

El análisis de conglomerado para complementar el estudio de patrones electroforéticos en *Psidium* spp.¹

Cluster analysis for supplementing *Psidium* spp. electrophoretical pattern study

N. Albany², J. Vilchez², A. Nava³, M. González² y
C. Castro de Rincón⁴

Resumen

Existe poca investigación en la cual el análisis estadístico es usado para explicar patrones electroforéticos en estudios de caracterización de especies. Esta investigación fue realizada con el propósito de determinar la aplicabilidad del análisis de conglomerado para complementar el estudio de patrones electroforéticos y diferenciar *Psidium guajava* L. de *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Niedz, basado en los patrones isoenzimáticos de α -esterasa, β -esterasa, fosfatasa ácida y peroxidasa. En conclusión el análisis de conglomerado complementó el estudio de zimograma y permitió diferenciar ambas especies para los sistemas isoenzimáticos α -esterasa, β -esterasa y fosfatasa ácida.

Palabras claves: conglomerados, electroforesis, guayaba

Abstract

There is little research in which statistic analysis is used in order to explain electrophoretical patterns in species characterization studies. This research was carried out with the purpose of determining the applicability of cluster analysis as a complement to electrophoretical pattern studies for distinguishing *Psidium guajava* L. from *Psidium guajava* L. *friedrichsthalianum* (Berg) Niedz, based on α -esterase, β -esterase, acid phosphatase and peroxidase isoenzymatic patterns. In conclusion the cluster analysis complemented the zymogram study and permitted the distinction of both species through α -esterase, β -esterase and acid phosphatase isoenzymatic system.

Key words: cluster, electrophoresis, guava.

Recibido el 18-10-1996 ● Aceptado el 16-06-1997

1. Proyecto cofinanciado por CONICIT N° SI-2609 y CONDES N° 1037-94.

2. Facultad de Agronomía, La Universidad del Zulia.

3. Departamento de Agronomía. Facultad de Agronomía. La Universidad del Zulia. Apartado 15205. Maracaibo, ZU4005, Venezuela. E-mail: anava@europa.ica.luz.ve

4. Departamento de Estadística. Facultad de Agronomía. La Universidad del Zulia

Introducción

El análisis isoenzimático ha sido comúnmente usado en agronomía, sistemática y estudios evolutivos (18) y permite estudiar en forma indirecta el genoma de una determinada especie (7), ya que de éste se genera un patrón de bandeo que corresponde al fenotipo electroforético de la enzima estudiada (4), basado en la variabilidad existente en relación al peso molecular, carga eléctrica y mantenimiento de su actividad catalítica, permitiendo la confección de patrones isoenzimáticos (1).

El parentesco genético puede ser estimado por pedigrí, heterosis, morfología, proteínas e isoenzimas (8) por tanto, es factible caracterizar especies a través del análisis isoenzimático. Sin embargo son muy pocas las investigaciones que utilizan un análisis estadístico para establecer parentescos genéticos derivados de análisis isoenzimáticos. No obstante el análisis de conglomerado aglomerativo está siendo usado cada vez más en la investigación sobre mejoramiento genético para determinar el parentesco entre líneas consanguíneas, híbridos o variedades (9). Hamman (6), establece que las técnicas de análisis multivariado facilitan la interpretación y visualización de la medición fenotípica.

El conglomerado simplemente definido consiste en agrupar unidades taxonómicas operacionales semejantes, que pueden estar distribuidas dentro del espacio fenético en forma regular o al azar (16). El resultado del análisis de conglomerado es una matriz de disimilitud construida en base a un coeficiente de distancia el cual puede

ser expresado en forma porcentual (9), cuya representación espacial es lo que se conoce como fenograma o dendograma y puede ser interpretado en forma intuitiva.

Entre los coeficientes más usados para un análisis de conglomerado se encuentran el coeficiente de similitud de Dice y el de Jaccard. Este último es equivalente al coeficiente de Gower (9) y se caracteriza por no considerar los apareamientos negativos, siendo el más simple entre los de su clase (16). Los coeficientes de similitud y distancia son estimadores cuantitativos que describen el grado de asociación o semejanza entre los elementos comparados, expresado en valor numérico, entre 0 y 1, o en porcentaje (0 y 100 %, respectivamente).

El análisis de sistemas isoenzimáticos basado sólo en el estudio del zimograma resulta poco eficiente, ya que éste se fundamenta en el análisis visual del patrón de bandeo de la enzima estudiada, el cual se complica al aumentar el número de bandas y/o muestras; debido a las limitaciones visuales. Sin embargo, complementar el estudio del zimograma con el dendograma (conglomerado) permite realizar un análisis más completo y eficiente de los sistemas isoenzimáticos.

El objetivo de este trabajo fue demostrar la aplicabilidad del análisis por conglomerado, para diferenciar las especies de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Niedz, basado en los patrones isoenzimáticos de α -esterasa, β -esterasa, fosfatasa ácida y peroxidasa.

Materiales y métodos

Electroforésis. Las muestras de las especies *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Niedz, fueron tomadas del Centro Frutícola del estado Zulia, seleccionando hojas completamente expandidas del 3^{er}, 4^{to} y 5^{to} nudo, las cuales se maceraron con las soluciones extractoras: Tris-glicina pH 8,0, Tris-HCl pH 7,5 y González de León, conformándose de esta manera un total de 18 tratamientos (cuadro 1). Los protocolos para electroforésis y tinción de las isoenzimas α -esterasa, β -esterasa, fosfatasa ácida y peroxidasa han sido descritos y se realizaron por triplicado para cada tratamiento (2, 10, 14).

Análisis estadístico. Los patrones isoenzimáticos de α -esterasa, β -esterasa, fosfatasa ácida y peroxidasa

fueron representados en papel (zirmogramas) utilizando la distancia promedio (cm) de tres observaciones de la(s) banda(s) de cada unidad taxonómica operacional (UTO'S) o tratamiento, medida desde el borde inferior del carril hasta el centro de la(s) misma(s) y ponderadas a una distancia de gel predeterminada (7 cm), descartando observaciones fuera de tipo.

El análisis de conglomerado se realizó de la siguiente manera:

1. Se construyó un gráfico para cada isoenzima con la(s) distancia(s) promedio recorrida por la(s) banda(s) vs. tratamiento, excluyendo aquellos tratamientos que no mostraron bandas en el revelado de los geles.

2. Se trazó una línea recta y paralela al eje de las abscisas (trata-

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos.

Tratamientos	Especies	Posición de hoja	Soluciones extractoras
T ₁	<i>P. guajava</i>	N ₃	González de León
T ₂	<i>P. guajava</i>	N ₃	Tris-Glicina
T ₃	<i>P. guajava</i>	N ₃	Tris-HCl
T ₄	<i>P. guajava</i>	N ₄	González de León
T ₅	<i>P. guajava</i>	N ₄	Tris-Glicina
T ₆	<i>P. guajava</i>	N ₄	Tris-HCl
T ₇	<i>P. guajava</i>	N ₅	González de León
T ₈	<i>P. guajava</i>	N ₅	Tris-Glicina
T ₉	<i>P. guajava</i>	N ₅	Tris-HCl
T ₁₀	<i>P. friedrichsthalianum</i>	N ₃	González de León
T ₁₁	<i>P. friedrichsthalianum</i>	N ₃	Tris-Glicina
T ₁₂	<i>P. friedrichsthalianum</i>	N ₃	Tris-HCl
T ₁₃	<i>P. friedrichsthalianum</i>	N ₄	González de León
T ₁₄	<i>P. friedrichsthalianum</i>	N ₄	Tris-Glicina
T ₁₅	<i>P. friedrichsthalianum</i>	N ₄	Tris-HCl
T ₁₆	<i>P. friedrichsthalianum</i>	N ₅	González de León
T ₁₇	<i>P. friedrichsthalianum</i>	N ₅	Tris-Glicina
T ₁₈	<i>P. friedrichsthalianum</i>	N ₅	Tris-HCl

T = tratamiento. P= *Psidium*. N= nudo de la rama.

mientos), uniendo las bandas de los distintos tratamientos con distancia semejante.

3. Se enumeró cada línea trazada en el punto 2, en forma ascendente, comenzando por la más cercana al eje de las abscisas hasta la última línea formada.

4. Se construyó una matriz, ubicando en la primera columna en orden creciente el número de líneas paralelas generadas en el gráfico (punto 3) y en la primera fila o "renglón", los tratamientos. Esta matriz se alimentó con código binario para indicar presencia (1) y ausencia (0) de banda(s) para cada tratamiento; sobre cada línea paralela del gráfico.

5. Partiendo de la matriz binaria se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard (Sj) entre pares de tratamientos a comparar, a través de la siguiente fórmula:

$$S_j = \frac{N^{\circ} B. C}{N^{\circ} B. C + N^{\circ} B. N. C}$$

Donde:

Sj: Coeficiente de similitud de Jaccard entre dos tratamientos a comparar.

N° B.C: Número de bandas comunes entre los tratamientos a comparar.

N° B.N.C: Número de bandas no comunes entre los tratamientos a comparar.

6. Se calculó el coeficiente de disimilitud o distancia (D) utilizando la siguiente fórmula:

$$D = 1 - S_j$$

Donde:

D: Coeficiente de disimilitud.

Sj: Coeficiente de similitud de Jaccard entre pares de tratamientos a comparar.

7. Se construyó una nueva matriz denominada primera matriz de distancia (PMD), en la cual se ubicaron en la primera columna y primera fila todos los tratamientos que se compararon. Se alimentó PMD con los coeficientes de distancia entre pares de tratamientos comparados.

8. Se buscó el menor coeficiente de distancia y se construyó una segunda matriz de distancia (SMD), uniendo los tratamientos involucrados con el menor coeficiente de distancia. La SMD se alimenta de los coeficientes de distancia calculados en PMD y recalculando (promedio) solo aquellos relacionados con los tratamientos unidos por el menor coeficiente de distancia.

9. Se repitió el punto 8 hasta que los coeficientes de distancia que relacionaban los tratamientos o grupos de tratamientos fuesen 1, o bien, todos los tratamientos comparados formaran un solo grupo a una distancia determinada.

10. Con los coeficientes de distancia que unieron los tratamientos comparados en cada matriz, se elaboró el fenograma, colocando en el eje de las ordenadas el valor del coeficiente de distancia y en el eje de las abscisas los tratamientos comparados.

Este procedimiento puede realizarse a través del Proc Cluster del SAS (15) o del programa NTSYS (11).

Resultados y discusión

Los resultados se presentan en figuras, ubicando en la parte superior el dendograma y en el inferior el zimograma para cada sistema isoenzimático.

α -esterasa. Para esta isoenzima se formaron cinco grupos bien definidos (figura 1). El primer grupo, conformado por T₁₀, T₁₁, T₁₂, T₁₃ y T₁₄ agrupados a una distancia cero, indicando 100 % de similitud, todos los

tratamientos anteriormente señalados involucraron a *P. friedrichsthalii* como especie estudiada.

En el segundo grupo se agruparon T₅, T₆ y T₈ a una distancia de 0,667 o 33,3 % de similitud, incluye los tratamientos que mostraron en el zimograma dos bandas.

El tercero, cuarto y quinto grupos (T₄ y T₇; T₂ y T₃; T₁ y T₉, respectivamente) se asociaron independientemente

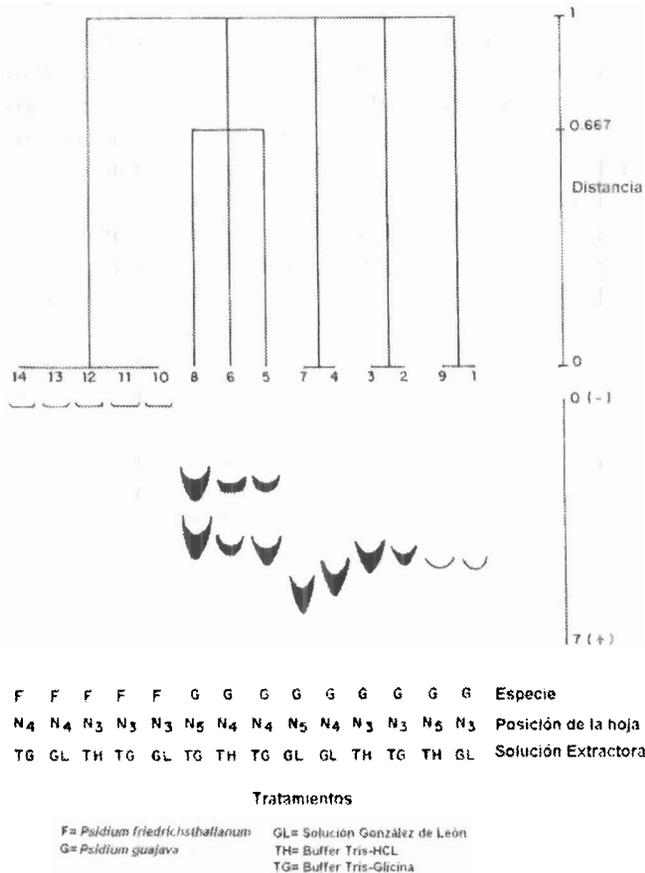


Figura 1. Dendograma y zimograma del sistema isoenzimático α -esterasa.

mente a una distancia cero, indicando 100 % de similitud. Los pares de tratamientos de cada grupo mostraron una banda con el punto medio ubicado en la misma posición dentro del zimograma.

El segundo, tercero, cuarto y quinto grupo, asociaron todos los tratamientos relacionados con la especie *P. guajava* y la diferencia entre ellos se basa en la posición relativa y número de bandas, generada por otros factores involucrados como buffers y posición de la hoja.

β -esterasa. En el dendograma se observa la formación de un primer grupo conformado por T_{10} , T_{11} , T_{13} , T_{14} , T_{16} y T_{18} agrupados a una distancia de 0 o 100 % de similitud, tal como se observa en el zimograma, donde cada tratamiento mostró una banda con el punto medio ubicado en la misma posición (figura 2). Este grupo de tratamientos involucró como especie estudiada a *P. friedrichsthalianum*.

El segundo grupo ($T_6(T_8(T_5(T_3, T_4)))$) asocia en un primer nivel los tratamientos 3 y 4 a una distancia cero, indicando 100 % de similitud, en el zimograma se observa un mismo patrón de bandedo, posteriormente T_5 se une a T_3 y T_4 a una distancia de 0,50; lo que indica 50 % de similitud. Al grupo ($T_5(T_3, T_4)$) se une el T_8 a una distancia de 0,584 indicando 41,6 % de similitud. A este grupo se asocia el T_6 a una distancia de 0,917 indicando 8,3 % de similitud. Los tratamientos T_6 , T_8 y T_5 en el zimograma muestran dos bandas, siendo semejante la ubicación de la banda inferior.

Finalmente aparecen en forma independiente en el dendograma T_1 , T_2 , T_7 y T_9 , es decir, son 100 % distintos,

en el zimograma muestran una única banda catódica en ubicaciones diferentes.

Fosfatasa ácida. El dendograma muestra la agrupación de ($(T_2, T_5)T_8$) T_6), uniéndose en un primer nivel T_2 y T_5 a una distancia de 0,667 con 33,3 % de similitud; siendo semejante la posición de la segunda banda aniónica (figura 3). Posteriormente a una distancia de 0,75 se une T_8 al grupo anterior, con 25 % de similitud, presentando tres bandas en el zimograma, de las cuales dos coinciden en posición con T_5 . A una distancia de 0,875 se une al grupo ($(T_2, T_5)T_8$) el T_6 con 12,5 % de similitud, su zimograma presenta tres bandas coincidiendo el punto medio de la banda intermedia con la posición de la banda superior de T_5 .

El dendograma muestra la presencia de T_{17} como UTO independiente ya que no se asocia a ningún otro tratamiento, en el zimograma se observa una única banda. T_{17} involucra a *P. friedrichsthalianum* a diferencia de los otros tratamientos que presentan más de una banda e incluyen a la especie *P. guajava*.

Peroxidasa. El dendograma de la figura 4 señala tres grupos conformados de la siguiente manera: El primer grupo está formado por ($((T_{11}, T_{12}, T_{14})T_{13})T_2$) T_3), uniéndose en un primer nivel T_{11} , T_{12} y T_{14} a una distancia cero, indicando 100% de similitud, en el zimograma se observan dos bandas en cada tratamiento. En un segundo nivel se une T_{13} al grupo anterior a una distancia de 0,667 ó 33,3% de similitud. En un tercer nivel

T₂ se asocia al grupo ((T₁₁, T₁₂, T₁₄) T₁₃) a una distancia de 0,800 lo que indica 20% de similitud. Finalmente en un cuarto nivel se une T₃ al grupo anterior (((T₁₁, T₁₂, T₁₄) T₁₃) T₂) a una distancia de 0,834 indicando 16,6 % de similitud. En el zimograma se observa a una distancia similar la banda más catódica de los tratamientos asociados.

Todos los tratamientos de este grupo involucran a *P. friedrichsthalianum* excepto T₂ y T₃.

El segundo grupo está conformado por (((T₁₆, T₁₈) T₄, T₁₅) T₆) agrupándose en un primer nivel T₁₆ y T₁₈ a una distancia cero, indicando 100% de similitud, dado que ambos tratamientos presentan en el zimograma

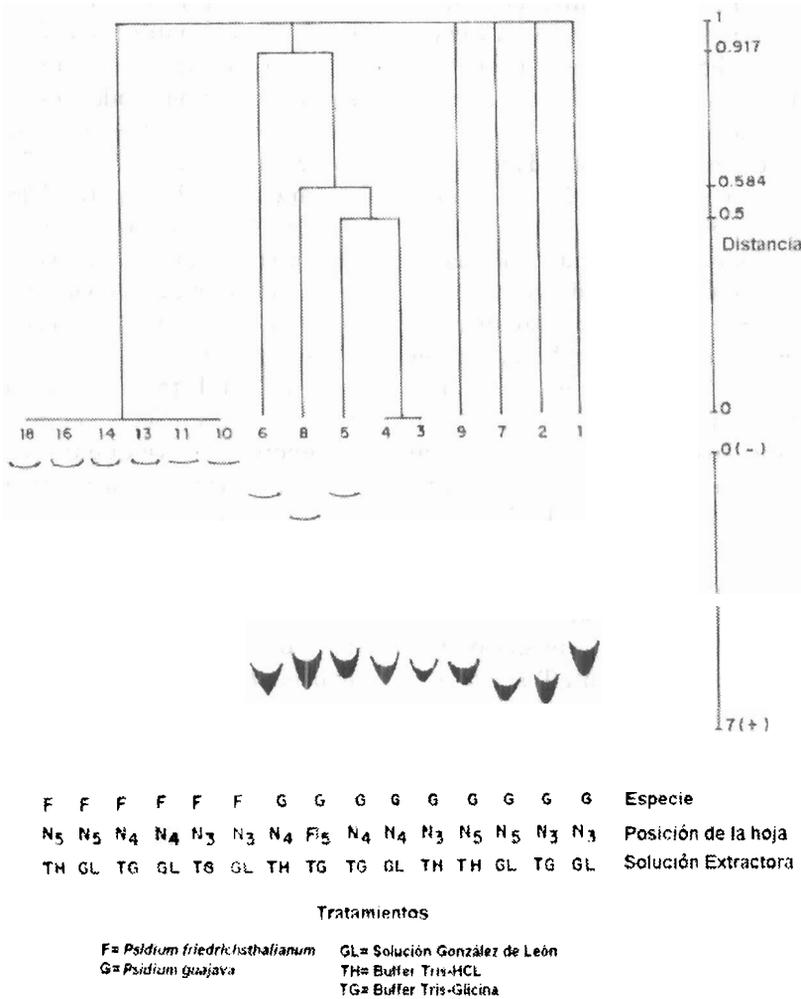


Figura 2. Dendrograma y zimograma del sistema isoenzimático β-esterasa.

por unión en un primer nivel T_9, T_8 y T_{17}, T_5 unidos en forma independiente, a una distancia de cero o 100% de similitud entre ellos; el zimograma muestra que T_{17}, T_5 y T_9, T_8 presentan dos bandas cada uno en posiciones iguales en el gel. En un segundo nivel se une a (T_9, T_8) el T_1 a una distancia de 0,334 e indicando 66,6% de

similitud. Posteriormente en un tercer nivel se une a (T_{17}, T_5) el T_{10} a una distancia de 0,5 e indicando 50% de similitud. En un cuarto nivel se unen los grupos $(T_{10}(T_{17}, T_5))$ y $(T_1(T_9, T_8))$ a una distancia de 0,647; compartiendo un 35,3% de similitud entre ambos. En un quinto nivel se une T_7 al grupo formado anteriormente, a una distan-

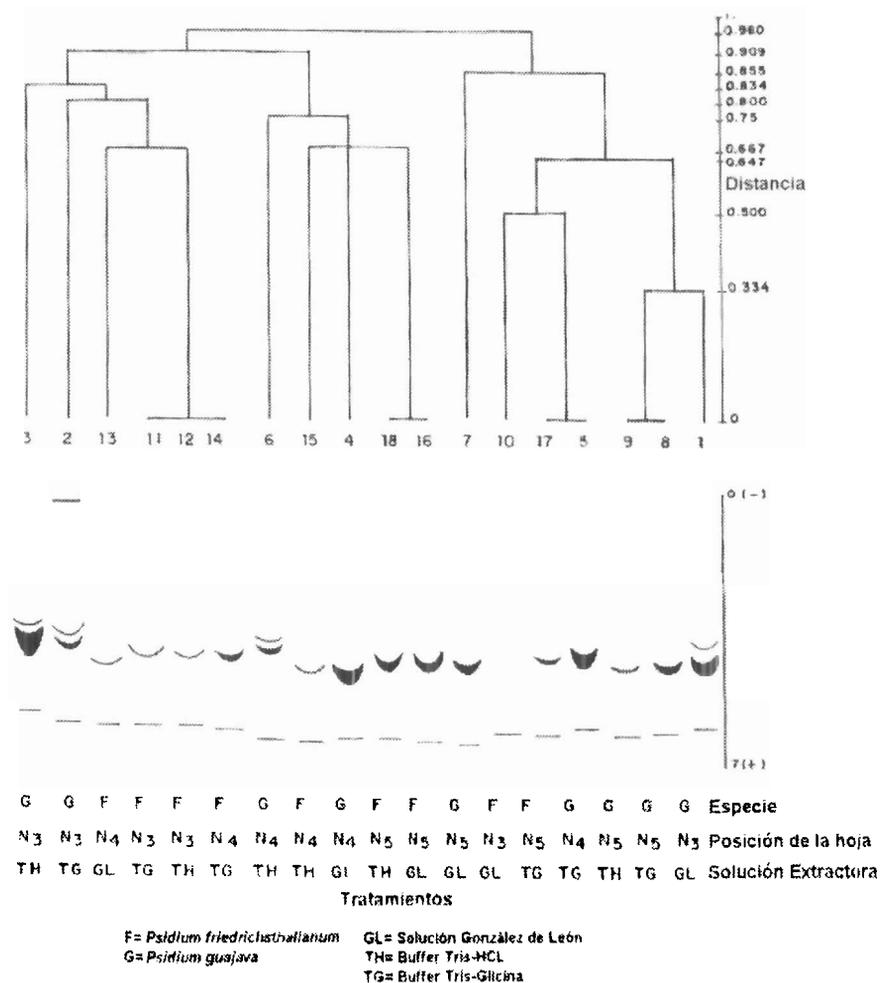


Figura 4. Dendrograma y zimograma del sistema isoenzimático peroxidasa.

cia de 0,855 ó 1,45% de similitud. Según el zimograma los tratamientos de este grupo presentan dos bandas excepto T₁, ubicándose la primera banda catódica en posición semejante. Todos los tratamientos de este grupo involucran a *P. guajava* excepto T₁₀ y T₁₇.

Finalmente este grupo (T₇(T₁₀(T₁₇, T₅))(T₁(T₉, T₈))) se une a (((((T₁₁, T₁₂, T₁₄) T₁₃) T₂) T₃), (((T₁₆, T₁₈) T₄, T₁₅) T₆)) a una distancia de 0,960 señalando un 0,04% de similitud entre ambos.

La información generada por el análisis de conglomerados a través del dendograma permite agrupar unidades taxonómicas operacionales (UTO'S) o muestras según un criterio y objetivo definido (número y distancia de banda), facilitando el estudio de un gran número de UTO'S aleatorizadas dentro

del gel. A su vez la información generada por el zimograma en cuanto a tamaño, grosor, forma e intensidad de la banda, complementan el estudio de los sistemas isoenzimáticos, ya que esta información puede ser determinante en la caracterización o diferenciación (10) de los elementos estudiados y no es representada en el dendograma.

Resultados comparables a los observados en este ensayo han sido obtenidos en otras especies (12, 13, 17).

En este estudio se observaron diferentes patrones de bandeo para una misma especie, debido a otros factores involucrados como buffer y posición de hoja en cada tratamiento aplicado, como manifestación del polimorfismo dentro de una misma especie para un mismo sistema isoenzimático (1, 3, 5).

Conclusiones

El análisis estadístico por conglomerado constituye un método confiable y eficiente para realizar el estudio de polimorfismo enzimático y establecer nexos comparativos entre materiales vegetales distintos, porque disminuye el tiempo de análisis facilitando la interpretación de los grupos asociados. En este estudio sólo se utilizaron las distancias recorridas por las bandas para la formación de los grupos, por tanto no se excluye el uso del zimograma para el análisis isoenzimático.

Los dendogramas generados a

partir de los patrones de bandeo (zimograma) de los sistemas isoenzimáticos α -esterasa, β -esterasa y fosfatasa ácida permiten diferenciar las especies *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg.) Niedz. Sin embargo, el sistema isoenzimático peroxidasa no permite establecer diferencias entre *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg.) Niedz, ya que el dendograma generado de su patrón de bandeo asoció dentro de un mismo grupo, tratamientos que involucran ambas especies.

Literatura citada

1. Barreto, A. y Pierre Simon J. 1982. Utilización de isoenzimas como marcadores genéticos en *Saccharum*. Turrialba 32 (3): 321-327.
2. Brewbaker, J., M. D. Upandhya, Y. Makinen and T. McDonald. 1968. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. III Gel electrophoretic methods and applications. *Physiol. Plant* 21: 930-940
3. Cedeño, O. y Perez, J. 1985. Caracterización de doce cultivares de soya (*Glycine max* [L] Merr.) por métodos bioquímicos. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* 16(1-2):76-69.
4. Crawford, D. 1989. Enzymes electrophoresis and plant systematics. In: Soltis, D. and Pamela Soltis (Eds.). *Isozymes in plant biology*. Discorides Press, Portland.
5. Degani, Ch., M. Cohen and R. El-Batsri. 1992. PGI Isozyme and its genetic control in mango. *Hort Science* 27(3):252-254.
6. Hamman, H. K. 1972. Utilization of multivariate statistics for discriminating among flue-cured tobacco varieties. *Tech. Bull. 212 North Carolina Agric. Exp. St. (Raleigh, NC)*.
- Mendoza, De Gyves. 1994. *Agrobiotecnología*. Grupo Editorial Iberoamericana S.A. de C.V. México.
8. Munn, R. and J. Dudley. 1994. A classification of 148 U.S. Maize Imbreds: I Cluster analysis based on RFLPs. *Crop Sci.* 34:842-851
9. Munn, R. and J. Dudley. 1995. A PC computer program to generate a dissimilarity matrix for cluster analysis. *Crop Sci.* 35:925-927.
10. Nava, A. y M. Gerder. 1993. Detección de polimorfismo enzimático en cinco variedades de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) mediante el estudio de enfoque isoelectrico y electroforesis en geles de disco. *Oléogunius* 48: 365-372.
11. NTSYS-pc. 1992. Numerical taxonomy and Multivariate analysis system, version 1.70. Setauket, New York: Exeter Software.
12. Oleo, M., J.P.C. Geyt, M. Jacobs, J.P.C. and Van-Gevt. 1992. Enzyme and storage protein electrophoresis in varietal identification of sugar beet. *Theoretical Applied Genet.* 85(2-3):379-385.
13. Pascual, L., F. Perfectti, M. Gutierrez and A.M. Vargas. 1993. Characterizing isozymes of Spanish cherimoya cultivar. *HortScience* 28(8):845-847.
14. Salazar, E. 1994. Aspectos básicos sobre electroforesis (Mimeografía), CENIAP, Maracay. 22 pp.
15. SAS Institute, Inc. 1985. *User's guide: Statistics*. 5th edition. SAS Inst., Inc., Cary, NC
16. Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy: the Principles and practices of numerical classification*. W. H. Freeman and Co., San Francisco.
17. Vaillancourt, R.E. and N.F. Weeden. 1993. Lack of isozyme similarity between *Vigna unguiculata* and other species of subgenus *Vigna* (Leguminosae)
18. Wendel, J. and N. Wendeen. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis, D. and Pamela Soltis (Eds.). *Isozymes in plant biology*. Discorides Press, Portland.