

# Análisis de variabilidad genética del huerto padre del mango (*Mangifera indica* Linn) variedad Ataúlfo

## *Analysis of genetic variation of orchard father of mango (Mangifera indica Linn) Ataulfo variety*

Miguel Salvador Figueroa<sup>1</sup>  
Rodolfo Torres de los Santos  
Isidro Ovando Medina  
José Alfredo Vázquez Ovando  
María de Lourdes Adriano Anaya

### RESUMEN

Por la calidad del fruto, el cultivo de la variedad Ataúlfo de mango (*Mangifera indica* L) se extiende, en México, desde Chiapas hasta Sinaloa. El material empleado para el establecimiento de los cultivos, provino de ocho individuos (Huerto Padre) descendientes del árbol original. La ausencia de un programa sistemático que controle el origen, distribución y seguimiento del material vegetal ha dado como resultado la existencia de árboles de mangos Ataúlfo de origen indefinido. Con el reconocimiento a la denominación de origen para el mango Ataúlfo del Soconusco, Chiapas, resulta necesario contar con marcadores inequívocos que certifiquen dicha variedad. En este sentido los marcadores moleculares resultan ideales. Para generar dichos marcadores primeramente hay que demostrar que los individuos del huerto padre tienen un mismo origen. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la variabilidad genética de los árboles del huerto padre de *Mangifera indica* L. variedad Ataúlfo. Para ello se estudió el patrón de amplificación aleatoria empleando los iniciadores de la serie A de Operon Technologies. Primeramente se estandarizó el procedimiento de extracción de DNA genómico y posteriormente se seleccionaron los mejores iniciadores. Los patrones de amplificación con los iniciadores OPA-04, OPA-05, OPA-08, OPA-10, OPA-13, OPA-15, OPA-17 y OPA-18, generaron un total de 62 productos, cuyo tamaño osciló entre 297.5 pb y 1924.5 pb. El análisis de los fragmentos permitió construir un dendrograma con 93.7% de similitud entre los individuos analizados y los separó en dos grupos principales.

**Palabras clave:** mango, Ataúlfo, RAPD, paterno.

### ABSTRACT

Due to the quality of the fruit, the harvest of the Ataulfo variety of mango (*Mangifera indica* L) goes from Chiapas to Sinaloa, in Mexico. The material used for the establishment of the crops came from eight individuals (the Orchard Father) descending from the original tree. The absence of a systematic program to control the origin, distribution and followup of the vegetable material has had as a consequence the existence of Ataulfo mango trees of indefinite origin. With the recognition to the designation of origin for the Ataulfo mango of the Soconusco Region, Chiapas, it is necessary to have unequivocal markers that certify this variety. For this purpose, the molecular markers are ideal. In order to generate such markers, firstly it is necessary to demonstrate that the individuals of the garden father have one same origin. Therefore, the objective of the present work was to determine the genetic variability of the trees of the garden father of *Mangifera indica* L. Ataulfo variety. The pattern of random amplification was studied by using the initiators of the "A" series of Operon Technologies. Firstly the procedure of extraction of genomic DNA was standardized and later on the best initiators were selected. The amplification patterns with the initiators OPA-04, OPA-05, OPA-08, OPA-10, OPA-13, OPA-15, OPA-17 and OPA-18, generated a total of 62 products whose size oscillated between 297.5 bp and 1924.5 bp. The analysis of the fragments allowed building a dendrogram with 93.7% of similarity among the analyzed individuals and it separated them in two main groups.

**Key words:** mango, Ataulfo, RAPD, paternal.

### INTRODUCCIÓN

Chiapas es un estado rico en biodiversidad, donde la interacción de ésta con los factores agroecológicos del trópico húmedo ha estimulado el desarrollo de especies endémicas y exóticas de plantas y animales con características únicas. Tal es el caso del mango (*Mangifera indica* L.) variedad Ataúlfo. Aparentemente originario de la ciudad de Tapachula, en la región Soconusco, situada en la llanura costera del océano Pacífico del estado de Chiapas, México, la variedad Ataúlfo se ha consolidado como uno de los cultivos

frutícolas más importantes del estado, convirtiéndose en un pilar del desarrollo económico y social de la región y de Chiapas. En el estado se cultivan aproximadamente 27 000 hectáreas de esta variedad (Sagar-Inifap-Produce, 2006) equivalente a 83% del área total cultivada con este frutal en toda la región y cuyo volumen anual de producción oscila en las 200 000 toneladas, por lo que ha generado diversas fuentes de empleo directo e indirecto.

La calidad del mango variedad Ataúlfo ha favorecido su incorporación en el mercado nacional e internacional siendo altamente competitivo

<sup>1</sup> Centro de Biociencias. Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera a Puerto Madero Km. 2.0. Tapachula, Chiapas, México. CP 30700. Tel. y Fax: +52 (962) 642 79 72 correo-e: msalvad@hotmail.com



y apreciado. El 11 de febrero de 2003, el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial publicó la Declaración de Protección de la Denominación de Origen Mango Ataúlfo del Soconusco, Chiapas con objeto de proteger el desarrollo de los productores de mango del estado obteniendo ventajas competitivas que conduzcan a mayor rentabilidad y con ello darle al estado el sello distintivo que lo caracterice e identifique como el productor originario de dicho mango, fortaleciendo su comercialización y otorgando seguridad legal al productor chiapaneco (IMPI, 2003).

Aunque el origen de la variedad Ataúlfo es incierto, se tiene conocimiento (no documentado) de que el primer árbol creció en el centro de la ciudad de Tapachula, Chiapas, en el predio del señor Ataúlfo Morales Gordillo. Actualmente sobreviven ocho árboles, todos derivados de semilla, que constituyen el Huerto Padre (Instalaciones de la Fundación Produce Chiapas, A.C.) de los cuales se han obtenido yemas y varetas para propagar este material en toda la región del Soconusco.

La comercialización de mango con características similares al mango Ataúlfo hace necesaria la aplicación de técnicas que certifiquen la autenticidad del producto. Los procedimientos tradicionales para la identificación de cultivares de mango están basados en rasgos morfológicos, pero la interpretación de estos rasgos es subjetiva y su evaluación es difícil (Singh, 1969). Los marcadores moleculares presentan la ventaja de ser ilimitados en número, además de no ser afectados por el ambiente y condiciones de crecimiento y presentar herencia simple (Nuez y Carrillo, 2000). Las enzimas pueden ser empleadas como marcadores moleculares y su presencia o ausencia dan la pauta específica para la identificación varietal. Recientemente, Gálvez-López, Adriano-Anaya, Villareal-Treviño, Mayek Pérez y Salvador-Figueroa (2007) caracterizaron isoenzimáticamente material de diversas variedades y tipos de *M. indica* de la región Soconusco, Chiapas, México, empleando en conjunto las enzimas glucosa-6-fosfato isomerasa 1 y 2, encontrando un patrón inequívoco para la variedad Ataúlfo, concluyendo que la rama filogenética de los mangos Ataúlfo de estos mangos se sitúa cerca de las variedades "Criollo" y "Tomy Atkins".

En los últimos años, la aplicación de técnicas basadas en el polimorfismo del ADN han tenido gran auge. Numerosos han sido los trabajos que han aplicado la técnica RAPD-PCR en

*Mangifera indica* y en diversas plantas (Adato, Sharon, Lavi, Hillel y Gazit, 1995; López-Valenzuela, 1996; Correa, Gonçalves, Faleiro y Moreira, 1997; Caixeta, Alves, Rodrigues y Tsai, 2001; Korbin, Kuras y Zurawicz, 2002; Nowosielski Podyma y Nowosielska., 2002; Ho, Ou, Yang y Hsiao, 2002; Karihaloo, Dwtvedi, Archak y Gaikwad, 2003).

En 1996, López-Valenzuela determinó la diversidad genética de 15 variedades comerciales de mango de diferentes regiones geográficas (México, Filipinas y Florida) mediante marcadores moleculares obtenidos por la amplificación al azar (RAPD, por sus siglas en inglés). Agrupó los cultivares en cuatro grupos principales de acuerdo con su origen geográfico, siendo la mayoría afines con el grupo de Florida, con excepción de la variedad Ataúlfo y Manililla que presentaron mayor similitud con el grupo de Filipinas. Aunado a esto, en 2003, Karihaloo *et al*, estudiaron la diversidad genética de 29 cultivares de mango (*M. indica* L.) de la India usando marcadores RAPD, agrupando los cultivares provenientes del norte con los de este, separados de los del sur que se agruparon con los del oeste. Encontraron 94.7% de variación molecular entre los individuos dentro de las regiones y 5.3% entre las regiones. Se piensa que los RAPD pudieran ser una alternativa para determinar la variabilidad genética de los árboles del huerto padre de la variedad Ataúlfo de mango y emplearlos como marcadores inequívocos para la certificación de dicha variedad.

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue determinar la variación molecular entre los árboles constituyentes del Huerto Padre de *Mangifera indica* L. var. Ataúlfo, mediante marcadores RAPDs.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de ADN genómico

El material vegetal fue obtenido de los árboles que constituyen el Huerto Padre del parque temático administrado por la Fundación Produce Chiapas, A.C. en la ciudad de Tapachula, Chiapas (164 msnm, Latitud Norte 14° 54' 16.3", Longitud Oeste 92° 15' 33.9") y transportado en hielo hasta las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del Centro de Biociencias de la UNACH. El ADN genómico fue extraído de hojas jóvenes empleando el método del Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) de acuerdo con



el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones [Polivinil Pirrolidona (PVP) 0.2%, proteinasa K 1%, CTAB 2% (p/v), NaCl 1.4M, 2-mercaptoetanol 0.3% (v/v), EDTA 20mM, Tris-HCl 100mM, pH 8.0, ARNasa 30 mg/ml]. La integridad del genoma se corroboró por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% a 80 V (Cámara de Electroforesis horizontal Midicel® PRIMOTM™ EC 330, POWER-PAC BIO-RAD 200) y tinción con bromuro de etidio. Las edades aproximadas (no corroboradas) de los árboles que constituyen el Huerto Padre de *M. indica* var. Ataúlfo son: A= 70 años B= 70 años; C= 50 años; D= 30 años; E= 70 años; F= 50 años; G= 30 años; H= 30 años.

### Cuantificación de ADN

La concentración de ADN se determinó empleando un espectrofotómetro Spectronic® 21D (Spectronic Instruments), a 260 y 280 nm de longitud de onda, como lo señalan Valadez y Kahl (2000).

### ADN polimórfico amplificado al azar

La amplificación al azar del ADN se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un volumen de mezcla de reacción de 50 µL compuesta de 50 ng de ADN, 10mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), buffer 10X, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 nM Iniciador (Serie A de la Compañía Operon Technologies) y 5 U Taq (Taq DNA Polymerase Mod. M1865A, PROMEGA). Las amplificaciones fueron realizadas en un Termociclador Bio-Rad (i-Cycler Modelo 6549) programado para 40 ciclos 1 min a 95 °C, 1 min a 36 °C y 5 min a 72 °C con un periodo de extensión final de 10 min a 72 °C y una temperatura final de almacenamiento de 4 °C por tiempo indefinido. Los productos de la amplificación se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X y se revelaron con bromuro de etidio. El tamaño de las bandas se estimó empleando el marcador de peso molecular Hind III Lambda Digest DNA Estándar (BIORAD C. 967788) y 50pb DNA Stepladder (PROMEGA G4552A). El análisis de las imágenes se realizó empleando el Universal Hood (Chemi-Doc Modelo 170-8126 BIO-RAD) acoplado al software Quantity One® Quantitation Software (The Discovery Series™ BIORAD).

### Selección de oligonucleótidos

A partir de las condiciones de reacción establecidas, un total de 20 decámeros correspondientes a la serie A de la Compañía Operon Technologies (Alameda, CA, USA) fueron probados utilizando el ADN del individuo A. Los oligonucleótidos que mostraron mayor polimorfismo y claridad de las bandas fueron elegidos.

### Análisis de datos

Mediante los patrones de bandas obtenidos con cada oligonucleótido se elaboró una matriz de datos. Los datos fueron registrados como variables discretas utilizando 1 para indicar presencia y 0 para indicar ausencia de una banda en cada uno de los genotipos. A partir de esta matriz ausencia/presencia se determinó una matriz de distancia genética mediante la comparación entre cada par de genotipos utilizando el Coeficiente de similitud de Nei y Li (1979). Una vez establecida la matriz de distancia genética se construyó un dendrograma mediante el análisis de agrupamiento por el método de los promedios aritméticos (UPGMA, por sus siglas en inglés).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ADN genómico extraído tuvo, en promedio, una absorbencia de 1.83 unidades ópticas a 260 nm, correspondiente a una concentración de 91.5 µg/µL de ADN de doble cadena. La calidad (pureza e integridad) que exige la técnica RAPD se corroboró a través de la electroforesis (Figura 1).

### Selección de oligonucleótidos

En la Figura 2 se muestra el patrón de amplificación aleatoria obtenido con los 20 iniciadores empleados en este estudio. Aunque con todos ellos se encontró amplificación, se seleccionaron ocho de ellos, tomando como criterio la claridad, robustez y número de bandas. Los iniciadores seleccionados fueron: OPA-04 (48 fragmentos), OPA-05 (47 fragmentos), OPA-08 (41 fragmentos), OPA-10 (56 fragmentos), OPA-13 (40 fragmentos), OPA-15 (42 fragmentos), OPA-17 (70 fragmentos), OPA-18 (49 fragmentos). Los fragmentos amplificados tuvieron como longitud mínima 297.5 pb y 1 924.5 pb como límite superior. El número de fragmentos obtenidos, y su tamaño, hacen posible su utilización de



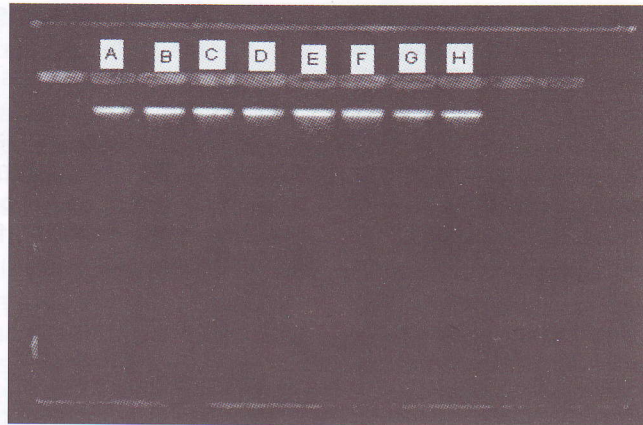


Figura 1. ADN genómico aislado de ocho individuos de *Mangifera indica* var. Ataúlfo. Las literales corresponden a los diferentes individuos localizados en el huerto padre.

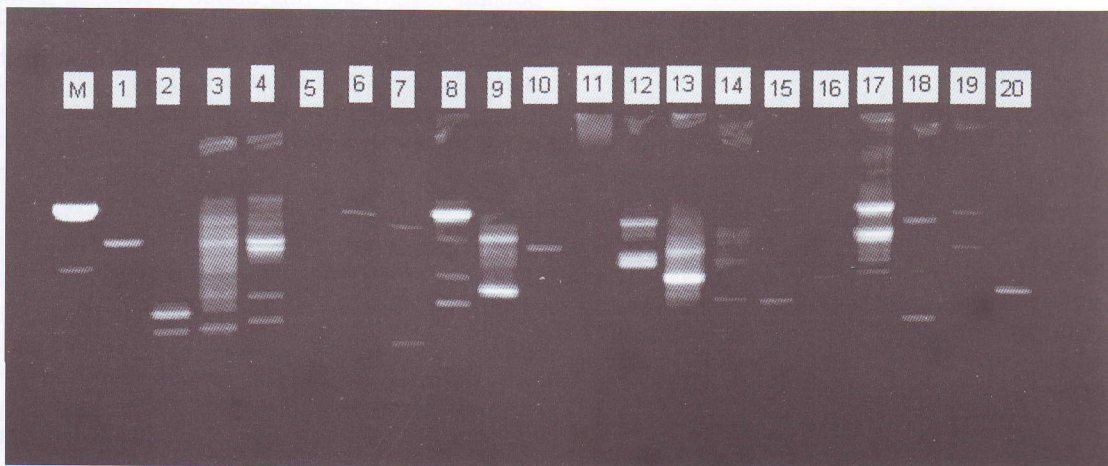


Figura 2. Fragmentos de amplificación aleatoria del genoma de los árboles del huerto padre de mango variedad Ataúlfo. Los números del 1 al 20 representan los diferentes iniciadores de la serie A de Operon Technologies. M= marcador de peso molecular.

acuerdo con los criterios previamente establecidos (Nuez y Carrillo, 2000). Teóricamente, la técnica RAPD-PCR genera patrones constituidos por 20 a 150 fragmentos amplificados con un peso molecular comprendido entre 200 pb y 2 000 pb en función del grado de mutación, deleción o inserciones en el genoma de la especie en cuestión (Nuez y Carrillo, 2000). Los resultados de este estudio están en el rango teórico mencionado, lo que fundamenta su empleo en estudios de caracterización de esta variedad.

En la Figura 3 se muestran los patrones de amplificación aleatoria del genoma de los árboles que constituyen el Huerto Padre, empleando los iniciadores previamente seleccionados. De todos los individuos estudiados, el marcado como "C" (50 años) presentó diversos problemas por lo que se eliminó del estudio.

### Análisis de los marcadores polimórficos

Con los patrones de amplificación anteriores se construyó una matriz binaria de ausencia (0) – presencia (1). El análisis de la matriz binaria permitió la construcción de la matriz de distancia genética, de acuerdo con Nei y Li (1979), arrojando valores que oscilaron desde 0.0252, entre el individuo "G" (30 años) y el individuo "E" (70 años), hasta 0.1215 entre el individuo "B" (70 años) y el individuo "F" (50 años), (Cuadro 1).

El análisis por agrupamiento (Figura 4) colocó a los siete árboles del huerto padre de la variedad Ataúlfo en dos grupos principales. El primer grupo estuvo compuesto por el individuo "B" (70 años), individuo que genéticamente fue el más alejado del resto de los árboles. El segundo grupo lo constituyeron los individuos "D" (30 años) "A" (70 años), "F" (50 años) y "H" (30 años),



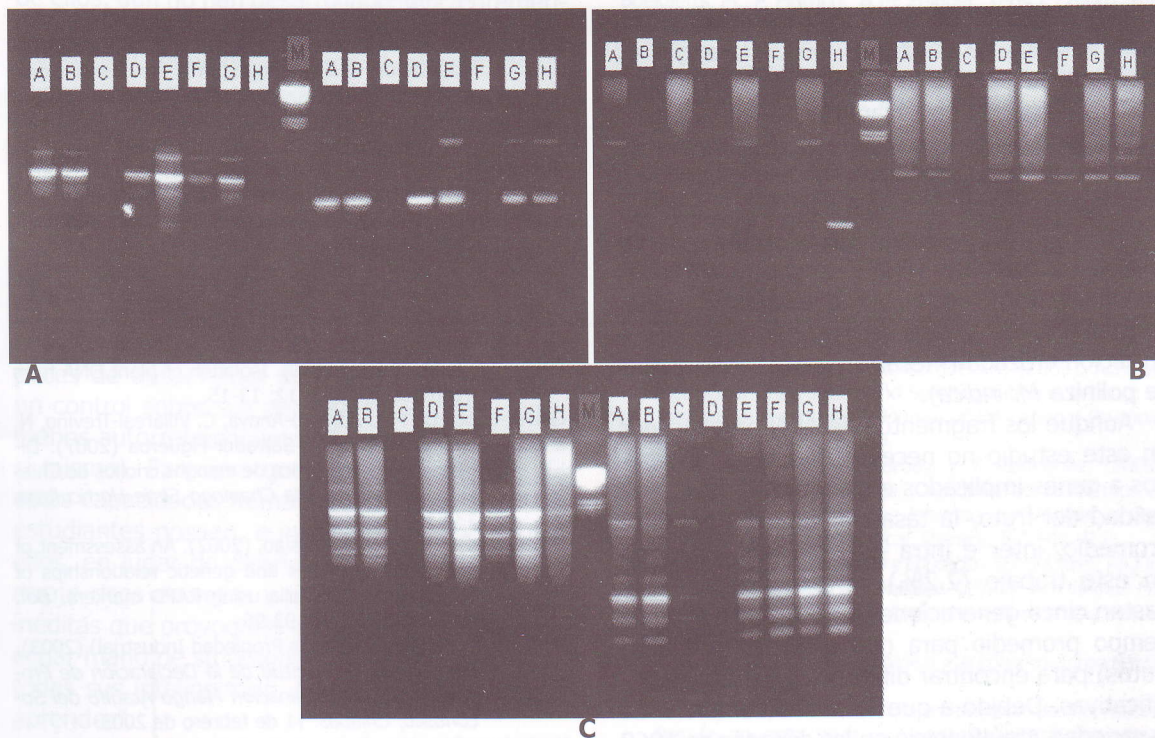


Figura 3. Polimorfismos detectados mediante RAPD en los individuos del huerto padre de la variedad Ataúlfo de mango obtenido mediante el empleo de los oligonucleótidos (A) OPA-08, OPA-10, (B) OPA-13, OPA-15, (C) OPA-17 y OPA-18, respectivamente. A, B, C, D, E, F, G y H = individuos. M = marcador de peso molecular.

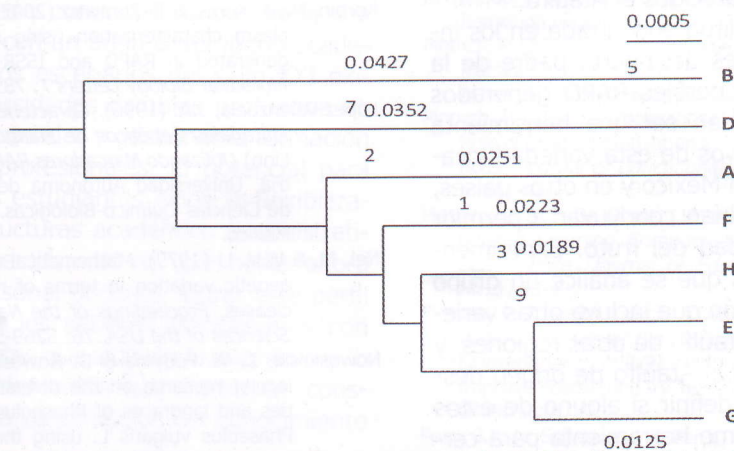


Figura 4. Ubicación (Dendrograma) de los siete individuos del huerto padre de *Mangifera indica* var. Ataúlfo, obtenida mediante análisis de agrupamiento por promedios aritméticos.

"E" (70 años) y "G" (30 años). Los dos últimos individuos fueron los más relacionados.

Por la posición en el dendrograma se pudiera deducir que el árbol "D" es descendiente del árbol "B", los árboles "F" y "H" son descendientes del árbol "A" y el árbol "G" probablemente descienda del árbol "E". La distancia genética promedio entre los individuos "B" y "D" y "A" y "H" fue 0.0075 y 0.0079, respectivamente (media de 0.0077), un indicador de que "D" y "H", ambos de 30 años de

edad, son descendientes de "B" y "A", respectivamente. Por otro lado la distancia genética promedio entre los individuos "A" y "F" fue de 0.0035, lo que indica que en efecto "F" es también un descendiente de "A" y no de "H". Lo anterior también confirma que "F" tiene más edad que "H".

Por otra parte la distancia genética promedio (0.0132) entre los individuos "G" y "E" fue similar a la obtenida entre los pares "BA" y "AE" (0.0172 y 0.0127, respectivamente) y dos veces mayor



a la distancia entre los pares "BD" y "AH". Por lo anterior se puede pensar que el individuo "G" no tiene 30 años de edad, por lo que tampoco es descendiente del individuo "E". Habrá que realizar más investigación para clarificar esa situación.

Independientemente de la inconsistencia observada entre la edad presuntiva y la distancia genética promedio del individuo "G", el porcentaje de disimilitud encontrado entre los siete individuos estudiados (4.3%) sugiere que todos tienen un mismo origen y que la variación genética encontrada podría ser resultante de la polinización cruzada (mecanismo mediante el cual se poliniza *M. indica*).

Aunque los fragmentos de ADN amplificadas en este estudio no necesariamente están ligados a genes implicados en las características de calidad del fruto, la tasa de variación genética promedio, inter e intra generacional, obtenida en este trabajo (2.2%) permite predecir que bastan cinco generaciones sucesivas (4 años de tiempo promedio para que un árbol produzca frutos) para encontrar diferencias genéticas significativas. Debido a que el cultivo comercial de la variedad Ataúlfo inició en las décadas de 1960 a 1970) y la falta de un programa de certificación del origen del material, pudieran explicar la presencia de frutos parecidos al Ataúlfo.

Pese a la alta similitud encontrada en los individuos constituyentes del huerto padre de la variedad Ataúlfo, los perfiles RAPD generados en este estudio podrían ser una herramienta para analizar los cultivos de esta variedad localizados en Chiapas, en México y en otros países, y potencialmente podrían coadyuvar a permitir certificar la autenticidad del fruto. Experimentos adicionales en los que se analice un grupo externo de comparación que incluya otras variedades, muestras de Ataúlfo de otras regiones, y las variedades similares al Ataúlfo de origen desconocido, permitirían definir si alguno de estos marcadores es útil como herramienta para certificación.

## CONCLUSIONES

Los individuos constituyentes del huerto padre del mango variedad Ataúlfo, mostraron 93.7% de similitud.

Los patrones de amplificación polimórfica, obtenidos con los oligonucleótidos seleccionados, permitieron identificar a cada uno de los árboles del huerto padre de la variedad Ataúlfo de mango.

## REFERENCIAS

- Adato A., D. Sharon, U. Lavi, J. Hillel & S. Gazit (1995). Application of DNA fingerprints for identification and genetic analysis of Mango (*Mangifera indica*) genotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 120(2): 259-264.
- Caixeta, M., S. T. Alves, V. Rodrigues y S. M. Tsai (2001). Caracterização da diversidade genética em Feijão por meio de marcadores RAPD. *Pesq. Agropec. Bras.* 36(2): 381-385.
- Correa, R., E. Gonçalves, F.G. Faleiro, & A. Moreira (1997). RAPD-PCR amplification of soybean DNA using pairwise combinations of primers. *Brazilian Journal of Genetics* 20(2) 307-310.
- Doyle, J.J. & J.L. Doyle (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Gálvez-López D., M.L. Adriano-Anaya, C. Villareal-Treviño, N. Mayek Pérez y M. Salvador-Figueroa (2007). Diversidad isoenzimática de mangos criollos de Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 13(1): 71-76.
- Ho, K., C. Ou, J. Yang, & J. Hsiao, (2002). An assessment of DNA polymorphisms and genetic relationships of Casuarina equisetifolia using RAPD markers. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43: 93-98.
- IMPI (Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial) (2003). *Extracto de la Solicitud de la Declaración de Protección a la Denominación Mango Ataúlfo del Sonorusco, Chiapas*. 11 de febrero de 2003.
- Karihaloo, J.L., Y.K. Dwtvedi S. Archak & A.B. Gaikwad. (2003). Analysis of genetic diversity of Indian mango cultivars using RAPD markers. *J. Horticultural Science & Biotechnology* 78(3): 285-289.
- Korbin, M., A. Kuras, & E. Zurawicz (2002). Fruit plant germplasm characterization using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 785-794.
- López-Valenzuela, J.A. (1996). *Caracterización Molecular de Materiales Genéticos de Mango* (*Mangifera indica* Linn) *Utilizando Marcadores RAPDs*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. Culiacán, Sinaloa, México.
- Nei, M. & W.H. Li (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 76: 5269-5273.
- Nowosielski, J., W. Podyma & D. Nowosielska (2002). Molecular research on the diversity of polish varieties and landraces of *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. using the RAPD and AFLP methods. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 7: 753-762.
- Nuez, F. y J.M. Carrillo (2000). *Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal*. Valencia: Editorial Universidad Politécnica de Valencia. pp. 25, 27.
- Sagar-Inifap-Produce. (2006). *Logros y aportaciones de la investigación al cultivo del mango "Ataúlfo" en Chiapas*. Chiapas, México.
- Singh, L.B. (1969). Mango. En: F.P. Ferwerda y F. Wit (eds.) *Outlines of Perennial crop breeding in the tropics*. Wageningen: Veenman y Zonen. pp 309-327.
- Valadez, E. y Kahl G. (2000). *Huellas de ADN en Genomas de Plantas*. México: Editorial Mundi Prensa. pp. 7-8.