



Instituto de Innovación en Biotecnología e Industria (IIBI)

Caracterización molecular del mango banilejo (*Mangifera indica* L.) por medio de isoenzimas y análisis AFLP

InvestigadoreInvestigador principal:

Dr. José R. Núñez, Ph.D. (IIBI)

Investigadores Asoc. :

Ing. Atharva V. Rosa, M.S. (IIBI)

Lic. Guarina DelMonte (IIBI)

Ing. Ineko Hodai (IIBI)



***Reporte Final de
Resultados***

Justificación



- a) Alta demanda en el exterior
- b) Variedad muy heterogénea
- c) Hay que garantizar uniformidad a los mercados
- d) La caracterización por marcadores es una actividad nueva en el país

Objetivos e Hipótesis

Objetivo General:

Obtención de una variedad de mango banilejo morfológica y fisiológicamente uniforme que pueda ser ofertada como variedad típica dominicana en mercados internacionales.



Objetivos Específicos

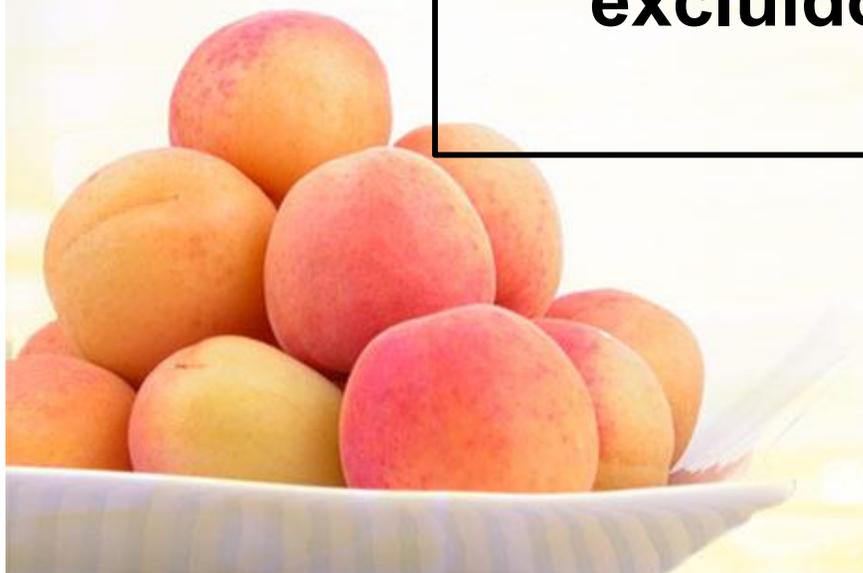
- 1) Usando la herramienta de isoenzimas, buscar diferencias genéticas entre los tipos de mangos banilejos cultivados en la Provincia Peravia



2) Usando la metodología de AFLP buscar diferencias a nivel de ADN para diferenciar los tipos de mangos banilejos que se cultivan en la Provincia Peravia.



- 3) Seleccionar los mejores tipos con características similares producto de los objetivos 1) y 2) para formar un banco de yemas a ser utilizado en los programas de multiplicación del IDIAF y/o SEA o productores particulares.**
- Los tipos no deseados serán excluidos.**



Hipótesis

“Por medio del uso de marcadores moleculares (isoenzimas y AFLP) es posible caracterizar los tipos de mango de la variedad “banilejo” y así desarrollar una variedad típica de origen dominicano”.



Estrategia de la Investigación

Las investigaciones de este proyecto se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Biotecnología Vegetal (CEBIVE), entidad perteneciente al Instituto de Innovación en Biotecnología e Industria (IIBI).



Las muestra biológicas se obtuvieron en las fincas del Dr. Mois Haché, del señor, Amable Díaz y del señor Angel Peguero, los tres pertenecientes al Cluster de Mango de la República Dominicana.

Estas fincas están localizadas en la Provincia Peravia, distante unos 60 km al suroeste de Santo Domingo.





En las fincas



Estrategia de la Investigación...

Las muestras se tomaron en hora de la mañana y luego de colocarse en bolsas plásticas se identificaron apropiadamente y se colocaron en un recipiente herméticamente cerrado conteniendo espuma refrigerante PolarPack® completamente congelada. Esto pudo conservar las muestras en un estado fresco hasta llegar al laboratorio en donde se colocaron en un refrigerador a -21°C .



Estas muestras se mantuvieron en óptimas condiciones de frescura hasta que fueron procesadas.

Usando unas tijeras filosas se procedió a cortar las hojas en pequeños trocitos.

Para la extracción de ADN se usaron 2 gramos de muestra y para la extracción de proteínas se usó un gramo de muestra.



Listado de Muestras



<i>Amable Diaz</i>		<i>Mois Haché</i>	<i>Angel Peguero</i>
FAD_1	FAD_13	FMH_1	FAP_1
FAD_2	FAD_21	FMH_2	FAP_2
FAD_3	FAD_22	FMH_3	FAP_3
FAD_4	FAD_31	FMH_4	FAP_4
FAD_5	FAD_41	FMH_5	FAP_5
FAD_6	FAD_42	FMH_8	
FAD_7	FAD_51	FMH_9	
FAD_8	FAD_52	FMH_10	
FAD_9	FAD_53	FMH_11	
FAD_10	FAD_54	FMH_12	
FAD_11	FAD_55		
FAD_12	FAD_61		

Material Vegetal



Tipos de hojas:

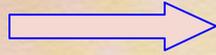
- a) *Muy viejas*
- b) *Muy tiernas*
- c) *Estado maduro perfecto*

Toma de muestras

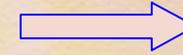




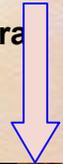
Preparación de la muestra



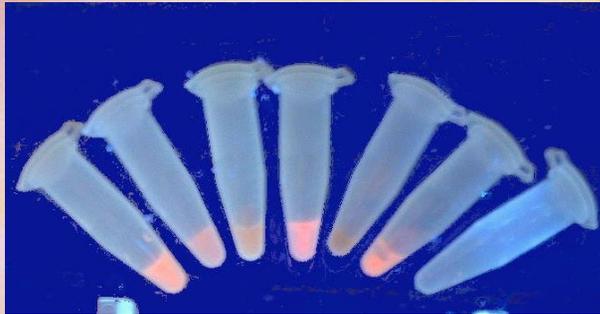
Pesado de la muestra



Molida de la muestra



Extracción



Prueba cualitativa



Espectrofotómetro
Beckman-Coulter
para cuantificación de ADN

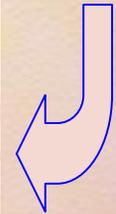
Cuantificación



Purificación



Filtrado



ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACION...

Para los análisis de AFLP se usaron 38 muestras tomadas aleatoriamente en una población de tres fincas.

Para los análisis de isoenzimas sólo se usaron las últimas ocho muestras seleccionadas.

El programa estadístico usado fue Statistica con el subprograma Sta-Clu para análisis de conglomerado. En este subprograma se usó el algoritmo Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean (Promedio de Pares de Grupos no Ponderado con Media Arimética) o UPGMA, por sus siglas en inglés.

Los parámetros de calidad fueron analizados con el programa SAS.

Equipos

Fuente Eléctrica para electroforesis



Centrífuga

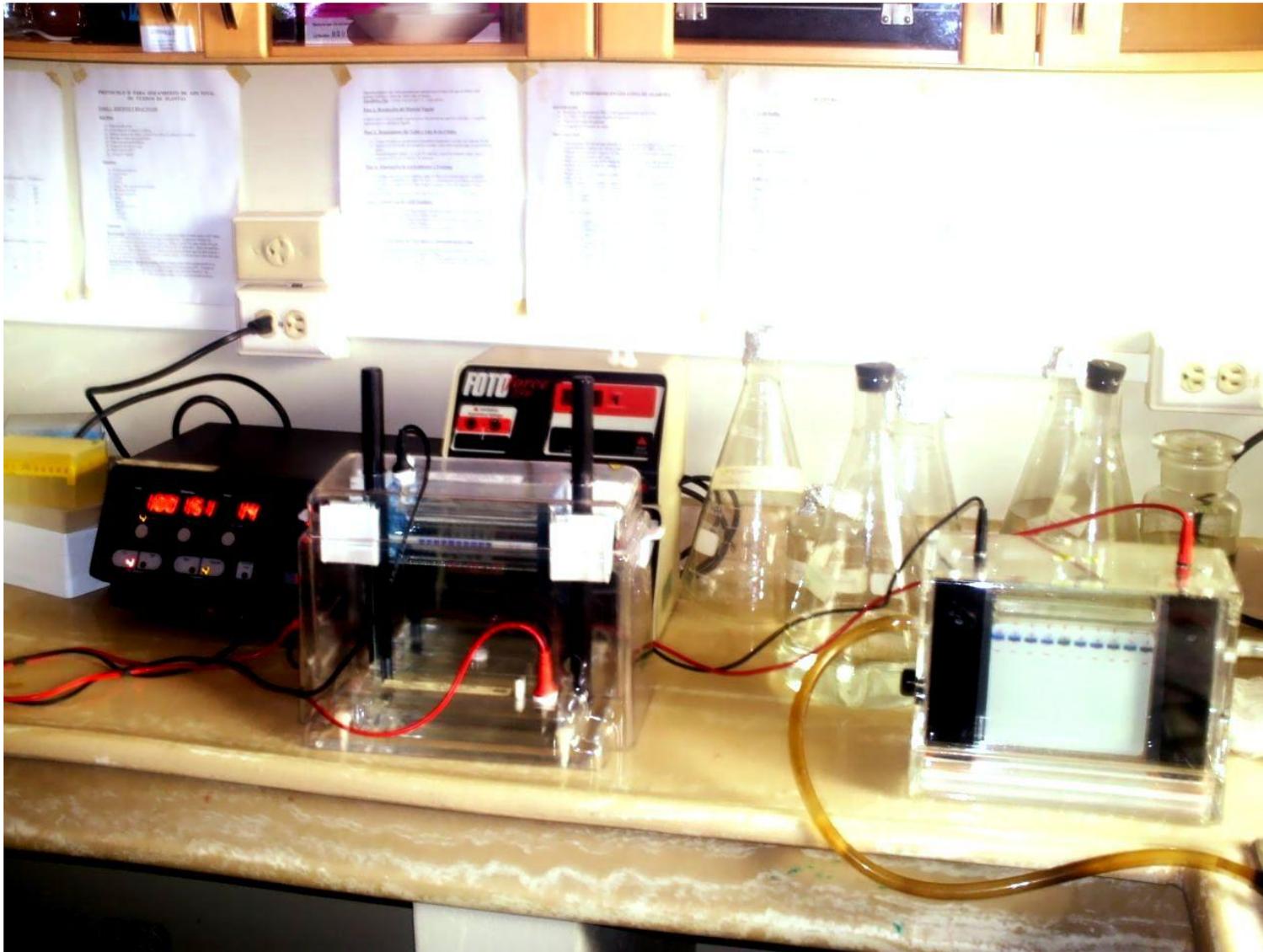


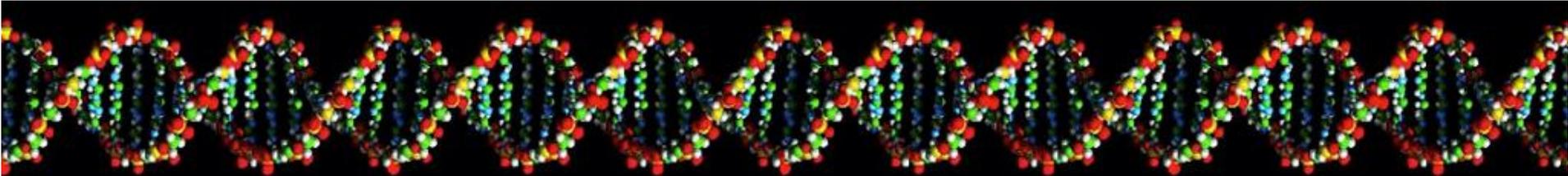
Espectrofotómetro



**Espectrofotómetro
Beckman-Coulter
para cuantificación de ADN**

Aparatos para Electroforesis

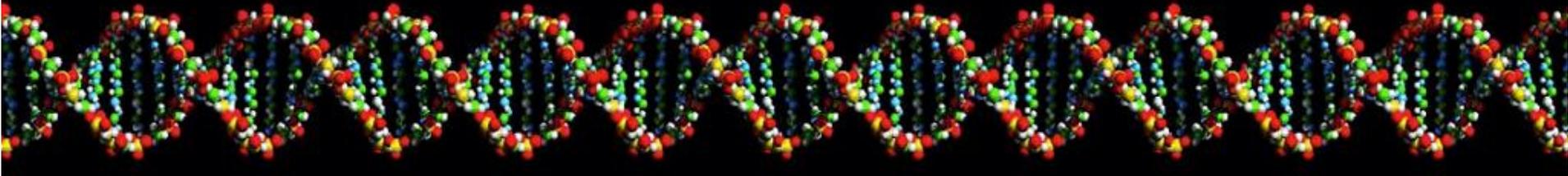




Extracción de las muestras

La extracción de Enzimas se llevó a cabo según lo establecido en el protocolo publicado por Wendel y Weeden (1989).

La extracción y purificación de ADN se hizo de acuerdo al protocolo de Nickrent (1996) con algunas modificaciones para adaptarlo al mango.



RESULTADOS LOGRADOS



A cada árbol seleccionado para análisis de isoenzima y AFLP se le tomaron muestras de frutos (cinco por cada árbol) para evaluar la morfología y calidad de los mismos. Los parámetros que se midieron fueron los siguientes:

<i>Parámetro</i>	<i>Promedio</i>
Diámetro del fruto (DF), cm	6.63
Longitud del fruto (LF), cm	7.86
Peso del fruto (PF), gm	195.30
Diámetro de la semilla (DS), cm	3.50
Longitud de la semilla (LS), cm	5.87
Peso de la semilla (PS), gm	29.28
Peso de la cáscara (PC), gm	30.07
Peso del mesocarpio (PM), gm	136.00
Grado brix (GB), % sólidos solubles	19.50

De acuerdo a los datos obtenidos en los análisis fenotípicos, los árboles FMH1, FMH8, FMH10, FMH12, FAD3, FAD4, FAD5, FAD10, FAP2 y FAP3 fueron seleccionados para continuar su evaluación fenotípica además de los análisis de AFLP e isoenzimas que se les realizaron.





***Promedio de las diez muestras seleccionadas
(segunda cosecha).***

	FMH1	FMH8	FMH10	FMH12	FAD3	FAD4	FAD5	FAD10	FAP2	FAP3
<i>DF, cm</i>	6.84	5.04	5.84	5.90	5.62	5.56	5.52	5.96	5.42	5.94
<i>LF, cm</i>	8.5	6.72	7.5	7.96	6.96	7.08	6.94	6.96	6.70	7.22
<i>PF, gm</i>	181.1	119.2	176.9	172.0	158.2	155.8	149.5	170.8	148.6	177.2
<i>DS, cm</i>	3.76	2.84	3.22	3.08	3.32	2.92	2.92	3.18	2.78	2.90
<i>LS, cm</i>	6.50	5.24	5.78	5.94	5.52	5.30	5.14	5.20	4.86	5.26
<i>PS, gm</i>	40.62	25.78	36.7	33.66	33.98	28.76	28.22	29.44	27.10	29.34
<i>PC, gm</i>	32.64	20.72	27.34	29.60	26.00	26.10	24.46	26.00	21.58	29.70
<i>PM, gm</i>	122.0	72.0	110.1	106.4	98.86	100.2	96.2	115.1	99.3	117.1
<i>GB, %SS</i>	17.2	18.2	18.4	17.0	19.0	17.0	20.2	18.6	20.4	22.2
<i>PS/PF</i>	0.19	0.21	0.21	0.20	0.21	0.19	0.19	0.17	0.18	0.17

*Análisis de AFLP usando el kit provisto por
Invitrogen™ AFLP® Analysis System I*

En las pruebas preliminares se realizaron 35 combinaciones de cebadores de las cuales se seleccionaron 4 como las mejores.

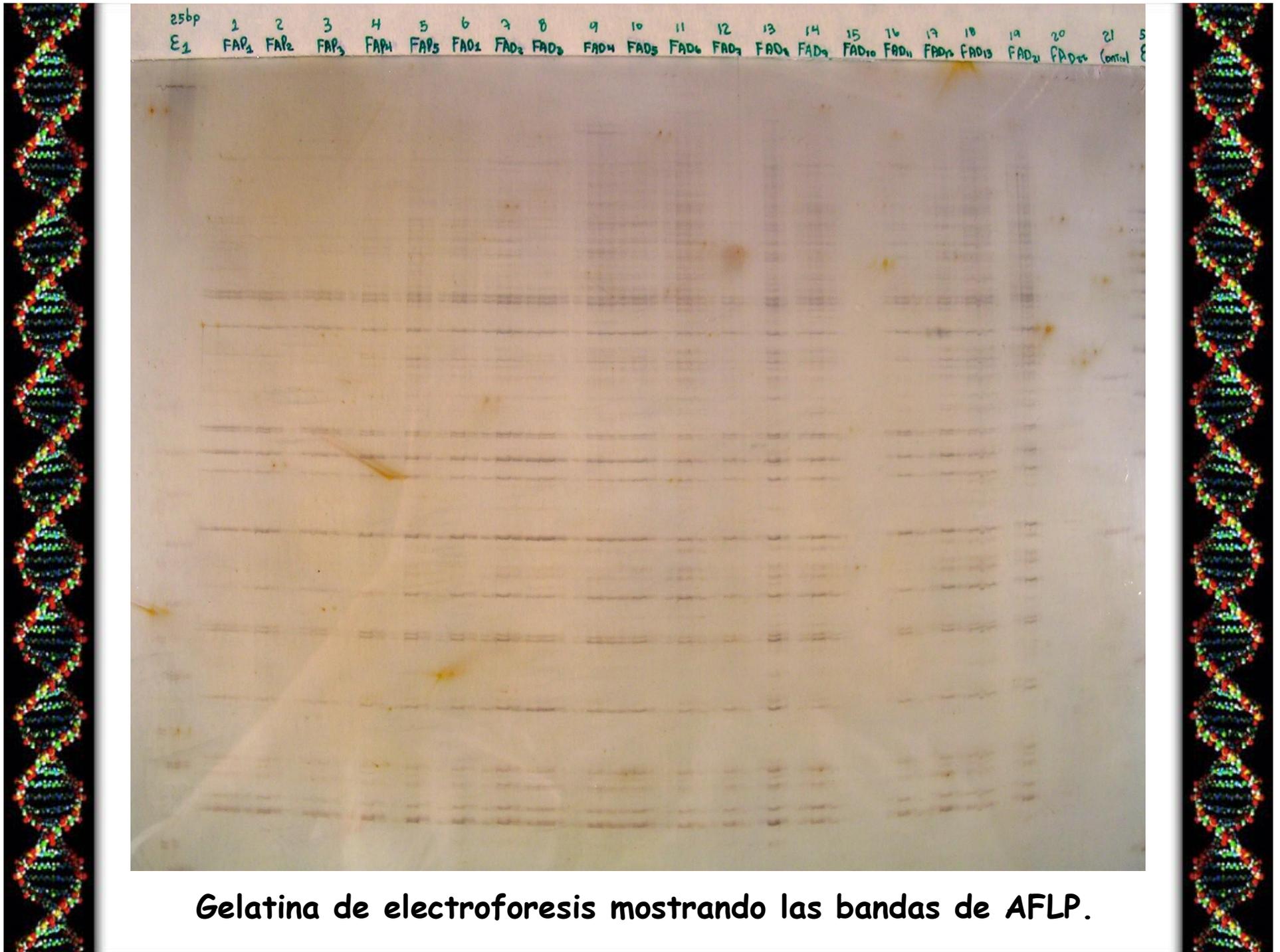
Estas fueron: EAGC-MCTG, EAGG-MCTG, EACA-MCAT y EACA-MCTA.



La combinación de cebadores que se usó en este kit fue **EACA- MCTA** por ser la que mejores resultados dio durante las pruebas preliminares.

Con esta combinación se analizaron las 38 muestras y se obtuvieron excelentes y numerosas bandas polimórficas en las gelatinas





Gelatina de electroforesis mostrando las bandas de AFLP.

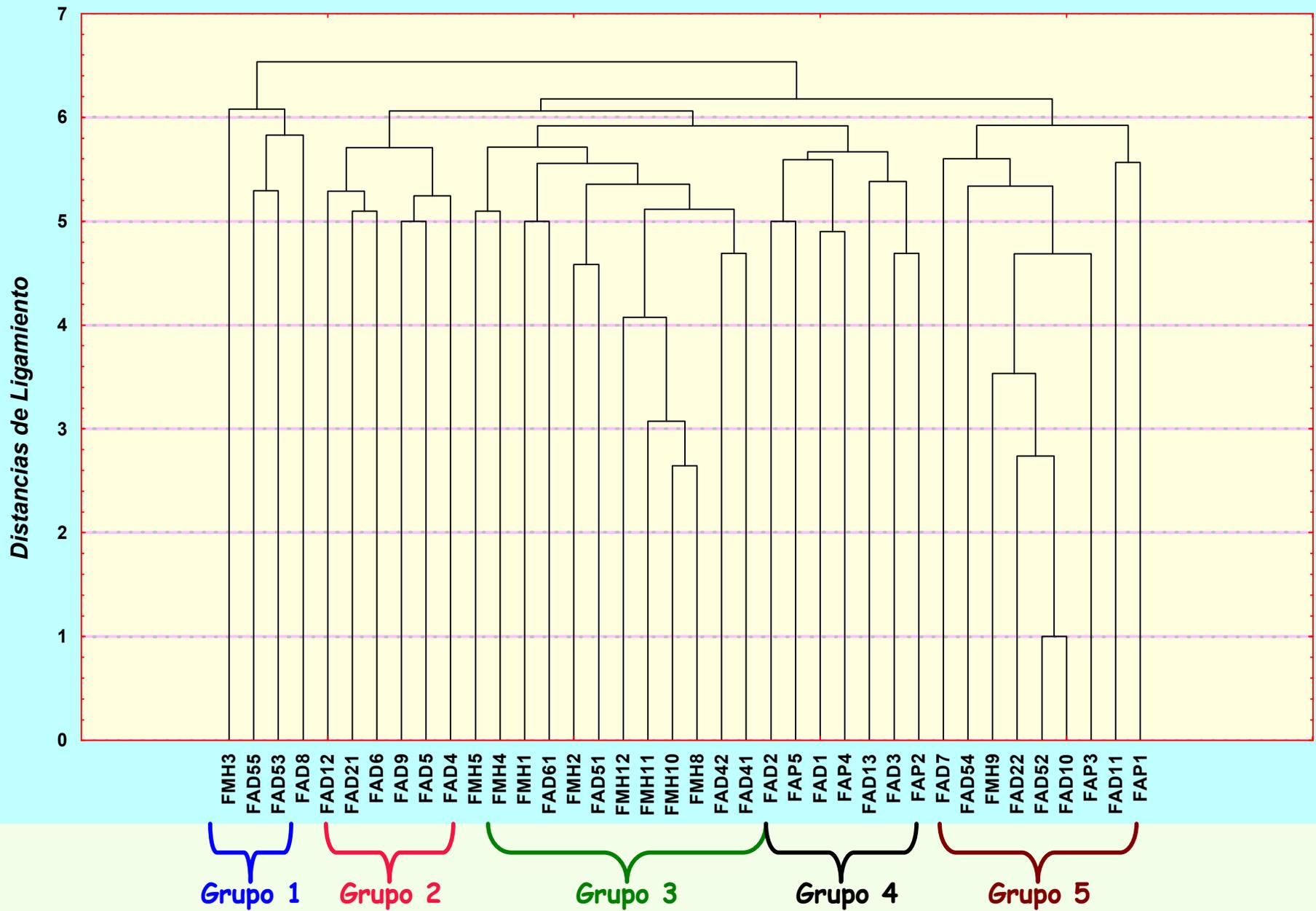


Gelatina de electroforesis mostrando patrones de bandas con diferentes intensidades

Dendrograma para las 38 muestras analizadas

Promedio no ponderado para grupo apareado

Distancias Euclidianas



Selección de árboles

Los árboles seleccionados fueron localizados en los grupos 2, 3 y 5. FAD4 fue localizado en el grupo 2 siendo este árbol diferente a todos los otros del grupo. El grupo 3 incluyó los árboles seleccionados FMH3 y FMH10 los cuales, aunque en el mismo grupo mostraron una gran distancia genética entre sí. El grupo 5 incluyó los árboles seleccionados FAD10 y FAP3 en el cual el árbol FAP3 no tuvo ningún parentesco con el resto del grupo y cuya distancia genética con el FAD10 fue muy pronunciada.



Fingerprinting de AFLP de Cuatro Muestras Seleccionadas

- *Protocolo de PCR Suplido por Invitrogen®*
- *Combinación de Cebadores (Primers): EACA-MCTA*
- *Fecha de Corrida: 06 febrero, 2008*
- *Técnico: Atharva Veda Rosa*
- *Escalera de ADN Marca Promega® de 50 PB*
- *Número de bandas de la escalera: 16*
- *Distancia entre bandas de la escalera (cm):*

Bandas	Cm
1-2	0.3
2-3	0.3
3-4	0.3
4-5	0.3
5-6	0.4
6-7	0.4
7-8	0.5
8-9	0.6
9-10	0.8
10-11	1.1
11-12	1.5
12-13	2.0
13-14	3.0
14-15	1.5
15-16	7.5



Número de bandas de muestras entre bandas de escalera

Bandas de Escalera	Muestra			
	FMH1	FAD4	FMH10	FAD10
-1	0	4	0	0
1-2	0	1	0	0
2-3	0	1	1	0
3-4	1	1	1	0
4-5	1	1	1	0
5-6	0	2	0	0
6-7	0	2	0	1
7-8	0	1	0	1
8-9	0	1	2	1
9-10	3	3	2	0
10-11	2	3	2	0
11-12	2	2	3	2
12-13	2	5	4	1
13-14	7	3	7	2
14-15	10	7	11	5
15-16	4	3	5	4
+16	0	1	0	2
Total de Bandas	32	41	38	19

Isoenzimas

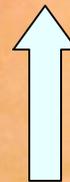
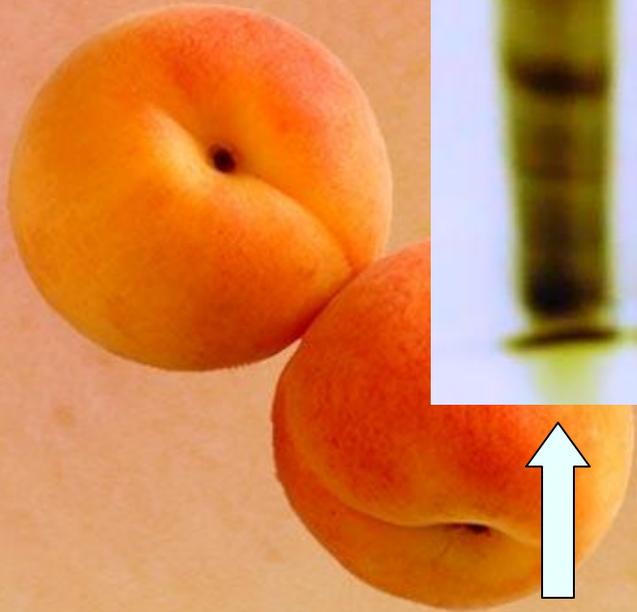
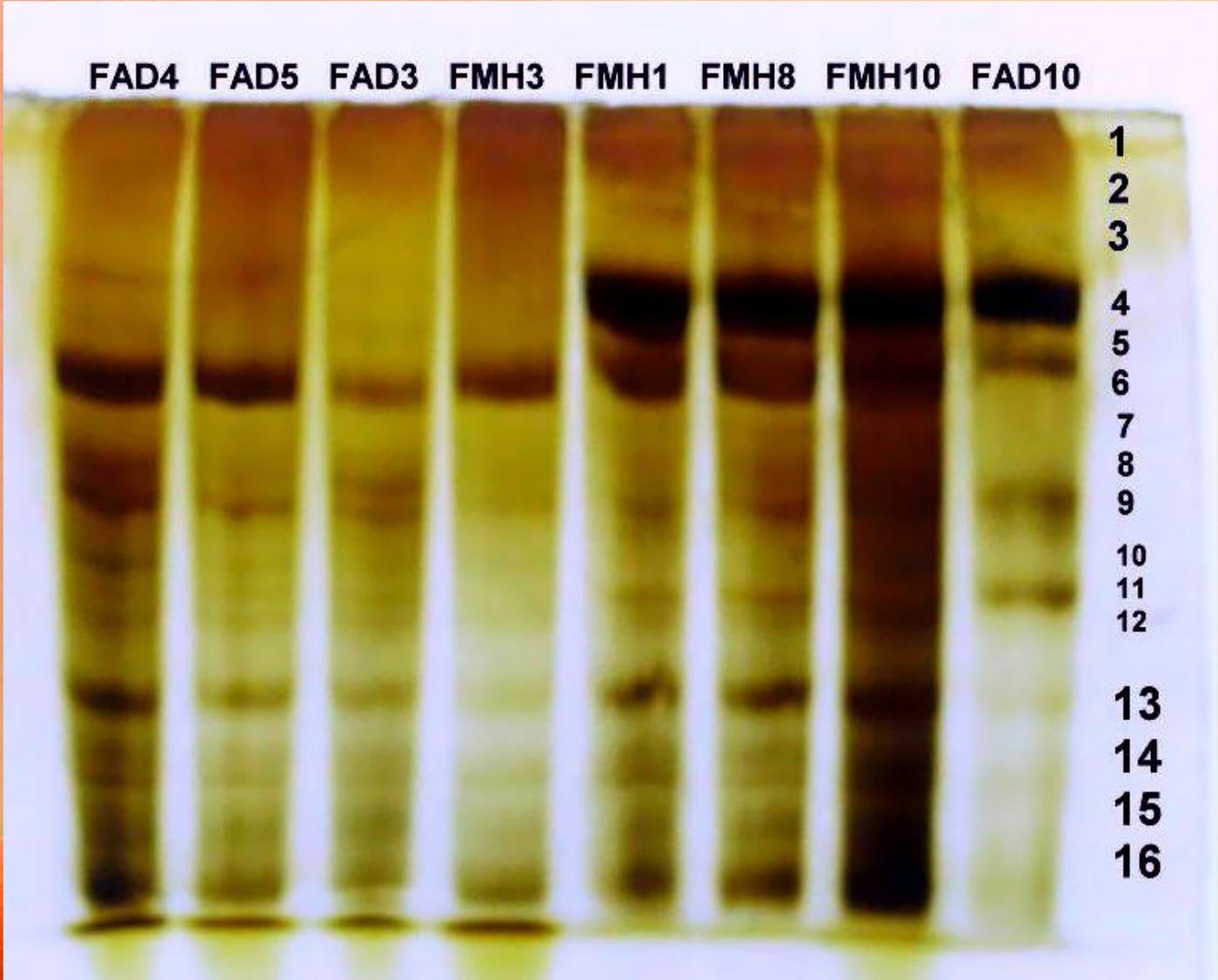
Protocolo de extracción de proteínas:

D.L. Nickrent (Molecular Methods in Plant Biology, Second Edition, 1996. Department of Plant Biology Southern Illinois University) con algunas modificaciones para su adaptación en mango.

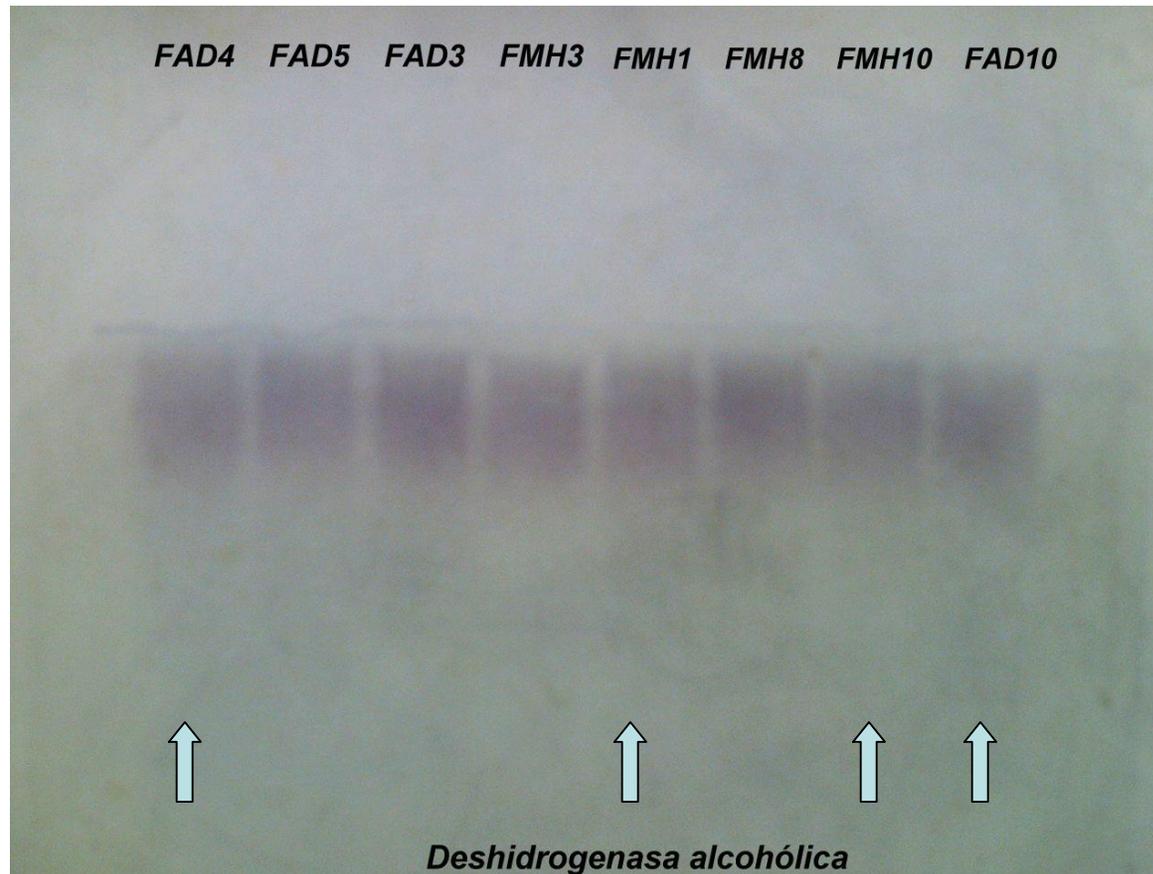
Métodos de tinción:

Para los métodos de tinción se adaptaron varios procedimientos basados principalmente en los análisis de isoenzimas descritos por Vallejos (1983) y Wendel y Weeden (1989).



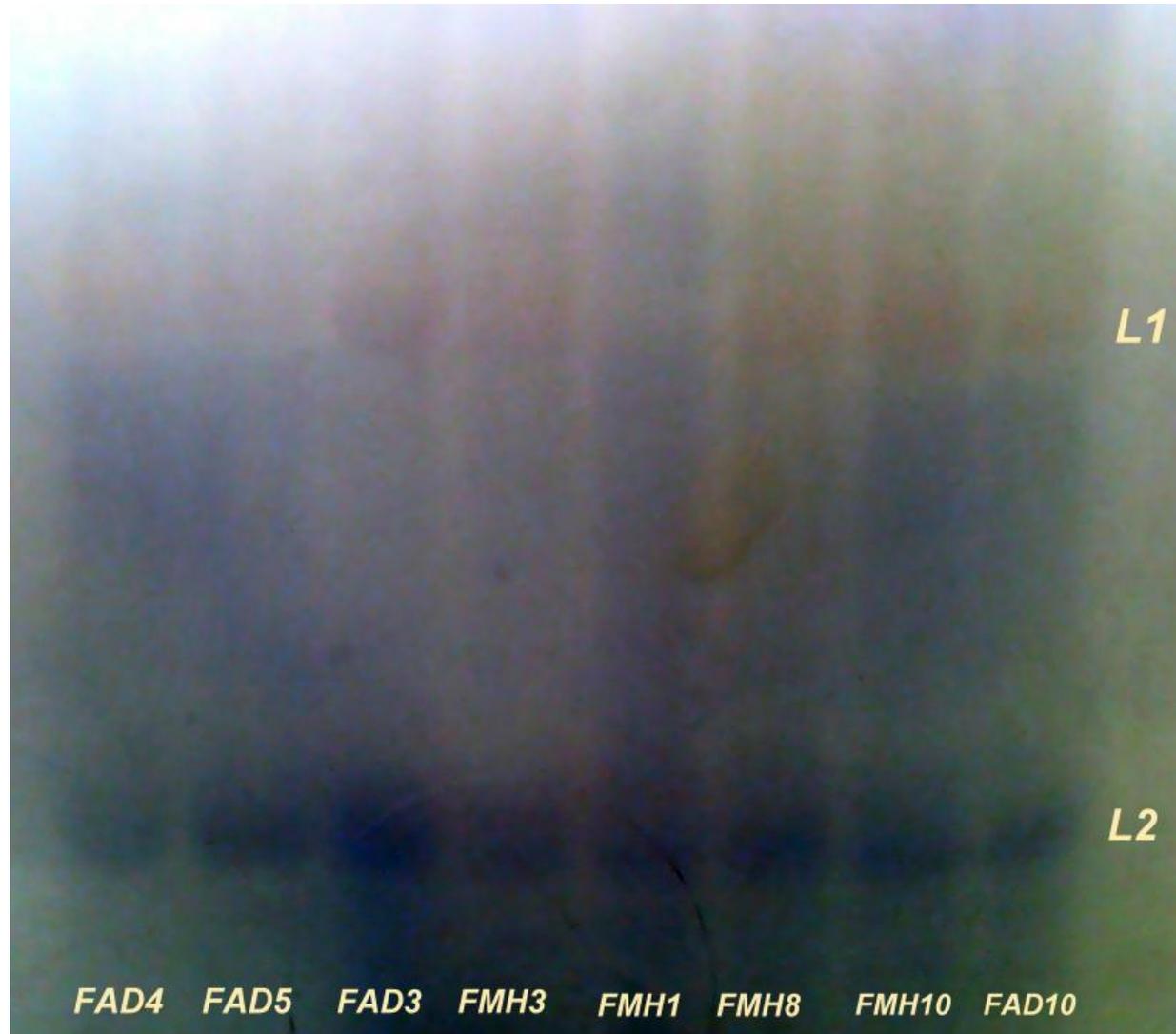


Bandas de la Isoenzima Deshidrogenasa Alcohólica

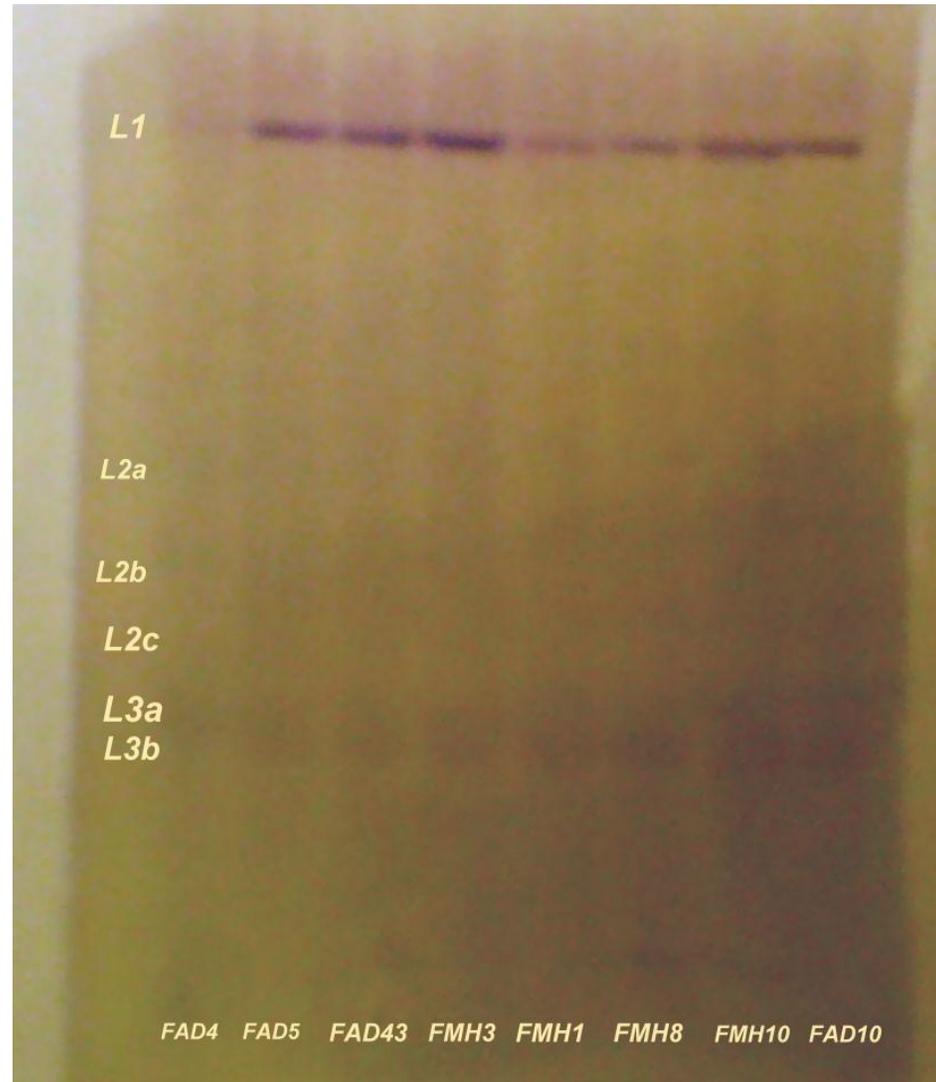


Bandas de Isoenzima Fenol Oxidasa





Gelatina de electroforesis mostrando el patrón de bandas de la isoenzima Deshidrogenasa láctica de las 8 muestras de mango seleccionadas.



Gelatina de electroforesis mostrando el patrón de bandas de la isoenzima Deshidrogenasa glutámica de las 8 muestras de mango seleccionadas.

Conclusión



- Los árboles seleccionados fueron debidamente identificados, y deberán ser cuidados y acondicionados para que sirvan de suplidores de yemas en programas de propagación de la variedad.
- A los cuatro árboles seleccionados se les practicó un análisis de AFLP individual el cual se muestra en la tabla de "fingerprinting" mostrada más arriba.



Es recomendable continuar estos trabajos de caracterización en otras fincas, no sólo con los mangos banilejos sino con otras variedades criollas que tienen un alto potencial comercial.



Agradecimiento

- El autor quiere expresar su agradecimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales no sólo por el apoyo financiero que brindó a este proyecto, sino por el entusiasmo que siempre mostró en la realización del mismo y por la extensión del plazo otorgado para la finalización del mismo. Va nuestro agradecimiento particular **al Profesor Ing. Gabriel Domínguez** por su apoyo continuo al proyecto y su comprensión en las razones de atraso en la finalización.
- **Al Ing. Agron. Rafael Matos** por su colaboración en el análisis estadístico de los datos.
- A todo el personal del IIBI y del CEBIVE que colaboraron para llevar a cabo este proyecto y en especial **a la Dra. Bernarda Castillo** por su decidido apoyo al proyecto y por su pronta respuesta a las solicitudes de compra de materiales y equipos que facilitó que el atraso no fuera más prolongado y al Ing. **Félix Rivas** por su continuo apoyo moral.
- Al Cluster de Mango por darnos su aval en esta investigación y en particular **al Dr. Mois Haché**, al señor **Angel Peguero** y al señor **Amable Díaz** por permitirnos usar sus fincas en la recolección de muestras y por su apoyo incondicional que nos brindaron.

Muchas Gracias