

IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES DE CHIRIMOYO MEDIANTE ANÁLISIS DE ISOENZIMAS.

L. Pascual	A. Vargas
F. Perfectti	M. Gutierrez
F.J. Garcia	
Dept. de Genética	Dept. de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Universidad de Granada	Universidad de Granada
18071 Granada (España)	18071 Granada (España)

Resumen

Se han utilizado isoenzimas para caracterizar 20 cultivares de chirimoyo (siete de ellos españoles) del banco de germoplasma de la E.E. "La Mayora". Se han analizado 15 sistemas isoenzimáticos, de los cuales 11 presentan variación: alcohol deshidrogenasa (ADH EC 1.1.1.1), glutamato oxalacetato transaminasa (GOT EC 2.6.1.1), isocitrato deshidrogenasa (IDH EC 1.1.1.42), leucil aminopeptidasa (LAP EC 3.4.11.1), malato deshidrogenasa (MDH EC 1.1.1.37), enzima málico (ME EC 1.1.1.40), fosfogluco isomerasa (PGI EC 5.3.1.9), fosfogluco mutasa (PGM EC 2.7.5.1), siquimato deshidrogenasa (SKD EC 1.1.1.25), superóxido dismutasa (SOD EC 1.15.1.1) y Triosa fosfato isomerasa (TPI EC 5.3.1.1); tres se muestran como invariables: fosfatasas ácidas (ACP EC 3.1.3.2), Diaforasa (DIA EC 1.6.4.3) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD EC 1.1.1.44) y uno no muestra suficiente actividad: Glutamato deshidrogenasa (GDH EC 1.4.1.2). En total se han computado 26 genes, de los cuales 15 son polimórficos.

La cultivares analizados muestran una alta diversidad genética ($H = 0,224$), lo que supone que el banco de germoplasma recoge buena parte de los recursos genéticos del cultivo.

Se ha conseguido caracterizar individualmente a todos los cultivares analizados, excepto Campas y Campas Mejorada, dos cultivares españoles, que presentan idéntico patrón electroforético para todos los isoenzimas, lo que posiblemente sea debido a que realmente sean el mismo cultivar.

Palabras Clave: *Annona cherimola*, diversidad genética, banco de germoplasma, recursos genéticos.

abstract

Twenty cherimoya cultivars, seven Spanish among them, from a germoplasm bank at E.E. "La Mayora" has been characterized by analysis of 15 isozyme systems, 11 of them showing variations: ADH, GOT, IDH, LAP, MDH, ME, PGI, PGM, SKD, SOD and TPI; 3 are invariable: ACP, DIA and 6-PGDH; finally, GDH does not show enough activity. A total of 26 genes have been computed, 15 of them being polymorphics. The cultivars show a great genetic diversity ($H=0.224$), which means that the germoplasm bank include most of the genetic sources for this crop. Individual characterization of cultivars has been carried out, but Campas and Campas Mejorada, two Spanish cultivars have identical electrophoretic pattern for all enzymes analyzed, suggesting that they may be the same cultivar.

Keywords: *Annona cherimola*, isozymes, cultivar identification, genetic diversity, genetic resources.

1. Introducción

Al chirimoyo (*Annona cherimola* Mill) es un árbol originario de las zonas subtropicales de los valles interandinos de Perú y Ecuador. En la actualidad España es el primer productor a nivel mundial de sus frutos, y su cultivo tiene gran importancia económica en las zonas de producción (la franja costera de Málaga y Granada).

Existen numerosos cultivares (cv.) de chirimoyo propagados vegetativamente y que son polimórficos para diversas características pomológicas de gran interés en fruticultura (Ellstrand and Lee, 1987).

Tradicionalmente se han venido usando características morfológicas y fisiológicas para la identificación de los cv. Sin embargo este tipo de marcadores se ven muy influenciados por las variables ambientales, por lo que su empleo en caracterización varietal es limitado.

Los isoenzimas se han utilizado ampliamente en la identificación y catalogación de cv. de numerosas especies de interés hortícola (Weeden, 1989; Torres et al., 1985). En chirimoyo, Ellstrand and Lee (1987) han identificado quince cv. californianos mediante el uso de ocho sistemas isoenzimáticos.

Los objetivos del presente trabajo son fundamentalmente dos: 1) caracterizar a nivel isoenzimático una parte de los cv. del banco de germoplasma de la E.E, "La Mayora", incluyendo a 7 cv. españoles; y 2) establecer el grado de diversidad genética que presenta la colección.

2. Material y Métodos

Se han estudiado 20 cv. de chirimoyo, siete de ellos de origen español: Campas (CA), Campas Mejorada (CM), Fino de Jete (FI), Manteca (MA), Negrito (NE), Pinchudo (PC) y Piña (PÑ); tres procedentes de Bolivia: Bolivia seedling #1, #2 y #3 (B1, B2, B3); tres de Chile: Chilena (CL), Corazón (CR) y Espinosa M (EM); tres de EE.UU.: Bays (BA), Booth (BH) y White (WH); otros tres de Perú: Cumbe (CU), Selección Perú 78 (P78) y Perú 410-16 (P410); y por último un cv. de Costa Rica: Salmón (SA).

Los cv. han sido seleccionados tratando de estudiar una muestra heterogénea, e intentando tener representantes de todos los países de procedencia disponibles en ese momento en el banco de germoplasma.

Se han realizado extractos de semillas y hojas jóvenes mediante homogeneización en un politron y posterior centrifugación en una centrífuga Beckman microfuge, usando el tampón de extracción Tris-HCl de Soltis et al. (1983).

Se han empleado las técnicas habituales de electroforesis en geles horizontales de almidón (concentración del 10%) y minigeles de poliacrilamida (T=10% C=5%).

Al finalizar las electroforesis los geles de almidón eran cortados en láminas y teñidos específicamente para diversos sistemas isoenzimáticos: fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2), alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), diaforasa (EC 1.6.4.3), glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2), glutamato oxalacetato transaminasa (EC 2.6.1.1), isocitrato deshidrogenasa (EC 1.1.1.42), leucil aminopeptidasa (EC 3.4.11.1), malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37), enzima málico (EC 1.1.1.40), 6 fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44), fosfogluco isomerasa (EC 5.3.1.9), fosfogluco mutasa (EC 2.7.5.1), siquimato deshidrogenasa (EC 1.1.1.25), superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) y triosa fosfato isomerasa (EC 5.3.1.1). Se han seguido las técnicas de tinción de Soltis et al (1983) para todos las enzimas salvo para la SOD que se ha empleado el sistema de tinción de Beauchamp and Fridovich (1971).

La interpretación de los patrones electroforéticos se ha realizado en base a los controles genéticos establecidos por Lee & Ellstrand (1987) y al estudio de progenies en cruzamientos dirigidos (Perfectti, 1992). La nomenclatura de las zonas de actividad, genes y alelos se ha realizado de acuerdo a los trabajos previos de Ellstrand and Lee (1987).

Tres parámetros se han calculado como medida de la variabilidad

genética: la proporción de loci polimórficos, riqueza alélica y la diversidad genética (Nei, 1987).

3. Resultados

De los 15 sistemas isoenzimáticos analizados, tres no muestran variabilidad. Es el caso de las fosfatasa ácida (ACPH), la diaforasa (DIA) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD). La ACPH muestra cuatro zonas de actividad, pero únicamente la zona ACP-2 muestra la suficiente resolución y constancia para ser interpretada como producto de un gen monomórfico, la DIA aparece como codificada por un gen monomórfico y la 6PGD muestra, en nuestros geles, una única zona de actividad sin variación que se corresponde con los productos del gen 6Pgd-2, descrito por Ellstrand and Lee (1987).

La glutamato deshidrogenasa no presenta la suficiente actividad como para ser interpretada y por ello no se ha utilizado en la cuantificación de la diversidad genética. El patrón de bandas que presenta es similar al de otras plantas, como el caso de *Vitis* (Loukakis and Roubelakis-Angelakis, 1991) o *Lupinus* (Ratajczak et al, 1989)

Los restantes sistemas isoenzimáticos muestran al menos un gen polimórfico. Así la alcohol deshidrogenasa (ADH) muestra una única zona de actividad codificada por un gen (Adh-1) polimórfico con dos alelos.

La glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) muestra tres zonas de actividad. La más catodal, GOT-1, está codificada por un gen polimórfico (Got-1) que presenta cuatro alelos en estos cv. La zona intermedia (GOT-2) también está codificada por un gen variable, en este caso con dos alelos. Por último GOT-3, (la más anodal) aparece como una banda de igual movilidad en todos los cultivares analizados. En total encontramos once patrones de bandas diferentes para este sistema isoenzimático.

La isocitrato deshidrogenasa (IDH) de chirimoyo está producida por dos loci, uno de ellos variable (Idh-2). Este gen presenta en los cv. aquí analizados tres alelos diferentes, aunque en otros cv. se ha descrito un cuarto alelo.

Para la leucil aminopeptidasa (LAP) encontramos tres zonas de actividad codificadas por tres loci. El más catodal, Lap-1, es polimórfico, presentando dos alelos.

La malato deshidrogenasa (MDH) aparece codificada por dos loci, Mdh-1 polimórfico con tres alelos y Mdh-2 monomórfico.

La enzima málico (ME) de chirimoyos aparece en nuestros geles como una zona de actividad producida por el gen Me-1 que presenta dos alelos.

La fosfoglucoisomerasa (PGI) muestra dos genes: Pgi-2, el más anodal, monomórfico y Pgi-1, variable. Este último locus presenta, en esta selección de cv., cinco alelos, uno de ellos nulo, habiéndose encontrado otras dos formas alélicas en los cultivares californianos estudiados por Ellstrand and Lee (1987).

La fosfoglucomutasa (PGM) presenta la particularidad de que la zona de actividad que aparece, con hasta cuatro bandas, está codificada por dos genes, de tal forma que las movilidades extremas son producidas por el gen Pgm-1, y los electromorfos de movilidad intermedia por el locus Pgm-2. Ambos genes son polimórficos y presentan dos alelos. En total se observan cinco genotipos diferentes en los cv. analizados.

La siquimato deshidrogenasa (SKD) de chirimoyos muestra de dos a tres bandas, de tal forma que el electromorfo más anodal parece codificado por un gen monomórfico (Skd-2) y las dos bandas más catodales por el locus polimórfico Skd-1. Este último gen presenta dos alelos y muestra una segregación distorsionada que se ajusta a la proporción 1:2 en los cruzamientos de los individuos heterocigotos, posiblemente debido a que este ligado a un gen letal.

La metaloenzima superóxido dismutasa muestra un patrón de bandas relativamente complejo, con hasta cinco zonas de actividad. Las tres más catodales no muestran la suficiente actividad y/o constancia como para ser

interpretadas. Sin embargo las zonas 4 y 5 parecen estar codificadas, respectivamente por Sod-4, monomórfico, y por Sod-5, variable con dos alelos y que no muestra actividad en la semilla. Las isoenzimas Cu-Zn-SOD son inhibidas por el CN⁻ e inactivadas por el H₂O₂, no siendo afectadas las Mn-SOD. Con el empleo de estos inhibidores, hemos podido identificar las Sod-4 y Sod-5 como isoenzimas Cu-Zn-SOD y a SOD-1 y SOD-2 como Mn-SOD.

Por último, la triosa fosfato isomerasa (TPI) muestra tres zonas de actividad. Las de mayor y menor movilidad están codificadas por dos genes polimórficos (Tpi-3 y Tpi-1 respectivamente) con dos alelos. La zona de movilidad intermedia, denominada TPI-Z, esta producida por los heterodímeros intergénicos entre los productos de los genes Tpi-1 y Tpi-2. Los homodímeros de este último gen presentan escasa actividad y por ello no se ponen de manifiesto habitualmente en los geles teñidos para la TPI (Patty et al, 1987). Tpi-2 muestra dos alelos. El genotipo para este gen puede determinarse a partir de los patrones de bandeo de la zona TPI-Z.

Los 14 sistemas enzimáticos analizados, todos a excepción de la GDH, están codificados por un mínimo de 26 loci, 15 de ellos polimórficos. La tabla 1 muestra los genotipos que presentan los veinte cultivares analizados para estos loci polimórficos.

La variabilidad presente en la colección se ha estimado con los tres parámetros. La proporción de loci polimórficos o polimorfismo (A), que en este caso tiene un valor de 57.69 %, la riqueza alélica (A) igual a 1.85 alelos/locus y por la diversidad genética (Nei, 1987) $D = 0.224$.

4. Discusión

De los 15 sistemas isoenzimáticos ensayados hemos conseguido una resolución y actividad aceptables para 14, todos a excepción de la GDH. De estos sistemas enzimáticos tan solo tres se muestran totalmente invariables (ACPH, DIA, 6PGD), por lo que no son útiles en identificación varietal.

En total se han computado 26 genes, de los que 15 son polimórficos, presentando de dos a cinco alelos por locus, con una media de 2.47 alelos/locus. Pero la mayoría de estos genes (el 73%) muestran poca variabilidad ya que solo presentan dos alelos. Únicamente MDH e IDH con tres alelos, GOT con cuatro y PGI con cinco, muestran más de dos formas alélicas.

Si estos datos los referimos a los cultivares españoles encontramos un menor número de genes polimórficos: doce, el 46.15% (que representa un 10% menos que para la totalidad de los cv. estudiados). Además estos loci variables muestran menor número de alelos, con una media de 2.25 alelos/locus.

La diversidad genética que presenta la colección es relativamente alta. Si se compara los parámetros utilizados para medir la variabilidad: Polimorfismo (P), Riqueza alélica (A) y Diversidad genética (D), de la colección y las medias para todas las plantas o para las plantas cultivadas (Doebley, 1989), observamos que nuestros valores de variabilidad son mayores (Tabla II).

En general se aprecia que la colección de chirimoyos presenta una alta variabilidad, tal como revelan los parámetros P y H. La diversidad genética es alta y, a falta de un estudio de poblaciones naturales de chirimoyos, puede considerarse que la colección representa considerablemente bien la diversidad genética presente en el cultivo.

Sin embargo el valor de A es pequeño en relación a la media para las plantas cultivadas, esto puede entenderse si se tiene en cuenta que la riqueza alélica es muy dependiente del n° de individuos analizados, por eso puede esperarse que, al estudiar mas cv., este valor aumente.

El grado de diversidad que tiene un cultivo es función del método de domesticación, de su sistema de cruzamiento y del método de su mantenimiento. Para el chirimoyo, un árbol cuyas variedades se transmiten por acodo e injerto y que no ha sido sometido a programas de mejora, se puede suponer que en cierta medida su diversidad no varía mucho de la de las poblaciones

naturales.

Con los genotipos para los 26 loci se puede discriminar casi la totalidad de los clones incluidos en este estudio. Únicamente dos cultivares se muestran indiferenciables: Campas y Campas Mejorada, los cuales presentan genotipos idénticos para todos los genes estudiados, lo que concuerda con la similitud morfológica general existente entre ellos (González, 1991). Podríamos suponer que CM podría ser un plantón (seedling) de CA con igual genotipo que la planta madre, una posibilidad que tiene una probabilidad pequeña. También podría tratarse de un mutante para algún gen no isoenzimático. Pero nosotros pensamos que CM es el mismo cultivar que CA, y que posiblemente descienda de algún árbol con características especialmente favorables de este último cv., habiéndose propagado vegetativamente con el nombre de Campas Mejorada. Esta similitud genética entre CA y CM es confirmada por la semejanza en caracteres fisiológicos y morfológicos cuando ambos cv. son cultivados en la misma parcela, bajo condiciones ambientales similares.

Ellstrand and Lee (1987) habían estudiado diversos cultivares de California, entre ellos White, Bays y Booth, y de otros países como Salmón y Fino de Jete. Los genotipos que hemos obtenido para estos cv. concuerdan con los de estos investigadores, salvo en el caso del cv. WH para la Pgm-2 donde Ellstrand and Lee (1987) encuentran un genotipo 13.

Los cv. españoles pueden ser fácilmente identificados entre sí por el análisis de únicamente dos sistemas isoenzimáticos: GOT y TPI, o GOT e IDH, o TPI y PGM. Campas y Fino de Jete, los cv. más cultivados en España, pueden ser identificados entre sí mediante el uso de la GOT o la PGM, pues estos cv. son tan semejantes que tan solo se diferencian en dos de los 26 genes estudiados.

Los demás cultivares pueden ser diferenciados con algunos de los sistemas enzimáticos empleados. Con solo tres enzimas, caso por ejemplo de la GOT, TPI y MDH, se puede discriminar entre todos los cv. estudiados, con excepción de Campas y Campas Mejorada.

5. Agradecimientos

Agradecemos a el Dr. J. M. Farré el apoyo prestado para la realización de este trabajo. Este estudio ha sido subvencionado por el proyecto de la CICYT AGR89-0419

6. Referencias

- Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971. Localization of superoxide dismutase on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-268
- Doebley, J.F. 1989. Isozyme evidence and the evolution of crop plants. In: *Isozymes in Plant Biology* (Soltis, D.E. & Soltis, P.S. Eds.) Dioscorides Press. Portland
- Ellstrand, N.C. and Lee, J.M. 1987. Cultivar identification of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) using isozyme markers. *Scientia Hort.* 32: 25-31
- Gonzalez Yuste, R. 1991. Estudio de material vegetal en el banco de germoplasma de chirimoyo de la estación experimental "La Mayora". E.U.I.T.A. Sevilla
- Lee, J.M. and Ellstrand, N.C. 1987. Inheritance and linkage of isozymes in the cherimoya. *J.Hered.* 78: 383-387
- Loulakakis, K.A. and Roubelakis-Angelakis, A. 1991. Plant nad(h)-glutamate dehydrogenase consists of two subunit polypeptides and their participation in seven isoenzymes occurs in an ordered ratio. *Plant Physiol.* 97: 104-111
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics.* Columbia University Press, New York
- Patty, L.R., Lee, J.M. and Ellstrand, N.C. 1988. Interpretation of triose

- phosphate isomerase isozymes in the cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Biochemical Genetics*. 26: 123-130
- perfectti, F. 1992. Caracterización isoenzimática de cultivares de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.). Tesis de licenciatura. Universidad de Granada
- Ratajczak, L., Ratajczak, W., Koroniak, D., Przybylska, M. and Mazurowa, H. 1988. Glutamate dehydrogenase isoenzymes in yellow lupine root nodules. II Subunits composition. *Acta Physiologiae Plantarum* 10: 49-55
- Soltis, D.E., Haufler, C.H., Darrow, D.C. and Gastony, G.S. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and staining schedules. *American Fern Journal*. 73:
- Torres, A.M., Diedenhofen, U., Bergh, B.O. and Knight, R.J. 1978. Enzyme polymorphisms as genetic markers in the avocado. *Amer.J.Bot.* 65: 134-139
- Weeden, N.F. 1989. Applications of isozymes in plant breeding. *Plant Breeding Reviews* 6: 11-54

Tabla I. Genotipos de los cultivares analizados para los loci polimórficos

	Adh-1	Got-1	Got-2	Idh-2	Lap-1	Hdh-1	Me-1	Pgi-1	Pgm-1	Pgm-2	Skd-1	Sod-5	Tpi-1	Tpi-2	Tpi-3
CH	12	34	22	22	12	11	11	44	11	11	12	22	11	11	12
FI	12	24	22	22	12	11	11	44	11	12	12	22	11	11	12
HA	12	24	12	22	12	11	11	25	11	12	22	22	11	11	11
HE	12	44	22	24	11	11	11	44	11	11	12	22	11	12	12
PC	12	24	22	24	12	12	11	44	11	12	12	22	12	12	12
PH	22	44	22	22	12	11	11	26	11	11	22	22	11	11	11
B1	11	13	12	22	22	11	11	66	11	11	22	22	22	22	11
B2	12	13	12	22	22	11	22	66	12	12	22	22	12	22	12
B3	11	13	11	22	22	11	11	66	12	12	22	22	22	22	11
CR	22	33	22	24	12	11	12	66	11	11	22	22	22	22	22
EM	12	13	22	24	12	12	22	66	11	11	22	11	11	12	22
CU	22	33	22	24	22	12	12	56	11	11	22	22	11	22	22
P410	12	12	22	22	22	11	11	44	11	12	12	22	11	11	12
P78	12	23	22	24	22	11	12	44	11	11	22	12	11	12	12
BA	12	34	22	24	11	11	12	5n	11	11	22	22	11	12	22
BB	22	13	12	22	12	12	22	56	11	22	22	22	11	22	22
ME	12	23	22	12	22	11	11	26	12	11	22	22	12	22	12
SA	22	34	12	22	22	13	12	44	11	12	22	22	11	22	22

Tabla II. Diversidad genética

	Polimorfismo	Riqueza alélica	Diversidad
Colección chirimoyos	57.69	1.85	0.224
Plantas cultivadas	49	2.15	0.19
Todas las plantas	34.2	1.69	0.113



10

**ABRIL
1993**

ACTAS DE HORTICULTURA

**Sociedad Española de Ciencias Hortícolas
Associação Portuguesa de Horticultura**

II CONGRESO IBÉRICO DE CIENCIAS HORTÍCOLAS

ZARAGOZA, 27 al 30 de abril de 1993

COMUNICACIONES/COMUNICAÇÕES

TOMO 2

IDENTIFICACIÓN CULTIVOS "IN VITRO" HORTICULTURA



**MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION Y TECNOLOGIA AGRARIA Y ALIMENTARIA**