

CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA E IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS AL PORCENTAJE DE MATERIA SECA EN ACCESIONES CUBANAS DE YUCA (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ)

ENTIDAD EJECUTORA DEL RESULTADO: Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT).

AUTOR PRINCIPAL: Yoel Beovides García (INIVIT)

OTROS AUTORES: Marilys Diley Milián Jiménez (INIVIT) Daniel Rodríguez Pérez (INIVIT) Osmany Molina Concepción (INIVIT) Katia Rodríguez Rodríguez (INIVIT) Aymé Rayas Cabrera (INIVIT) María Isabel Román Gutiérrez (INIVIT) M.Sc. Milagros Basail Pérez (INIVIT) Jorge López Torres (INIVIT) M.Sc. Arletys Santos Pino (INIVIT) Víctor Reinaldo Medero Vega (INIVIT) Yenisey Gutiérrez (INIVIT) Dayana Rodríguez González (INIVIT) José Antonio Cruz Alfonso (INIVIT)

COLABORADORES: Aurora Molina Rodríguez (INIVIT) Maritza Camejo Hernández (INIVIT) Martha I. Fernández Hernández (INIVIT) Humberto Toledo Hernández (INIVIT) Cira Z. Morejón Matos (INIVIT) Jesús García Ruiz (INIVIT) Martin Fregene (Danforth Center, EE.UU) Janneth Patricia Gutiérrez (CIAT, Colombia).

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:

Yoel Beovides García

INIVIT, Apartado 6, Santo Domingo, V. Clara,

Email: biomol.biotec@inivit.cu,

Teléf.: 42-403102.

RESUMEN

Antecedentes: El resultado propuesto integra de manera armónica y con un alcance, novedad e impactos propios, otros resultados que oportunamente han recibido dos Premios Provinciales del CITMA en Villa Clara (2008 y 2014) y dos Premios Ramales del MINAG (2006 y 2015). Su impacto tiene carácter científico, teórico y práctico.

Problema que se ha resuelto de acuerdo con los objetivos: contribuye al establecimiento en Cuba de las bases científico-metodológicas que permiten trabajar en la optimización del programa de mejoramiento genético de la yuca y a la conservación y uso de la variabilidad genética estudiada. La combinación armónica de descriptores

morfológicos y agronómicos, y de técnicas moleculares, enfoque nunca antes utilizado en Cuba en ese cultivo, tuvo como objetivos: (1) caracterizar molecular, morfológica y agronómicamente la variabilidad genética de una colección de trabajo de yuca e (2) identificar marcadores moleculares asociados al porcentaje de materia seca (PMS).

Resultados: Con 34 marcadores microsátélites (SSR) polimórficos se reveló una alta diversidad y diferenciación genética entre 94 accesiones cubanas. Se caracterizaron morfoagronómicamente 50 accesiones de interés genético con 39 descriptores de la especie y, mediante polimorfismo de nucleótido simple (SNP), estrategias de desequilibrio de ligamiento (DL) y de mapeo de asociación, se identificaron seis alelos asociados a los más bajos valores de PMS. La caracterización morfoagronómica confirmó la existencia de una variabilidad genética importante, permitió la discriminación de las accesiones y la identificación de cultivares con potencialidades para el consumo humano ('CPA Victoria de Girón'; 39,6 t.ha⁻¹ y 'Crema-1'; 34,0 t.ha⁻¹), y descubrir otros idóneos para uso agroindustrial por su alto PMS (> 43%): 'Yema de Huevo' y 'Clon 14'. Este es el primer informe acerca del empleo de SSRs en estudios de diversidad en el germoplasma cubano de yuca y junto a la caracterización morfoagronómica, permitieron identificar y recomendar nuevos cultivares. Se diseñaron y utilizaron nuevos cebadores específicos a partir de secuencias de genes de la ruta metabólica del almidón y se identifican e informan los primeros marcadores moleculares asociados a PMS en yuca.

Estos resultados están en plena correspondencia con las directrices trazadas y las prioridades actuales para aportar al desarrollo socioeconómico del país; ellos representan una novedosa contribución científica al mejoramiento genético de la yuca, y a las estrategias de conservación y uso de su diversidad autóctona en Cuba. Varios elementos avalan la contribución e impacto de los mismos, entre ellos: dos Premios Ramales del MINAG (2006, 2015), dos Premios Provinciales (CITMA, 2008 y 2014) y casi 10 premios municipales, provinciales y nacionales; su presentación en casi 20 eventos científicos nacionales e internacionales; la realización de cinco publicaciones en revistas seriadas certificadas, incluida una internacional de impacto, así como otras siete en diferentes formatos digitales. Igualmente, forman parte de dos tesis de Ingeniero Agrónomo y una de Doctor en Ciencias Biológicas, defendidas exitosamente; están vinculados a nueve resultados del MINAG, seis registros en el CENDA y otros dos en la ANIR. Desde el punto de vista práctico, los nuevos cultivares que se proponen aquí superan en casi 10 t.ha⁻¹ el rendimiento de la mayoría de los clones comerciales actuales y por primera vez, dos de ellos se proponen por su potencial agroindustrial. Dos cultivares están en proceso de registro oficial y cinco avales de entidades productivas respaldan su aceptación entre los productores por sus resultados productivos e impacto económico y social.

COMUNICACIÓN CORTA DEL RESULTADO

Antecedentes. Las principales limitaciones para garantizar un adecuado uso de la diversidad genética conservada en cultivos de interés económico como la yuca, están

asociadas al conocimiento disponible sobre su valor intrínseco. Las técnicas basadas en descriptores morfológicos, agronómicos y moleculares contribuyen a conocer y utilizar mejor el patrimonio genético que se conserva en los bancos de germoplasma de especies de importancia económica (**AgriSost: 12(1), 2005**). Esta investigación tuvo por objetivo caracterizar molecular, morfológica y agronómicamente la variabilidad genética de una colección de yuca e identificar marcadores moleculares asociados al porcentaje de materia seca (PMS), temas prioritarios en la investigación del cultivo.

Materiales y métodos. Se estudiaron 94 accesiones del germoplasma de yuca de Cuba y otras 71 procedentes de varios países productores del cultivo en África, Asia y América. Los estudios de diversidad molecular se realizaron con 36 microsatélites (**Bioteología Vegetal, 6(1): 9-14, 2006**) según la metodología descrita por Fregene *et al.* (2003), la caracterización morfoagronómica se realizó con 39 descriptores internacionales (Fukuda y Guevara, 1998) en 50 accesiones autóctonas cubanas por su interés para el fitomejoramiento. Se incluyen pesquisas realizadas entre 2002 y 2015.

Los análisis para la identificación de marcadores moleculares asociados a PMS, son los primeros realizados a partir de una colección natural en el cultivo (todas los estudios moleculares se realizaron en instalaciones del Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia) e incluyeron la búsqueda en el *Genbank* de secuencias que corresponden a 12 genes relacionados con la ruta metabólica del almidón en diferentes especies vegetales, con alta homología con el genoma de yuca según la estrategia de López *et al.* (2005). Se diseñaron 16 nuevos pares de cebadores y mediante las técnicas del polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP), análisis de desequilibrio de ligamiento y la detección de SNPs, se analizó la existencia de alelos asociados al PMS.

Principales resultados. En general, los resultados demuestran la existencia de diversidad genética de utilidad en las accesiones de yuca de la Colección Cubana y sus relaciones con parientes cultivados de África, Asia y América. Este es el primer estudio con microsatélites realizado en este cultivo en Cuba. (**B.A.S.E, 19(4): 364-377, 2015**). Estos resultados son muy útiles en los programas de mejoramiento y selección de mejores clones para la producción de yuca. (**Cultivos Tropicales, 35(2): 43-50, 2014**)

Caracterización molecular con SSRs. En 34 SSRs se observó un alto nivel de amplificación y de polimorfismo para los 165 genotipos de yuca estudiados. En total se generaron 221 bandas con tallas que oscilaron desde 83 pb hasta 298 pb y se detectaron entre dos y 11 alelos por *locus* para una promedio de 6,5 con más de un 98% de *loci* polimórficos en todas las accesiones y países como promedio. Esa información está disponible en <http://www.ciat.cgiar.org/molcas/estudios.jsp?code=6&pais=Cuba>.

Se detectaron 17 alelos únicos o con baja frecuencia de aparición entre las accesiones cubanas (varios de ellos son alelos raros). Este resultado evidencia la presencia de información genética específica que pudiera reflejar características peculiares en las accesiones cubanas, incluso exclusivas, las que podrían estar asociadas a caracteres de interés agronómico. Todos los indicadores de diversidad y diferenciación genética fueron

altos y evidencian el valor del germoplasma de Cuba. (*B.A.S.E*, 19(4): 364-377, 2015)

Caracterización morfológica. Por primera vez se usan los descriptores de Fukuda y Guevara (1998) en la caracterización de accesiones del germoplasma de yuca conservado en Cuba. El análisis estadístico con los descriptores cualitativos, permitió discriminar aquellos que más contribuyeron a la variabilidad y la ubicación de las 50 accesiones en tres grandes grupos de acuerdo a sus características principales. El primer grupo es el más pequeño, e incluye a siete cultivares con las hojas apicales de color verde claro, hábito de ramificación erecto y plantas tipo cilíndricas; destaca aquí la coincidencia de las accesiones ‘CEMSA 74-110’ (29), ‘CPA Victoria de Girón’ (35) y ‘Crema-1’ (39) en diez de los once descriptores de mayor contribución a la variabilidad. (*Cultivos Tropicales*, 35(2): 43-50, 2014)

De manera especial, el cultivar ‘Cayo Bejuco’ (18) tiene la pulpa de la raíz de color amarillo intenso, lo que sugiere la presencia de carotenos. Esta es una característica importante con fines industriales (alimentos humanos y animales) y por tanto, importante por sus implicaciones dietéticas y para el mejoramiento genético hacia la ampliación de los usos del cultivo. Esto sugiere la necesidad de profundizar en este tema y esta colección de trabajo en investigaciones futuras. (*Cultivos Tropicales*, 35(2): 43-50, 2014)

Evaluación agronómica. Al considerar las variables cuantitativas de mayor contribución estadística a la variabilidad, se confirmó la amplia variabilidad (Fig. 1) y el potencial de la colección de trabajo estudiada. (*Cultivos Tropicales*, 35(2): 43-50, 2014)

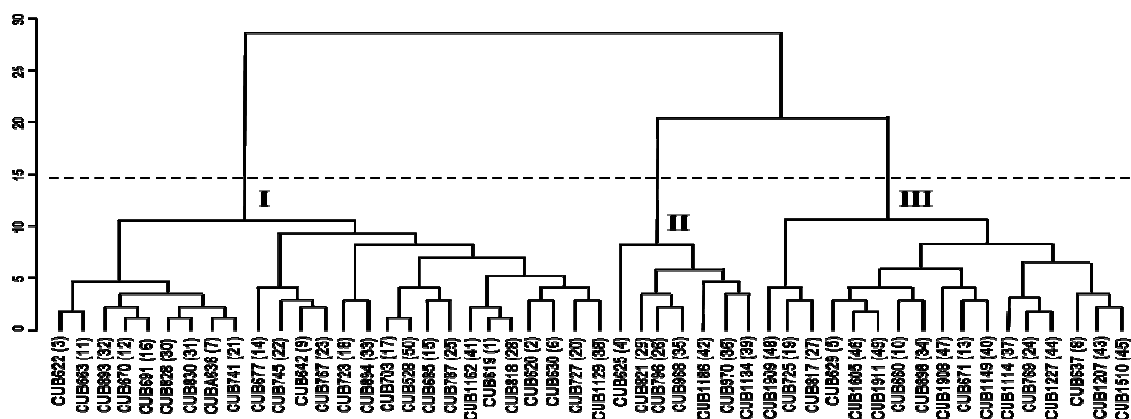


Figura. 1. Resultado del análisis de agrupamiento de las 50 accesiones cubanas de yuca estudiadas mediante el método de Ward y la distancia euclidiana a partir de los descriptores cuantitativos evaluados con mayor contribución a la variabilidad.

El grupo más interesante fue el segundo, también el más pequeño y donde quedan los siete clones de mayor altura, erectos o raramente ramificados, con mayor número y peso de raíces comerciales y están entre los de menor contenido de materia seca en las raíces. Se ubican aquí los clones: ‘Señorita’ (4), ‘CEMSA 74-110’ (29), ‘Señora’ (26),

'CPA Victoria de Girón' (35), 'Puerto Plata' (42), 'CPA Juan González' (36) y 'Crema-1' (39); éste último con excelentes cualidades para la producción. Este grupo coincide totalmente con el grupo I observado en el análisis con los descriptores cualitativos. (***Cultivos Tropicales*, 35(2): 43-50, 2014**)

La evaluación agronómica permitió identificar cultivares con potencialidades para ser usados en el consumo fresco o para la agroindustria. Los cultivares CUB796 'Señora' (30 152,17 kg.ha⁻¹; 30,15 t.ha⁻¹), CUB1134 'Crema-1' (34 489, 13 kg.ha⁻¹; 34,49 t.ha⁻¹) y CUB968 'CPA Victoria de Girón' (37 483,70 kg.ha⁻¹; 37,48 t.ha⁻¹) de porte erecto y raíces blancas estuvieron entre los más aceptados para el consumo. Las accesiones CUB787 'Cangreja' y CUB1186 'Puerto Plata' con rendimientos superiores a los 25000,00 kg.ha⁻¹ (25,0 t.ha⁻¹), de raíces castaño oscuro y poco ramificadas, también tienen posibilidades para el consumo humano, en este caso con posibles cosechas antes de los nueve meses. Todos tienen rendimientos similares o superiores en al menos un 10% a los de los principales clones comerciales. (***Cultivos Tropicales*, 35(2): 43-50, 2014**)

Determinación del porcentaje de materia seca. Por su alto PMS y buen rendimiento, los cultivares 'Yema de Huevo' (26,9 t.ha⁻¹; 45,8% MS) y 'Clon-14' (26,4 t.ha⁻¹; 43,9% MS) tienen alto potencial con fines agroindustriales. Además, se identificaron otras accesiones con altos PMS en las raíces (***Centro Agrícola*, 37(3): 73-78, 2013**)

En Cuba no se han recomendado cultivares por su alto PMS para ese fin, por lo que se usan los clones comerciales. La identificación de cultivares con mayor rendimiento y alto PMS en sus raíces, tiene un significativo valor práctico en función de la prioridad que da Cuba al desarrollo de la agroindustria (lineamientos VI Congreso del Partido) y las potencialidades de este cultivo con el que se pueden sustituir diversos productos de importación tanto para producir concentrados animales como alimentos para humanos.

Varios de los cultivares seleccionados ya se han evaluado en varias localidades de Villa Clara, Ciego de Ávila, Camagüey y Holguín con la participación de productores de yuca, con el objetivo de lograr su introducción a la producción. También se actualizó y amplió la caracterización de las 50 accesiones para su mejor manejo dentro del germoplasma conservado con información amplia y actualizada según los estándares internacionales.

Identificación de marcadores moleculares asociados a PMS. Por primera vez, se identifican seis alelos asociados a los más bajos PMS en el cultivo. Este es el primer informe a nivel internacional de identificación de marcadores moleculares asociados a PMS en yuca. Los nuevos cebadores utilizados se diseñaron para este estudio, y representan un novedoso aporte a nivel mundial. (***Afr J Agric Res, en arbitraje*, 2016**)

IMPACTO CIENTÍFICO-TÉCNICO, MEDIOAMBIENTAL, ECONÓMICO Y SOCIAL DEL RESULTADO

En este tipo de investigación fundamental aplicada, a veces, resulta complejo realizar una correcta valoración de su impacto. No obstante, los resultados se corresponden con las directrices actuales de la investigación y desarrollo del cultivo de la yuca en el

mundo y con las prioridades de la agricultura cubana, con notables aportes novedosos, y científicos, en proceso de introducción exitosa en la producción y la mejora genética.

Científico. Mediante investigaciones de alto rigor científico, gracias a la combinación armónica de técnicas convencionales y novedosas herramientas moleculares, enfoque nunca antes utilizado en Cuba en este cultivo, contribuyen al conocimiento del patrimonio genético que se conserva en el país, así como, sobre sus relaciones con otros genotipos de diferente origen geográfico. Por primera vez en Cuba, se utilizaron los descriptores de Fukuda y Guevara (1998) lo que estandariza su caracterización según estándares internacionales. Se identificaron los primeros marcadores moleculares asociados a PMS en el cultivo. Sin lugar a dudas, resultados de gran impacto y alcance científico, así como, de aplicación en nuevas investigaciones.

Medioambiental. Con el uso por primera vez de marcadores moleculares en el germoplasma de yuca cubano, se demostró su amplia base genética y el valor de la yuca tradicionalmente cultivada en Cuba, lo que facilita los procesos de fitomejoramiento y potencian las estrategias para su conservación y manejo sostenibles, especialmente, su empleo para aumentar la producción y usos de la yuca en Cuba.

Económico y social. Haber encontrado accesiones con alto PMS ($> 43\%$) y buen rendimiento ($> 26 \text{ t.ha}^{-1}$) que puedan utilizarse hacia el logro de una mayor eficiencia y amplitud de usos agroindustriales de la yuca, para lo cual no existen cultivares recomendados en Cuba, tiene gran importancia y aplicación práctica. Alrededor del 70-80% del PMS se debe al almidón; un mayor PMS mejora la calidad de la harina (y la eficiencia en la conversión yuca fresca-yuca seca) y permite obtener almidones con más eficiencia, productos que pueden sustituir niveles importantes de importaciones como la harina de trigo, así como, promover su utilización en múltiples aplicaciones industriales nacionales. Ello abre nuevos mercados mediante una amplia diversidad de productos que podrían fabricarse en Cuba para animales y humanos; todo esto en concordancia con la política agroindustrial aprobada en los Lineamientos del VI Congreso del Partido.

Los resultados se encuentran aplicados en el INIVIT y los mejores cultivares se evalúan en diferentes provincias del país, como parte de las evaluaciones requeridas para su recomendación según las potencialidades de ellos en cada localidad específica. Las evaluaciones comparativas con los clones comerciales en varias localidades de Villa Clara, Cienfuegos, Ciego de Ávila, Camagüey y Holguín muestran que algunos de los nuevos cultivares producen como promedio al menos $5-7 \text{ t.ha}^{-1}$ más que la mayoría de los clones comerciales, eso significa un incremento de $140 \text{ quintales.ha}^{-1}$ e ingresos superiores a los \$ 8000.00 pesos por hectárea más para los nuevos. Y tienen, además, excelente calidad culinaria y buena aceptación entre los productores. Varios productores evalúan positivamente los nuevos clones en extensión en varias localidades.

Validación del Resultado (todos los detalles en el punto 5). Estos resultados formaron parte de una Tesis de Doctorado (propuesta a la condición de Mejor Tesis del año en 2014) y dos Trabajos de Diploma de Ingeniero Agrónomo (5 puntos). Igualmente se han presentado en más de 20 eventos científicos nacionales e internacionales y fueron publicados cinco artículos en revistas seriadas certificadas, incluida una internacional de impacto. También se relacionan otras publicaciones en otras revistas, en soporte electrónico, Memorias de Congresos, folletos, boletines y plegables.

Otros aspectos vinculados directamente al resultado lo validan: tres registros en el Centro Nacional de Derecho de Autor (CENDA), nueve resultados destacados del MINAG, así como, diferentes premios del Forum, las BTJ (incluidos tres a nivel Nacional), la ANIR y la ACTAF (más de 20 premios desde la base a la nación). Además, forman parte de otros premios, reconocimientos, registros CENDA, resultados destacados del MINAG, entre otros, a lo largo de los últimos 10 años.

Evidencias que confirman su notable impacto en la comunidad científica son los dos Premios Provinciales del CITMA en Villa Clara: en 2008 (incluye lo referente a los estudios de diversidad con técnicas moleculares y bioquímicas) y en 2014 (relacionado con la caracterización morfológica y agronómica de los cultivares de mayor interés genético), así como, dos Premios Ramales del MINAG (2006 y 2015).

Estos resultados se obtuvieron por la ejecución de seis proyectos de investigación: dos PNCT Biotecnología, dos del Programa Ramal de Viandas del MINAG y dos internacionales con el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

Fregene MA; M Suárez; J Mkumbira; H Kulembeka; E Ndedya; A Kulaya; S Mitchel; U Gullberg; H Rosling; AG Dixon; R Dean y S Kresovich (2003) Simple sequence repeat marker diversity in cassava landraces: genetic diversity and differentiation in an asexually propagated crop. *Theor Appl Genet* 107: 1083–1093.

Fukuda WMG y CL Guevara (1998) Descriptores morfológicos e agronómicos para a caracterização de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Cruz das almas: EMBRAPA-CNPMP, 1998. (EMBRAPA-CNPMP, Documento 78), 38p.

López C; B Piegu; R Cooke; M Delseny; J Thome y V Verdier (2005) Using cDNA and genomic sequences as tools to develop SNP strategies in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet* 110: 425-431.