

Caracterización genético-bioquímica de 16 accesiones de *Clitoria ternatea* L.

Ania Pinares de la Fe*, Yamilka Ramos Valdéz**, Clara González Arencibia***, Xonia Xiquéz Martín*** y María Isabel Román Gutiérrez****

* Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana

** Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spíritus

*** Facultad de Biología, Universidad de La Habana

**** Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INIVIT

RESUMEN

Se utilizaron marcadores isoenzimáticos para la caracterización genético-bioquímica de 16 accesiones de *Clitoria ternatea* L., para lo cual se analizaron 8 sistemas isoenzimáticos (Esterasas, Peroxidasas, Polifenoloxidasas, Fosfatasas ácidas, Anhidrasa carbónica, Citocromo oxidasa, Xantina deshidrogenasa y Malato deshidrogenasa), de las cuales solo tres resultaron ser polimórficas (Esterasas, Fosfatasas ácidas y Anhidrasa carbónica). Además se aplicaron técnicas de análisis multivariado lo que permitió formar grupos de alta afinidad. Para el estudio citogenético, se realizó un análisis del cariotipo y se comprobó que el número cromosómico es $2n=16$, para lo cual fue necesario establecer una metodología que permitiera la visualización y conteo de los mismos.

Palabras clave: *Clitoria ternatea* L., sistemas isoenzimáticos, marcadores genético-bioquímicos, número cromosómico

ABSTRACT

Isozyme markers were used for biochemical-genetic characterization of 16 accessions of *Clitoria ternatea*. Eight isoenzymatic systems (esterase, peroxidase, polyphenoloxidase, acid phosphatase, carbonic anhydrase, cytochrome oxidase, xantine deshydrogenase and malate deshydrogenase) were analyzed. Only three of them were polymorphic (esterase, acid phosphatase and carbonic anhydrase). Multivariate analysis applied allowed to obtain high affinity groups, also. Karyotype analysis was made and chromosome number $2n = 16$ was verified. It was necessary to establish a methodology that allowed the chromosome visualization and counting.

Key word: *Clitoria ternatea*, isozyme system, biochemical-genetic markers, chromosome number

INTRODUCCIÓN

Actualmente en Cuba, muchas investigaciones desarrolladas en pastos y forrajes están dirigidas a crear la base alimentaria para el mantenimiento y crecimiento de la masa ganadera y avícola, lo que ayudaría a abastecer de algunos alimentos a la población, con una sustancial disminución en las importaciones de los mismos; lo cual requiere de una caracterización de las colecciones de las plantas forrajeras de los bancos de germoplasma para futuros trabajos de mejoramiento (Villanueva y Mena, 1996).

Dentro de las plantas utilizadas con estos fines, además de las gramíneas, un papel fundamental lo tienen las leguminosas forrajeras, entre las cuales se encuentra la especie *Clitoria ternatea* L., conocida como Conchita azul. Esta es utilizada exitosamente como abono verde y cultivo de cobertura, se asocia bien con las gramíneas, posee un alto potencial de producción de semillas y altos rendimientos de materia seca, altos contenidos de proteína, una adecuada resistencia a las plagas y enfermedades tanto en cultivo puro como asociada, posee principios activos útiles para la medicina tradicional y en muchos casos se utiliza como planta ornamental (Binder, 1997).

Con el objetivo de que estas colecciones de recursos genéticos tengan un valor práctico para los investigadores, es necesario, además de una caracterización morfológica y agronómica, realizar un estudio genético de las mismas debido a que estas variables pueden estar limitadas por la escasez de tiempo y recursos; además es necesario tener en cuenta que estos caracteres son altamente influenciados por el ambiente y puede ocurrir que los resultados obtenidos no presenten una verdadera divergencia genética entre los genotipos evaluados (Andersen *et al.*, 1990; Vall y *et al.*, 1995).

Por primera vez en Cuba se realiza la caracterización genético-bioquímica y citogenética de la colección cubana de *Clitoria ternatea* L., con el objetivo de:

- Seleccionar el mejor método que permita la visualización y conteo de los cromosomas.
- Realizar la caracterización genético-bioquímica de la colección.
- Determinar las afinidades genéticas entre las accesiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizó la colección cubana de *Clitoria ternatea* L., proveniente del banco de germoplasma de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spíritus.

La colección consta de 16 accesiones procedentes de diferentes lugares (Tabla I), a las cuales se le realizaron estudios citogenéticos y se les aplicaron técnicas isoenzimáticas para conocer el grado de variabilidad genética de la colección.

Caracterización citogenética

Basados en la metodología aplicada para la caracterización citogenética de colecciones de plátano Burro, tabaco y malanga (Acosta, 1999; Hernández, 1998; Millian, 2000) las raíces de 1cm de longitud fueron sometidas a tres tratamientos.

Tratamiento 1

- Pretratamiento con 8-Hidroxiquinolina (0,02 %) durante 1 hora.
- Fijación del material usando una mezcla de etanol absoluto y ácido acético glacial a la proporción de 3:1 durante 4 días.
- Lavado con agua destilada.
- Hidrólisis con HCL 1N a 60° C, durante 20 minutos.
- Lavado con agua destilada
- Tinción con el Reactivo de Schiff, durante 3 horas
- Squash
- Conteo y fotografiado de los cromosomas.

Tratamiento 2

- Pretratamiento con 8-Hidroxiquinolina (0,02%), durante 2 horas.

- Fijación con mezcla de etanol absoluto y ácido acético glacial a la proporción de 3:1 durante 6 días.
- Lavado con agua destilada .
- Hidrólisis con HCL 1N a 60° C durante 25 minutos.
- Lavado con agua destilada .
- Tinción con Hematoxilina de Gomory a 60° C durante 3 horas.
- Squash.
- Conteo y fotografiado de los cromosomas.

Tratamiento 3

- Pretratamiento con 8-Hidroxiquinolina (0,02%) durante 3 horas.
- Fijación con mezcla de etanol absoluto y ácido acético glacial a la proporción de 3:1 durante 7 días.
- Lavado con agua destilada.
- Hidrólisis con HCL 1N a 60° C durante 15 minutos.
- Lavado con agua destilada.
- Tinción con Hematoxilina de Gomory a 60° C durante 2 horas.
- Squash.
- Conteo y fotografiado de los cromosomas.

Caracterización genético- bioquímica

Preparación de las muestras

- Para la preparación de las muestras fueron seleccionadas hojas jóvenes de plantas adultas
- Se maceraron 5 gramos de hojas frescas y sanas en un mortero frío, a los cuales se le añadió 10 gotas de una solución de sacarosa al 20%.
- Los extractos fueron filtrados en tela de gasa, envasados en viales plásticos y mantenidos a -15°C hasta su utilización.

TABLA I

Colección de *Clitoria ternatea* L. de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spíritus.

NO	ACCESIONES	LUGAR DE PROCEDENCIA
1	Testigo	Estación Experimental "Indio Hatuey"
2	Mexicana	Estación Experimental "Indio Hatuey"
3	HN-26	La Habana
4	Semilla- Negra	Estación Experimental "Indio Hatuey"
5	HN-49	La Habana
6	SC-80	Zona centro de Sancti Spíritus
7	SC-94	Zona centro de Sancti Spíritus
8	SC-134	Zona centro de Sancti Spíritus
9	SC-135	Zona centro de Sancti Spíritus
10	SC-136	Zona centro de Sancti Spíritus
11	SC-137	Zona centro de Sancti Spíritus
12	SC-138	Zona centro de Sancti Spíritus
13	SN-139	Zona norte de Sancti Spíritus
14	SC-163	Zona centro de Sancti Spíritus
15	Silvestre	La Habana
16	Tehuana	Estación Experimental "Indio Hatuey"

Corridas electroforéticas

- Se utilizó un sistema de buffer discontinuos según Orstein (1964) y Davis (1964).
- Se realizaron en gel de poliacrilamida (PAGE) y con buffer de corrida de Tris-glicina 0.04 M, pH 8,3 en un aparato de corrida en lámina vertical y un gel de separación al 10%.
- El frente de corrida se marcó agregando al buffer de los compartimentos, 10 microlitros de una solución de azul de bromofenol al 1 %.
- Se aplicaron tinciones específicas (Tabla II).
- Se lavaron los geles con agua destilada y fueron mantenidos en una solución de ácido acético glacial al 10%, hasta el momento de confeccionar los electroforetogramas.
- Las movilidades electroforéticas fueron medidas en centímetros y se calculó el porcentaje de bandas polimórficas en relación con el número total de bandas para cada sistema.

Análisis estadístico

Se confeccionó una matriz de similitud mediante el índice de Vaughan y Denfor (González, 1989) y se realizó un análisis de conglomerados que permitió agrupar las accesiones en cuanto a sus similitudes empleando el programa CLUSTER (Coyula, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización citogenética

De los tres tratamientos aplicados para la caracterización citogenética, el que permitió una mejor visualización y

conteo de los cromosomas fue el tercero, obteniéndose como resultado que todas las accesiones presentan un número cromosómico de $2n=16$, con la peculiaridad de tener 10 cromosomas largos y 6 cortos, esto confirma lo reportado por Josson (1991) al estudiar otras colecciones de *Clitoria ternatea* L., de la cual también obtuvo datos de cariomorfología y el comportamiento estable de los cromosomas. Con esta especie también se han realizado estudios de fertilidad del polen que oscila entre un 93-97% y de autotetraploidía inducida por colchicina (Gandhi y Patil, 1994, 1997).

En nuestro país se han aplicado técnicas citogenéticas para la caracterización de recursos fitogenéticos, como por ejemplo en los géneros *Xanthosoma*, *Nicotiana*, en clones de plátano burro (Millian, 2000; Hernandez, 1998; Acosta, 1999). Sin embargo no existían referencias del estudio del cariotipo realizados a colecciones cubanas de leguminosas forrajeras, por lo que estos resultados son de gran utilidad, ya que sirven de punto de partida para el estudio de otros parámetros del cariotipo.

Caracterización genético- bioquímica

De los ocho sistemas isoenzimáticos evaluados, solamente tres resultaron ser polimórficos como es el caso de las Esterasas, Fosfatasas ácidas y Anhidrasa carbónica; en el resto de los sistemas no se observaron diferencias en cuanto al número y posición de bandas.

En el zimograma del sistema Peroxidasa (Fig. 1) se observan cinco bandas presentes en todas las accesiones, lo cual no coincide con lo planteado por Zheng y Cheng

TABLA II

Sistemas isoenzimáticos estudiados y tinciones empleadas en *Clitoria ternatea* L.

TIPO DE ENZIMA	SISTEMA ENZIMÁTICO	NOMENCLATURA	TINCIÓN
Oxidorreductasa	Peroxidasas E.C. 1.11.1.7	Per	Iglesias <i>et al.</i> 1974
	Malato deshidrogenasa E.C. 1.1.1.3.7	MDH	
	Polifenoloxidasas E.C. 1.10.3.1	PPO	Wendel y Weeden, 1989 Guedes y Rodríguez, 1974
	Xantina deshidrogenasa E.C. 1.2.1.3.7	XDH	Vallejos, 1983
	Citocromo oxidasa E.C. 1.9.3.1	CO	Vallejos, 1983
	Hidrolasas	Fosfatasas ácidas E.C. 3.1.3.2	APS
Esterasas E.C. 3.1.1		Est	Glez y Glez, 1981
Liasas	Anhidrasa carbónica E.C. 4.2.1.1	AC	Glez, 1990

(1993), respecto a que estas enzimas son muy empleadas en los estudios genéticos- bioquímicos en plantas, por ser uno de los más polimórficos en cuanto al número de isoformas.

Este sistema se utilizó en la caracterización del germoplasma de *Brachiaria humidicola* y *Brachiaria jubata* que junto a otros sistemas permitieron la diferenciación de las mismas (Miles et al., 1996).

En el caso de las Polifenoloxidasas (Fig. 2) se observan 2 bandas para todas las accesiones; sin embargo, existen referencias del empleo de estas enzimas en otras especies de leguminosas, pertenecientes a los géneros *Phaseolus*, *Vigna*, *Desmodium*, *Arachis* y en especies de gramíneas, la cual ha permitido diferenciar los materiales bajo estudio (Hussain, 1987; Miles et al., 1996).

Los sistemas Citocromo oxidasa, Xantina deshidrogenasa y Malato deshidrogenasa, presentan un total de bandas de 3, 1, 2 respectivamente, presentes en todas las accesiones por lo que los tres sistemas se clasifican como monomórficos.

Para el sistema isoenzimático Esterasas (Fig. 3) se presentan un total de 4 bandas, de las cuales dos son comunes a todas las accesiones. La banda de 4.3 unidades, no aparece en las accesiones SC-134, SC-135 y SN-139. En el caso de la banda de 6.0 unidades, no se observa en las accesiones Testigo, SC-134, SC-135, SN-139 y Silvestre.

Estos resultados eran de esperar debido a que las esteraras juegan un papel importante en los procesos fotosintéticos de las plantas y su estabilidad de la expresión enzimática las hace muy importantes en estudios genéticos y en la identificación de especies de gramíneas tales como *Brachiaria humidicola* y *Brachiaria ruziencis*, las cuales pueden ser perfectamente diferenciadas por sus patrones de bandas específicos de a y b esterasa; además este sistema permitió la caracterización exitosa de la especie forrajera de *Arachis* (Valls et al., 1995).

En el sistema isoenzimático de Anhidrasa carbónica (Fig. 4), se observan siete bandas en total y de ellas, cinco son comunes a todo el material. La banda de posición 2.6 unidades, no se encuentra en las accesiones Testigo, HN-26 y SC-137. La otra banda polimórfica, es la correspondiente a 2.8 unidades y está ausente en SC-135 y SC-136.

Las isoenzimas Fosfatasas ácidas (Fig. 5), presentan un total de cinco bandas, cuatro de las cuales son comunes a todas las accesiones y la banda de 5.8 unidades, solamente esta presente en las accesiones HN-49, SC-137, Silvestre y Tehuana.

Los resultados del polimorfismo para cada sistema isoenzimático, se presentan en la tabla III. Se puede observar que en general, la colección exhibe un polimorfismo bajo, lo cual está dado básicamente por el origen común de la mayoría de las accesiones en estudio.

Empleando los resultados isoenzimáticos, se realizó un análisis de conglomerados y se confeccionó el dendrograma correspondiente (Fig. 6), el cual muestra la formación de 4 grupos con un alto grado de asociación. Las accesiones SC-134 y SN-139; Tehuana y HN-49; SC-138 y SC-163; SC-80, SC-94, S-Negra, y Mexicana muestran total coincidencia (1.00). Lo anterior pone de manifiesto, la baja variabilidad genética de la colección, lo cual confirma que algunas de las accesiones de Conchita azul colectadas en la provincia de Sancti Spiritus, pueden constituir duplicados dentro de este material.

En Cuba la complementación de la caracterización morfoagronómica con estudios del polimorfismo isoenzimático y aplicación de técnicas citogenéticas, para la determinación de las afinidades genéticas en los bancos de germoplasma de leguminosas forrajeras tropicales, es un tema novedoso. Por esta razón, este estudio representa una metodología de trabajo, que por primera vez se emplea, para la caracterización y evaluación de los recursos fitogenéticos de los pastos y forrajes, como base de los programas de mejoramiento genético, con vistas a obtener, variedades de alta calidad para la alimentación animal y otros usos en la ganadería.

TABLA III

Resultados isoenzimáticos de la colección de *Clitoria ternatea* L.

Sistema Isoenzimático	Total de Bandas	Total de Bandas Polimórficas(%)
Peroxidasas	5	0
Esterasas	4	2 (50%)
Polifenoloxidasas	2	0
Anhidrasa carbónica	7	2 (28,5%)
Citocromo oxidasa	3	0
Xantina deshidrogenasa	1	0
Fosfatasas ácidas	5	1 (20%)
Malato deshidrogenasa	2	0

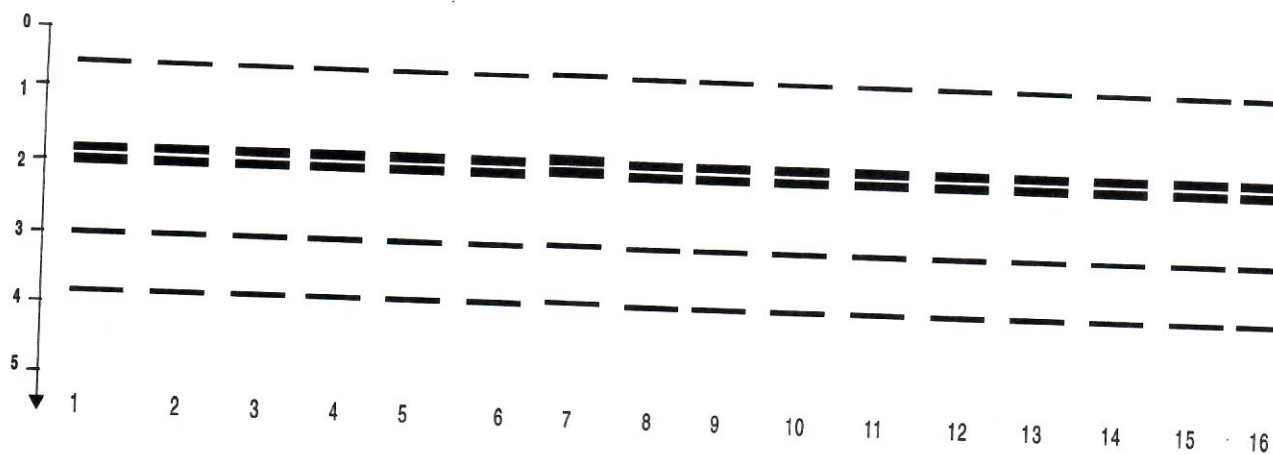


Fig. 1. Zimograma de Peroxidasas de accesiones de *Clitoria ternatea* L.

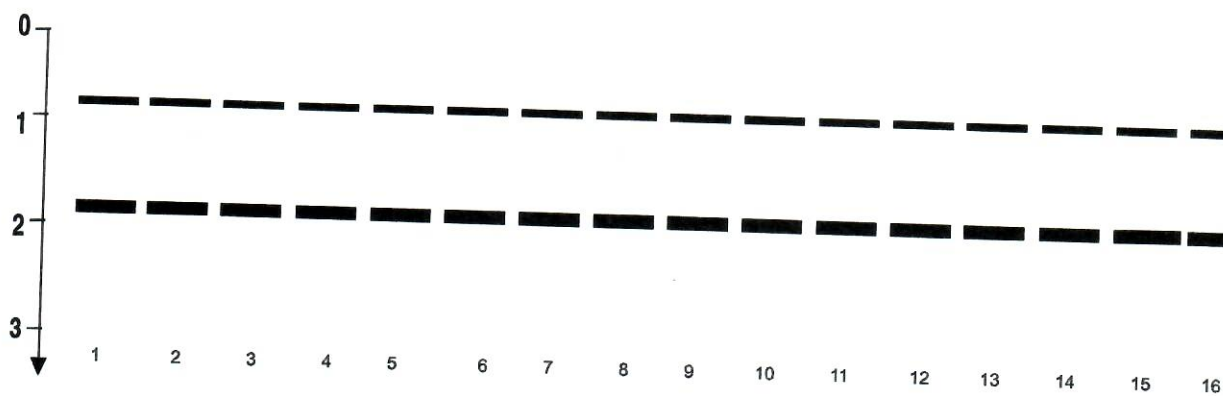


Fig. 2. Zimograma de Polifenoloxidasas de accesiones de *Clitoria ternatea* L.

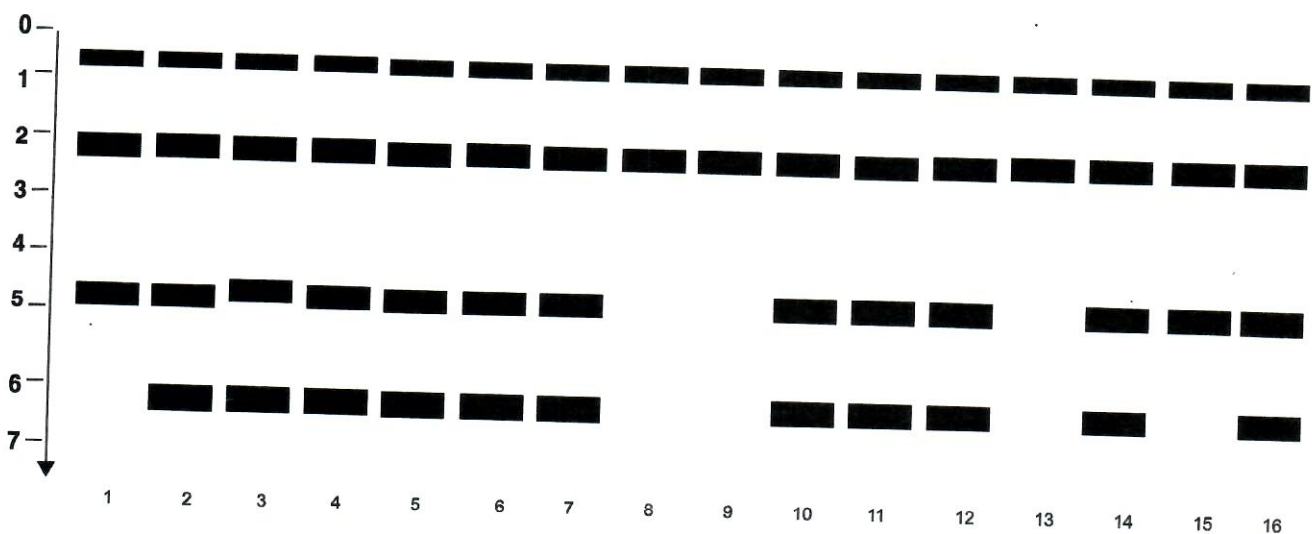


Fig. 3. Zimograma de Esterasas de accesiones de *Clitoria ternatea* L.

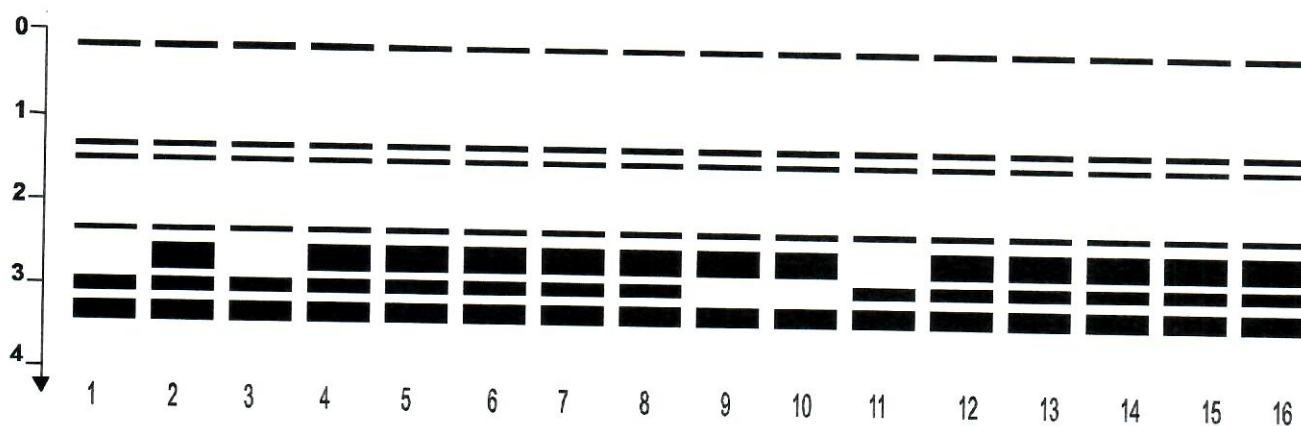


Fig. 4. Zimograma de Anhidrasa carbónica de accesiones de *Clitoria ternatea* L.

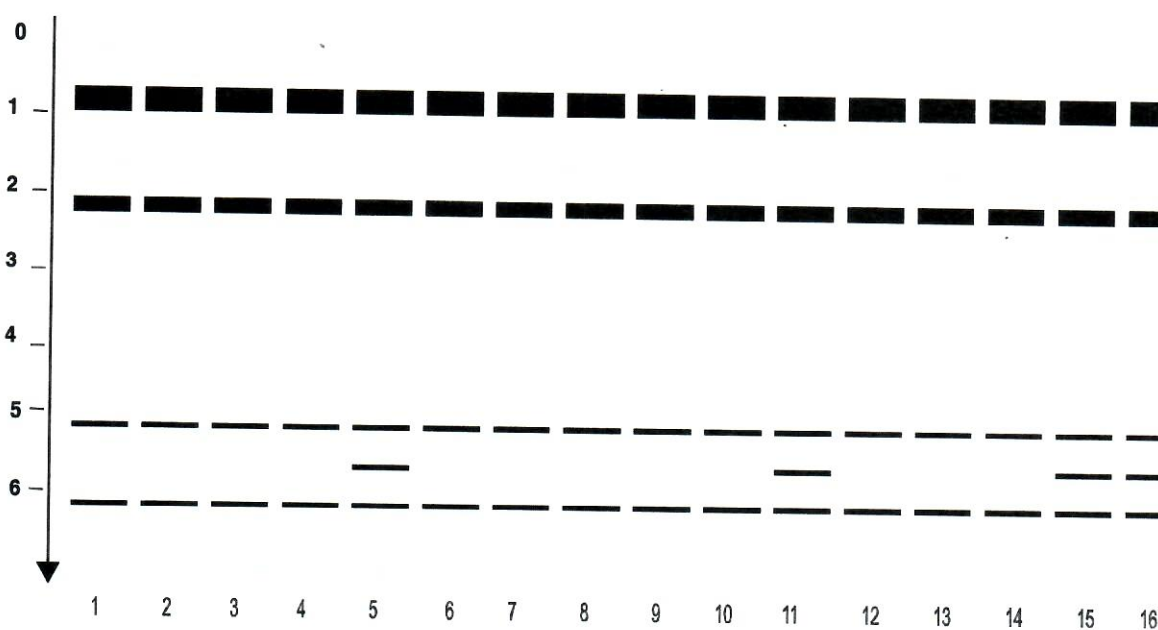


Fig. 5. Zimograma de Fosfatasa ácida de accesiones de *Clitoria ternatea* L.

CONCLUSIONES

·Se establece el mejor método para contar los cromosomas observándose que el número cromosómico de todas las accesiones de la colección cubana de *Clitoria ternatea* L. fue $2n=16$, mostrando 10 cromosomas largos y 6 cromosomas cortos.

·Los sistemas isoenzimáticos: Fosfatasa ácida, Anhidrasa carbónica y Esterasa, resultaron ser los

únicos polimórficos en cuanto al número y posición de bandas, ya que el resto de los sistemas isoenzimáticos estudiados no presentaron variabilidad genética.

·Las mayores afinidades genéticas dentro de la colección se presenta entre las accesiones SC-139 y SC-134; SC-138 y SC-163; Tehuna y HN-49; SC-80, SC-94, S-Negra y Mexicana, ya que muestran total coincidencia para los ocho sistemas isoenzimáticos estudiados.

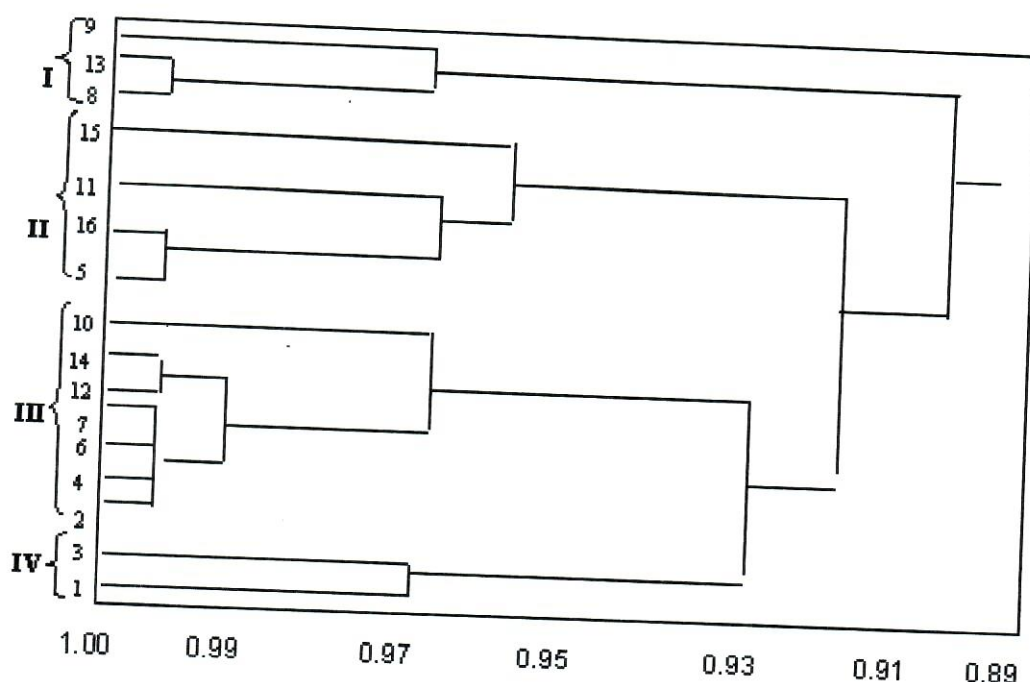


Fig. 6. Dendrograma a partir de las isoenzimas de Conchita azul.
 Grupo I : SC-134, SN-139, SC-135.
 Grupo II : SC-137, Tehuana, HN-49, Silvestre.
 Grupo III : SC-136, SC-163, SC-138, SC-80, SC-94, S-negra y Mexicana.
 Grupo IV : HN-26 y Testigo.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta R. 1999. Caracterización citogenética, morfoagronómica y genético-bioquímica de diez clones de plátano burro (*Mussa ssp.*, Grupo ABB). Tesis de Diploma. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Andersen WR, Fairbanks DJ. 1990. Molecular markers: important tools for plant genetic resource characterization. *Diversity*, 6(3): 92-98.
- Binder U. 1997. *Clitoria ternatea* L. En: Manual de leguminosas de Nicaragua. Edd. ESTELI: 20-27
- Coyula R. 1996. Programa estadístico CLUSTER.
- Davis BJ. 1964. Disc electrophoresis II. Methods and applications to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* No. 121: 404 - 422.
- Gandhi S and Patil VP. 1994. Meiotic chromosome behaviour in *Clitoria ternatea*. and *Clitoria biflora*. *Citology*. 59: 103-107.
- Gandhi S and Patil VP. 1997. Colchicine induced autotetraploidy in *Clitoria ternatea*. *Citology*. 62: 13-18.
- González C. 1989. Comportamiento genético - bioquímico de la lima persa SRA - 58 (*Citrus latifolia* Tan.) sobre diferentes patrones en Cuba. Tesis Candidato a Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Hernández I. 1998. Caracterización citogenética e isoenzimática de haploides y un dihaploide del género *Nicotiana*. Tesis de Diploma. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Hussain A. 1987. Manual práctico para la detección electroforética de isoenzimas y otras proteínas. CIAT: 34-41.
- Jonson M. 1991. Cytology of (*Clitoria ternatea* L.). *Rev The Philippine Agriculturist*. 74 (1): 85-91.
- Miles JW, Mass BL, Valle CB. 1996. Natural variation in *Brachiaria* and exiting germoplasm collections. En Hasson J. *Biology, Agronomy and Improvement*. Ed. CIAT.
- Millian M. 2000. Caracterización de la variabilidad del género *Xantosoma* en Cuba. Tesis para optar por el título de Master en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Orstein L. 1964. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* No. 121: 321-349.

Valls JF, Mass BL, López CR. 1995. Recursos genéticos de *Arachis silvestre* y diversidad genética. En: Manual de Agronomía de especies forrajeras de *Arachis*. Edd. Kerridge, P.C. CIAT. 45-57.

Villanueva F, Mena L. 1996. Establecimiento y utilización de *Clitoria ternatea* L. en zonas tropicales. Genetic Resources and Crop Evolution. 45 (1):20-26.

Zheng P, Cheng YD. 1993. Peroxidase isoenzymes analysis of Guang dong sweet potato germoplasm. In: Proceeding

of the Asian Sweet Potato Germoplasm. Network Meeting; Ganzhu. China. 123-142.

Recibido: 27 de marzo del 2001.

Direcc. de los autores: *Jardín Botánico Nacional, Carretera "El Rocío" km 3 ½, Calabazar, Boyeros. CP. 19230, Ciudad de La Habana, Cuba. **Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Calle 25 # 455 e/ J e I Vedado. Plaza 10400. Ciudad de la Habana, Cuba. **Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spíritus, Aptdo 222811, Sancti Spíritus, Cuba. ***Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INIVIT, Aptdo 6 Santo Domingo, CP 53000, Cuba.

Revista del
**Jardín Botánico
Nacional**

El Consejo de Redacción de la Revista del Jardín Botánico Nacional y la Dirección de la Institución, agradecen la desinteresada colaboración y la rapidez en la revisión de trabajos correspondientes al Vol. XXII (2001) a los siguientes especialistas:

Dra. Esther Diosdado Salces
Dra. Angela T. Leiva Sánchez
M.Sc. Esperanza Peña García
Dr. Víctor R. Fuentes Fiallo
Dr. Carlos Sánchez Villaverde

Dr. Sergio González Suárez
Dr. Alberto Álvarez de Zayas
Dr. Rosalina Berazaín Iturralde
Dr. Jorge Gutiérrez Amaro
Dr. Miguel Rodríguez Hernández