

Determinación de las afinidades genéticas de 30 variedades de la colección cubana de mango (*Mangifera indica*.L)

Marlyn Valdés^{*}; Clara González^{*}; María Isabel Román^{**}; Xonia Xiqués^{*} Maricela Capote^{***}; Juliet Valdés-Infante^{***}; Orlando Coto^{***}; Elancia Thermidor^{*}

^{*} *Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 # 455 entre J e I Ciudad de La Habana. E-mail: marlyn@fbio.uh.cu*

^{**} *Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales*

^{***} *Instituto de Fruticultura Tropical.*

INTRODUCCIÓN

El género *Mangifera* es nativo de la región tropical del sureste de Asia, desde la India hasta Filipinas. Los mangos (*Mangifera indica* L.) han estado bajo cultivo desde hace probablemente cuatro mil años o más, por lo que el origen de las formas cultivadas se pierde en la antigüedad. Los centenares de variedades de mango que hoy en día se conocen, es posible que se hayan derivado de más de una especie silvestre (Mukherjee, 1972; Instructivo Técnico del mango, 1982).

El mango es indudablemente la especie de mayor importancia en la familia *Anacardiaceae*, tanto por su distribución mundial como por su importancia económica, debido a que ocupa el quinto lugar de las frutas que se consumen a nivel mundial y el tercero en interés en los países tropicales, después del plátano (*Musa* spp.) y de la Piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Actualmente su cultivo contempla más de cien países y en Cuba, se encuentra extendido a todo lo largo del mismo, ocupando el 35% de la áreas de frutales cultivadas, con una media de producción anual de aproximadamente setenta mil toneladas (López-Valenzuela *et al.*, 1997; Capote *et al.*, 2003).

La mayor cantidad de mangos cultivados en Cuba procede de la Florida, entre los que se encuentran los de interés comercial, así como los de las colecciones en los centros experimentales. Pero además, en nuestro país se comercializan variedades procedentes de la India, Indochina y la Antillas, así como otras oriundas de Cuba.

Hasta hace unos años la descripción y caracterización de las diferentes accesiones de mango, se basó solamente en los caracteres morfoagronómicos, por lo que se han comenzado a desarrollar diferentes técnicas a nivel molecular como herramientas para la descripción de los genotipos y conocer el grado de relación entre los mismos (Capote *et al.*, 2003).

El empleo de las técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) para diferentes sistemas isoenzimáticos, ha sido ampliamente utilizado en diferentes cultivos para la caracterización de accesiones, colecciones y bancos de germoplasma, por constituir marcadores moleculares de expresión que permiten conocer el grado de plasticidad genética del germoplasma disponible y la relación filogenética existente entre las entidades (González *et al.*, 2001, Cornide *et al.*, 2002).

El objetivo de nuestro trabajo fue caracterizar desde el punto de vista genético-bioquímico 30 variedades del banco de germoplasma de mango (*Mangifera indica* L), mediante el empleo de la electroforesis en gel de poliacrilamida de los sistemas isoenzimáticos peroxidasa, polifenoloxidasas y anhidrasa carbónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana. El material vegetal empleado provino de la colección de la especie *Mangifera indica* L. en Cuba, localizada en el Municipio de Alguizar en la Provincia de la Habana. Las variedades estudiadas se muestran en la tabla I.

Para la preparación de las muestras fueron seleccionadas al azar hojas jóvenes de plantas adultas provenientes del campo. Los extractos crudos se obtuvieron macerando 5 gramos de hojas frescas y sanas conservadas en congelación a las cuales se le añadió 10 gotas de solución de sacarosa al 20%. Dichos extractos fueron filtrados en tela de gasa y conservados en tubos de eppendorf a -15°C hasta su utilización.

TABLA I. Variedades de mango y nomenclatura empleadas en el estudio.

Variedades	Nomenclatura	Variedades	Nomenclatura
Deliciso	1	Reina de México	16
Eldon	2	Delicias 1	17
Haden Muñoz	3	Lancetilla	18
Corazón	4	San Diego	19
Mameizón	5	Super Haden	20
Chino Rojo	6	La Paz	21
Chino Amarillo	7	Chino Esperón	22
Señora	8	Springfield	23
Estero del Pinar 2	9	MININ	24
Biscochuelo	10	Smith	25
Mario	11	Pedro	26
Julie	12	San Felipe	27
Baltazar	13	Kent	28
Filipino	14	Keitt	29
Santa Cruz	15	Bombay Tardío	30

Las corridas electroforéticas se realizaron en gel de poliacrilamida (PAGE), en un sistema de buffer discontinuo según Orstein (1964) y Davis (1964), el buffer de corrida fue Tris glicina 0.04 M, pH 8.3 en un aparato de corrida en lámina vertical según Raymond (1964) y modificado en el Laboratorio de Isoenzimas de la Facultad de Biología (Chapell *et al.*, 1974). El gel de separación utilizado fue de 8.5% utilizando una corriente de 50 mA y voltaje constante. El frente de corrida se marcó agregando al buffer 10 microlitros de una solución de azul de bromo fenol al 1% para marcar la banda de Kohlrausch.

Las tinciones realizadas aparecen en la tabla II.

Tabla II. Sistemas isoenzimáticos y métodos de tinción empleados.

Sistema Isoenzimático	Nomenclatura	Método de tinción
Peroxidasas E.C. 1.11.1.7	Px	Iglesias y col., 1974
Polifenoloxidasas E.C.1.10.3.1	Ppo	Guedes y Rodríguez, 1974
Anhidrasa carbónica E.C 4.2.1.1	Ac	Brewer y Singh, 1970

Los geles después de la tinción fueron lavados con agua destilada y mantenidos en una solución de ácido acético glacial al 10% hasta el momento de la confección de los zimogramas. Las movilidades electroforéticas fueron medidas en centímetros a partir del punto de origen y se representaron los zimogramas en papel milimetrado.

A partir de los resultados obtenidos en los electroforetogramas, se construyó una matriz de presencia - ausencia de bandas, seleccionando aquellas que eran polimórficas. La matriz se procesó por el programa estadístico NTSYSpc versión 2.10j (Applied Biostatistics, 2000) se utilizó el índice de Dice (Crisci y López, 1983; Crivisqui, 1998) y el algoritmo SAHN, aplicando el método de UPGMA (Unweighted Pair- Group Method using Arithmetic Averages)(Hair, J.F *et. al* (1992), en el que se representan las relaciones fenéticas entre el material estudiado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El zimograma para las isoenzimas Peroxidasas presenta un total de ocho bandas agrupadas en cinco loci genéticos (Px). Sólo el locus Px₅, el de menor migración anódica, es monomórfico. Se destaca el locus Px₁, el cual posee dos bandas y sólo aparece en la variedad Filipino. Se presentan 12 zimotipos diferentes para este sistema, lo que evidencia que existen identidades electroforéticas entre variedades (Fig. 1).

Las isoenzimas Polifenoloxidasas poseen un total de ocho bandas pertenecientes a cinco loci (PPO). El 100% de sus loci son polimórficos y se detectan 18 zimotipos, dado el alto grado de variabilidad del sistema. Esto hace que un menor grupo de variedades coincidan en el número y posición de las bandas (Fig. 2).

En el caso de las isoenzimas Anhidrasa Carbónica, se observan un total de ocho bandas dentro de cinco loci genéticos (AC). El locus AC₄ es el único monomórfico en estas isoenzimas, las que agrupan a las variedades en 15 zimotipos diferentes. Las variedades Reina de México, Delicia1, MININ y Pedro presentan la banda del locus AC₄, mientras que el resto tienen entre dos y siete bandas (Fig. 3).

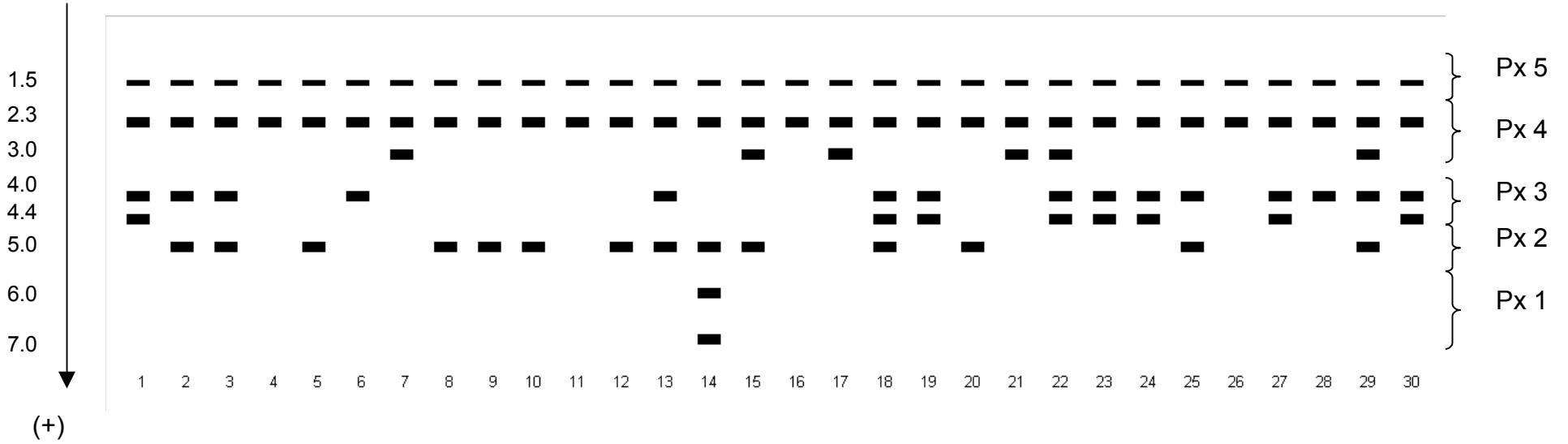


Figura 1. Zimograma del sistema isoenzimático Peroxidasas de 30 variedades de mango.

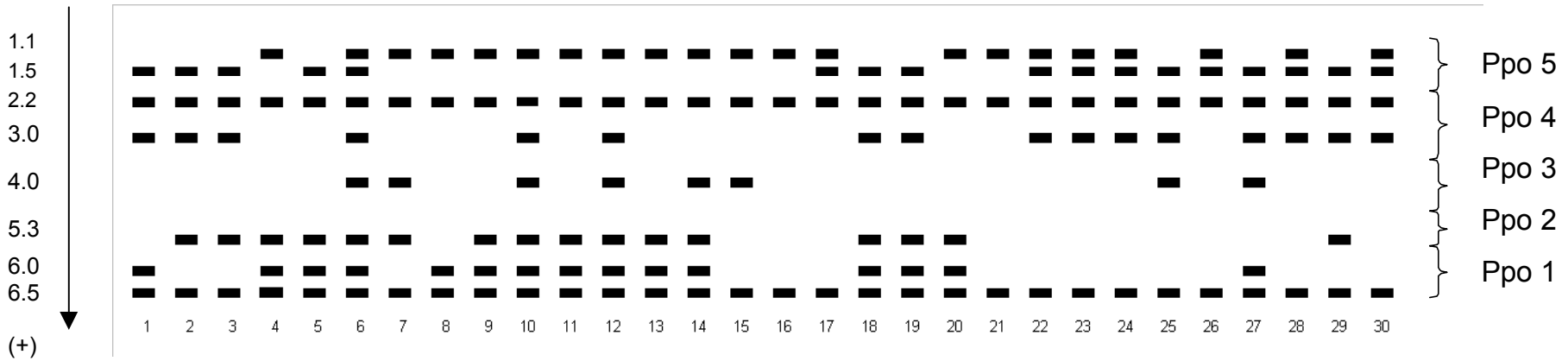


Figura 2. Zimograma del sistema isoenzimático Polifenoloxidasas de 30 variedades de mango.

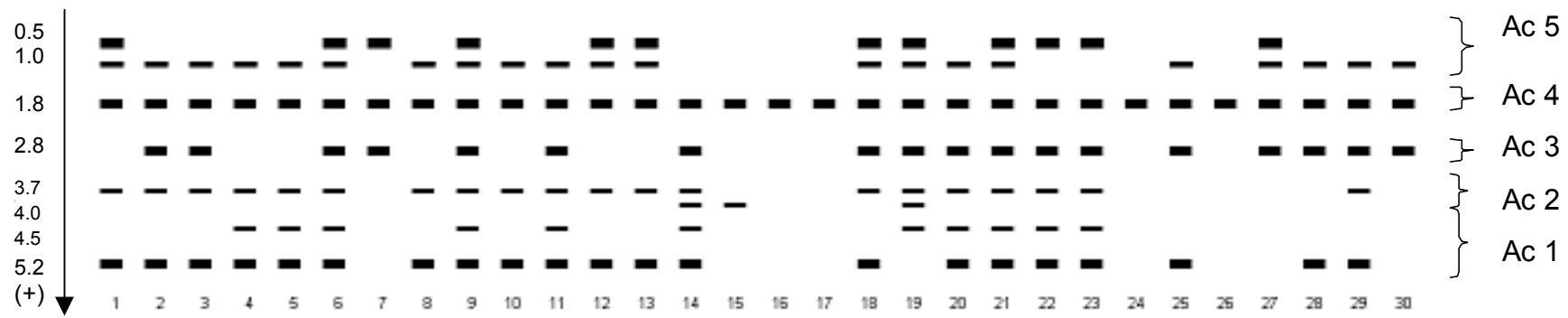


Figura 3. Zimograma del sistema isoenzimático Anhidrasa Carbónicas de 30 variedades de mango.

Teniendo en cuenta los tres sistemas isoenzimáticos estudiados, se observa en la tabla III un alto porcentaje de polimorfismo enzimático (86.6%), ya que de un total de quince loci genéticos, trece de ellos muestran diferencias en los patrones de bandas, aunque en todos los sistemas el valor medio de alelos (bandas) por locus es de 1.6. El sistema más polimórfico fue polifenoloxidasas (100 %). Estos resultados coinciden con los encontrados por Degani *et. al* (1990; 1992) en estudios taxonómicos de variedades de mango, quien detectó polimorfismo en diferentes sistemas isoenzimáticos.

Tabla III. Análisis cuantitativo de los resultados electroforéticos.

Sistemas	Total de bandas	Total de loci	Total de loci polimórficos	% de loci polimórficos	X de bandas por locus	Total de alelos raros
Peroxidasas	8	5	4	80	1.6	0
Polifenoloxidasas	8	5	5	100	1.6	0
Anhidrasa carbónica	8	5	4	80	1.6	0
Total	24	15	13	86.6	1.6	0

En la figura 4 se muestra el dendrograma que representa las afinidades fenéticas entre 30 variedades de mango. Se aprecia la formación de cuatro grupos, a partir de un índice de similitud de 0.50, en los que se pueden distinguir diferentes subgrupos, confeccionados por un índice de 0.75.

En el grupo I se observan 3 subgrupos, en el primero aparecen las variedades Delicioso (1), Lancetilla (18), Chino Rojo (6), San Diego (19), San Felipe (27), Chino Esperón (22), Springfield (23). El segundo subgrupo está formado por Eldon (2), Haden Muñoz (3), Keitt (29) y Smith (25) y el tercero por MININ (24), Kent (28), Bombay Tardío (30).

El grupo II está constituido por 3 subgrupos, uno de ellos integrado por Corazón (4), Mario (11), Estero del Pinar 2 (9), Super Haden (20), Mameyzón (5), Señora (8), Biscochuelo (10), Julie (12), Baltazar (3). Las variedades Filipino (14) y La Paz (21), integran respectivamente los subgrupos restantes.

El grupo III está formado por las variedades Chino Amarillo (7) y Santa Cruz (15).

El grupo IV está constituido por las variedades Delicias I (17) y Pedro (26) y Reina de México.

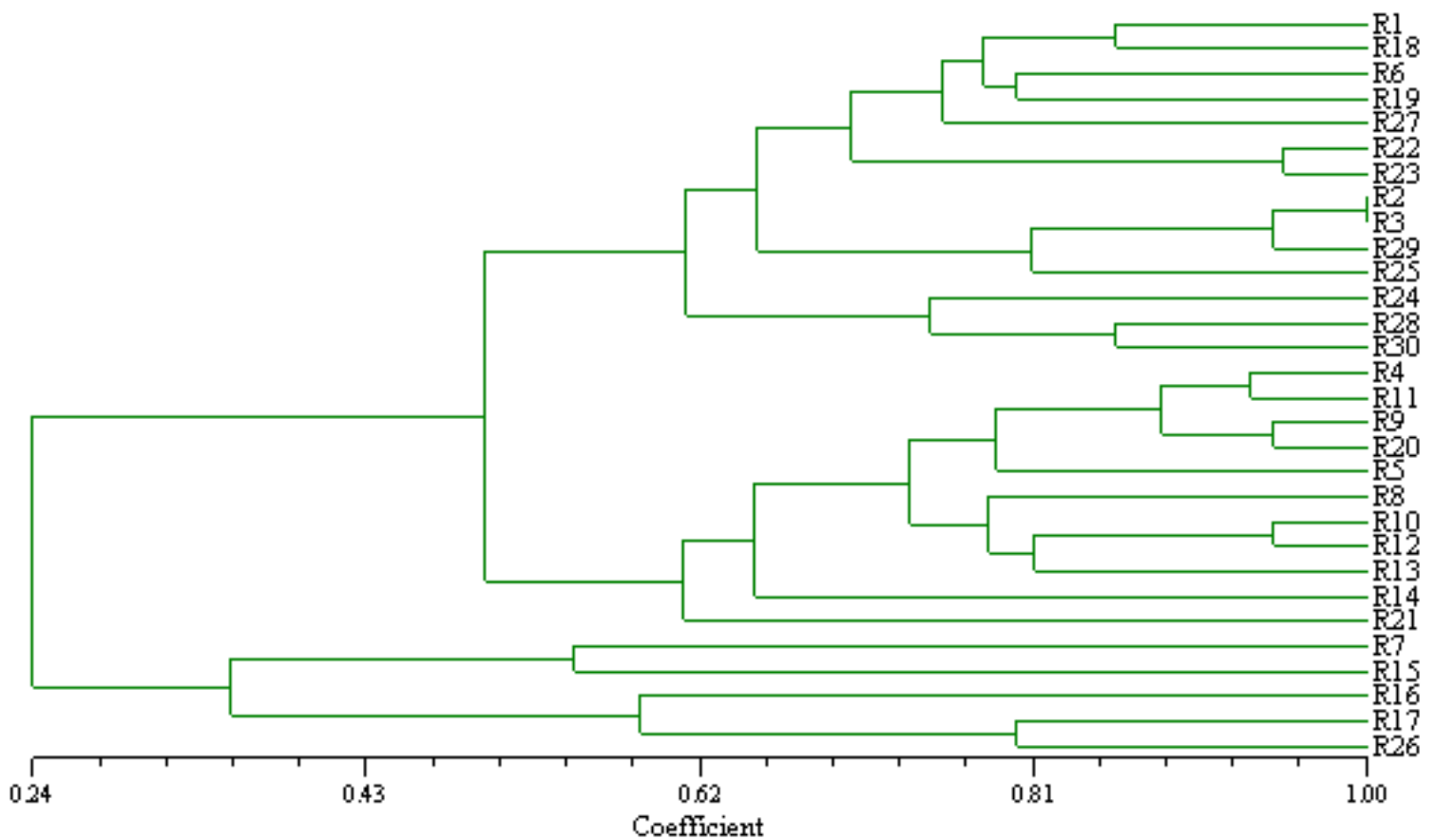


Figura 4: Dendrograma que representa las afinidades fenéticas entre las 30 variedades del banco de germoplasma de mango, utilizando el índice de Dice y el algoritmo SAHN, aplicando el método UPGMA del Programa NTSYSpc versión 2.10j.

Leyenda

- | | | |
|-----------------------|---------------------|-------------------|
| R1 Delicioso | R11 Mario | R21 La Paz |
| R2 Eldon | R12 Julie | R22 Chino Esperón |
| R3 Haden Muñoz | R13 Baltazar | R23 Springfield |
| R4 Corazón | R14 Filipino | R24 MININ |
| R5 Mameyzón | R15 Santa Cruz | R25 Smith |
| R6 Chino Rojo | R16 Reina de México | R26 Pedro |
| R7 Chino Amarillo | R17 Delicias 1 | R27 San Felipe |
| R8 Señora | R18 Lancetilla | R28 Kent |
| R9 Estero del Pinar 2 | R19 San Diego | R29 Keitt |
| R10 Biscochuelo | R20 Super Haden | R30 Bombay Tardío |

Se puede plantear que los grupos se formaron por las semejanzas en los patrones isoenzimáticos y la expresión génica, ya que no se corresponden con ninguna

característica morfoagronómica en particular, ni con los resultados obtenidos en estudios recientes con las mismas variedades empleando marcadores moleculares de DNA (Istr y AFLP), los que mostraron muy poca variabilidad genética, aún atendiendo al origen y diversidad geográfica de los genotipos, lo que confirma un fondo genético común y un proceso posterior de domesticación de las variedades de esta especie, producto a las demandas del consumo y la comercialización (Ravisharka *et al.*, 2000; Kasbkush *et al.* 2001; Capote *et al.*,. 2003)

En el presente trabajo se evidencia una mayor variabilidad en el material, debido a que las isoenzimas, aunque se encuentran muy cerca del gen, son marcadores de expresión los cuales dependen de la interacción genotipo- ambiente y de su sistema de regulación. Es importante tomar en consideración la recomendación realizada por Capote *et al.* (2003) de la necesidad de coleccionar e introducir nuevas variedades que aumenten el acervo genético en esta especie para los futuros programas de mejoramiento.

CONCLUSIONES

1. Se presentó un alto polimorfismo enzimático (86.6%) en las variedades de mango estudiadas (*Mangifera indica* L.). El sistema polifenoloxidasas es el que posee mayor porcentaje de bandas polimórficas (100%).
2. Las variedades de mango se ubicaron en cuatro grupos de afinidad isoenzimática, dos de ellos subdivididos en tres subgrupos,
3. Estos resultados constituyen el primer estudio isoenzimático en mango, realizado en Cuba, lo cual puso de manifiesto la variabilidad existente en este banco de germoplasma.

BIBLIOGRAFÍA.

- Brewer, G and Singh (1971). Introduction to isozyme techniques. Academic Press New York. USA 186pp.
- Capote Maricela; D, Becker; Juliette, Valdés-Infante; R, Cueto and ,.W. Rohde (2003). Developmen and application of varius DNA markers types for the characterization of genetic diversity within commercial mango varieties in Cuba. **J. Genetic & Breed. 56:** 30-36.
- Chapel ,J; L, Iglesias; A, Barreto; F, Baisne y J,P,Simon.(1974). A simplified apparatus for vertical slab electrophoresis in poliacrilamide gel. Laboratory practice. No23, p.311-312.
- Cornide, M.T; A. Arencibia; V. Berovides; D. Calvo; O. Coto; C. González; M. Rodríguez; J. Sánchez; A. Sigarroa y X. Xiqués 2003. Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Editorial Felix Varela. 366pp.
- Crisci, J.V y López, M.F.(1983). Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Secretaría general de la Organización de Estados Americanos (OEA) Washington. D:C:132p.
- Crivisqui, E. (1998). Presentación de los Métodos de clasificación. Valdivia. Chile 5-16 de enero de 1998. 56p
- Davis, B.J (1964). Disc electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. **Ann.N.Y.Acad.Sci.12:** 404-427.
- Degani C.R. El- Batei & S.Gazit (1990) Enzyme polym rphsm in mango. **J.Amer. Soc.HortSci.** 115: 44-47
- Degani C.R.; Cohen R; El-Batei & S.Gazit. (1992) PGI isozyme diversity and its genetic control in mango. **HortScience.27(3):** 252-254.
- Eiadthong ,W; Yonemori, K; Sugiura, A; Utsunomiya, N and Subhadrabandhu, S.(1999). **Scientia Horticulturae 82:** 57-66.
- González , C:T y J.A. González. (1981). Estudio de los patrones isoenzimáticos para lima persa III. Caracterización isoenzimática.**Cienc. Téc. Agric.Vol.4(2):** 102-108.

- González C.T, I, Galán; H. García.(1992). Identificación de variedades de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) a través de análisis isoenzimáticos. **Rev. Biología** vol.6, nº 3:197-200.
- González C.T; Díaz, S; Román,M.I; Xiqués,X; Florido, M; Lara, R.M; Pérez, L. (2001). **Rev. Jardín Botánico Nacional. 22(2):** 271-278.
- Guedes,M y C.I, Rodríguez (1974). Disc electrophoretic pattern of phenoloxidase from leaves of coffee cultivars. Sep. De Portugal. **Acta biológica. Serie A, Vol XIII:169-177.**
- Hair, J.F; Anderson, R.E; Tatham, R.L; and Black,W.C.(1992).Multivariate data analysis. Macmillan Publ. Co. Nueva York. 544p.
- Iglesias, L; H. Lima y J.P. Simon. (1974). Isozymes identification of nucellar seedlings in *Citrus*. **J. Heredity 65.p.** 81-84.
- Instructivo Técnico del Mango(1982).Departamento de otros frutales. Dirección de cítricosy otros frutales. **MINAGRI-CIDA.**
- Kasbkush, K; Jinggui, F; Tomer, E; Hillel, J & Lavi, U.(2001).**Euphytica122:129-136.**
- López-Valenzuela J.A; Martinez O and Paredes-López O (1997). Geographic differentiation and embryo type identification in *Mangifera indica* L. cultivars using RAPD markers. **HortScience 32 (6):1105-1108.**
- Mukherjee,SK(1972). Origin of mango. **Economic Botany 26 :260-264.**
- NTSYSpc versión 2.10j (2000). Applied Biostatistics.
- Orstein, L.(1964). Disc electrophoresis I. Background and theory. **Ann. Ny. Acad. Sci. No 121:321-349.**
- Ravishankar ,K.V.; Lalitha Anand and M.R.Dinesh. (2000).**Journal of Horticultural Science & Biotechnology 75.(2) 98-201.**
- Raymond,S.(1964). Acrilamide gel electrophoresis. **Ann. Ny. Acad. Sci. No. 121:350-361.**
- Sigarroa, A. y M.T. Cornide. (1995). Marcadores moleculares para la selección de variedades vegetales. **Avances en la Biotecnología Moderna.Vol 3: 17-47.**