

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



Investigador principal:

José R. Núñez, Ph.D. (IIBI)

Investigadores Asociados:

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

Lic. Guarina DelMonte (IIBI)

Ing. Ineko Hodai (IIBI)

Antecedentes



El mango banilejo se produce principalmente en la provincia Peravia, tomando su nombre de la común cabecera, Baní.

Esta variedad es muy heterogénea por la diversidad de formas y tamaños que encontramos en cualquier finca que visitemos.



Objetivo General



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

Metodología de selección

Para garantizar una buena uniformidad debemos seleccionar clones con las mismas características morfológicas y fisiológicas, y para esto se necesita una herramienta precisa como lo es la biología molecular.



Justificación



- 1) Alta demanda en el exterior
- 2) Variedad muy heterogénea
- 3) Hay que garantizar la uniformidad a los mercados
- 4) La caracterización por marcadores es una actividad nueva en el país

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).



Muestreo

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

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



Muestreo: Material Vegetal



a)



b)



c)

Tipos de hojas:

a) Muy viejas

b) Muy tiernas

c) Estado maduro perfecto

Transporte Muestras

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 .



Procesamiento de las muestras

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.

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			

Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo usando un protocolo de D.L. Nickrent (Molecular Methods in Plant Biology, Second Edition, 1996.

Department of Plant Biology Southern Illinois University) el cual se modificó y se adaptó para su uso en mango por ser esta una planta muy difícil para la extracción de ADN.

Purificación y cuantificación de ADN

El ADN se re-purificó con fenol:cloroformo:isoamílico dos veces dando como resultado un ADN de muy buena calidad. La cuantificación del ADN se realizó a través de un proceso de espectrofotometría con un espectrofotómetro marca BECKMAN COULTER Modelo DU Series 700 UV/Vis de rastreo (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California USA).



Preparación de la muestra



Pesado de la muestra



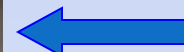
Molida de la muestra



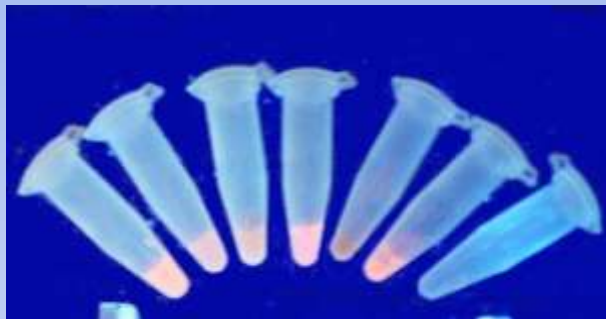
Extracción



Filtrado



Purificación



Prueba cualitativa



Cuantificación

10/06/2013

Análisis de AFLP



El proceso de AFLP se llevó a cabo con un kit para tales fines provisto por Invitrogen Corporation (invitrogen™ AFLP® Analysis System I), Carlsbad, CA, siguiendo el protocolo incluido en éste.

Los ciclos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador marca Genius (Techne Incorporated, New Jersey, 08540-6328, USA).

Electroforesis



La electroforesis se corrió en una cámara vertical marca FisherBiotech modelo FB-SEQ-3345 (Fisher Scientific, Pittsburg, Pa, USA) y la tinción se realizó con nitrato de plata al 0.2% por 20 minutos después de haberse oxidado con ácido nítrico (1%) por 3 minutos.

La preservación de las gelatinas para su lectura se hizo por tratamiento con metanol al 10% por 15 minutos,

Resultados Logrados

Se utilizaron tres (3) fincas propiedad de miembros del cluster de mango de la República Dominicana que fueron los siguientes:

- Amable Diaz con 22 muestras
- Mois Haché con 12 muestras
- Angel Peguero con 5 muestras.

Resultados:

A cada árbol seleccionado para análisis de 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:

Resultados Morfológicos

Parámetro	Promedio
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

Resultados ...

De acuerdo a los datos obtenidos en los análisis fenotípico, 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.



Promedio de las diez muestras seleccionadas (segunda cosecha).

Muestra Parámetro	FMH1	FMH8	FMH10	FMH12	FAD3	FAD4	FAD5	FAD10	FAP2	FAP3
DF, cm	6.84	5.04	5.84	5.90	5.62	5.56	5.52	5.96	5.42	5.94
LF, cm	8.5	6.72	7.5	7.96	6.96	7.08	6.94	6.96	6.70	7.22
PF, gm	181.1	119.16	176.88	172.04	158.2	155.8	149.54	170.78	148.56	177.24
DS, cm	3.76	2.84	3.22	3.08	3.32	2.92	2.92	3.18	2.78	2.90
LS, cm	6.5	5.24	5.78	5.94	5.52	5.30	5.14	5.20	4.86	5.26
PS, gm	40.62	25.78	36.7	33.66	33.98	28.76	28.22	29.44	27.10	29.34
PC, gm	32.64	20.72	27.34	29.60	26.00	26.10	24.46	26.00	21.58	29.70
PM, gm	122.04	72.02	110.1	106.44	98.86	100.24	96.24	115.10	99.34	117.12
GB, %ss	17.2	18.2	18.4	17.0	19.0	17.0	20.2	18.6	20.4	22.2
PS/PF	0.19	0.21	0.21	0.20	0.21	0.19	0.19	0.17	0.18	0.17

Selección

Los árboles FMH1 y FMH10 de la finca del señor Mois Haché fueron preseleccionado por sus cualidades al igual que los árboles FAD4 y FAD10 de la finca del señor Amable Días y el árbol FAP3 de la finca del señor Ángel Peguero.



Análisis de AFLP

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

Estas fueron:

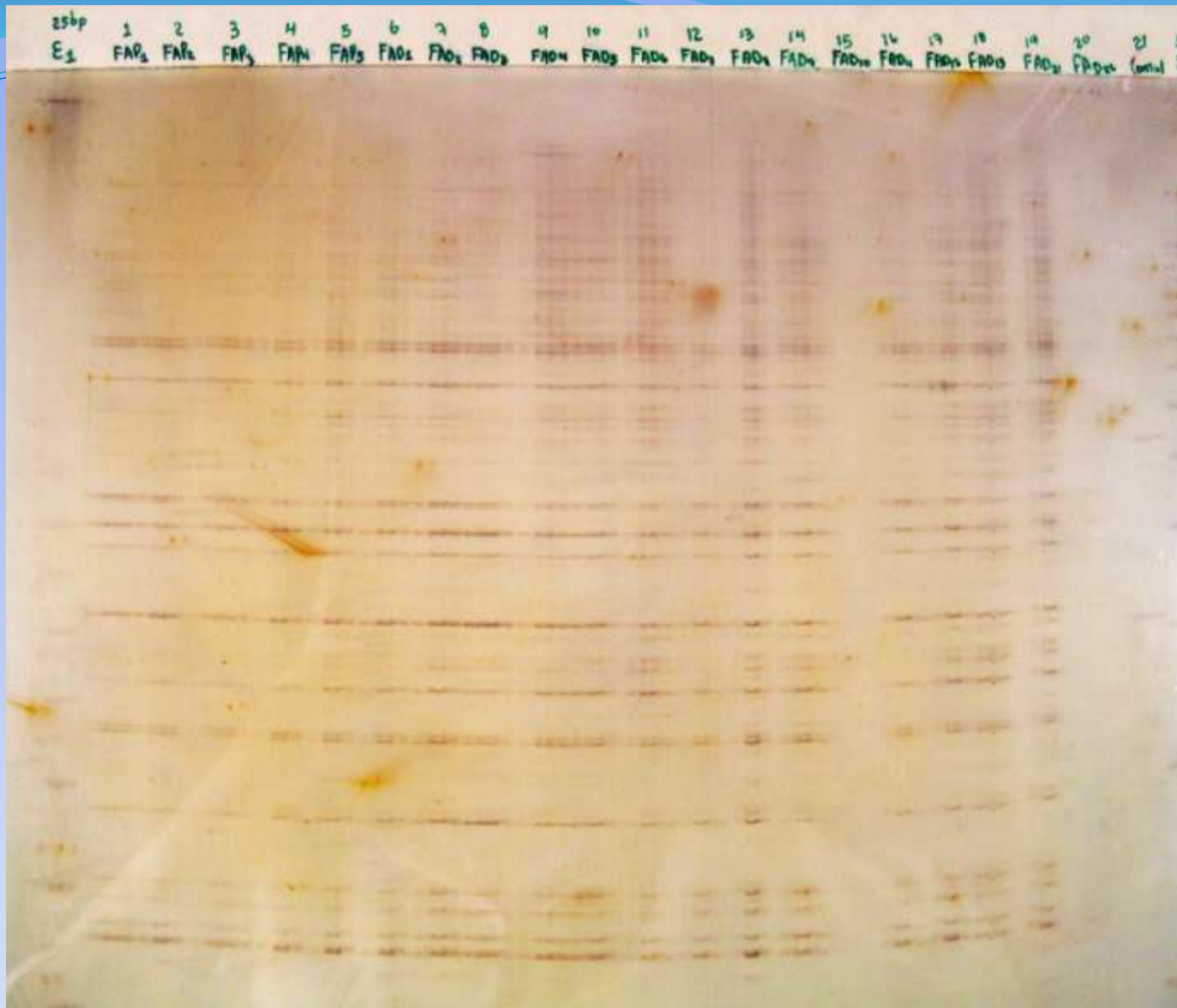
EAGC-MCTG, EAGG-MCTG, EACA-MCAT y

EACA-MCTA.

(E = EcoRI; M = MseI)

Análisis de AFLP...

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 (parcial).

Patrones de Bandas

Muestra											Posición Bandas
FAP1	FAP2	FAP3	FAD4	FAD5	FAD6	FMH1	FMH2	FMH3	FMH4	FMH5	
			—		—						1
					—						2
					—						3
—	—		—	—	—	—			—	—	4
			—	—	—	—	—	—	—	—	5
		—	—	—	—		—	—		—	6
		—		—	—			—	—	—	7
	—		—	—	—		—		—	—	8
	—			—	—			—	—		9
—	—		—	—	—			—			10
—	—	—		—	—			—			11
—	—		—	—	—			—			12
		—	—	—	—					—	13
—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	14
			—		—	—	—		—	—	15
—			—		—	—	—	—	—		16
	—		—	—	—	—		—	—		17
—				—	—	—	—		—		18
			—	—	—					—	19
—	—	—		—	—			—	—	—	20
			—	—	—		—		—		21
—		—	—	—	—					—	22
			—	—	—		—	—		—	23
—	—	—	—	—	—	—			—	—	24
					—	—		—			25
—	—		—	—	—	—	—	—	—		26
			—						—		27
—	—	—	—	—	—		—				28
						—	—	—			29
—			—		—			—	—	—	30

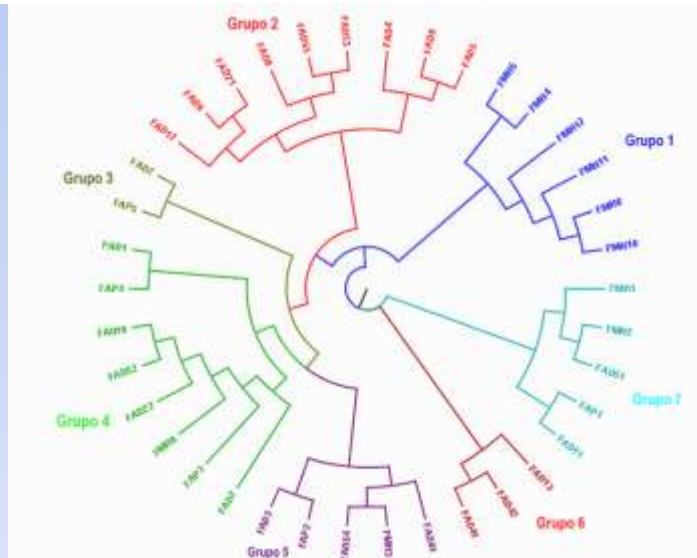
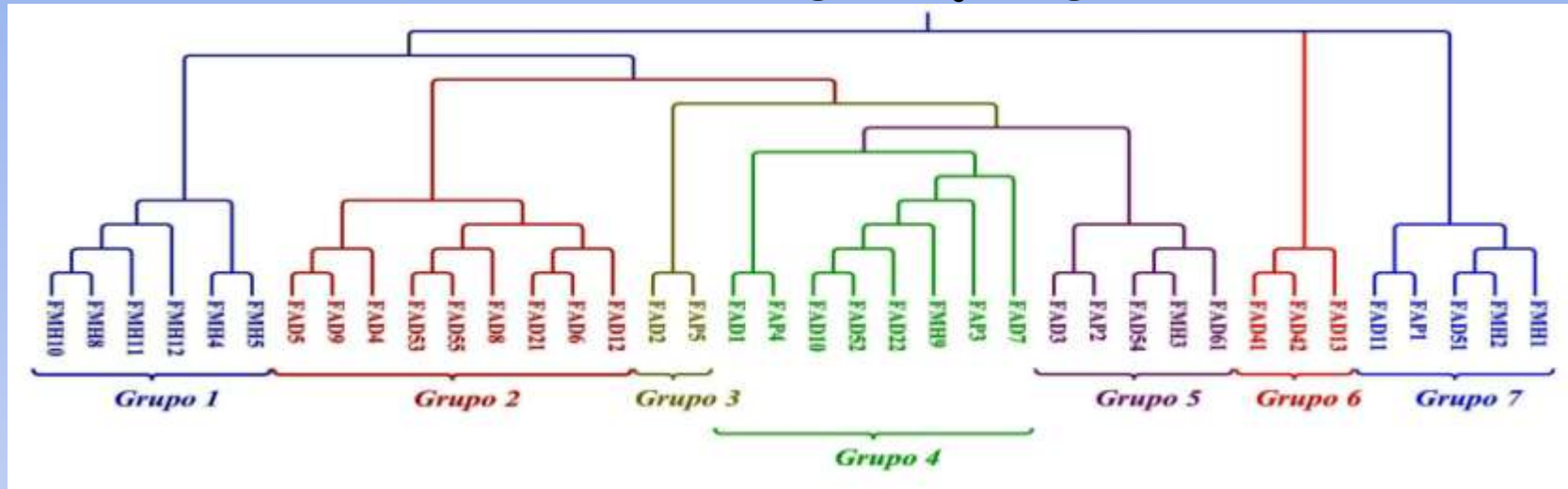
Representación diagramático parcial de los patrones de banda obtenidos en la corrida de electroforesis en gelatina de poliácridamida de los AFLP.

Matriz Generada

Banda Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
FAP1	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	0/0	1/1
FAP2	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0
FAP3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0
FAP4	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	0/0
FAP5	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
FAD1	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	0/0
FAD2	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
FAD3	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0
FAD4	1/1	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	0/0	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
FAD5	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0
FAD6	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
FAD7	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0
FAD8	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
FAD9	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
FAD10	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
FAD11	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	1/1
FAD12	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
FAD13	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1
FAD21	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
FAD22	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
FAD41	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	1/1	1/1
FAD42	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	1/1	1/1
FAD51	0/0	0/0	1/1	0/0	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	1/1	0/0	1/1	1/1

Dendrograma para las 38 muestras analizadas

Shared alleles- Neighbor joining Tree



Selección de árboles

Los árboles seleccionados fueron localizados en los grupos 1, 2, 4 y 7. FAD4 fue localizado en el grupo 2 siendo este árbol diferente a todos los otros del grupo. El grupo 4 incluyó los árboles seleccionados FAP3 y FAD10 los cuales, aunque en el mismo grupo mostraron una gran distancia genética entre sí. El grupo 1 incluyó el árbol seleccionado FMH10 y el Grupo 7 incluyó el árbol FMH1 el cual no tuvo ningún parentesco con el resto del grupo.

Fingerprinting de AFLP de Cuatro Muestras Seleccionadas

➤ <i>Protocolo de PCR</i> <i>Suplido por</i> <i>Invitrogen®</i> ➤ <i>Combinación de</i> <i>Cebadores (Primers):</i> <i>EACA-MCTA</i> ➤ <i>Fecha de Corrida: 06</i> <i>febrero, 2008</i> ➤ <i>Técnico: Atharva</i> <i>Veda Rosa</i> ➤ <i>Escalera de ADN</i> <i>Marca Promega® de</i> <i>50 PB</i> ➤ <i>Número de bandas de</i> <i>la escalera: 16</i> ➤ <i>Distancia entre</i> <i>bandas de la escalera</i> <i>(cm):</i>	Bandas	Cm	Muestra				
			Bandas de Escalera	FMH1	FAD4	FMH10	FAD10
	1-2	0.3	-1	0	4	0	0
	2-3	0.3	1-2	0	1	0	0
	3-4	0.3	2-3	0	1	1	0
	4-5	0.3	3-4	1	1	1	0
	5-6	0.4	4-5	1	1	1	0
	6-7	0.4	5-6	0	2	0	0
	7-8	0.5	6-7	0	2	0	1
	8-9	0.6	7-8	0	1	0	1
	9-10	0.8	8-9	0	1	2	1
	10-11	1.1	9-10	3	3	2	0
	11-12	1.5	10-11	2	3	2	0
	12-13	2.0	11-12	2	2	3	2
	13-14	3.0	12-13	2	5	4	1
	14-15	1.5	13-14	7	3	7	2
	15-16	7.5	14-15	10	7	11	5
			15-16	4	3	5	4
			+16	0	1	0	2
			Total de Bandas	32	41	38	19

Conclusión

- Con este trabajo se demostró la gran variabilidad genética de una variedad de mango no seleccionada, y la cual ha sido propagada básicamente por semilla.
- 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 (CONIAF) no sólo por el apoyo financiero que brindó a este proyecto, sino por el entusiasmo que siempre mostró en la realización del mismo.

Va nuestro agradecimiento particular al Profesor Ing. Gabriel Domínguez por su apoyo continuo al proyecto.

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, y al Ing. Félix Rivas por su continuo apoyo moral.

Al Clúster de Mango por darnos su aval en esta investigación y en particular al Dr. Mois Haché 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