

RELACION Y AGRUPAMIENTO DE CULTIVARES DE CHIRIMOYO EN BASE AL ANÁLISIS DE MARCADORES GENÉTICOS

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

Resumen

Se han estudiado 20 cultivares de chirimoyo (*Annona cherimola*) para comprobar la relación entre los genotipos para 26 loci isoenzimáticos y los agrupamientos de los cultivares en base a su país de origen y variedad botánica.

Se ha construido un dendrograma UPGMA de los cultivares en base a sus distancias genéticas. En este dendrograma se aprecia un agrupamiento más acorde con el país de origen que en base a la variedad botánica.

Se ha realizado un análisis discriminante para encontrar los marcadores isoenzimáticos que mejor agrupan a los cultivares en categorías previamente definidas (procedencia y variedad botánica). Este análisis revela que un 95% de los cultivares puede agruparse correctamente en su país de origen, pero tan sólo un 45% es agrupado correctamente en su variedad botánica.

En general se aprecia la débil relación entre las variedades botánicas y los genotipos para los 26 loci isoenzimáticos.

Por último se discute el posible origen peruano de los cultivares existentes en España.

Palabras Clave: *Annona cherimola*, isoenzimas.

Abstract

Twenty cherimoya (*Annona cherimola* Mill) cultivars has been studied in order to analyze the relationships between 26 isoenzymatic loci and the grouping of cultivars by their origin country or botanic variety. An UPGMA dendrogram has been drawn according to genetic distances between cultivars. Origin of cultivars is more in accord than botanic varieties with clusters. A discriminant analysis in order to find out which isoenzymatic markers produce the best grouping of cultivars according to previously established categories. 95% of cultivars are correctly grouped by origin and only 45% by botanic variety. In the latter part of this work the possible Peru origin of the Spanish cultivars is discussed.

Keywords: *Annona cherimola*, isozymes, botanic varieties.

formando agrupamientos denominados clusters. Para realizarlo hemos utilizado los programas NEIGHBOR y DRAWGRAM del paquete PHYLIP 3.4 (Felsenstein, 1991) usando la matriz de distancias de χ^2 .

Por último se ha realizado, a partir de las frecuencias alélicas para cada cultivar, un test discriminante iterativo mediante el programa BMDP 7M, definiendo dos tipos de agrupamientos a priori: variedades botánicas y países de origen. El análisis discriminante encuentra la combinación de variables (alelos) que mejor predice agrupamientos de casos (cultivares) dados a priori. Esta combinación de variables predictivas se denomina función de clasificación.

Este programa va eligiendo variables (alelos) que maximizan el éxito de la función discriminante de forma iterativa. En cada paso la variable que maximiza la separación entre grupos es añadida (o retirada) a la función de clasificación. El programa también evalúa el número de casos correctamente clasificados y presenta una tabla resumen de la clasificación.

3. Resultados

Al examinar la matriz de distancias entre (tabla 2) cultivares se observa que estas oscilan entre el 0.00 que presentan Campas y Campas Mejorada y el 3.87 de Bolivia seedling #3 y Bays. En general se aprecia que los cv. procedentes de Bolivia (B1, B2 y B3) son los que, al enfrentarse al resto de los cv., presentan mayores valores de distancia, mostrando por tanto que son los más diferentes del resto. Los cv. españoles entre sí así como los bolivianos, son los que presentan valores más bajos de distancias.

En el dendrograma (figura 1) se observan tres cluster principales: el primero integrado por los cv. españoles y dos de Perú (P410 y P78), un 2º cluster formado por los cv. bolivianos y WH (EE.UU.) y un tercero que incluye a los cv. de Chile y a algunos de otros países (uno de Perú, 2 de EE.UU. y el representante de Costa Rica).

Cuando se ha realizado el análisis discriminante para países de origen se encuentra que cuatro alelos son los que mejor discriminan entre los cv. Estos son el alelo 6 de la Pgi-1, el 4 de la Got-1, el 2 de la Lap-1 y el 2 de la Adh-1. Con estos alelos se obtienen las funciones de clasificación que consiguen agrupar correctamente a todos los cultivares menos a uno (tabla 3).

Este mismo tipo de análisis demuestra que únicamente el alelo 1 de la Tpi-2 discrimina a los cv. en sus variedades botánicas, pero con un bajo éxito (tabla 4). Tan solo el 45% de los cultivares es situado correctamente en su variedad.

4. Discusión

En el dendrograma (figura 1) puede apreciarse la relación entre la similitud genética y los países de origen de los cultivares. Cada uno de los tres agrupamientos es exclusivo para un país. Así el 1º para España, el 2º para Bolivia y el último para Chile, quedando los representantes de los demás países distribuidos en varios clusters. Además se hace evidente la relación existente entre los cultivares españoles y los de Perú, lo que induce a pensar en este último país como posible origen del material vegetal a partir del cual se han desarrollado los cultivares españoles.

Sin embargo cuando se analiza la relación entre los agrupamientos del dendrograma y las variedades botánicas está no resulta tan clara, pudiéndose apreciar que los tres clusters muestran casi las mismas variedades botánicas, sin manifestar una clara diferenciación en la distribución de éstas.

A diferencia del análisis basado en distancias genéticas, que tiene en cuenta a todos los genes estudiados, el análisis discriminante encuentra alelos particulares que maximizan el éxito en la clasificación de los cultivares en grupos preestablecidos. Sin embargo, el resultado de estos análisis es similar al que se observa cualitativamente en el dendrograma.

Los genotipos de los cv. para los loci isoenzimáticos analizados en el presente trabajo muestran una amplia dependencia con el país de origen de

1. Introducción

El chirimoyo parece ser originario de los valles interandinos de Perú (Guzmán, 1951) y Ecuador, desde donde se ha extendido a diferentes regiones de clima subtropical del planeta.

La clasificación de los cultivares de chirimoyo se ha realizado tradicionalmente en base a su adscripción a una de las cinco variedades botánicas descritas (Bayley, 1914; Schroeder, 1951). Estas variedades se basan en la apariencia morfológica del fruto, la chirimoya. Esta presenta una apariencia exterior típica en placas o aureolas formadas por los restos de tejido que rodean a los pistilos cuando estos se fusionan para dar el sincarpio. Las cinco variedades descritas son:

Laevis. Carece de protuberancias o indentaciones, manteniendo una piel lisa.

Impressa. El fruto posee aureolas que delimitan superficies ligeramente cóncavas. Frutos con forma ariñonada o acorazonada.

Umbonata. Con la piel reticulada y protuberancias pequeñas generalmente situadas en el centro de la aureola.

Mamillata. Con la piel reticulada y con acusadas protuberancias que casi desaparecen en la madurez, quedando la piel lisa en la parte media y distal del fruto, mientras que en la parte basal, cercana al pedúnculo, presenta la piel marcada y con "tetillas". El fruto recuerda la forma de una piña.

Tuberculata. Piel fuertemente reticulada y con marcadas protuberancias.

Sin embargo, la morfología del fruto no parece constituir un sistema de clasificación apropiado, ya que es un carácter que no permanece constante en un mismo cultivar, e incluso ni siquiera dentro de un mismo árbol (Kahn et al, 1991).

La utilización de los isoenzimas como marcadores genéticos ha demostrado ser de gran utilidad en el estudio de plantas cultivadas, incluyendo la identificación varietal, el conocimiento del sistema de cruzamiento, conocimiento del polen efectivo en la fertilización natural, grado de diversidad, así como para determinar relaciones entre los isoenzimas y caracteres de interés pomológico y comercial (Weeden, 1989).

En este trabajo analizamos las posibles relaciones entre los marcadores isoenzimáticos (26 genes estudiados en chirimoyos para la identificación varietal) con las variedades botánicas y con el país de procedencia de los cv.

2. Material y Métodos

Se han estudiado electroforéticamente 20 cv. de chirimoyo de diferentes países de origen y variedades botánicas. La tabla 1 recoge la denominación de estos, su abreviatura, país de origen y variedad botánica.

Se han analizado, mediante las técnicas habituales de electroforesis de isoenzimas, hojas jóvenes y semillas procedentes de autofecundaciones para obtener el genotipo para 26 loci. Los sistemas isoenzimáticos utilizados son: fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2), alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), diaforasa (EC 1.6.4.3), 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).

A partir de los genotipos para los marcadores isoenzimáticos se ha calculado una matriz de distancias de χ^2 entre cultivares mediante el programa BMDP 2M.

Hemos obtenido un dendrograma usando el método UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages) (Sneath & Sokal, 1973), que se enmarca dentro de los llamados métodos jerárquicos o secuenciales (Weir, 1990).

Este análisis reúne a los cultivares en base a su menor distancia,

estos cultivares. Esta relación entre el origen geográfico y la distribución alélica es mayor que la que se aprecia entre las variedades botánicas y los genotipos para estos isoenzimas.

¿Puede la similitud existente entre los cultivares españoles y los peruanos indicar el posible origen de los cultivares ibéricos?. Los cv. españoles forman un grupo muy homogéneo que muestra una gran similitud genética con ciertos cultivares peruanos, lo que indica que posiblemente los cultivares de Granada y Málaga se desarrollaron a partir de material vegetal aportado desde Perú, que al fin y al cabo es el país de origen de la especie (Guzmán, 1951).

Otro argumento en favor de esta hipótesis lo obtenemos cuando sometemos los cultivares a otro análisis discriminante, pero esta vez estableciendo solo los 3 países de origen: Bolivia, Perú, Chile y dejando sin clasificar, en principio, a los cultivares de EE.UU., España y Costa Rica (que sabemos no son las zonas de aparición de la especie).

Cuando procedemos de esta manera obtenemos una función de clasificación con tan solo dos alelos como discriminantes: el 6 de la Pgi-1 y el 2 de la Tpi-3. Se obtiene un 100 % de éxito al colocar en sus respectivos países a los representantes de Bolivia, Chile y Perú (tabla 5).

Se aprecia lo anteriormente expuesto en el análisis de cluster: la mayoría de los cultivares españoles son considerados como peruanos. Así mismo dos de los tres cultivares de EE.UU. y el representante de Costa Rica quedan incluidos dentro de los cultivares peruanos.

Varias pueden ser las explicaciones por las que los cv. no puedan ser clasificados correctamente en sus variedades botánicas, en base a los marcadores isoenzimáticos. Que ambas características (morfología del fruto y marcadores isoenzimáticos) no muestren relaciones debido a una evolución independiente de ambas (varios estudios tanto en animales (Kambhampati and Rai, 1991) como en plantas (Price et al, 1984) han mostrado que no siempre la variación isoenzimática va pareja con la variación en características morfológicas), que la morfología del fruto este controlada por genes independientes a los loci isoenzimáticos, o bien, que las llamadas variedades botánicas reflejen una alta variación ambiental que enmascare la relación entre los loci isoenzimáticos y los genes que controlan la morfología del fruto.

Ante esta situación cabe preguntarse para que sirve la clasificación en base a la morfología del fruto. Ciertamente esta es cada vez menos utilizada (si alguna vez lo fue), y se prefiere emplear el nombre del cultivar, con independencia de la variedad botánica. Únicamente es interesante utilizar esta nomenclatura para referirse de forma rápida a la morfología de la chirimoya, una característica de indudable interés comercial. Además sería más adecuado hacer una clasificación botánica recurriendo a múltiples caracteres morfológicos y genéticos, y no únicamente a determinadas características tan variables como la piel de la chirimoya.

4. 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

- Bayley, L.H. 1914. The standard cyclopedia of horticulture. Vol II. Macmillan Co. New York
- Felsenstein, J. 1991. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.4. Univ. of Washington
- Guzmán, V.L. 1951. Informe del viaje de exploración sobre la chirimoya y otros frutos subtropicales. Otras exploraciones sobre la chirimoya. C.Nac.de Invest.y Exper. Agrícola La Molina. Lima. Perú.71: 1-25
- Kahn, T.L., Ellstrand, N.C. & Arpaia, M.L. 1991. Current research on the

cherimoya cultivars and flowering behavior in California. Fruit Gardener. June: 8-11
 Kambhampati, S. & Rai, K.S. 1991. Patterns of morphometric and allozyme variation in *Aedes albopictus*. Entomol. exp. appl. 60: 193-201
 Price, S.C., Shumaker, K.M., Kahler, A.L., Allard, R.W. & Hill, J.E. 1984. Estimates of population differentiation obtained from enzyme polymorphisms and quantitative characters. J. Hered. 75: 141-142
 Schroeder, C.A. 1951. Fruit morphology and anatomy of the cherimoya. Botanical Gazette. 112: 436-446
 Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco
 Weeden, N.F. 1989. Applications of isozymes in plant breeding. Plant Breeding Reviews. 6: 11-54
 Weir, B.S. 1990. Genetic Data Analysis. Sinauer Associates. Sunderland: 162
 -171

Tabla 1. Relación de cultivares estudiados, con indicación de su abreviatura, variedad botánica y país de origen.

CULTIVAR	ABREVIATURA	VARIEDAD	ORIGEN
410-16	P410	Impressa	Perú
Bays	BA	Impressa	EE.UU.
Bolivia seedling # 1	B1	Tuberculata	Bolivia
Bolivia seedling # 2	B2	Mamillata	Bolivia
Bolivia seedling # 3	B3	Tuberculata	Bolivia
Booth	BH	Impressa	EE.UU.
Campas	CA	Umbonata	España
Campas mejorada	CM	Umbonata	España
Chilena	CL	Impressa	Chile
Corazón	CR	Impressa	Chile
Cumbe	CU	Umbonata	Perú
Espinosa M	EM	Umbonata	Chile
Fino de Jete	FI	Impressa	España
Manteca	MA	Umbonata	España
Negríto	NE	Impressa	España
Pinchudo	PC	Tuberculata	España
Piña	PN	Impressa	España
Salmón	SA	Mamillata	Costa Rica
Selección Parí 78	P78	Impressa	Perú
Whita	WH	Mamillata	EE.UU.

Tabla 2. Distancias de χ^2 entre los cultivares.

CA	0.00																			
CM	1.29	1.29																		
FI	2.38	2.38	2.00																	
MA	1.63	1.63	1.83	2.71																
NE	2.08	2.08	1.63	2.58	1.83															
PC	2.16	2.16	2.31	1.91	2.45	2.83														
PN	3.21	3.21	3.46	3.16	3.46	3.27	3.16													
B1	3.32	3.32	3.37	3.27	3.56	3.27	3.37	2.31												
B2	3.61	3.61	3.65	3.27	3.83	3.46	3.56	1.41	2.16											
B3	3.06	3.06	3.37	3.56	3.16	3.27	3.37	2.71	2.58	3.16										
CL	3.16	3.16	3.46	3.65	3.16	3.06	3.16	2.71	2.58	3.16	2.31									
CR	3.21	3.21	3.46	3.65	3.27	3.27	3.37	3.46	2.83	3.83	2.16	2.71								
EM	3.06	3.06	3.37	3.42	3.16	3.06	3.11	3.16	2.71	3.56	2.00	2.00	2.45							
CU	1.83	1.83	1.29	2.38	2.45	2.08	2.71	3.21	3.11	3.42	3.27	3.56	3.42	3.27						
P410	2.24	2.24	2.38	2.89	2.45	2.38	2.94	3.11	2.89	3.51	2.16	2.83	2.52	2.45	2.24					
P78	2.45	2.45	2.77	2.83	2.16	2.77	2.83	3.51	3.21	3.87	2.58	2.58	2.65	2.38	3.16	2.52				
BA	3.51	3.51	3.46	3.32	3.65	3.37	3.51	3.46	2.31	3.46	3.06	2.83	2.71	2.31	3.42	3.32	2.94			
BH	2.77	2.77	2.89	2.83	2.89	2.71	2.71	2.52	2.52	2.77	2.65	2.38	3.16	2.71	3.00	2.65	2.83	3.27		
WH	2.71	2.71	2.77	3.11	2.94	2.83	3.16	3.32	2.65	3.42	2.83	2.83	3.27	2.38	2.83	2.52	2.83	2.45	3.11	
SA																				
CA	CM	FI	MA	NE	PC	PN	B1	B2	B3	CL	CR	EM	CU	P410	P78	BA	BH	WH	SA	

Tabla 3. Clasificación de cv. en países según el análisis discriminante

PAÍS	%	Nº DE CULTIVARES CLASIFICADO EN CADA PAÍS:					
		España	Bolivia	Chile	Perú	EE.UU.	Costa Rica
España	100.0	7	0	0	0	0	0
Bolivia	100.0	0	3	0	0	0	0
Chile	66.7	0	1	2	0	0	0
Perú	100.0	0	0	0	3	0	0
EE.UU.	100.0	0	0	0	0	3	0
Costa Rica	100.0	0	0	0	0	0	1
TOTAL	95.0	7	4	2	3	3	1

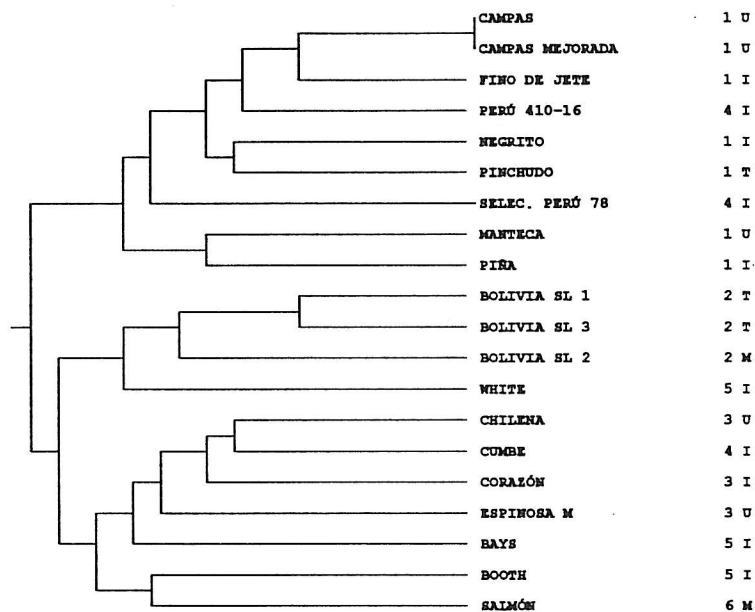
Tabla 4. Clasificación de cv. en variedades botánicas según el análisis discriminante

PAÍS	%	Nº DE CULTIVARES CLASIFICADO EN CADA VARIEDAD:			
		Impressa	Umnonata	Tuberculata	Mamillata
Impressa	0.0	0	8	1	0
Umnonata	100.0	0	5	0	0
Tuberculata	66.7	0	0	2	1
Mamillata	66.7	0	1	0	2
TOTAL	45.0	0	14	3	3

Tabla 5. Clasificación de cv. en países (Perú, Bolivia, Chile) según el análisis discriminante

PAÍS	%	Nº DE CULTIVARES CLASIFICADO EN CADA PAÍS:		
		Bolivia	Chile	Perú
España	0.0	1	0	6
Bolivia	100.0	3	0	0
Chile	100.0	0	3	0
Perú	100.0	0	0	3
EE.UU.	0.0	0	1	2
Costa Rica	0.0	0	0	1
TOTAL	100.0	4	4	12

Gráfica 1. Dendrograma UPGMA de los cultivares en base a la distancia de χ^2 .



1= España, 2= Bolivia, 3= Chile, 4= Perú, 5= EE.UU., 6= Costa Rica
 I= Impressa, U= Umnonata, T= Tuberculata, M= Mamillata



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**