

# Caracterización citogenética y genético-bioquímica de los clones incluidos en el grupo "Amarillo" del género *Xanthosoma*

María Isabel Román\*, Marilys Milián\*, Xonia Xiqués\*\*, Clara González\*\* y Margarita Nadal\*\*

\* Instituto Nacional en Viandas Tropicales (INIVIT), Cuba.

\*\* Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

## RESUMEN

Se realizó el análisis citogenético y genético-bioquímico de 15 clones del género *Xanthosoma*, incluidos en el grupo "Amarillo", pertenecientes al Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales. Se determinó la presencia de  $2n=2x=26$  cromosomas y la caracterización isoenzimática mostró las afinidades genéticas entre las accesiones.

**Palabras clave:** citogenética, electroforesis, isoenzimas, Malanga

## ABSTRACT

Fifteen clones belonging yellow group identified from the germoplasm collection of Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) were analyzed. Cytogenetic and genetic biochemical analysis were carry out. The chromosomal number of all clones was  $2n=2x=26$ . The isoenzymatical analysis showed a high level of genetic affinities between the fifteen clones.

**Key words:** cytogenetics, electrophoresis, isozymes, malanga

## INTRODUCCIÓN

Las colecciones de los recursos fitogenéticos juegan un importante papel en el mantenimiento de la diversidad biológica y en la conservación de información para los programas de mejoramiento. Estas deben ser estudiadas desde el punto de vista morfológico, genético y biométrico, lo cual permite conocer su valor potencial. La malanga (género *Xanthosoma*) constituye una de las viandas tropicales preferidas por la población, lo cual hace a este cultivo un producto de alta demanda en el mercado nacional e internacional, es por ello que diferentes países han planteado obtener un aumento significativo en la producción de este cultivo, con la finalidad de satisfacer las demandas crecientes del mismo (López & al. 1995, Dottin 1997).

En Cuba, se conserva el germoplasma del género *Xanthosoma* con el mayor número de accesiones sin erosión genética en los últimos diez años, donde se han evaluado morfoagronómicamente clones procedentes de colectas nacionales e internacionales, estudios que deben ser complementados con análisis genéticos, los que ayudarán a la correcta clasificación de los clones de este género.

Es por ello que los objetivos del presente trabajo fueron: Determinar el número de cromosomas de los clones pertenecientes al "grupo amarillo" del género *Xanthosoma* y establecer las afinidades genéticas entre los clones mediante los análisis isoenzimáticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Banco de Germoplasma de Aráceas del Instituto de Investigaciones en Viandas

Tropicales (INIVIT), ubicado en el municipio de Santo Domingo, provincia de Villa Clara, Cuba.

La colección se plantó de acuerdo a un Diseño Completamente Aleatorizado, en el mes de abril de 1993 y se aplicaron las normas de cultivo recomendadas en el Instructivo Técnico para la Malanga (Ministerio de la Agricultura 1990).

Se analizaron 15 clones pertenecientes al grupo "Amarillo" de la colección nacional de malanga del género *Xanthosoma* (Tabla I).

Para realizar el análisis del cariotipo se colocaron cinco cormos de cada clon en bolsas de polietileno en condiciones de humedad. Cuando brotaron las raíces se tomaron aquellas que tenían aproximadamente 1 cm de longitud. Dichas raíces se sometieron a un pretratamiento con 8-Hidroxiquinolina (0.02%) durante 1,2 y 3 horas para seleccionar la mejor variante. Posteriormente se procedió a la fijación del material usando una mezcla de etanol absoluto y ácido acético glacial a la proporción 3:1 de 4 a 7 días. Seguido a esto se lavaron con agua destilada para eliminar los restos del fijador y proceder a la hidrólisis, la cual se realizó con HCl 1N a 60°C durante 10, 15 y 20 minutos, a continuación se volvió a lavar con agua, esta vez para eliminar los restos del ácido y se sometieron a tinciones con Hematoxilina de Gomory a 60°C durante 2,3 y 4 horas.

Una vez culminada la tinción se colocaron los ápices en porta objetos, añadiéndole una gota de ácido acético al 45%; se colocó el cubre objeto y se flameó la preparación sobre un mechero de alcohol. Posteriormente se realizó el "squash".

TABLA I

Clones del grupo Amarillo pertenecientes a la colección nacional de malanga del género *Xanthosoma*.

No.	N.Introd.	Clones	Color de la masa (Grupo – Número)*	Nomenclat.	Procedencia
1	1466	Encintada	Amarillo (A-1)	E	Cuba
2	1475	De Seda	Amarillo (A-2)	DS	Cuba
3	1443	Amarilla-1	Amarillo Naranja(A-3)	A-1	Cuba
4	1464	Amarilla-2	Amarillo (A-4)	A-2	Cuba
5	1480	Chopo Amarillo	Amarillo (A-5)	ChA	Cuba
6	1242	Amarilla Criolla-1	Blanco rosado (A-6)	AC-1	Cuba
7	1243	Amarilla	Amarillo (A-7)	A	Cuba
8	1255	Amarilla Ceniza	Amarillo Naranja(A-8)	ACz	Cuba
9	1238	Amarilla Especial	Amarillo Naranja(A-9)	AE	Cuba
10	1232	Amarilla Criolla	Amarillo Naranja(A-10)	AC	Cuba
11	1261	Amarilla Especial-4	Amarillo (A-11)	AE-4	Cuba
12	1245	Belembe	Amarillo claro (A-12)	B	Guadalupe
13	1229	Amarilla Trinidad	Amarillo (A-13)	AT	Trin. Tobago
14	906	Amarilla Riza	Blanco Rosado (A-14)	AR	Cuba
15	1460	Amarilla-3	Amarillo (A-15)	A-3	Cuba

\* La información entre paréntesis de la cuarta columna, corresponde al número de orden de los clones dentro de cada grupo.

Se observaron y contaron los cromosomas de 20 células por clon en un microscopio óptico, marca Leitz, modelo Ortholux con cámara fotográfica acoplada modelo Orthomat. Los cariotipos fueron fotografiados con un objetivo 100x y la lente de la cámara con un ocular de 10x.

Para realizar los análisis electroforéticos de isoenzimas se prepararon las muestras, seleccionando al azar hojas jóvenes de plantas adultas provenientes del campo en el estadio particular de desarrollo ontogenético de cigarro. Los extractos crudos se obtuvieron macerando 5 gramos de hojas frescas y sanas en un mortero a los cuales se le añadió diez gotas de una solución de Sacarosa al 20%. Los extractos fueron filtrados en tela de gasa, envasados en viales plásticos y mantenidos a  $-15^{\circ}$  C hasta su utilización (González & al. 1984).

Las corridas electroforéticas se realizaron en gel de poliácridamida (PAGE) y un sistema de buffer discontinuos según Orstein (1964) y Davis (1964), con Buffer de corrida de Tris- Glicina 0,04 M, pH 8,3 en un aparato de corrida en lámina vertical según Raymond (1964).

Se aplicaron tinciones específicas (Tabla II) para visualizar las bandas de los sistemas peroxidadas, polifenoloxidas y esterases.

A partir de los resultados obtenidos en los zimogramas para los sistemas isoenzimáticos se midieron las semejanzas entre los clones y especies con el empleo del MAT-GEN para obtener la matriz de similitud a partir de índice de Jaccard, la cual se procesó a través de un análisis de Conglomerados empleando el Programa CLUSTER (Sigarroat & Cornide, 1995).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estableció la metodología más apropiada para la observación y conteo de los clones de masa amarilla del género *Xanthosoma* (Fig.1), la cual puede servir para el estudio del cariotipo de otros clones de este género. Todos los clones estudiados presentaron  $2n=2x=26$  cromosomas (Fig. 2).

Darlington y Wylie (1955) encontraron en ejemplares de la América tropical de la especie *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, un número cromosómico de  $2n=26$ . Marchant (1973) extiende este carácter al género *Xanthosoma* en general.

TABLA II

Sistema isoenzimáticos empleados y tinciones utilizadas para el género *Xanthosoma*.

Tipo de enzima	Sistema enzimático	Nomenclatura	Método de Tinción
Oxidoreductasas	Peroxidasas	Prx E.C.1.11.1.7	Iglesias & al., (1974)
	Polifenoloxidasas	PPO E.C.1.10.3.1	Guedes y Rodríguez (1974)
Hidrolasas	Esterasas	Est E.C.3.1.1	González y González (1981)

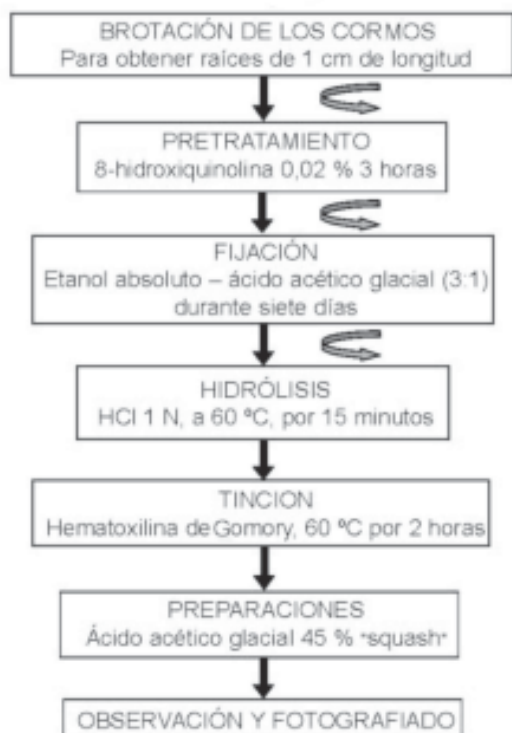


Fig. 1. Metodo para el analisis de cariotipo de clones del género *Xanthosoma*.

Bai (1982) en la evaluación de aspectos citogenéticos de una colección de clones de *Xanthosoma* spp. en el Instituto de Investigaciones de Agricultura Tropical (IITA) de Nigeria, encontró clones tetraploides de malanga amarilla ( $2n=4x=52$ ) y clones diploides con 26 cromosomas.

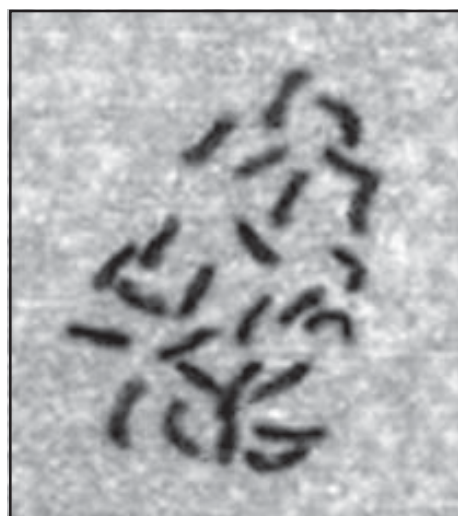


Fig. 2. Células de clones de malanga del grupo Amarillo del género *Xanthosoma* en metafase mitótica con  $2n=26$  cromosomas (100X).

En la Figura 3 se presenta el zimograma para las isoenzimas Esterasas, con un total de doce bandas. Las bandas de 0,3 y 1,3 unidades están presentes en 10 de los 15 clones estudiados. La zona de mayor migración anódica se caracteriza por un gran polimorfismo; se observan bandas propias en los clones 'Amarilla-2' (A-2), 'Amarilla Criolla' (AC) y 'Belembe' (B).

Para las isoenzimas Peroxidasas (Figura 4) se observan un total de 11 bandas, de las cuales la de posición en 1,0 unidades es común a todos los clones. Las bandas de posición 4,5 y 5,0 unidades están presentes en todos clones excepto en

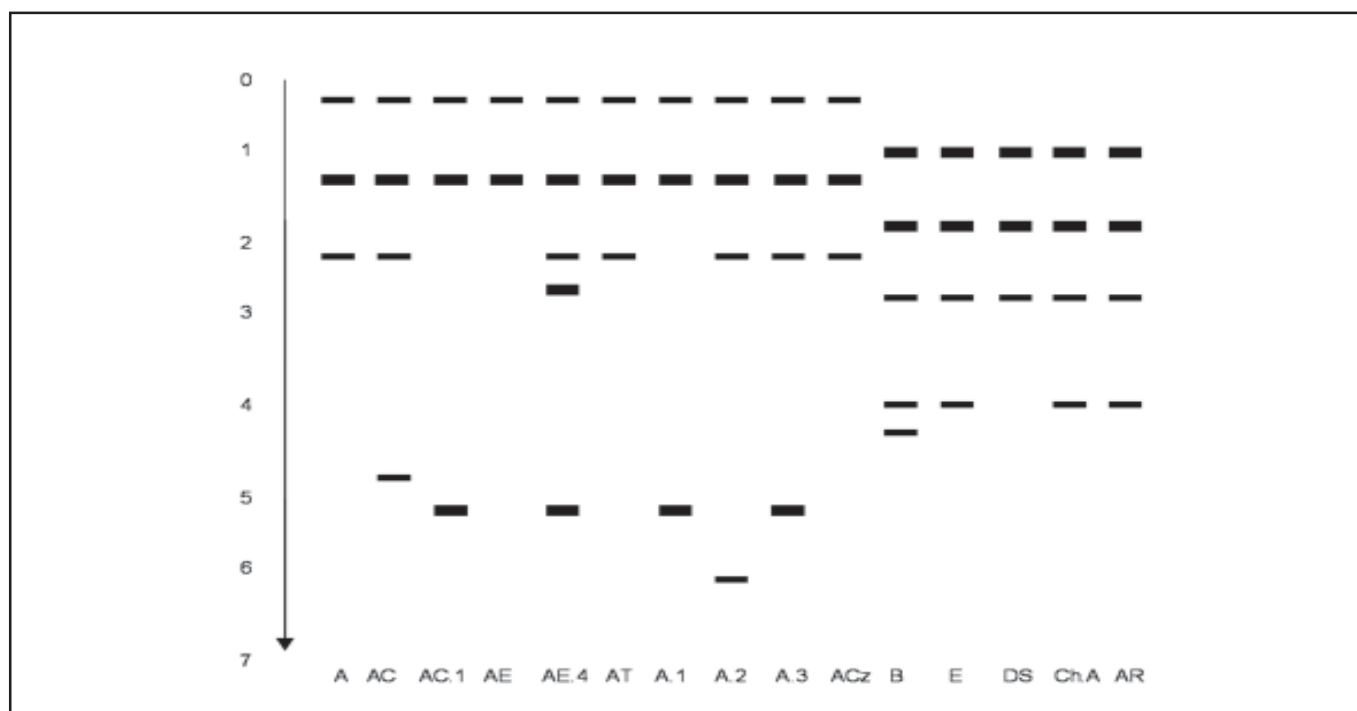


Fig. 3. Zimograma correspondiente al sistema isoenzimático Esterasas (grupo Amarillo).

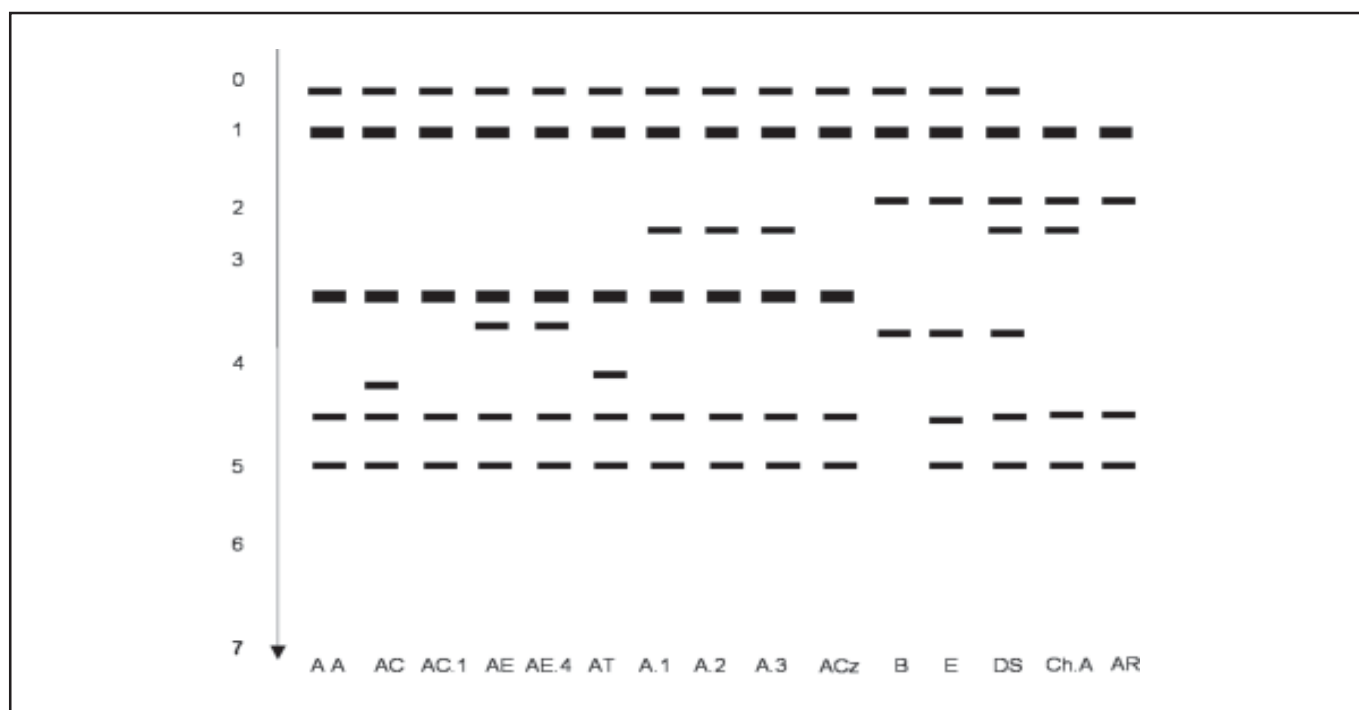


Fig. 4. Zimograma correspondiente al sistema isoenzimático Peroxidasa (grupo Amarillo).

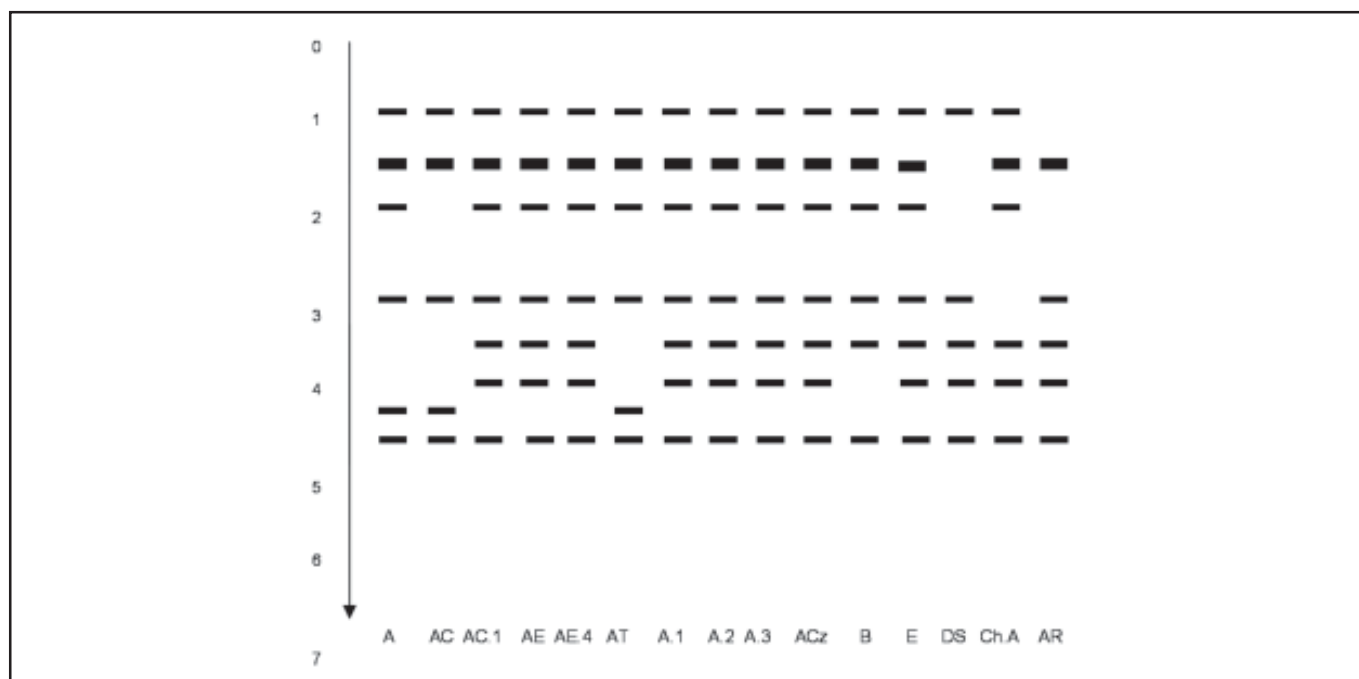


Fig. 5. Zimograma correspondiente al sistema isoenzimático Polifenoloxidasas (grupo Amarillo).

todos los clones excepto en 'Belembe' (B) y la banda de 0, 'Belembe' (B) y la banda de 0,5 unidades los clones excepto en 'Belembe' y la banda de 0,5 unidades está ausente en los clones 'Chopo Amarillo' (ChA) y 'Amarilla Riza' (AR). Se observa la presencia de algunas bandas propias en los clones 'Amarilla Criolla' (AC), 'Amarilla Trinidad' (AT), 'Belembe' (B), Encintada' (E), 'De Seda' (DS), 'Amarilla Especial' (AE)

y 'Amarilla Especial-4' (AE-4) en la región de mayor migración anódica.

Para este sistema isoenzimático se presentó un gran polimorfismo de bandas en cuanto a número y posición. Sólo se observan con patrones idénticos los clones 'Amarilla Especial' (AE) y 'Amarilla Especial-4' (AE-4) y 'Amarilla-1' (A-1), 'Amarilla-2' (A-2) y 'Amarilla-3' (A-3).

El sistema Polifenoloxidasas, en el zimograma que muestra la Figura 5, presenta un total de ocho bandas, la de mayor migración anódica es común a todo el material; la banda de menor migración solamente está ausente en 'Amarilla Riza' (AR) y las bandas de 1,5 y 2,1 unidades, no se observan en 'De seda' (DS). Esta última banda tampoco se presenta en 'Amarilla criolla' (AC) y 'Amarilla Riza' (AR). La banda de 3,3 sólo está ausente en el clon 'Chopo amarillo' (ChA).

De manera general para este grupo se obtuvo una gran diferencia entre los clones que lo conforman, dado por la presencia en algunos casos de bandas propias y en otros por la ausencia de bandas comunes, lo cual se corresponde con los resultados del análisis morfoagronómico donde también se observó una gran dispersión de este grupo, en cuanto a los caracteres cualitativos y cuantitativos (Milián, 2001).

El grupo Amarillo presenta un elevado polimorfismo como muestra la Tabla III. Para los sistemas Esterasas y Peroxidasas se presentaron diez patrones de bandas, la mayoría de los clones tiene su propio patrón; mientras que el sistema Polifenoloxidasas con siete patrones diferentes, presenta uno común para los clones Amarilla Criolla-1' (AC-1), 'Amarilla Especial' (AE), 'Amarilla Especial-4' (AE-4), 'Amarilla-1' (A-1), 'Amarilla-2' (A-2), 'Amarilla-3' (A-3), 'Amarilla Ceniza' (Acz) y 'Encintada' (E) y otro para 'Amarilla' (A) y 'Amarilla Trinidad' (AT).

Como se puede apreciar, el clon 'Belembe' (B) mostró su identidad isoenzimática en los tres sistemas estudiados, lo que corrobora los resultados obtenidos por Milián (2001) en el análisis de Componentes Principales para los caracteres morfoagronómicos más importantes.

La Figura 6 muestra el dendrograma obtenido por el análisis de Conglomerados con los sistemas isoenzimáticos Esterasas, Peroxidasas y Polifenoloxidasas, donde se puede apreciar la formación de dos grupos. En el grupo I se ubican, en su mayoría, los clones que han sido prospectados en las regiones oriental y central cubanas y otros obtenidos por mejoramiento genético. Se distingue en este grupo el clon 'Amarilla Trinidad' (AT).

En el grupo II se reúnen cinco clones, los que presentaban patrones de bandas característicos que los separaban. En general, son materiales prospectados en la provincia de Guantánamo o introducidos desde Guadalupe, como es el caso de 'Belembe' (B).

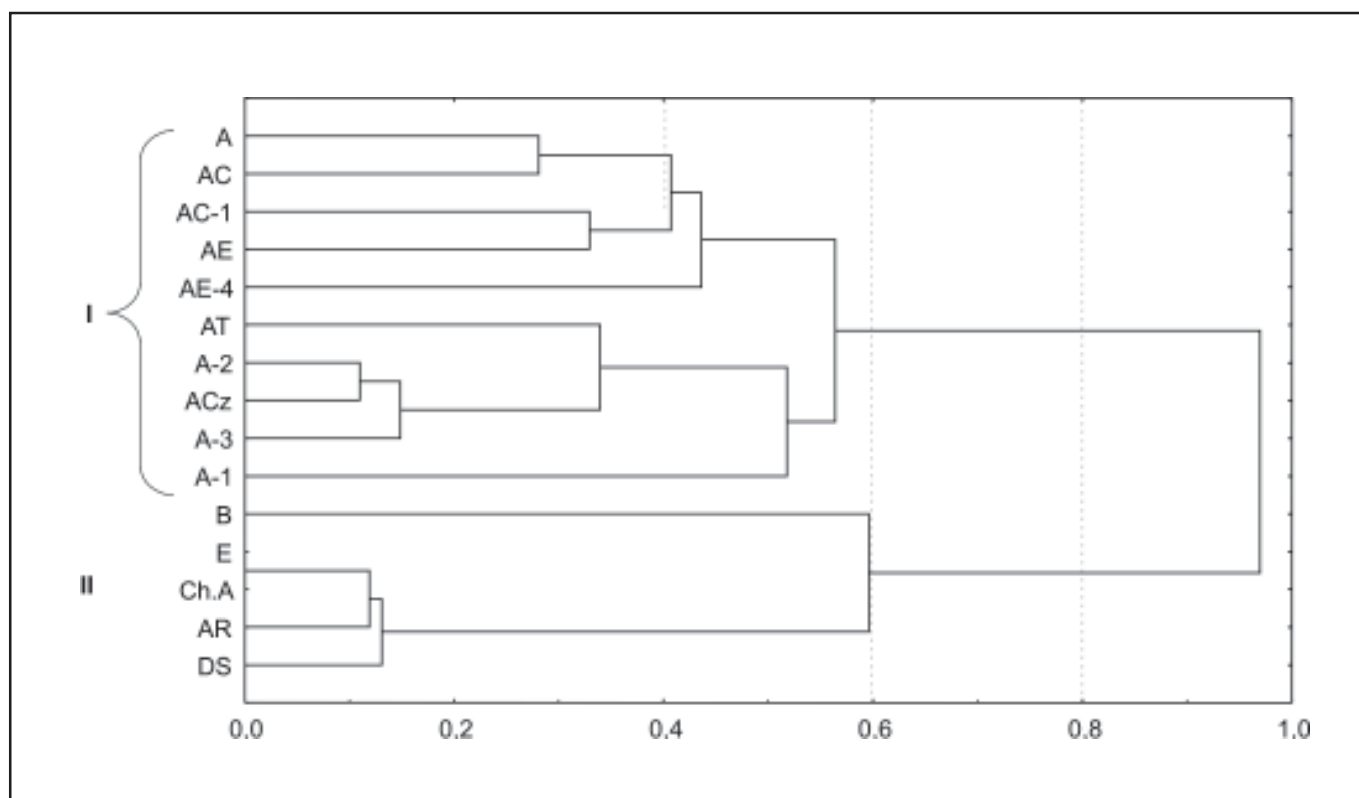
Existen en la colección clones muy diferentes del resto como 'Belembe' (B) y 'Amarilla Trinidad' (AT). El primero fue introducido desde la Isla de Guadalupe y su descripción coincide con la reportada por León (1987) y Purseglove (1988) para *Xanthosoma brasiliense* Engl., pues crece en macollas hasta de un metro, generalmente de unos 50cm de alto, con varios tallos que provienen de un cormo

**TABLA III**

Patrones electroforéticos obtenidos en los sistemas isoenzimáticos analizados mediante el programa MAT-GEN para el grupo Amarillo.

<b>Grupo Amarillo.</b>			
<b>Esterasas</b>		<b>Peroxidasas</b>	
<b>Patron</b>	<b>Clones</b>	<b>Patron</b>	<b>Clones</b>
101010000000	A,AT,Acz	11100010000	B
101010000100	AC	11100010011	E
101000000010	AC-1, A-1	11110010011	DS
101000000000	AE	01110000011	ChA
101011111110	AE-4	01100000011	AR
101010000001	A-2	11001000011	A, AC.1, Acz
101010000010	A-3	11001000111	AC
010100111000	B	11001100011	AE, AE-4
010100110000	E, ChA, AR	11001001011	AT
010100100000	DS	11011000011	A-1, A-2, A,3
<b>Polifenoloxidasas</b>			
<b>Patron</b>	<b>Clones</b>		
101010000000	A,AT		
101010000100	AC		
101000000010	AC-1, AE, AE-4, A-1, A-2, A-3, ACz, E		
101000000000	B		
101011111110	DS		
101010000001	ChA		
101010000010	AR		

**Leyenda:** 1- presencia de banda  
0- ausencia de banda



**Fig. 6.** Dendrograma que muestra la similitud genética entre los clones del grupo Amarillo, a partir de un Análisis de Conglomerados con los sistemas isoenzimáticos.

pequeño de pulpa amarillenta que no se utiliza como alimento. Las hojas tienen pecíolos largos y delgados, de 20 a 40 cm de longitud; la lámina es hastada, con dos lóbulos basales triangulares, a menudo asimétricos y un lóbulo basal más grande de ápice agudo.

'Amarilla Trinidad' clon, introducido desde Trinidad y Tobago, presenta hojas hastadas y de color verde oscuro con borde morado, el pecíolo es de color morado oscuro con la base de color rojo y la arista morado oscuro, los cormos y cormelos son pequeños y tienen forma irregular, descripción que coincide con la expuesta por Cordero (1986) para la especie *Xanthosoma atrovirens* Koch & Bouché.

Por las características distintivas de estos clones descritos anteriormente y unido a las diferencias genéticas que mostraron estos clones en el análisis electroforético, apoya la recomendación de incluirlos en especies diferentes a *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott.

## CONCLUSIONES

-Los clones analizados, los cuales tienen la masa de los cormos y cormelos de color amarillo, presentan un número cromosómico de  $2n=2x=26$ .

-Los sistemas isoenzimáticos empleados resultaron polimórficos y permitieron conocer las afinidades genéticas que se presentan entre las accesiones.

## RECOMENDACIONES

-Tener en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo, para realizar la correcta ubicación taxonómica de los clones estudiados.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bai, K. 1982. Cytogenetic. Root and tubers 23. IITA, Nigeria, 114-116.
- Cordero M. 1986. Clasificación Botánica de la Yautia. Curso nacional de Yautia, FAO. 90 pp.
- Darlington, C.D. & Wylie, A.P. 1955. Chromosome atlas of flowering plants. London, Allen Unwin, 374-393p.
- Davis, B. J. 1964. Acrylamide gel electrophoresis. Ann N.Y. Acad. No. 121: 350-361.
- Dottin, M. 1997. Tecnología para la micropropagación in vitro de los clones de *Xanthosoma sagittifolium* (L.). Tesis de Maestría. Universidad Central de Las Villas, Cuba. 99 pp.
- González, C. & González, A. 1981. Estudio de patrones para la Lima persa III. Caracterización isoenzimática. Cien. Tec. Agric. 4(2): 102-108.
- González, C., La Vista, M. & González, J. 1984. Estudio de patrones de isoenzimas para la lima persa. Prsc. Soc. Citricultura. 32: 14-17.
- Guedes, M. E. & Rodriguez, C. I. 1974. Disc electrophoresis patterns and phenoloxidase from leaves coffee cultivars. Acta Biológica Serie A. Vol XIII, 169-177.

Iglesias, L., Lima, H. & Simon, J. P. 1974. Isozymes identification of nucellar seedlings in Citrus. *J. Heredity*. 65: 81-84.

León, J. 1987. Botánica de los Cultivos Tropicales. Colección de Libros y Materiales Educativos. II CA. San José, Costa Rica. No. 84, 445 pp.

López, Z., Vázquez, M. & López, F. 1995. Raíces y Tubérculos. Editorial Pueblo y Educación. Segunda Edición. 150 pp.

FAO 1996. Informe sobre el estado de los Recursos Fitogenéticos en el mundo. 75 pp.

Marchant, C. J. 1973. Chromosome variation in Araceae: V. Acoreae to Lasieae- *Kew Bull*: 199-210.

Milián, M. 2001. Caracterización de la variabilidad del género *Xanthosoma* en Cuba. Tesis de Maestría. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 103 pp.

Ministerio de la Agricultura. 1990. Instructivo técnico de la malanga *Xanthosoma*. 26 pp.

Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* No 35: 121-349.

Purseglove, J. W. 1988. Tropical Crops Monocotyledons. John Wiley and Sons, INC., New York, 321 pp.

Raymond, S. 1964. Acrilamide gel electrophoresis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* No 121: 350-361.

Sigarroa, A., Cornide, M. T. 1995. Marcadores moleculares para la selección de variedades vegetales. *Avances en Biotecnología Moderna*. Vol. 3: 17-47.

**Recibido:** 2004

**Direcc. de los autores:** \* Instituto Nacional en Viandas Tropicales (INIVIT). Apto. 6 Santo Domingo, CP. 53000, Cuba. \*\* Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25, No 455 e/ J e I, Vedado. Plaza 10400. Ciudad de La Habana, Cuba.