 5] understand the origin and evolution of cultivated plants and their wild relatives

Key words: Isoenzymes, plants.

Las isoenzimas como marcadores moleculares han desempeñado un papel fundamental en diferentes disciplinas botánicas, en particular, han hecho posible un mejor entendimiento de la biología evolutiva de plantas. Las isoenzimas fueron originalmente definidas como formas moleculares múltiples de las enzimas que tienen funciones idénticas o similares y están presentes en el mismo individuo (Market y Moller, 1959). Las isoenzimas pueden presentar varias formas alélicas en ese locus en particular, las cuales se conocen como aloenzimas ((Prakash, *et al.*, 1969). En su mayoría estas aloenzimas son selectivamente neutras y se utilizan como marcadores hereditarios para cuantificar las frecuencias alélicas y genotípicas de los individuos, que son los estimadores básicos de la composición genética de una población.

Los análisis isoenzimáticos tienen ventajas y desventajas. Aquí pretendemos por un lado, exponer brevemente el método de electroforesis para anali-

zar isoenzimas, se discuten las ventajas y desventajas del método. En la segunda parte se presenta un análisis de las investigaciones que se han llevado a cabo utilizando dicho análisis en las diferentes áreas botánicas.

Metodología de isoenzimas

Electroforesis

La electroforesis se originó en los años treinta (Tiselius, 1937, citado en Kephart, 1990) junto con las técnicas de zimogramas (Hunter y Markert, 1957; citado en Kephart, 1990). Se ha usado para estudios de variación genética por genetistas, sistemáticos y biólogos de poblaciones (Gottlieb, 1977; Brown, 1979; Hamrick *et al.*, 1979; Ellstrand, 1984; Crawford, 1985; Soltis y Soltis, 1989; Soltis *et al.*, 1992). Se convierte en uno de los métodos más comunes para fraccionar mezclas moleculares con cromatografía líquida y ul-

tracentrifugación (Gordon *et al.*, 1988). Entre las técnicas de electroforesis de proteínas, el análisis de isoenzimas es usado ampliamente por su eficiencia y costo relativamente bajo, particularmente en estudios de variabilidad intraespecífica. Aunque las tecnologías de ADN están expandiéndose, las proteínas importantes permanecen como productos postranscripcionales y traslacionales del ADN de un organismo y como componentes estructurales y enzimáticos de las células.

Los cuatro principales métodos de electroforesis difieren en la naturaleza de la matriz (gel): gel de almidón (incluyendo ambos sistemas, horizontal y vertical), gel de poliacrilamida, gel de agarosa y gel de acetato de celulosa.

A pesar de las ventajas que ofrecen los diferentes métodos, los geles de almidón siguen siendo los preferidos pues se pueden analizar muchos individuos con muchas enzimas, aunque tengan menor poder de resolución. Son varias las razones de preferencia: simplicidad en la preparación del gel, el almidón no es tóxico (la acrilamida es neurotóxica), es de bajo costo y fácil de cargar las muestras en el gel. Estas muestras son normalmente homogenizados crudos no centrifugados. Quizás la razón más poderosa para el uso del gel de almidón es la cantidad de datos generados por gel. Un gel puede ser rebanado horizontalmente hasta 6 veces, lo que representa visualizar 6 enzimas para un número de individuos que puede ser de entre 20 y 40.

1. *Elección del tejido.* Los tejidos vegetales que son usados con más frecuencia son: hojas, pecíolos, tallos suculentos, porciones terminales de raíces, semillas (endospermo y embrión), plántulas, cotiledones, hipocótilos, hojas jóvenes, entre otros. Todos ellos tienen alta actividad enzimática y son tejidos fácilmente disponibles. El polen también es una fuente rica de enzimas y es de fácil extracción, su interpretación genética se hace comparándolo con tejido somático diploide. De cualquier tejido que se elija, lo importante es que las diferentes muestras estén en las mismas condiciones fisiológicas y ontogénicas, así como saber si existen diferencias en la expresión enzimática en cada tejido empleado.

2. *Homogenado de la muestra para extraer las enzimas.* Cada taxon y cada tejido tienen sus propios problemas para romper las células y extraer las proteínas. Mientras que para tejido animal, las soluciones de extracción son sencillas, para plantas generalmente se requieren soluciones más complejas, debido a la presencia de compuestos secundarios. Especialmente los fenoles interfieren con la actividad enzimática, también los taninos endógenos, alcaloides, terpenos y otros cons-

tituyentes celulares (Loomis, 1974). Algunas consideraciones importantes son: a] Elección de la solución amortiguadora de extracción adecuada. De máxima importancia, pues hay evidencia de que la solución de extracción puede afectar el número de loci detectables y la variación en esos loci, es decir el número de bandas visualizadas por loci. b] Cantidad de tejido. c] Almacenamiento del homogenado (congelación y ultracongelación), o el uso inmediato de éste. d] Frecuencia de congelación y descongelación (cuando no se emplean extractos frescos). e] Tipo de tejido disponible.

En varias publicaciones hay diferentes recetas de las soluciones de extracción. Las más utilizadas son las de Mitton *et al.* (1979), Soltis *et al.* (1983, Cheliak y Pitel (1984), Wendel y Weeden (1989) entre otros.

3. *Preparación del gel.* Los geles de almidón proporcionan una matriz no tóxica, cuyos poros son similares en tamaño a las proteínas, creando un tamiz molecular que incrementa la resolución de separación de proteínas. Además los geles pueden ser rebanados horizontalmente, proporcionando "réplicas" de geles que son teñidos para diferentes enzimas.

La resolución de las proteínas depende en parte del tipo y la concentración de almidón. El almidón hidrolizado de papa es el más usado; éste varía de lote a lote, por lo cual es importante tener suficiente almidón del mismo lote para el estudio completo. Los geles son generalmente preparados a concentraciones de entre 10% y 12% (peso-volumen), aunque algunos usan 9 y hasta 14%.

4. *Sistemas de soluciones.* Estos sistemas consisten en la solución usada para preparar el gel y la solución del electrodo, el cual es una solución ionizada que conduce corriente a través del gel durante la corrida. Existen varios sistemas de soluciones amortiguadoras para el gel y el electrodo, los cuales son usados tanto en plantas como en animales. Ninguno de estos sistemas es ideal para todos los taxa y para todas las enzimas, es necesario ensayar varios para encontrar los adecuados.

Dos principales tipos de sistemas son utilizados: continuos y discontinuos. Los sistemas continuos más comúnmente usados son los que están hechos a base de histidina-citratos (pH 5.7 a pH 7.0), o de morfolina-citratos (pH 6.1); entre los discontinuos están el de tris-citratos (desde pH 7 a 9), el de litio-borato (pH 7 a 8) y otros.

5. *Condiciones de corrida.* Los rangos de corriente aplicados al gel varían dependiendo del grosor del gel y de los sistemas de soluciones utilizados (por lo gene-

ral entre 80 y 400 voltios, 7-17 watts y de 5 a 75 mAmpierios). El tiempo de la corrida también depende del sistema utilizado.

6. *Tinción histoquímica*. Después de que termina la electroforesis, los geles son teñidos inmediatamente para visualizar la presencia de enzimas específicas, cuyos patrones de migración en el gel son usados como marcadores genéticos y como fuente de información acerca de la variabilidad genética de los taxa.

La tinción se hace con los protocolos específicos de cada enzima. Las soluciones de tinción contienen substratos específicos y las enzimas de las muestras actúan junto con esos sustratos y producen una reacción que se acopla a la de un colorante (Gottlieb, 1977; Vallejos, 1983 y varios más).

Existe una extensa lista de protocolos de enzimas utilizados en plantas (Brewer y Sing, 1979; Shaw y Prasad, 1970; Harris y Hopkinson, 1976, Conkle *et al.*, 1982, Soltis *et al.*, 1983, Vallejos, 1983; Cheliak y Pitel, 1984, Wendel y Weeden, 1989) no todos funcionan para todos los grupos de plantas. Es necesario probar varias recetas y quizá modificarlas.

7. *Interpretación del gel*. La aplicación correcta de las isoenzimas requiere que los patrones de bandeo observados sean interpretados correctamente. Varios factores son considerados los más importantes y determinantes en el número de bandas observadas en el gel: a) el número de genes que las codifican; b) la expresión de alelos (homócigos o heterócigos); c) el número de subunidades polipeptídicas de la enzima y d) la localización subcelular.

Para un locus dado, el número de bandas varía entre individuos homócigos y heterócigos, y también varía dependiendo de la estructura cuaternaria de la enzima, es decir, si es monomérica los individuos homócigos presentan una sola banda (esto es porque consiste de una sola subunidad polipeptídica) y los heterócigos presentan dos bandas (dos polipéptidos diferentes); si es una enzima dimérica, los heterócigos presentan tres bandas (dos homodímeros de los padres y un producto adicional de movilidad intermedia o heterodímero compuesto por ambos polipéptidos). Por otro lado, en las enzimas tetraméricas se observan 5 bandas en los individuos heterócigos. En los individuos heterócigos, las bandas heteroméricas, es decir las formadas por más de un tipo de subunidad, sólo se formarán si los alelos involucrados se expresan en el mismo compartimento celular (p. ej., las enzimas cloroplásticas no formarán heterómeros con las enzimas del citosol).

En ciertos casos se puede expresar más de un locus en un mismo tejido, esto es debido a la existen-

cia de isoenzimas en compartimentos celulares distintos (p. ej., cloroplastos, mitocondrias y citosol) o a la existencia de loci duplicados.

Hay evidencias de que las isoenzimas tienen diferente grado de variabilidad dependiendo de la localización subcelular (esto puede deberse a la función biológica específica que realice la isoenzima). Por ejemplo, las *pgi* de los plástidos de varias especies de plantas son más variables que las del citoplasma, tanto en la cantidad de alelos como en las movilidades electroforéticas de éstos (Gottlieb, 1982).

Los estudios de aloenzimas se hacen frecuentemente sin confirmar la herencia mendeliana de los fenotipos de las isoenzimas. Sin embargo, es generalmente deseable que tal confirmación se realice, y es esencial, si es posible, la interpretación alternativa de los patrones de bandeo.

Para comprobar si los alelos segregan mendelianamente es necesario observar los patrones de bandeo de la progenie de madres con genotipo conocido, o bien de la progenie de cruza controladas. Con estos datos se pueden probar las hipótesis de segregación alélica y de distribución independiente de los loci.

La segregación no mendeliana de un locus puede deberse a la existencia de deriva meiótica (Lewontin y Dunn, 1969), selección gamética, selección cigótica (Mulcahy y Kaplan, 1979), o selección en los estadios previos a la fase del ciclo de vida estudiado (p. ej. en el paso de semilla a plántula). La distribución no mendeliana de los loci ocurre cuando éstos se encuentran en el mismo cromosoma y suficientemente cercanos entre sí como para tener tasas de recombinación menores a 0.5 (Hartl y Clark, 1989). La herencia de los marcadores enzimáticos debe tomarse en cuenta al estimar los parámetros de la estructura genética de las poblaciones, o para hacer otro tipo de análisis (p. ej. análisis de paternidad).

Aplicaciones a estudios de biología evolutiva

Las isoenzimas han sido aplicadas exitosamente en los análisis genéticos para evaluar y entender cuestiones de biología evolutiva como sistemas de reproducción y patrones de entrecruzamiento, relaciones entre fenotipo y ambiente, filogenias, variabilidad y endemismos, diversidad en plantas clonales y apomíticas, interacciones planta-insecto, relaciones entre morfología o citología y polimorfismo en una amplia variedad de taxa silvestres y cultivados. Todos estos estudios se han hecho con base en los siguientes parámetros:

Medidas de diversidad genética. Las isoenzimas frecuentemente se han usado para medir la variación existente dentro de las poblaciones así como su

distribución. Las medidas generalmente usadas para tal propósito son: el índice de loci polimórficos (P) que es una medida de la proporción de loci que muestran más de un alelo en una población y el índice de diversidad genética (H) definido como el porcentaje de loci heterocigos esperado en un individuo tomado al azar de la población (Nevo, 1978; Brown y Moran, 1981; Hamrick, 1982; Hedrick, 1983; Nei, 1987).

Distribución de la variación dentro y entre poblaciones. Quizá uno de los aspectos más interesantes para los biólogos evolutivos es la distribución aloenzimática dentro y entre poblaciones. Hay dos medidas comúnmente usadas de diferenciación de la población aplicada a datos aloenzimáticos. El estadístico F_{ST} de Wright (1951) que mide la varianza en las frecuencias alélicas entre poblaciones relativo a la estandarización de varianzas basado en la media de las frecuencias alélicas ($F_{ST} = \sigma^2/pq$). Esto es calculado para cada alelo en cada locus. El estadístico de la diversidad genética de Nei (1973) también es usado para partir la variación dentro y entre poblaciones. El estadístico G_{ST} es la diversidad genética debido a la variación entre poblaciones (D_{ST}) dividida por el total de la diversidad (H_T); $G_{ST} = D_{ST}/H_T$.

Factores evolutivos que actúan sobre las poblaciones naturales. La distribución de la variación aloenzimática dentro y entre poblaciones es el producto de interacciones entre varios factores evolutivos. Estos son la selección natural, la mutación, los sistemas reproductivos, el flujo génico y la deriva génica.

1. *Sistemas reproductivos en plantas.* Los sistemas reproductivos tienen un papel crucial en la composición de las poblaciones. Los sistemas reproductivos no sólo determinan las frecuencias genotípicas en las siguientes generaciones, también afectan parámetros de la población tales como tamaño de vecindad, flujo de genes y selección. Loveless y Hamrick (1984) encontraron que los sistemas reproductivos tienen un papel central en determinar la distribución de la variación dentro y entre poblaciones.

La endogamia es un tipo de sistema reproductivo que produce índices de fijación positivos y en donde la frecuencia de apareamiento entre organismos de genotipo semejante es mayor a lo que se esperaría si el apareamiento fuera al azar. Hay diferentes niveles de endogamia que van desde la autofecundación estricta hasta sistemas de apareamiento mixto, en donde una fracción de la progenie es producida por autofecundación y la otra por entrecruzamiento al azar (Hedrick, 1983; Hartl y Clark, 1989).

La depresión endogámica es la disminución en la adecuación de la progenie producida por autofecundación o por apareamiento entre parientes, en relación con la producida por apareamiento al azar (Charlesworth y Charlesworth, 1987). La magnitud de la depresión endogámica puede ser estimada comparando la adecuación (en términos del porcentaje de absorción y de germinación, para el caso de plantas) de la progenie producida por autofecundación en relación a la de la progenie producida por entrecruzamiento al azar (Lande y Schemske, 1985).

Las aloenzimas son especialmente valiosas para estudiar los sistemas reproductivos de plantas y tienen tres distintas ventajas sobre los marcadores morfológicos y son: a) las aloenzimas son expresadas codominantemente y es poco probable que afecten el comportamiento del polinizador; b) muchos de los loci isoenzimáticos son polimórficos, casi cualquier especie presenta al menos uno o dos y c) las aloenzimas probablemente no están sujetas a fuertes fuerzas selectivas (Brown *et al.*, 1989).

2. *Flujo génico.* El flujo génico (Nm) es otro factor que puede afectar la composición genética de las poblaciones, determina el grado en que una especie de una población local es una unidad evolutiva independiente. Si hay mucho flujo génico las poblaciones evolucionan conjuntamente y si hay poco, cada población evoluciona de manera independiente. Si los valores de flujo génico son mucho mayores a uno, entonces se superan los efectos de la deriva y se evita diferenciación local, y si es menor a uno, la deriva génica actúa de manera independiente en cada población (Slatkin, 1994).

Cuantificar el efecto de esta fuerza en las poblaciones naturales ha sido un problema difícil de resolver (Hamrick, 1987). Varios métodos se han desarrollado para estimar la magnitud del flujo génico como la utilización de marcadores morfológicos, polen marcado, polvos fluorescentes, etc. Sin embargo, la disponibilidad de aloenzimas mejoró mucho los estimados de flujo de genes.

Las aloenzimas han sido usadas para a) Siguiendo la dispersión de un solo alelo marcado, lo cual puede ser un problema pues no es fácil encontrar individuos con alelos unidos. b) Estimación del flujo de genes a partir de la distribución de la variación aloenzimática entre poblaciones, utilizando dos métodos que dependen de la distribución de la frecuencia alélica entre poblaciones.

El primer método está basado en la relación $F_{ST} = 1/[4Nm + 1]$ (Wright, 1951). Esta relación supone neutralidad de alelos para cada locus. El segundo método usa la distribución de frecuencias de alelos

raros o exclusivos para estimar el número promedio de inmigrantes intercambiados entre poblaciones locales (Slatkin, 1981, 1985; Barton y Slatkin, 1986). Estos dos métodos tienen gran atractivo ya que pueden aplicarse directamente a los datos aloenzimáticos. Se puede decir que los dos métodos para calcular N_m son redundantes puesto que usan los mismos datos. Sin embargo, los estimados de Slatkin están basados en las bajas frecuencias alélicas, mientras que los cálculos basados en F_{ST} dependen en gran medida de la distribución de alelos comunes.

El tercer procedimiento para estimar el flujo de genes es el análisis de paternidad, el cual proporciona una descripción detallada de la estructura reproductiva de los individuos en la población. El análisis de paternidad usa loci genéticos polimórficos para identificar al padre (o padres en el caso de semillas o plántulas) más probable de un conjunto de datos (Meagher y Thompson, 1986). La resolución del procedimiento es dependiente del número de padres potenciales. Este procedimiento tiene varias ventajas sobre otros, aunque se requiere de varios loci polimórficos y de tamaños grandes de muestras.

En los trabajos que se han reportado valores de flujo génico utilizan la fórmula de Crow y Aoki (1984) que es una modificación de la de Wright (1951) mencionada arriba, y es $N_m = [1/F_{ST}] - 1/4a$, donde $a = [n/(n-1)]^2$ y $n = \#$ de sitios o subpoblaciones. Dicha fórmula establece dos propiedades muy importantes de la F_{ST} : que es casi independiente de la tasa de mutación y del número de subpoblaciones usadas. Slatkin y Barton (1989) demuestran que también es poco afectada por distintos tipos de selección, y consideran a éste como uno de los mejores métodos para estimar el flujo génico, superior a otros como el uso de métodos de alelos exclusivos de Slatkin (1985) porque la F_{ST} usa todos los datos electroforéticos y por lo tanto es menos sensible a errores de lectura, mientras que el método de los alelos privativos es muy sensible a errores de lectura al confundir alelos raros con otros más comunes.

3. *Deriva génica y selección natural.* El descubrimiento de los altos niveles de variación aloenzimática lleva a la controversia de si la variación es mantenida por selección o por combinación de mutación y deriva (Allard y Kahler, 1972; Kimura y Ohta, 1972, citados en Hamrick, 1989). Tanto la deriva génica como la selección natural modifican las frecuencias alélicas y genotípicas. Sin embargo, la deriva génica actúa simultáneamente sobre todos los loci del genoma, mientras que la selección natural sólo lo hace sobre algunos loci específicos. Esta diferencia llega a ser muy notoria cuando se consideran varias poblaciones para varios loci con alelos múltiples y puede utilizarse como

argumento para discriminar entre ambas fuerzas. La deriva ha sido más fácil demostrarla cuando está actuando sobre las poblaciones, al respecto, existen varios trabajos hechos en México, en donde se demuestra el efecto de esta fuerza (por ejemplo Escalante *et al.*, 1994).

Las isoenzimas son marcadores genéticos que facilitan los estudios de selección. Las isoenzimas han proporcionado una gran utilidad en describir patrones de adaptación a microhábitats en varias especies que se autofecundan. Aunque no hay evidencias directas de que la selección actúe sobre las isoenzimas, estos marcadores han sido muy útiles para monitorear cambios en la composición genética de la población. Las isoenzimas también han sido muy útiles para estudiar los efectos de la heterocigosis en la adecuación, existen varias revisiones al respecto.

Como ya se mencionó, uno de los principales problemas del uso de isoenzimas para documentar directamente la selección, es que está pobremente entendido cómo diferentes formas para un locus afecta la adecuación individual. Además, la dificultad en poblaciones naturales para asegurar que las isoenzimas no están ligadas a ningún otro gen en el cual la selección está actuando (Lewontin, 1974; Hedrick, 1980, 1982). Mientras que es más fácil el desarrollo de escenarios adaptativos para características morfológicas y fisiológicas, es frecuentemente difícil demostrar el componente genético para la variación de esas características.

Conclusiones

Una gran variedad de técnicas están disponibles para separar proteínas, cada una tiene sus ventajas particulares. Sin embargo, la electroforesis horizontal en geles de almidón ofrece un método relativamente barato, de fácil manipulación, buena resolución, no es tóxico y se puede analizar de forma rápida la variación para uno o varios loci en poblaciones naturales y artificiales, y cualquier forma de vida, desde bacterias hasta el hombre. Permite a los investigadores obtener muchos datos de aloenzimas por unidad de esfuerzo y por unidad de tiempo. Por estas razones, las electroforesis de geles de almidón se ha mantenido como el mejor método para realizar estudios poblacionales de variabilidad de aloenzimas.

La aplicación correcta de las isoenzimas requiere que los patrones de bandeo observados en los geles sean interpretados correctamente. La principal suposición desde el punto de vista evolutivo, en el uso de las isoenzimas es que los cambios en la movilidad de enzimas en un campo eléctrico reflejan cambios en la codificación de la secuencia del ADN. Esto es, si los

patrones de bandeo de dos individuos difieren, se supone que esas diferencias tienen bases genéticas y son heredables (Matson, 1984). También se supone que la expresión enzimática es codominante, es decir, que se expresan todos los alelos para un locus.

La electroforesis no es un detector perfecto de la variación genética, tampoco de todos los cambios de aminoácidos que resultan de la movilidad electroforética. Las bandas de una enzima, o electromorfos, con una movilidad dada representan los productos de más de un gen. Cálculos basados en los cambios por unidad de carga sugieren que cerca de una tercera parte de las sustituciones de aminoácidos pueden ser electroforéticamente detectables (Ferguson, 1980).

Una cuestión importante de los usuarios de los geles de almidón, concierne a la naturaleza y el grado de variabilidad críptica que puede ser revelada usando técnicas electroforéticas adicionales. Aunque hay una gran variedad de locus a locus, las evidencias disponibles indican que un locus polimórfico es más polimórfico bajo condiciones electroforéticas adicionales, mientras que los loci monomórficos se mantienen invariables. La heterogeneidad oculta es poco probable que sea un problema para la mayoría de los estudios, sin embargo, al parecer su magnitud tiene poco impacto en inferencias filogenéticas o sistemáticas y su presencia puede ser irrelevante en otras aplicaciones (e.g. cuando los polimorfismos aloenzimáticos seleccionados son usados como loci marcadores para medir sistemas de cruzamiento o el rastreo de factores ligados en programas de reproducción).

El análisis de isoenzimas ha tenido un gran impacto en los estudios de biología vegetal, es quizás el método más utilizado para entender y resolver cuestiones de evolución, por ejemplo, en estudios de los estados reproductivos del ciclo de vida de las plantas; para determinar la importancia de factores históricos; para correlacionar características fisiológicas y demográficas con variación aloenzimática en poblaciones vegetales; identificar procesos de especiación e hibridación, origen y evolución de plantas cultivadas y el parentesco con sus ancestros silvestres; como marcadores para estudiar y manipular características cuantitativas, entre otras. Posiblemente, la principal aplicación es la determinación de los niveles de variación genética dentro y entre poblaciones.

La ventaja más importante de las isoenzimas sobre otros tipos de características es la relativa abundancia de loci polimórficos que pueden ser usados como marcadores genéticos.

Es tal la popularidad del uso de la tecnología del ADN que podría pensarse que va a desplazar a los isoenzimas como marcadores moleculares, sin embargo,

esto no es así. Los dos métodos son complementarios en muchos casos. Actualmente, los análisis de ADN no han sido exitosamente usados en estudios de la estructura genética de las poblaciones. El primer impulso se dio por la facilidad de extraer ADN del cloroplasto. Desafortunadamente, se ha probado, en general que el ADN_c está altamente conservado con poca variación a nivel de especies o poblaciones. Sin embargo, el ADN_c es excepcionalmente útil en estudios de sistemática de órdenes superiores. Recientemente, regiones altamente variables de ADN nuclear han sido usadas para huellas (*finger print*) de variedades de especies cultivadas (ver Hamrick, 1989). Se espera que esta tecnología logre analizar varios cientos de individuos en un periodo de tiempo y costo razonable para estudios de estructura genética. La posibilidad de usar regiones altamente variables en análisis de paternidad o reconstrucción genealógica es realmente interesante. Pero para muchos otros tipos de estudios, las isoenzimas siguen siendo la mejor opción. Futuras investigaciones de la estructura genética de las poblaciones, muy probablemente consistirán en combinar e integrar los análisis de isoenzimas y de ADN para examinar la dinámica del proceso que moldea la estructura genética de las poblaciones.

Literatura citada

- Álvarez-Buylla R.E. y Garay A.A. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia* a tropical pioneer tree species. *Evolution* 48:437-453.
- Barton N.H. y Slatkin M. 1986. A quasi-equilibrium theory of distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity* 56:409-415.
- Brewer G.J. y Sing F. 1970. *An introduction to isozyme techniques*. Academic Press, New York.
- Brown A.H.D. 1979. Enzyme polymorphisms in plant populations. *Theoretical Population Biology* 15:1-42.
- Brown A.H.D., Burdon J.J., Jarosz A.M. 1989. Isozyme analysis of plant mating systems. En: Soltis D.E., Soltis P.S. (Edrs.) *Isozymes in plant biology*. Advances in Plant Sciences Series vol. 4. Dioscorides Press, Portland, Oregon, 73-86.
- Charlesworth D. y Charlesworth B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:237-268.
- Cheliak W.M. y Pitel J.A. 1984. Genetic control of allozyme variants in mature tissues of white spruce trees. *Journal of Heredity* 75:34-40.
- Conkle M.T., Hodgskiss P.D., Nunnally L.B., Hunter S.C. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. USDA Forest Service Technology Report psw-64.
- Crawford D. 1985. Electrophoretic data and plant speciation. *Systematic Botany* 10:405-416.

- Crow J.F., Aoki K. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **81**:6073-6077.
- Eguiarte L.E., Pérez Nasser N. y Piñero D. 1992. Genetic structure, outcrossing rates and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity* **69**:217-228.
- Ellstrand N.C. 1984. Multiple paternity within the fruits of the wild radish, *Raphanus sativus*. *American Naturalist* **123**:819-828.
- Escalante A.M., Coello G., Eguiarte L. y Piñero D. 1994. Genetic structure and mating system in wild and cultivated population of *Phaseolus coccineus* and *P. vulgaris* (Fabaceae). *American Journal of Botany* **81**:1096-1103.
- Ferguson A. 1980. Isozyme studies and their interpretation. En: Hawksworth D.L., (Ed.) *Prospects in systematics*. The Systematics Association. Special volume Núm. 36
- Gordon M. Huang X., Pentoney S. y Zare R. 1988. Capillary electrophoresis. *Science* **242**:224-228.
- Gottlieb L. 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **64**:161-180.
- Gottlieb L. 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* **216**:373-380.
- Hamrick J.L. 1982. Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany* **69**:1685-1693.
- Hamrick J.L. 1987. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations. En: Urbanska K. (Ed.) *Differentiation patterns in higher plants*. Academic Press, New York, 53-67.
- Hamrick J.L. 1989. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. En: Soltis D.E., Soltis P.S. (Edrs.) *Isozymes in plant biology*. Advances in Plant Sciences Series vol. 4. Dioscorides Press, Portland, Oregon, 87-105.
- Hamrick J.L. Linhart Y.B., Mitton J.B. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically-detectable genetic variation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **10**:173-200.
- Harris H. y Hopkinson D.A. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland, Amsterdam.
- Hartl D.L. Clark A.G. 1989. *Principles of populations genetics*. Second edition. Sinauer Sunderland, Massachusetts.
- Hedrick P.W. 1980. Hitchhiking: a comparison of linkage and partial selfing. *Genetics* **94**:791-808.
- Hedrick P.W. 1982. Genetic hithhiking: a new factor in evolution? *BioScience* **32**:845-853.
- Hedrick P.W. 1983. *Genetics of population*. Science Books Int., Boston.
- Kephart S.R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *American Journal of Botany* **77**:693-712.
- Lande R., Schemske D.W. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding. *Evolution* **39**:24-40.
- Lewontin R.C. 1974. *The genetics basis of evolutionary change*. Columbia University Press, New York.
- Lewontin R.C., Dunn L. 1969. The evolutionary dynamics of a polymorphism in the house mouse. *Genetics* **45**:705-722.
- Loomis W.D. 1974. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods in Enzymology* **31**:528-544
- Loveless M.D., Hamrick J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations *Annual Review of Ecology and Systematics* **15**:65-95
- Markert C.L., Moller F. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species-specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **45**:753-763.
- Matson R.H. 1984. Applications of electrophoretic data in avian systematics. *Auk* **101**:717-729.
- Meagher T.R., Thompson E. 1986. The relationships between single parent and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. *Theoretical Population Biology* **29**:87-106.
- Mitton J.B. 1989. Physiological and demografhic variation associated with allozyme variation. En Soltis D.E., Soltis P.S. (Edrs.) *Isozymes in plant biology*. Advances in Plant Sciences Series Vol. 4. Dioscorides Press, Portland, Oregon, 127-145.
- Mitton J.B., Grant M.C. 1984. Associations among protein heterozygosity, growth rate and developmental homeostasis. *Annual Review of Ecology and Systematics* **15**:479-500.
- Mitton J.B., Linhart Y., Sturgeon K. 1979. Allozyme polymorphisms, detected in mature needle tissue of ponderosa pine. *Journal of Heredity* **70**:86-89.
- Mulcahy D.L., Kaplan S.M. 1979. Mendelian ratios despite non-random fertilization *Americana Naturalist* **113**:419-425.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **70**:3321-3323.
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, USA.
- Nevo E. 1978. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theoretical Population Biology* **13**:121-177.
- Pérez-Nasser N., Eguiarte L.E. y Piñero D. 1993. Mating system and genetic structure of the distylous tropical tree *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* **80**(1):45-52.
- Prakash S. Lewontin R.C. Hubby J.L. 1969. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV Patterns of genic variation in central marginal and isolated population of *Drosophila pseudobscura*. *Genetics* **61**:841-858.
- Shaw C.R., Prasad R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipies. *Biochemical Genetics* **4**:297-320.
- Slatkin M. 1981. Estimating levels of gene flow in natural populations. *Genetics* **99**:323-335.

- Slatkin M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39:53-65.
- Slatkin M. 1994. *Gene flow and population structure*. En: Real L.A. (Edr.) *Ecological Genetics*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Slatkin M. Barton N.H. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43:1349-1368.
- Soltis D.E., Haufler C.H. Darrow D.C. y Gastony G.J. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers and staining schedules. *American Fern Journal* 73:9-27.
- Soltis D.E. y Soltis P.S. (Edrs.) 1989. *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press, Portland, Or.
- Soltis, P.S., Soltis D.E. y J.J. Doyle (Edrs.) 1992. *Molecular Systematics of Plants*. Chapman and Hall. New York.
- Stuber C. Wendel J., Goodman M., Smith J. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.) Technical Bulletin 286, North Caroline State University, Raleigh.
- Tanksley S.D. Orton T. 1983. *Isozymes in plant genetics and breeding*. Part A, B. Elsevier Amsterdam.
- Vallejos E. 1983. Enzyme activity staining. En: Tanksley S.D., Orton T. (Edrs.) *Isozymes in plant genetics and breeding*. Part A. Elsevier Amsterdam, 469-516.
- Wendel J. Weeden N. 1989. Visualization and interpretation of plant isozyme. En: Soltis D., Soltis P. (Edrs.) *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press, Portland 5-45.
- Wright S. 1951. The genetical structure of population *Annals Eugenics* 15:323-354.