

Estudio de las afinidades genéticas en clones de *Manihot esculenta* Crantz de importancia económica para Cuba

Marlyn Valdés^{1*}, María Isabel Román², Clara González¹, Xonia Xiqués¹, Yoel Beovides² y Sergio Rodríguez².
*Autor para correspondencia.

¹Facultad de Biología. Universidad de la Habana. Calle 25. Entre: I y J. Vedado. C.P: 2400. Cuba.
e-mail: marlyn@fbio.uh.cu

²Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Santo Domingo, Villa Clara. Cuba.

RESUMEN

Se determinaron las afinidades genéticas entre 12 clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), a partir del estudio de los sistemas isoenzimáticos: Peroxidasas, Polifenoloxidasas y Anhidrasa Carbónica. Se empleó para el análisis de los resultados el programa MAT-GEN. Todos los sistemas enzimáticos estudiados resultaron polimórficos, con el mayor grado para las isoenzimas Anhidrasa Carbónica. El dendrograma mostró la formación de cuatro grupos de acuerdo con las relaciones filogenéticas entre los clones estudiados.

Palabras clave: dendrograma, sistemas isoenzimáticos, yuca

ABSTRACT

The genetic affinity were studied between 12 Cassava clones (*Manihot esculenta* Crantz) after studying the isozymatical systems: Peroxidase, Phenoloxidase and Carbonic Anhydrase. The MAT-GEN program was used for the analyzing results. All the isozymic systems were polymorphous. The dendrogram showed the formation of four groups, according the phylogenetic relations.

Key words: cassava, dendrogram, isozymatical system

INTRODUCCION

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un cultivo muy versátil para economías modernas y atractivo para productores con escasos recursos, por ser uno de los más eficientes en la producción de carbohidratos, tolerante a la baja fertilidad del suelo, a la sequía y capaz de recuperarse de los daños causados por la mayoría de las plagas y enfermedades que lo atacan (Raemarks, 1993; Best y Henry, 1994).

Los avances que ha mostrado el cultivo de la yuca, han permitido en los últimos años la aplicación de técnicas modernas capaces de potenciar un mayor conocimiento de los materiales actuales. Hacia el alcance de este objetivo, estas técnicas ofrecen nuevas y potentes herramientas, que pueden contribuir al mejoramiento genético de los cultivares existentes y de nuevos obtenidos por diferentes vías (Sasson, 1996).

Los estudios electroforéticos de diferentes sistemas isoenzimáticos, constituyen una técnica válida y rápida para la detección de la variabilidad genética, ya que son marcadores de expresión que no están sujetos a una marcada influencia ambiental y permiten distinguir los genotipos y establecer las relaciones filogenéticas entre ellos (González, 2002).

En Cuba, se conserva la colección de yuca en el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales de Villa Clara la cual constituye el tercer banco de germoplasma de América con 440 accesiones, la mayoría autóctonas con una gran variabilidad fenotípica; el 60.64% presenta raíces sabrosas al paladar, el 90.83% bajo contenido de fibras y el 60.91% son de pulpa suave a medianamente dura (Milian *et al.*, 2000).

Es por ello que, el objetivo de este trabajo fue determinar las afinidades genéticas entre diferentes clones de yuca de importancia económica para Cuba, mediante el empleo de marcadores isoenzimáticos.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron los clones comerciales: 'Señorita' (1), 'CMC-40' (2), 'CEMSA 74-725' (3) y 'CEMSA 74-6329' (4), los clones promisorios 'INIVIT Y-93-1' (5), 'INIVIT Y-93-4' (6), 'INIVIT Y-93-7' (7), 'INIVIT Y-93-8' (8) e 'INIVIT Y-93-12' (9) y los clones de avanzada 'INIVIT Y-98-1' (10), 'INIVIT Y-98-2' (11) e 'INIVIT Y-98-3' (12), provenientes de estacas de cultivo tradicional del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Santo Domingo, Villa Clara. Los mismos fueron cultivados en condiciones homogéneas de suelo, iluminación, temperatura y

humedad. Los análisis electroforéticos se realizaron en gel de poliacrilamida (PAGE), empleando un gel de separación del 10% y un sistema de buffer discontinuos, para los sistemas

isoenzimáticos Peroxidasas, Polifenoloxidasas y Anhidrasa Carbónica (Tabla 1), utilizando extractos foliares a partir de 5 g de brotes jóvenes (González *et al.*, 2002a).

Tabla 1. Sistemas isoenzimáticos utilizados para el estudio de la variabilidad genética en diferentes clones de yuca y métodos de tinción empleados.

| Sistemas Isoenzimáticos | Nomenclatura | Método de tinción |
|-------------------------|--------------|-------------------------------|
| Peroxidasas | Px | Iglesias <i>et al.</i> , 1974 |
| Polifenoloxidasas | PPO | Guedes y Rodríguez, 1974 |
| Anhidrasa Carbónica | Ac | Brewer y Singh, 1971 |

Los resultados electroforéticos en base a los patrones de bandas para los tres sistemas isoenzimáticos, fueron procesados mediante el paquete de programas MAT-GEN (Sigarroa y Cornide, 1995) y el análisis de conglomerados a partir de una matriz de Jaccard (Linares, 1988).

RESULTADOS Y DISCUSION

Para el sistema Polifenoloxidasas (PPO), se presentaron un total de seis bandas pertenecientes a tres loci. El locus PPO₃ fue el único monomórfico. Dentro del locus PPO₁ carecieron de la banda de mayor migración anódica, los clones CMC-40, INIVIT Y 93-4 e INIVIT Y 93-12. Sin embargo, dentro de PPO₂, no se observó en el clon Señorita la banda de mayor migración y en el clon CMC-40 la banda de menor migración. En el resto de los clones se apreciaron las dos bandas de este locus (Fig. 1A).

Las funciones de las Polifenoloxidasas en las plantas no han sido determinadas respecto a su gran distribución, por lo que proponen hipotéticamente que participen en la defensa, biosíntesis de los fenilpropanoides, regulación del oxígeno plastídico y en el transporte de electrones. La acción catalítica de estas enzimas está ligada al oscurecimiento y pérdida de sabor en los alimentos derivados de los vegetales y frutas en almacenamiento y resultan en pérdida de su valor nutricional.

En el sistema Peroxidasas (Px), aparecieron un total de 10 bandas agrupadas en cinco loci. El locus Px₁ presentó dos bandas, que no se encontraron en los clones 'Señorita', 'INIVIT Y-98-1' e 'INIVIT Y-98-3'. En el locus Px₄ se presentó una situación similar, ya que se observaron dos bandas y no estuvieron presentes en los clones 'INIVIT Y-98-1' e 'INIVIT Y-98-3', la de menor migración. Los demás loci resultaron monomórficos y presentaron también dos bandas cada uno (Fig. 2B).

Las isoenzimas Peroxidasas juegan un rol importante en las plantas en los procesos fotosintéticos, asociados a los mecanismos de

resistencia al estrés, daños y al ataque de agentes potógenos (Reuveni, 1995), este sistema presenta gran estabilidad en su expresión enzimática, por lo que se recomiendan para estudios de desarrollo en las plantas, así como en la identificación de híbridos y cultivares (Stattmann y Wenzel, 1994).

El sistema isoenzimático Anhidrasa Carbónica (Ac), mostró un total de siete bandas agrupadas en cuatro loci, dos de ellos monomórficos. El locus Ac₁ posee una banda que solamente estuvo presente en los clones Señorita e INIVIT Y-98-2. Dentro del locus Ac₂ se observaron dos bandas con marcado polimorfismo, ya que los clones Señorita, 'INIVIT Y-93-12', 'INIVIT Y-98-1' e 'INIVIT Y-98-3' carecieron de las dos bandas; el clon 'CEMSA 74-6329 sin embargo, no mostró la banda de mayor migración anódica y los clones 'INIVIT Y-93-4' e 'INIVIT Y-93-7' de la de menor migración (Fig. 3C).

Análisis similares han sido realizados por González *et al.* (2002a) en tres clones de yuca propagados por diferentes métodos de cultivo, en la que se obtuvo un marcado polimorfismo para el sistemas Peroxidasas; sin embargo, los sistemas Polifenoloxidasas y Anhidrasa Carbónica resultaron ser monomórficos.

Estudios realizados por otros autores en bancos de germoplasma de diferentes cultivos, coincidieron en plantear que existe polimorfismo para los sistemas Peroxidasas y Polifenoloxidasas, como por ejemplo en clones del banco de germoplasma de yuca en Cuba (Milian *et al.*, 2000); en diecinueve accesiones de arroz (*Oriza sativa*, L.) (González *et al.*, 2001); en veinte cultivares de aguacate (*Persea americana*, Mill.) (González *et al.*, 2002b), en el banco de germoplasma de *Colocasia esculenta*, L. Schot en Cuba (Rodríguez-Manzano *et al.*, 2001). También se demostró la utilidad en los análisis electroforéticos de isoenzimas y de proteínas totales en la detección de duplicados en la colección de yuca del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1998).

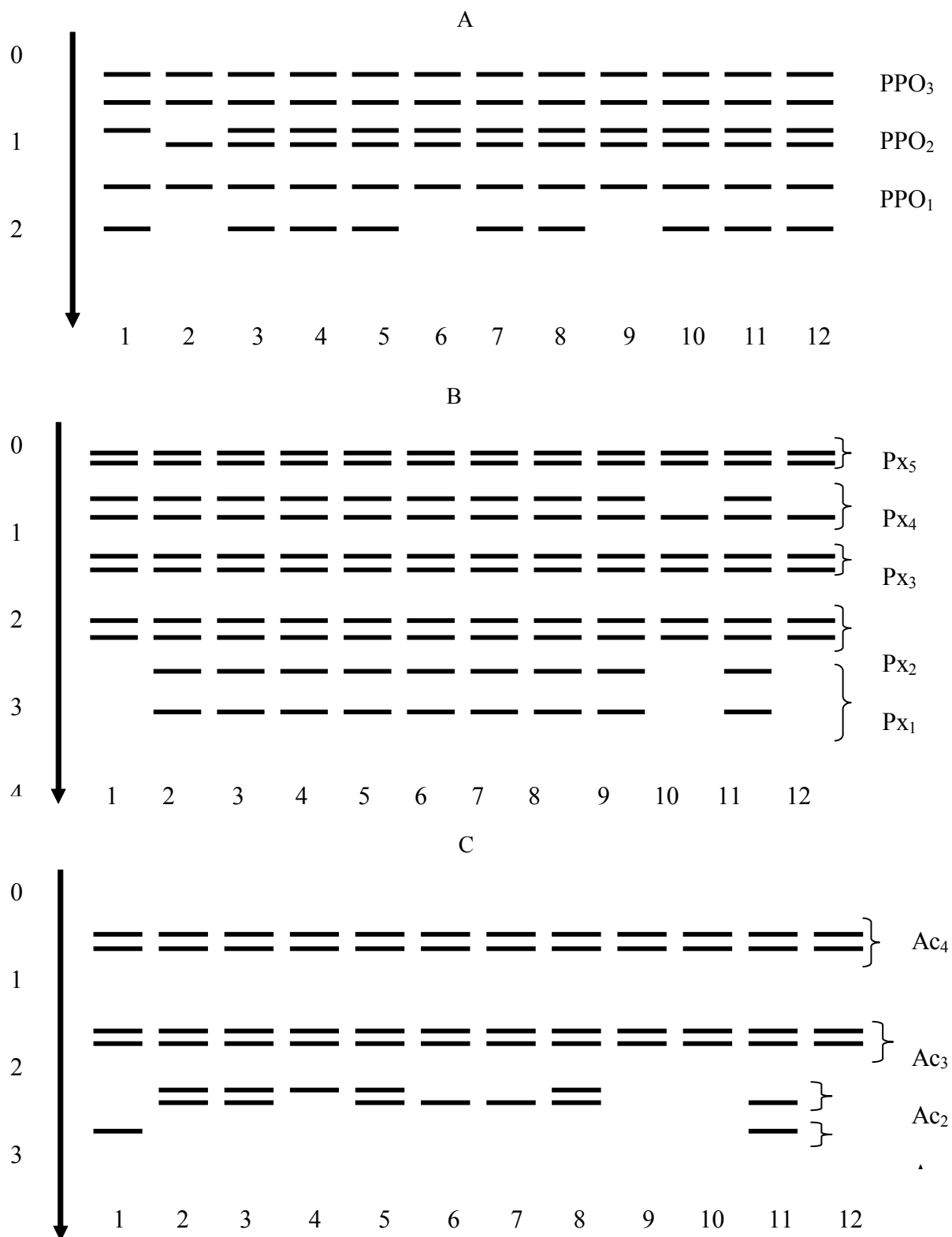


Figura 1. Zimogramas de polifenoloxidasas (A), Peroxidasas (B) y Anhidrasas carbónicas (C) para diferentes clones de yuca, Señorita' (1), 'CMC-40' (2), 'CEMSA 74-725' (3) y 'CEMSA 74-6329' (4), los clones promisorios 'INIVIT Y-93-1' (5), 'INIVIT Y-93-4' (6), 'INIVIT Y-93-7' (7), 'INIVIT Y-93-8' (8) e 'INIVIT Y-93-12' (9) y los clones de avanzada 'INIVIT Y-98-1' (10), 'INIVIT Y-98-2' (11) e 'INIVIT Y-98-3' (12).

Román *et al.* (2003), obtuvieron polimorfismo para estos sistemas incluyendo, además; la Anhidrasa Carbónica en el estudio de diferentes marcadores de variabilidad genética en el género *Musa*, lo que fue de gran utilidad en la separación de grupos dentro del género. Por el contrario, estudios realizados por Pinares *et al.* (2001) en dieciséis accesiones del banco de germoplasma de *Clitoria ternatea*, L., el sistema Peroxidasas y Polifenoloxidasas resultaron ser

monomórficos y Anhidrasa Carbónica poco polimórfica.

El dendrograma obtenido con estos resultados (Fig. 2), muestra la formación de cuatro grupos (I, II, III y IV). Los clones 'Señorita' (1) y 'CMC-40' (2) de alto rendimiento y excelentes propiedades culinarias, se ubicaron solos en los grupos I y III; debido a sus diferencias genéticas con respecto al resto del material vegetal.

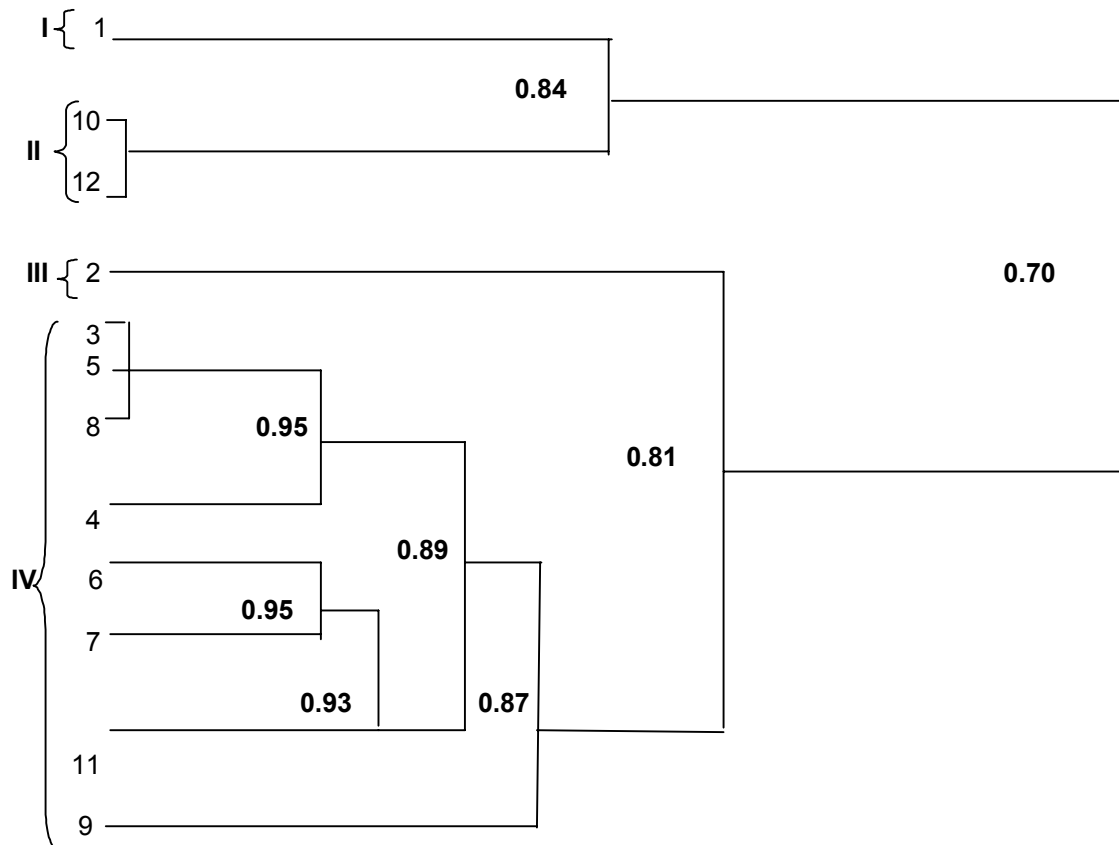


Figura 2. Dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados (Cluster) con el índice de Jaccard para los sistemas isoenzimáticos. Peroxidasas, Polifenoloxidasas, y Anhidrasas carbónicas en diferentes clones de yuca.

En el grupo II aparecieron los clones 'INIVIT Y-98-1' (10) e 'INIVIT Y-98-3' (12), los cuales se consideran de avanzada por sus características morfoagronómicas y poseen idénticos zimogramas para los tres sistemas isoenzimáticos.

El resto de los clones, ubicados en el grupo IV, correspondieron a los promisorios, comerciales y de avanzada, con un alto grado de afinidad genética entre ellos.

Por el análisis de los zimogramas es posible la existencia de duplicados, que son los pertenecientes a los clones 'INIVIT Y-98-1' e 'INIVIT Y-98-3' y los clones 'CEMSA 74-725' (3), INIVIT Y-93-1' e INIVIT Y-93-8', con una total coincidencia de los zimotipos en los tres sistemas analizados, por lo que se sugiere ampliar el número de

sistemas isoenzimáticos estudiados y si es necesario realizar estudios de marcadores de DNA.

Los resultados obtenidos en este trabajo, son de gran importancia en los programas de investigación relacionados con el mejoramiento genético en especies de plantas de interés económico, ya que evidencia la utilización de marcadores genéticos que puedan ser usados para ayudar en la selección y permitan identificar los genotipos. La caracterización de plantas sobre la base de las variaciones electroforéticas de las isoenzimas, constituye una poderosa técnica para separar y clasificar los genotipos en muchas especies (González, 2002).

La novedad del presente trabajo radica en que por primera vez en Cuba se analiza la variabilidad

genética de clones de yuca representativos del banco de germoplasma cubano, mediante el empleo de técnicas de electroforesis, lo cual permitió formar grupos de afinidad en la especie *Manihot esculenta* Crantz. Estos resultados han confirmado lo descrito por otros autores citados anteriormente en relación con la utilización de marcadores isoenzimáticos en el estudio de las afinidades genéticas en las diferentes accesiones en los bancos de germoplasma de diferentes cultivos.

REFERENCIAS

- Best, R y Henry J (1994) Cassava: towards the years 2000. International Network of Cassava Genetic Resources. Serie 10, pp. 179
- Brewer, G y Singh CF (1971) Introduction to isozymes techniques. Acad. Pres. New York, pp. 186
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (1998) El Banco de Germoplasma de Yuca del CIAT. Taller sobre conservación *ex situ* de recursos fotigenéticos. Boletín Cartagena de Indias, Colombia, IPGRI América. 16p.
- González, CA, Díaz S, Román MI, Xiques X, Florido M, Lara RM, Pérez L (2001) Análisis de diecinueve accesiones de arroz (*Oryza sativa* L.) mediante electroforesis de isoenzimas y proteínas totales. Revista Jardín Botánico Nacional, 22(2): 271-178
- González, CA (2002) Detección del polimorfismo genético mediante marcadores bioquímicos en plantas. En: MT. Cornide *et al* (eds) Marcadores moleculares. Nuevos Horizontes en la Genética y la Selección en Plantas, Capítulo 2, La Habana, pp. 36-66
- González, C, Beovides Y, Román MI, Xiques X, Florido M, Lara RM, Acosta R (2002a) Detección de la variabilidad genética en el cultivo de la Yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mediante estudios isoenzimáticos y de proteínas totales. Revista Biología, 16(1): 42-48
- González, C, Román MI, Xiques X, Dueñas J, Jiménez R, Rodríguez N (2002b) Caracterización isoenzimática de cultivares de aguacate (*Pessea americana*, Mill.). Revista Biología, 16(1): 49-55
- Guedes, ME y Rodríguez CI (1974) Disc electrophoresis patterns of phenoloxidase from leaves of *coffee* cultivars. Dep. de Portugal Acta Biológica. Serie A 13: 169-177
- Iglesias, L, Lima H y Simon JP (1974) Isozymes identification of nucellar seedling in *citrus*. J. Heredity 65: 81-84
- Linares, G (1988) Análisis de datos. La Habana. Pueblo y Educación, pp. 590
- Milian, MD, Sanchez I, Rodríguez S, Ramirez T, Cabrera M, Medero V, Guerra D (200) Caracterización, evaluación y conservación de la colección cubana de germoplasma de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). LJ Carvaldo, AM Thro y AD Vilarinhos (eds). Proceeding IV International Scientific Meeting Cassava biotechnology Network. Brasilia. 626 p.
- Pinares A, Ramos Y, González C, Xiques X, Román MI (2001) Caracterización genético-bioquímica de dieciséis accesiones de *Clitoria ternatea* L. Revista Jardín Botánico Nacional, 22(2): 285-292
- Raemarks, CJ (1993) Primary and cyclic somatic embryogenesis in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Ph. D. Thesis. Agricultural University Wageningen, pp. 98
- Reuveni, R (1995) Biochemical markers as tools for the screening resistance against plant pathogens. 2.In: Novel approaches to integrated pest management. Edd. CRC. Press Inc.
- Rodríguez-Manzano, A, Rodríguez-Nodal A, Román MI, Fundora Z, Castiñeira L (2001) Morphological and isoenzyme variability of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) germoplasm in Cuba. Plant Genetic Resources Newsletter, 126: 31-40
- Román MI, Alonso M, Barrios A (2003) Marcadores de variabilidad genética en el género *Musa*. Sitio Web de la Representación de la FAO en Cuba. fao.cubasi.cu
- Sasson, A (1996) Biotechnologies in developing countries: Present and Future. UNESCO-Publishing, pp. 98
- Sigarroa, A y Cornide MT (1995) Marcadores moleculares para la selección de variedades vegetales. Avances en Biotecnología Moderna 3:17-47
- Stattmann, M y Wenzel E (1994) Interspecific somatic hybrids between *Solanum khasianum* and *S. aculeatissimum* produced by electrofusion. Plant Cell Reports, 13: 193-196