

Anatomía y fisiología de mango con diferente ploidía (*Mangifera indica* L) para una mayor eficiencia en el uso del agua

Introducción:

El mango se cultiva en 100 países y es el quinto fruto con mayor consumo a nivel mundial, con un mercado de exportación que crece al 9.6% anualmente, llegando a 2,3 millones de toneladas en 2020 (Galán Saúco, 2009; FAO, 2020). España es prácticamente el único país europeo con una producción comercial de mango, que se concentra en dos regiones fundamentalmente: las Islas canarias, con 400ha aproximadamente, y Andalucía con 4500ha (INE, 2019). De toda la producción andaluza, el 90% se concentra en la costa de Málaga, en el ámbito regional conocido como la Axarquía, y el 10% restante en la costa de Granada. A pesar de que es un cultivo de relativa reciente incorporación, ya que se introdujo en la península en los años 1950, la expansión de su cultivo y comercialización es indudable, generando trabajo y riqueza en estas zonas rurales.

El origen del mango se sitúa en zonas tropicales de la India (Kosterman y Bompard, 1993), desde donde se expandió al resto del mundo. Es por ello que el mango es una especie perennifolia que en los trópicos puede alcanzar hasta 30m de altura, donde crece de forma idónea en los rangos de temperatura de 10 a 33 °C (Galán Saúco, 2009). El límite del cultivo del mango se establece por las temperaturas bajas, y por ello, la provincia de Málaga en España es la zona latitudinal más alejada del ecuador donde se cultiva el mango, y, por tanto, con claras diferencias en morfología y comportamiento respecto a las regiones tropicales. Por ejemplo, debido a las bajas temperaturas invernales, que provocan una parada del crecimiento durante varios meses, el porte de los árboles es menor. Asimismo, esas bajas temperaturas provocan una intensa floración prematura que ha de ser podada para promover una segunda floración y así mantener la cosecha. Idealmente, el mango necesita unas condiciones de precipitación homogéneamente que

van desde 250mm 5000 mm. Por tanto, en las condiciones climáticas mediterránea debe irrigarse, especialmente en el periodo de crecimiento activo (desde marzo a octubre). Sin embargo, una de las consecuencias negativas del cambio climático es la falta de predictibilidad en las precipitaciones, cada vez más escasas en la costa mediterránea, reduciendo por tanto el agua disponible para riego. Esto presenta nuevos retos al cultivo del mango, que se suman a la baja diversidad en su producción, ya que el 80% de la superficie de cultivo en la Axarquía se concentra en una única variedad (Osteen), lo que lleva a un exceso de oferta en el mes de octubre poniendo en peligro la sostenibilidad de este cultivo en el tiempo. Es por ello que la búsqueda de nuevas variedades, a ser posible con una mayor eficiencia en el uso del agua y por tanto más resilientes a los efectos adversos del cambio climático, es esencial.

El IHSM La Mayora, centro perteneciente al CSIC y la Universidad de Málaga, en la Axarquía malagueña, se ha convertido en una referencia internacional en estudios de mejora y adaptabilidad de frutales subtropicales, tales como el mango, a nuevos ambientes. Una de las apuestas más relevantes, que se ha llevado a cabo en las últimas décadas, es la apuesta por la biodiversidad, y, por tanto, se ha generado una colección de variedades única en Europa, con 75 accesiones diferentes de mango provenientes de diferentes pañises. Entre ellas, se han detectado algunas variedades que poseen sus cromosomas duplicados (poliploides). Las plantas poliploides poseen una robustez ante estreses de tipo abiótico, tales como la sequía (Levin, 1983; Warner y Edwards, 1993). Es por ello que se han utilizado tradicionalmente en agricultura, y de hecho el 40% de las plantas cultivadas son poliploides (Simmonds, 1980). Se conoce en base a pruebas en campo su resistencia a estreses, pero se han estudiado muy poco hasta la fecha desde el punto de vista de su estructura hidráulica vascular, un aspecto esencial para entender mejor cómo utilizan el agua estas especies. Este hueco en el conocimiento es

particularmente relevante en plantas leñosas (Maherali et al., 2009; Hao et al., 2012) y en mango en particular, no se había abordado de forma integral hasta la fecha.

Este estudio, que se constituyó en la tesis fin de máster del primer autor, se basó en la hipótesis de que la duplicación de cromosomas podría suponer un incremento en el tamaño de los conductos vasculares y, por tanto, en las capacidades hídricas de mango y otras especies de árboles. En colaboración con investigadores de la Universidad de Harvard (Estados Unidos), el trabajo persiguió tres objetivos consecutivos: en primer lugar, entender la estructura de los conductos vasculares del mango; posteriormente, comparar la estructura vascular de mangos de diferente ploidía; finalmente, con esa información, evaluar la fisiología de mangos diploides y tetraploides para testar si las diferencias anatómicas se correspondían con una mejor eficiencia hídrica, uno de los retos del cambio climático.

Material y métodos

Se utilizaron árboles adultos de dos variedades de mango no cultivadas comercialmente en España: la variedad 'Winters' (diploides, $2n$), que posee árboles de porte vigoroso, y la variedad 'Kensington', de la cual existen individuos diploides ($2n$) y tetraploides ($4n$) en la colección de germoplasma del IHSM. Inicialmente, se cuantificó el área foliar y la estructura interna de las hojas con técnicas de inmunocitoquímica, usando anticuerpos de pared celular, que determinaron por vez primera la estructura química de las paredes de los cloroplastos y las células epidérmicas. Se cuantificó el tamaño y densidad de las células importantes en el intercambio de gases (estomas), comparando muestras de diferente ploidía.

Para determinar la estructura de los conductos vasculares del floema, se utilizaron métodos de microscopía óptica de fluorescencia y electrónica de barrido, combinados con análisis de imagen, cuantificando la longitud y el diámetro de miles de conductos

vasculares pertenecientes a diferentes áreas de los árboles: venas de las hojas, troncos de diferente diámetro (Figura 1) e inflorescencias. Se distinguió entre los conductos vasculares del xilema, encargado del transporte de agua y sales, de los del floema, que discurren en paralelo y se encargan del transporte de sustancias nutritivas y hormonales. También se cuantificó el radio de los micro-poros que conectan los tubos del floema. Con todas estas medidas, se han aplicado modelos de flujo de transporte hidráulico para

predecir la conductividad de los conductos vasculares diploides y tetraploides.

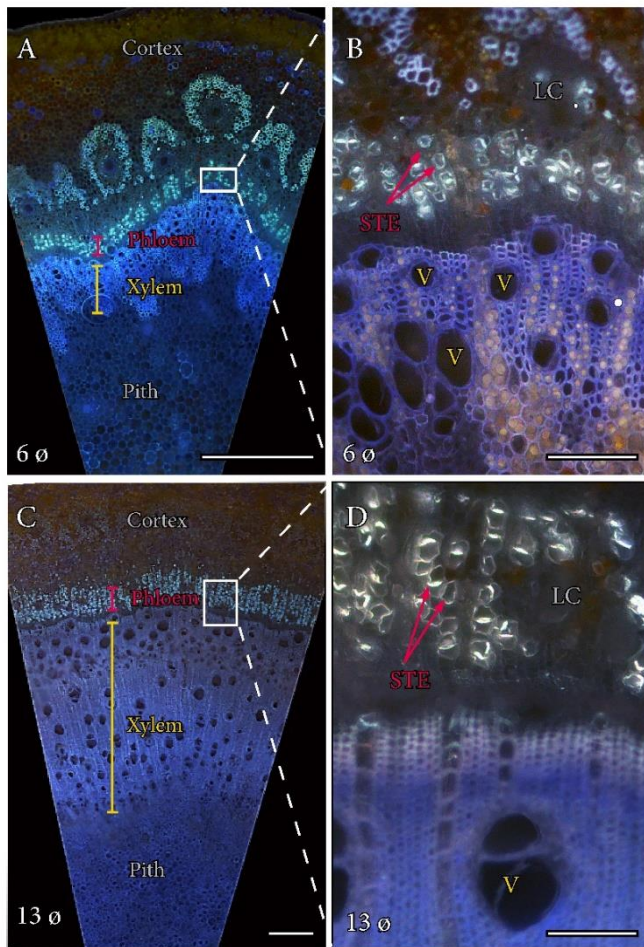


Figura 1. Secciones transversales de troncos de mango 'Winters' de diferente diámetro, enfatizando el floema (flechas rojas) y los tubos conductores que lo componen (en la foto STE). Extraída de Barceló-Anguiano *et al.*, 2021a. *Horticulture Research*.

Con el objetivo de entender las diferencias a nivel fisiológico, se evaluaron propiedades de intercambio gaseoso en campo, como medidas de deshidratación y potencial hídrico en laboratorio, focalizando en el cultivar Kensington y enfatizando las diferencias observadas entre individuos de diferente ploidía, así como sus posibles implicaciones hídricas. Se siguió una metodología estructurada en cadena: primero, se

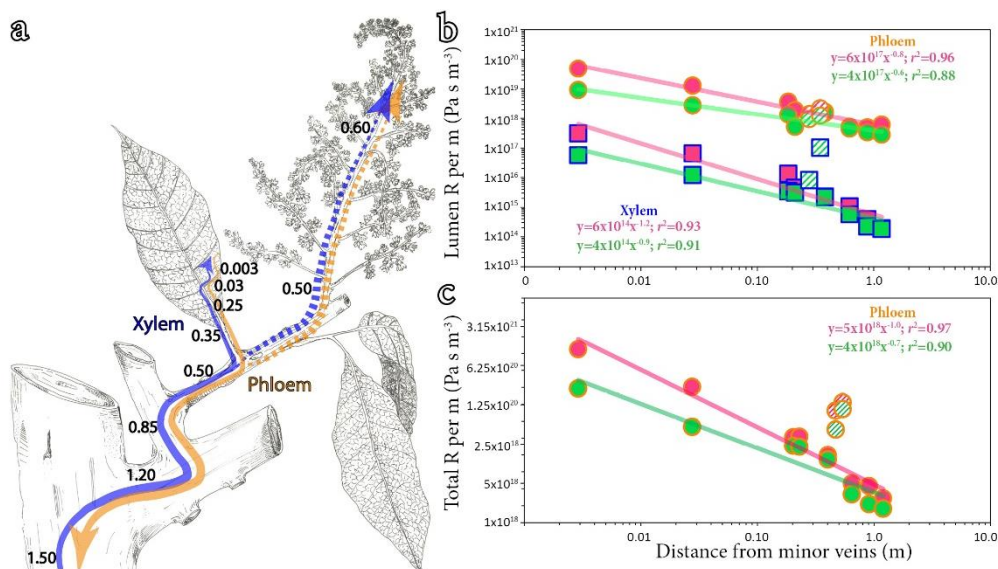
realizó un test de citometría de flujo (analizador de ploidía Cyflow ® PA, Partec), que evalúa el tamaño de los núcleos, y que confirmó que los individuos de 'Kensington' eran tetraploides. Posteriormente se extrajo ADN para la identificación de marcadores moleculares SSR, que se amplificaron por PCR y se secuenciaron. De este modo, se estableció que el cultivar tetraploide era idéntico genéticamente al diploide, solamente difiriendo la carga cromosómica, conteniendo el doble. Las medidas fisiológicas incluyeron medidas de conductancia estomática en campo y, una vez en el laboratorio, se evaluó la capacidad de deshidratación de hojas diploides y tetraploides con el tiempo, así como el potencial hídrico durante la deshidratación por el método de cámara de Scholander, de tal modo que se pudieron extrapolar parámetros de elasticidad, contenido hídrico en turgor y fracción apoplástica de agua en las hojas.

Resultados

Las medidas anatómicas que se han llevado a cabo en este trabajo son muy laboriosas e incluyen una gran cantidad de micro fotografía y análisis de imagen. En el caso de los conductos vasculares, se modelizó inicialmente la conductividad del floema en las diferentes áreas de los troncos de los árboles del mango, de tal modo que se elucidó por vez primera esta propiedad en esta especie. Estos resultados dieron lugar a una publicación en una revista de prestigio del grupo Nature, que se encuentra en el primer lugar de importancia dentro del ámbito de la Horticultura (Barceló-Anguiano *et al.*, 2021a).

Los resultados anatómicos se compararon entre individuos de diferente ploidía, destacando el mayor tamaño celular de las hojas de mango tetraploides comparado con los diploides. En particular, las células estomáticas (encargadas del intercambio gaseoso y evapotranspiración) eran de mayor tamaño y menor densidad en las hojas tetraploides. Además, se pudo comprobar por vez primera que estas diferencias de tamaño se

mantenían a nivel de orgánulos, en particular los cloroplastos. Para poder tener una perspectiva completa del árbol, se evaluaron de forma independiente los órganos aéreos: hojas de troncos e inflorescencias. Cada uno de estos órganos, se diseccionó en zonas funcionales: en los troncos, se distinguió entre diámetros de tamaño decreciente, en las hojas, se distinguió entre venas de diferente orden (desde el pecíolo hasta las venas menores, de quinto orden); en las inflorescencias, se distinguió entre la base y el ápice. La detallada evaluación de los conductos vasculares destacó que los tubos cribosos del floema eran en general de mayor diámetro y longitud en los árboles tetraploides comparados con los diploides. En el caso del xilema, esta correspondencia era clara solamente para la longitud de los conductos, pero no el diámetro. Asimismo, el tamaño de los poros de los tubos cribosos era mayor en los árboles tetraploides. Como resultado, la resistencia al flujo de agua y foto asimilados, respectivamente, era menor en los árboles



tetraploides (Figura 2).

Figura 2. Modelización de la resistencia hidráulica del floema (naranja) y del xilema (azul) en árboles diploides (símbolos rosa) y tetraploides (símbolos verde). Las flechas indican la dirección del flujo en cada uno de los conductos vasculares, y los números, la distancia en m. Imagen extraída de Barceló-Anguiano *et al.*, 2021b. *The Plant Journal*.

Para poder comprobar los efectos a nivel fisiológico de las diferencias anatómicas, mediciones en campo revelaron que, a pesar de que el potencial hídrico de las hojas era muy similar entre individuos diploides y tetraploides, las conductancias estomáticas de los individuos diploides eran mayores en todos los casos, lo cual implicaba una mayor transpiración y por lo tanto su eficiencia en el uso del agua era menor. Esto se corroboró incluso en árboles con el riego cortado, que a pesar de que reducían su evapotranspiración, mantenían la diferencia de conductancia estomática entre ploidías, mayor en diploides. Asimismo, los resultados de las curvas presión-volumen, elaboradas en el laboratorio, confirmaron una mayor resistencia de las hojas tetraploides a perder agua comparadas con las diploides (Figura 3). En cuanto se aplicaba presión, las hojas diploides perdían su potencial de un modo más rápido, por tanto la tetraploides conservaban su status hídrico.

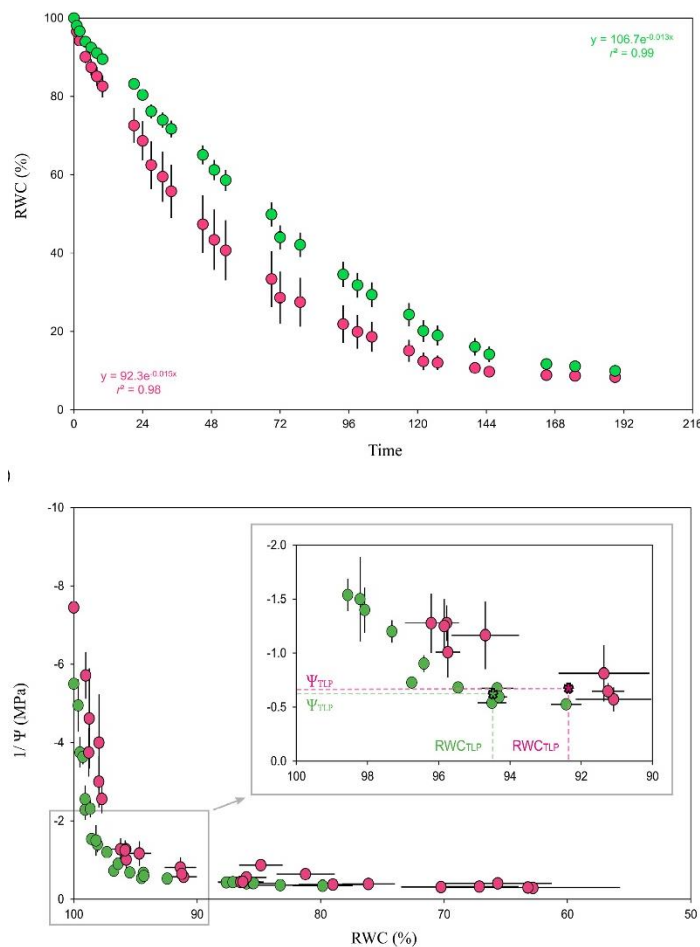


Figura 3. a) Pérdida de contenido de agua relativo (RWC) con el tiempo en hojas diploides (símbolos rosa) y tetraploides (símbolos verde), mostrando la mayor capacidad de retención de agua en el tiempo de tetraploides. b) Curvas de relación de volumen de agua en hojas y potencial hídrico en hojas diploides y tetraploides de mango. Figura extraída de Barceló-Anguiano *et al.*, 2021b. *The Plant Journal*.

Con estas evaluaciones se extrapolaron parámetros de la fracción de agua apoplástica, elasticidad de los tejidos foliares, el índice de masa foliar y el contenido de masa de agua, que destacaron su mayor magnitud en individuos tetraploides (Tabla I).

	SW/DW	Π_0 (MPa)	Π_{TLP} (MPa)	C'_{FT} (mol·m ⁻² ·MPa ⁻¹)	RWC _{TLP} (%)	ϵ (MPa)	a_f (%)	LMA (g dry mass·m ⁻²)	WMA (g H ₂ O·m ⁻²)
Ploidy									
Diploid	2.22	-1.23	-1.48	0.50	92.38	17.94	53.01	152.83	191.95
Tetraploid	2.28	-1.37	-1.63	0.51	94.50 *	24.11 *	62.37 *	187.28 *	245.65 *

* $P \leq 0.001$

Tabla I. Parámetros extrapolados de las curvas presión-volumen, que comparan entre ploidías: peso en saturación y peso seco (SW/DW); potencial osmótico en turgor máximo (Π_0) y en pérdida de turgor (Π_{TLP}), capacitancia en turgor máximo (C'_{FT}), contenido relativo de agua en turgor máximo (RWC_{TLP}), módulo de elasticidad (ϵ), fracción apoplástica de agua (a_f), índice de masa foliar (LMA) e índice de masa acuosa (WMA). Extraída de Barceló-Anguiano *et al.*, 2021b. *The Plant Journal*.

Discusión

Estos trabajos han elucidado por vez primera la arquitectura vascular del mango, particularmente del floema, que es un tejido muy desconocido en la mayoría de los árboles, pero esencial para el crecimiento, supervivencia y productividad de las plantaciones. La geometría de los vasos conductores del floema cambia con el grosor de las ramas en mango, una propiedad que determina la conductividad hidráulica bajo los modelos de flujo desarrollados por Munch en 1930, y que, debido a la complejidad que supone su estudio, es desconocida en la mayoría de los árboles (Savage *et al.*, 2017). En árboles de mango, el incremento de las dimensiones de los conductos del floema sigue una relación logarítmica con el grosor de la rama, lo cual implica que la conductividad de este tejido se incrementa a medida que los fotoasimilados fluyen desde las ramas jóvenes a los troncos más viejos, permitiendo así el transporte a largas distancias. Además, la ultraestructura de estos tubos ha revelado la presencia de placas cribosas compuestas, típicas de especies arbóreas. lo cual indica por vez primera que en árboles que se podan habitualmente, la estructura de los conductos vasculares varía independientemente de la distancia, y es por tanto la edad de las ramas, un factor a tener en cuenta en el transporte

a través del floema. Estos resultados se publicaron en *Horticultural Research* (Barceló-Anguiano *et al.*, 2021a).

La comparación de la anatomía entre plantas de diferente ploidía ha permitido confirmar la hipótesis de partida, que proponía que el incremento en el número de cromosomas estaba relacionado con un mayor tamaño de los conductos vasculares y, por tanto, afectando a la hidráulica de los árboles del mango. Las investigaciones con árboles de diferente carga cromosómica son muy escasas, ya que su disponibilidad en la naturaleza es limitada. Sin embargo, estudios previos habían relacionado el incremento en la ploidía con la capacidad de una especie de incrementar su resistencia a ecosistemas más áridos (Hao *et al.*, 2013; De Baerdemaker *et al.*, 2018). Nuestro trabajo ha sido pionero mostrando la relación ploidía-conductos del floema, nunca antes testada en una especie vegetal. Nuestros resultados son muy consistentes en el incremento de las dimensiones de los tubos cribosos, incluyendo el diámetro, longitud y cantidad de los poros que conectan los tubos, lo cual tiene implicaciones directas en la capacidad de las plantas poliploides en el transporte de sustancias alimenticias entre órganos fuente (hojas) y sumidero (frutos, por ejemplo). Además, la redimensión de los conductos vasculares afecta de modo significativo a las capacidades de las plantas para soportar períodos en los que el agua disponible para riego es escasa (Liesche *et al.*, 2019). De este modo, nuestro trabajo concluye que el mayor tamaño de los tubos del floema posibilitaría una mayor capacidad de soportar condiciones de falta de agua comparado con sus diploides congéneres, sin consecuencias drásticas para el transporte de foto asimilados hacia los frutos, esencial en árboles frutales. Asimismo, este trabajo es pionero por haber abordado el conocimiento de la arquitectura vascular en las inflorescencias, prácticamente inexploradas desde el punto de vista del floema en plantas con flor y se ha publicado en la revista *The Plant Journal* (Barceló-Anguiano *et al.*, 2021b).

Los resultados de este trabajo son pioneros para árboles frutales, pero también para especies arbóreas en general, ya que se ha comparado en detalle por vez primera la arquitectura vascular de individuos de líneas isogénicas, que son difíciles de encontrar de modo natural. Sin embargo, el uso de colecciones de germoplasma, tales como la que existe en el IHSM, posibilitan la búsqueda de variedades mejoradas de modo natural, cuya implantación en las parcelas de producción podría ser una alternativa sostenible a los efectos adversos del cambio climático. En este sentido, Málaga se está convirtiendo a través de estos estudios pioneros, en el epicentro de la investigación de agricultura subtropical sostenible.

Literatura citada

Barceló-Anguiano M, Hormaza JI, Losada JM. (2021a). Conductivity of the phloem in *Mangifera indica* L. *Horticulture Research* 8, 150.

Barceló-Anguiano M, Holbrook, NM, Hormaza JI, Losada JM. (2021b). Changes in ploidy affect vascular allometry and hydraulic function in trees. *The Plant Journal* 108: 541–554.

De Baerdemaeker, N.J., Hias, N., Van den Bulcke, J., Keulemans, W. & Steppe, K. (2018) The effect of polyploidization on tree hydraulic functioning. *Am J Bot* 105, 161–171.

Galán-Saúco, V., Grajal-Martín, M.J., Fernández-Galván, D., Coello-Torres, A., Juárez, J. & Navarro, L. (2001) Occurrence of spontaneous tetraploid nucellar mango plants. *HortScience* 36, 755–757.

Hao, G.Y., Lucero, M.E., Sanderson, S.C., Zacharias, E.H. & Holbrook, N.M. 2013. Polyploidy enhances the occupation of heterogeneous environments through hydraulic related trade-offs in *Atriplex canescens* (Chenopodiaceae). *New Phytol*, 197, 970–978.

Levin, D. A., 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *Am Nat* 122, 1–25.

Liesche, J., Pace, M.R., Xu, Q., Li, Y. & Chen, S. 2017. Height-related scaling of phloem anatomy and the evolution of sieve element end wall types in woody plants. *New Phytol* 214, 245–256.

Savage, J.A., Beecher, S.D., Clerx, L., Gersony, J.T., Knoblauch, J., Losada, J.M. *et al.* 2017. Maintenance of carbohydrate transport in tall trees. *Nature Plants* 3, 965–972.

Simmonds, N. W., 1980. Polyploidy in plant breeding. *SPAN* 23, 73–75.

Warner, D. A., Edwards, G. E., 1993. Effects of polyploidy on photosynthesis. *Photosynth Res* 35, 135–147.