

## Caracterización morfoagronómica de clones de (*Manihot esculenta* Crantz) obtenidos por cultivo *in vitro*

Yoel Beovides,<sup>1\*</sup> Víctor Medero<sup>1</sup>, Clara González,<sup>2</sup> Xonia Xiqués,<sup>2</sup> María I. Román<sup>1</sup>, Marilys Milián<sup>1</sup>, Santiago García<sup>1</sup>, Humberto Toledo<sup>1</sup> y Dablys Guerra<sup>1</sup> \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6, Santo Domingo 53000, Villa Clara, Cuba. e-mail: inivit@enet.cu

<sup>2</sup>Facultad de Biología, Universidad de la Habana.

### RESUMEN

En Cuba se han puesto a punto metodologías para la micropropagación de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), sin embargo poco se ha estudiado sobre la caracterización de los materiales vegetales obtenidos. En este trabajo se realizó la caracterización de un grupo de plantas procedentes de los clones: 'Señorita', 'CEMSA 74-725' y 'CMC-76', propagados por el método tradicional (estacas), por organogénesis y a partir de embriones somáticos con vistas a estudiar, mediante descriptores morfoagronómicos, la estabilidad genética de estos clones teniendo en cuenta las técnicas de cultivo *in vitro* empleadas. Se evaluaron 44 descriptores y se determinaron nueve variables cuantitativas y ocho cualitativas como las más importantes. Sólo se detectaron diferencias (entre y dentro de clones) para las variables cuantitativas: ancho y longitud del lóbulo de la hoja, longitud del pecíolo, altura total y de la primera ramificación, número de estacas y de raíces comerciales por planta, peso de las raíces comerciales y grosor del tallo. Estos resultados, que por primera vez se obtienen en Cuba en este cultivo, son de gran importancia para un mejor conocimiento de los clones en estudio y sirven como base para otros análisis futuros de validación de las metodologías de cultivo *in vitro* implementadas.

Palabras clave: descriptores morfoagronómicos, embriogénesis, estabilidad genética, organogénesis, yuca

### ABSTRACT

Methods for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) micropropagation have been refined in Cuba; however, few surveys have been carried out on characterization. A set of plants from 'Señorita', 'CEMSA 74-725' and 'CMC-76' clones was characterized. These plants were propagated by traditional methods (cuttings), organogenesis and starting from somatic embryos, so as, to study the genetic stability of the material through morphoagronomic descriptors taking into consideration *in vitro* culture techniques. 44 descriptors were evaluated and nine quantitative and eight qualitative variables were determined as the most important. Differences (between and within clones) were only detected for quantitative variables: width and length of leaf lobules, length of leaf stalk, total height and height of the first branch, stem number, number of marketable roots per plant, weight of commercial roots and stem thickness. These results obtained in this crop for the first time in Cuba are of great importance for a better knowledge of studied clones and constitute a base for further analysis to validate implemented *in vitro* culture methods.

Key words: morphoagronomic descriptors, genetic stability, cassava, organogenesis, embryogenesis

### INTRODUCCION

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) constituye la cuarta fuente de calorías después del arroz, la caña de azúcar y el maíz, y es un cultivo versátil para economías modernas y atractivo para productores con escasos recursos (Best y Henry, 1994). De modo general, tiene múltiples usos en industrias crecientes como la producción de alimentos, fármacos, alimentos concentrados para animales, textiles, papel y otras (Scott *et al.*, 2000).

En Cuba se han puesto a punto metodologías eficientes para la micropropagación de la yuca mediante organogénesis y por embriogénesis somática, las cuales pueden contribuir positivamente a los programas de mejoramiento genético del cultivo (Medero *et al.*,

2000). Sin embargo, poco se ha estudiado sobre la caracterización de los materiales de yuca que se obtienen mediante estos procesos en Cuba y en el mundo.

Coral (1984) durante un estudio del efecto del cultivo de meristemas sobre el rendimiento y el vigor de dos variedades comerciales de yuca, se refirió al efecto positivo que produjo el cultivo *in vitro* en el número de raíces comerciales y el número de estacas. Unos años después, Catao (1986) mientras evaluaba la estabilidad fenotípica de la variedad de yuca 'MCOL 1505', propagada por estacas (control), por brotes, por cultivo de meristemas, por embriogénesis somática y conservada *in vitro*, encontró que las plantas provenientes de embriones somáticos se diferenciaron significativamente del control tanto en las características

cualitativas como en las cuantitativas, efecto que consideró se debía al rejuvenecimiento producido por el cultivo *in vitro*.

La aplicación de marcadores morfoagronómicos, que generalmente tienen poca influencia del ambiente, es de gran importancia en el monitoreo de la variabilidad genética, incluso de aquella asociada a técnicas de cultivo *in vitro* (Ohnishi y Matsuoka, 1996).

En este trabajo se realizó la caracterización morfoagronómica de un grupo de materiales de yuca propagados por el método tradicional (estacas), por organogénesis y a partir de embriones somáticos, con el objetivo de evaluar el efecto de las técnicas de cultivo *in vitro* empleadas en la micropropagación de la yuca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se estudió un grupo de plantas procedentes de los clones: 'Señorita', 'CEMSA 74-725' y 'CMC-76', propagados por el método tradicional de estacas (C), mediante organogénesis (O) y embriogénesis somática (E) (Medero *et al.*, 2000). Se plantaron según un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas en un suelo Pardo Sialítico

con Carbonatos (Hernández *et al.*, 1995). Se aplicaron las normas técnicas del cultivo (MINAGRI, 1998) y la cosecha final se realizó a los 10 meses.

### Caracterización morfoagronómica

La caracterización y evaluación se realizó siguiendo un diseño completamente aleatorizado con nueve tratamientos (las tres variantes de propagación en los tres clones estudiados) y 15 réplicas (plantas individuales). Se evaluaron 44 variables morfoagronómicas según la Lista de Descriptores del cultivo (Fukuda y Guevara, 1998). Las plantas a evaluar se mantuvieron en el campo, en parcelas de 5 m de largo con cinco surcos, plantados a una distancia de siembra de 0.90 m x 0.90 m para los clones 'Señorita' y 'CEMSA 74-725' y de 0.90 m x 1.10 m para el clon 'CMC-76'. Se evaluaron 15 plantas por parcela en los tres surcos centrales.

A partir del estudio del comportamiento de cada una de las variables y teniendo en cuenta los criterios de Varela (1998), de excluir del análisis final aquellas características que no ofrecen diferencias entre los individuos o tratamientos, se procesaron estadísticamente sólo nueve descriptores cuantitativos y ocho cualitativos (Tabla 1).

Tabla 1. Variables cualitativas y cuantitativas analizadas por su contribución en la caracterización de diferentes clones de yuca.

Variables cuantitativas		Variables cualitativas	
Descriptores	Nomenclatura	Descriptores	Nomenclatura
Longitud del lóbulo (cm)	LLOB	Color del pecíolo	CPEC
Ancho del lóbulo (cm)	ALOB	Color externo del tallo	CETA
Longitud del pecíolo (cm)	LPEC	Presencia de pedúnculo en las raíces	PPRA
Altura total de la planta (cm)	ALTP	Color externo de la raíz	CERA
Altura de la primera ramificación (cm)	ALPR	Color de la corteza de la raíz	CCRA
Número de estacas comerciales por planta	NECP	Niveles de ramificación	NIRA
Número de raíces comerciales por planta	NRCP	Hábito de ramificación	HRAM
Peso de las raíces comerciales (kg)	PRAC	Tipo de planta	TPLA
Grosor del tallo (cm)	GROT		

Para el estudio de las variables cuantitativas se empleó un análisis de varianza bifactorial y para comparar las medias se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan, según criterios de Sigarroa (1985).

Las variables cualitativas y cuantitativas fueron analizadas mediante un Análisis de Conglomerados (cluster), a partir de una matriz de distancia Euclídeana. Además se empleó el análisis de Componentes

Principales, a partir de una matriz de correlaciones de Spearman (variables cualitativas) y de Pearson (variables cuantitativas) (Linares, 1988).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de conglomerados (cluster) para las variables cualitativas evidenció la formación de tres grupos: el primero agrupó a los materiales

propagados por el método tradicional, por organogénesis y por embriogénesis somática del clon 'Señorita', el segundo se correspondió con las tres formas de propagación del clon 'CEMSA 74-725' y el tercero, lo integraron las tres variantes estudiadas en el clon 'CMC-76'.

Resultados similares se obtuvieron en el análisis de componentes principales donde todas las variables tienen una contribución importante en la evaluación y diferenciación de las variantes estudiadas. Se observó que no se presentaron cambios morfológicos en los clones desde el punto de vista cualitativo dado por una total coincidencia de estos descriptores para todas las variantes que tienen idéntico comportamiento dentro de un mismo clon, independientemente de la procedencia del material de plantación.

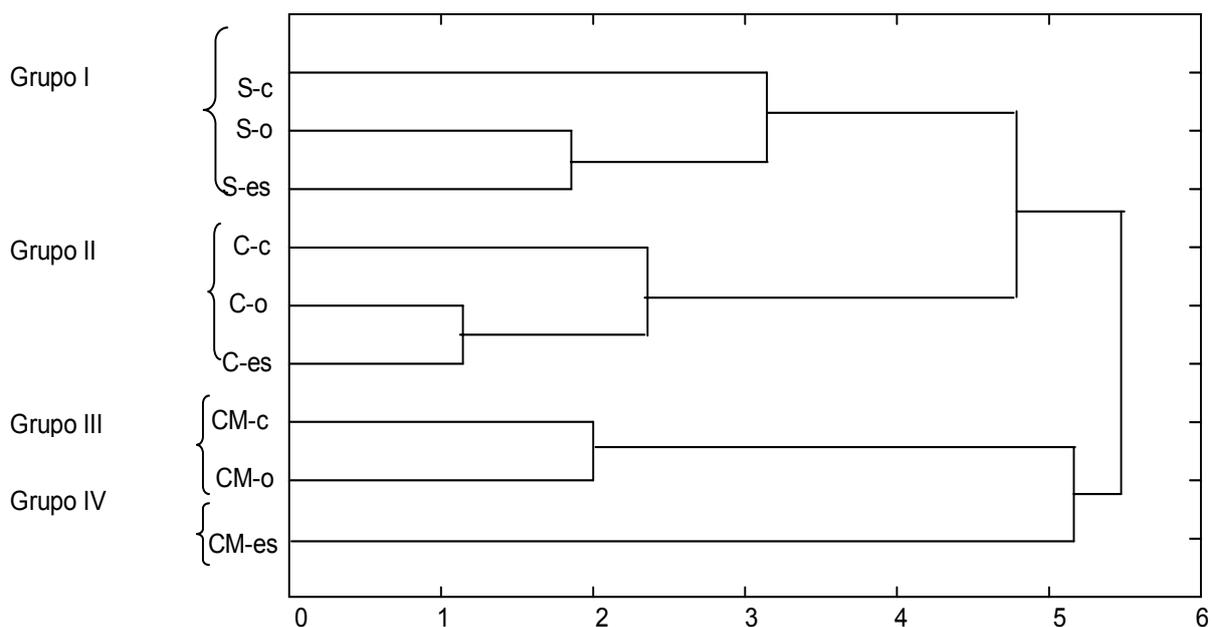
En la figura 1 puede observarse la formación de cuatro grupos en el análisis de conglomerados para las variables cuantitativas, lo que coincidió con los resultados del análisis de componentes principales.

Las plantas provenientes del clon 'Señorita' se agruparon en el primer cluster y se caracterizaron

por presentar un alto número de raíces comerciales por planta (11-12), pedunculadas y de más de 30 cm de longitud con un peso medio por planta de 2.8-3.2 kg, la altura de la planta alcanzó los 2.20 m y produjo de ocho a diez estacas comerciales por planta.

En el Grupo II se ubicó el clon 'CEMSA 74-725' con sus tres variantes de propagación, este genotipo tiene el lóbulo de la hoja más corto que el clon 'Señorita' (por debajo de 17 cm), promedió de ocho a diez raíces comerciales por planta con un rendimiento medio de 3.3 kg/planta y generalmente no produjo más de siete estacas comerciales.

Los materiales propagados por el método tradicional y por organogénesis provenientes del clon 'CMC-76' se concentraron en el grupo III, éste cultivar comúnmente superó los 2.40 m de altura, el tallo fue más grueso (2.9 cm de diámetro), ramificó por debajo de 0.8 m, y produjo diez raíces comerciales con un rendimiento promedio de 3.0 kg/planta y de 15 estacas comerciales por planta procedentes de la primera y segunda ramificaciones.



Leyenda: S- Señorita, C- CEMSA 74-725, CM- CMC-76, c-campo, o-cultivo de tejidos, es- embriogénesis somática.

Figura 1. Dendrograma obtenido mediante el análisis de conglomerados (cluster) de los clones de yuca estudiados con la utilización de descriptores cuantitativos.

Los materiales vegetales descendientes del clon 'CMC-76' obtenidos por embriogénesis somática se ubicaron solos en el Grupo IV, esta separación del resto de los materiales dentro del clon puede estar dada porque este genotipo responde muy bien a las técnicas biotecnológicas, el cual se considera un modelo para la embriogénesis somática en yuca

(Mathews *et al.*, 1993). Este comportamiento se manifiesta en el vigor de las plantas en condiciones de campo, lo cual se hizo muy evidente en caracteres como: el largo y el ancho del lóbulo de las hojas, la longitud del pecíolo, la altura total de la planta, el número de estacas comerciales por planta y el grosor del tallo.

En la tabla 2 se muestran los resultados de la prueba de rangos múltiples de Duncan, donde los descriptores antes mencionados exhibieron valores altos que se alejaron de la media y tuvieron diferencias significativas respecto al resto de los materiales estudiados, aspecto que influyó notablemente en la ubicación de los materiales de origen embriogénico de 'CMC-76' en el

dendrograma. También Catao (1986) durante sus estudios de evaluación de estabilidad fenotípica en el clon de yuca 'MCOL 1505', encontró que las plantas provenientes de embriones somáticos se diferenciaron significativamente del control tanto en las características cualitativas como en las cuantitativas, efecto que consideró vinculado al rejuvenecimiento producido por el cultivo *in vitro*.

Tabla 2. Resultado de las variables cuantitativas evaluadas en diferentes clones de yuca según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Variantes	Variables								
	LLOB	ALOB	LPEC	ALTP	ALPR	NECP	NRCP	PRAC	GROT
Señorita (C)	18.83 b	4.07 cd	27.46 b	2.17 d	0.00 e	6.75 g	12.90 a	2.78 b	2.64 c
Señorita (O)	19.77 b	4.21 c	28.44 b	2.22 d	0.00 e	7.06 g	12.64 a	3.49 a	2.87 ab
Señorita (ES)	20.87 a	4.26 c	28.93 b	2.23 d	0.00 e	7.13 g	11.79 ab	3.56 a	3.03 a
C- 74 725 (C)	16.86 c	3.89 d	27.68 b	2.18 d	1.49 b	8.31 f	8.51 c	3.25 a	2.80 b
C- 74 725 (O)	17.99 c	4.08 cd	28.06 b	2.23 d	1.79 a	9.33 e	9.34 c	3.77 a	2.93 ab
C- 74 725 (ES)	18.17 bc	4.07 cd	28.25 b	2.21 d	1.89 a	10.05 d	10.39 b	3.76 a	2.94 ab
CMC-76 (C)	18,10 bc	4.51 b	23.07 c	2.39 c	0.73 d	15.57 c	7.48 d	2.07 c	2.62 c
CMC-76 (O)	18.25 b	4.62 a	22.36 c	2.63 b	0.94 c	17.52 b	10.06 b	2.23 c	2.79 b
CMC-76 (ES)	21.20 a	4.78 a	31.06 a	2.74 a	1.05 b	18.37 a	10.91 b	2.75 b	3.20 a
S <sub>x</sub> AxB	0.744***	0.138***	1.014***	0.049***	0.123***	0.395***	0.913***	0.283***	0.197 *

LLOB-longitud del lóbulo de la hoja, ALOB-ancho del lóbulo, LPEC-longitud del peciolo, ALTP-altura total de la planta, ALPR-altura de la primera ramificación, NECP-número de estacas comerciales por planta, NRCP-número de raíces comerciales por planta, PRAC-peso de las raíces comerciales por planta (kg), GROT-grosor del tallo.

Letras diferentes indican significación estadística para  $p < 0.05$ , según la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan. \*\*\*  $p < 0.001$ . Se comparan valores entre líneas de una misma columna.

Estos resultados coincidieron igualmente con los obtenidos por Coral (1984), quién indicó el efecto positivo del cultivo *in vitro* en yuca sobre el número de raíces comerciales, el número de estacas y además, en el largo de los lóbulos foliares respecto al control propagado por estacas.

Carvalho *et al.* (2000) en un estudio con 21 descriptores morfológicos en yuca encontraron en el análisis de componentes principales que los caracteres altura total de la planta, peso de las raíces comerciales y el contenido de almidón representaban los más importantes con un 34.8% de la variación y por tanto los de mayor significado en la discriminación de cultivares.

Los estudios realizados aquí mostraron un comportamiento muy parecido dentro de cada clon entre las plantas procedentes de cultivo *in vitro*, y siempre con un desarrollo vegetativo superior a los propagados por estacas, generalmente con diferencias significativas sobre éstas. Con el análisis realizado se evidenció que las variables más importantes para la caracterización de los materiales de yuca estudiados fueron: longitud del lóbulo de la hoja, ancho del lóbulo, altura total de la planta, altura

de la primera ramificación, número de estacas comerciales por planta, número de raíces comerciales, peso de las raíces comerciales y grosor del tallo (cuantitativas); también resultaron determinantes en la diferenciación de ellos las variables: color del peciolo, color externo del tallo, presencia de pedúnculo en las raíces, color externo de la raíz, color de la corteza de la raíz, niveles de ramificación, hábito de ramificación y tipo de planta (cualitativas).

A las consecuencias producidas en los vegetales por el cultivo *in vitro* se han referido varios autores, pues debido a la propia composición del medio y las condiciones de cultivo, éstos muestran un rejuvenecimiento de los tejidos, el cual se produce al perder el tejido la señal que poseía de la planta de origen (Yeung, 1995) y que generalmente, se traduce en mayor vigor de las plantas y en un incremento del potencial productivo o su recuperación.

Otros autores han encontrado evidencias sobre el efecto beneficioso que produce el cultivo *in vitro* en otros vegetales. En la micropropagación a escala comercial del cultivar de banano 'Gran Enano' (*Musa* spp.), se percibió un 25% de aumento del rendimiento en producción correspondiendo un 17% al efecto

fisiológico del rejuvenecimiento (Orellana, 1994). En la caña de azúcar (*Sacharum* spp. híbrido) se mantuvo, aún después de dos multiplicaciones vegetativas de las plantas cultivadas *in vitro*, un aumento altamente significativo en el rendimiento, caracterizado por un incremento en el número de tallos (Jiménez, 1995).

Durante la evaluación morfológica de materiales de malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) propagados por cormos, por organogénesis y por embriogénesis, Pilgrim (2000) halló que las variantes procedentes de cultivo *in vitro* mostraron similitudes en su comportamiento morfológico, con diferencias significativas en variables como el número de cormos y su peso total respecto al método tradicional (cormos). Lui (1997) también se refirió a la similitud hallada entre plantas *in vitro* de malanga en condiciones de campo las cuales superaron a las propagadas por la vía tradicional.

El rejuvenecimiento observado en los clones de yuca micropropagados es de gran importancia en el 'refrescamiento' de la 'semilla' de yuca por vía biotecnológica y confirman la necesidad de implementar el cultivo *in vitro* como una contribución esencial para elevar los rendimientos del cultivo en cuba a partir de la utilización de material de plantación de alta calidad.

## CONCLUSIONES

Los estudios realizados demostraron que las técnicas de cultivo *in vitro* empleadas para la micropropagación de los clones 'Señorita', 'CEMSA 74-725' y 'CMC-76' no generan diferencias para los caracteres cualitativos dentro de cada clon. Sin embargo, en los clones estudiados las plantas procedentes del cultivo *in vitro* poseen valores superiores para la mayoría de las variables cuantitativas analizadas, respecto al método tradicional, aspecto que corroboró el efecto de rejuvenecimiento producido por las técnicas biotecnológicas sobre el comportamiento morfoagronómico de los clones de yuca estudiados.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda ampliar estas investigaciones recurriendo a los estudios isoenzimáticos, citogenéticos y moleculares, con vistas a profundizar en otros aspectos vinculados a la estabilidad genética de los clones y a potenciar la aplicación del cultivo *in vitro* en la obtención de 'semilla' de yuca de alta calidad.

## REFERENCIAS

Best, R y Henry H (1994) Cassava: towards the year 2000. International Network or Cassava Genetic Resources. Report of the First meeting of International Meeting Network for Cassava Genetic Resources. CIAT, Colombia, 18-23 August, International Crop Network. Series 10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 179 p.

Carvalho, LJC, Schaal Ba y Fukuda WMG (2000) Morphological descriptors and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) marker used to assess the genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces revealed by PCR-based markers. In: L.J.C.B Carvalho, A.M Thro y A.D Vilariños (Eds) IV International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología/CBN, Brasília, 626 p.

Catao, C (1986) Evaluación de la estabilidad fenotípica de una variedad de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) propagada vegetativamente por diferentes métodos. Tesis. Univ. del Valle, Colombia, 96p.

Coral C., J.C (1984) Efecto del cultivo de meristemas sobre el rendimiento y vigor de dos variedades comerciales de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis Ingeniero Agrónomo. Palmira, Universidad Nacional de Colombia. 76p.

Fukuda, W.M.G, Guevara CI (1998) Descriptores morfológicos e agronómicos para a caracterização de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Cruz das almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1998. (EMBRAPA-CNPMPF, Documento 78), 38p.

Hernández, A (1995) Nueva Versión de Clasificación de los Suelos de Cuba. Instituto de Suelos de Cuba, La Habana, s/p.

Jiménez, E (1995) Propagación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Instituto de Biotecnología de las Plantas-Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Cuba, 97 p.

Linares, G (1988) Análisis de datos. Ed. Pueblo y Educación, La Habana, Cuba, 590 p.

Lui, W (1997) Culture of callus and protoplast of tannia *Xanthosoma* spp. in Puerto Rico. Mayagüez. Campus 2:20-22

Mathews, H, Schopke C, Carcamo R, Chavarriaga P, Fauquet E Y Beachy Rn (1993) Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. Plant Cell Report 12:328-333

Medero, V, Rodríguez S, Borroto C, Gómez R, López J, García M, Ventura J, Cabrera M, Torres M Y Álvarez M (2000) Sistema para la embriogénesis somática en clones cubanos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). L J C B Carvalho, A M Thro y A D Vilarinhos (Eds) Proceeding IV International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network, Brasília, 626 p.

MINAGRI (1998) Instructivo Técnico sobre el Cultivo de la Yuca. Castellanos, P (Ed.). SEDGRI/AGRINFOR, Ciudad de La Habana, Cuba, 18 p.

Ohnishi, O Y Matsuoka Y (1996). Search for the wild ancestor of buckwheat. Taxonomy of *Fagopyrum* (*Polygonaceae*) species based on morphology, isozymes and CP DNA variability. Genes and Genetic Systems 71(6):61-65

Orellana, P (1994) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa clara, Cuba, 96 p.

Pilgrim, M (2000) Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Tesis presentada en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas (Resumen). Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Cuba, 31 p.

Scott, GJ, Best R, Rosegrant M Y Bokanga M (2000) Roots and tubers in the global food system: A vision statement to

the year 2020. A co-publication of International Potato Center (CIP), International Center of Tropical Agriculture (CIAT), International Food Policy Research Institute (IFPRI), International Institute of Tropical Agriculture (IITA), and International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Printed in Lima, Perú: International Potato Center, 111p.

Sigarroa, A (1985) *Biometría y Diseño Experimental*. Ed Pueblo y Educación, La Habana, Cuba, 743 p.

Varela, M (1998) *Análisis multivariado de datos, aplicación a las Ciencias Agrícolas*. Departamento Matemática Aplicada, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), La Habana, 56 p.

Yeung, E C (1995) Structural and development patterns in somatic embryogenesis. In: *In vitro embryogenesis in plants*. T. A Thorpe (Ed), London. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 247-253.