

Caracterización morfoagronómica e isoenzimática de 23 accesiones de *Leucaena* spp.

Morphoagronomic and isoenzymatic characterization of 23 *Leucaena* spp. accessions

Hilda B. Wencomo¹, Alba Álvarez², O. Coto³, Maykelis Díaz¹ y R. Ortíz⁴

¹Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"

Central España Republicana, CP 44280, Matanzas, Cuba

E-mail: hilda.wencomo@indio.atenas.inf.cu

²Centro de Aplicaciones Tecnológicas y de Desarrollo Nuclear (CEADEN), Cuba

³Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical (IIFT), Cuba

⁴Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Cuba

Resumen

El objetivo de este trabajo fue valorar el grado de diversidad existente en 23 accesiones de *Leucaena*, atendiendo a los caracteres morfoagronómicos e isoenzimáticos. Se incluyeron cinco especies de este género (*L. leucocephala*, *L. lanceolata*, *L. diversifolia*, *L. macrophylla* y *L. esculenta*), además de los cultivares comerciales. Se evaluó: la altura de la planta, el número de ramas, el grosor del tallo, el comportamiento de los patrones fenológicos de floración y fructificación, el número de pinnas por hoja y de pínulas por pinna, entre otros. Se realizaron además los análisis electroforéticos peroxidadas (*Prx*), α - y β -esterasas (*Est*), malato deshidrogenasa (*Mdh*) y alcohol deshidrogenasa (*Adh*). Las accesiones cumplieron con los criterios de selección predeterminados en cuanto a los caracteres morfoagronómicos, aunque no en el mismo tiempo. En este sentido, se destacaron *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú, CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929, CIAT-17480, cv. Ipil-Ipil y cv. CNIA-250; *L. lanceolata* CIAT-17255 y CIAT-17501, y *L. diversifolia* CIAT-17270. Se pudo detectar la existencia de variabilidad genética dentro de la colección. Los sistemas isoenzimáticos (esterasas y peroxidadas) resultaron polimórficos en la muestra estudiada, principalmente las esterases. Por otra parte, el análisis de diversidad genética permitió diferenciar *L. leucocephala* con una mayor claridad respecto al resto de las especies estudiadas, aunque no se ganó en discriminación dentro de la especie.

Palabras clave: Evaluación, *Leucaena* spp., recursos genéticos

Abstract

The objective of this work was to evaluate the existing diversity degree in 23 *Leucaena* accessions, regarding the morphoagronomic and isoenzymatic characteristics. Five species of this genus were included (*L. leucocephala*, *L. lanceolata*, *L. diversifolia*, *L. macrophylla* and *L. esculenta*), in addition to the commercial cultivars. The following aspects were evaluated: plant height, number of branches, stem diameter, performance of the phenological flowering and fructification patterns, number of pinnae per leaf and of pinnules per pinna, among others. Besides the electrophoretic analyses peroxidases (*Prx*), α - and β -esterases (*Est*), malate dehydrogenase (*Mdh*) and alcohol dehydrogenase (*Adh*) were conducted. The accessions fulfilled the predetermined selection criteria regarding the morphoagronomic characteristics, although not in the same time. In this sense, *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Peru, CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929, CIAT-17480, cv. Ipil-Ipil and cv. CNIA-250; *L. lanceolata* CIAT-17255 and CIAT-17501, and *L. diversifolia* CIAT-17270, stood out. The existence of genetic variability within the collection could be detected. The isoenzymatic systems (esterases and peroxidases) turned out to be polymorphic in the studied sample, mainly esterases. On the other hand, the analysis of genetic diversity allowed differentiating *L. leucocephala* more clearly as compared to the other studied species, although no better discrimination was made within the species.

Key words: Evaluation, genetic resources, *Leucaena* spp.

Introducción

El estudio de los árboles y los arbustos para su empleo en la ganadería con diferentes propósitos productivos, de forma dirigida o espontánea, no es una actividad nueva (Murgueitio, 2003). En la actualidad la reconversión social y ambiental de la ganadería es una urgencia y una prioridad para la región latinoamericana y caribeña; la agroforestería pecuaria, como sistema no agresivo al entorno, puede constituir una parte sustancial de este proceso de cambio (Funes, 2004).

Sin embargo, el fomento de estos sistemas implica la selección de especies ecológica y económicamente apropiadas para los fines que se persiguen. De ahí la necesidad de la puesta en marcha de un programa encaminado a la búsqueda, la introducción, la evaluación y la selección de estos importantes fitorrecursos, como una fase imprescindible para su futura extensión.

Se debe señalar, además, que para la introducción de nuevas especies o accesiones en los sistemas anteriormente citados, es importante la adecuada caracterización, identificación y evaluación del material mediante descriptores agromorfológicos o morfoagronómicos. No obstante, estos rasgos son alterables por factores abióticos, como el ambiente, y bióticos, como la edad del cultivo. Es ahí donde la caracterización de la diversidad genética (Acosta, 1999), mediante técnicas bioquímicas como la electroforesis (de proteínas o isoenzimas), desempeña un papel importante como complemento de la caracterización y evaluación morfoagronómica, al igual que el análisis directo de ADN (Schmidt *et al.*, 2003), lo cual permite tener conocimientos más amplios y profundos del material evaluado.

Los principales estudios de caracterización e identificación del género *Leucaena* realizados en Cuba, en *Leucaena leucocephala* (Ruiz y Febles, 2006), se han centrado en los caracteres morfoagronómicos bajo condiciones de campo o en experimentos aislados, incluyendo solamente las cuatro variedades registradas como comerciales, pertenecientes a esta especie. Pese a ello, hasta el momento no se han realizado estudios

Introduction

The study of trees and shrubs for their utilization in livestock production with different productive purposes, in an aimed or spontaneous way, is not a new activity (Murgueitio, 2003). At present, the social and environmental reconversion of livestock production is urgent and a priority for the Latin American and Caribbean regions; livestock production agroforestry, as a non-aggressive system for the environment, may constitute a substantial part of this process of change (Funes, 2004).

However, the promotion of these systems implies the selection of ecologically and economically appropriate species for the purposes sought. Hence the need to implement a program aimed at the search, introduction, evaluation and selection of these important plant resources, as an essential stage for their future extension.

It should also be stated that for the introduction of new species or accessions in the above-mentioned systems, the adequate characterization, identification and evaluation of the material by means of agromorphological or morphoagronomic descriptors is important. Yet, these features can be altered by abiotic factors, such as the environment, and biotic factors, such as the age of the crop. That is where the genetic diversity characterization (Acosta, 1999), through such biochemical techniques as electrophoresis (of proteins or isoenzymes), plays an important role as complement of the morphoagronomic characterization and evaluation, just like the direct DNA analysis (Schmidt *et al.*, 2003), which allows having further knowledge about the evaluated material.

The main characterization and identification studies of the *Leucaena* genus conducted in Cuba, in *Leucaena leucocephala* (Ruiz and Febles, 2006), have been focused on the morphoagronomic characteristics under field conditions or in isolated trials, including only the four varieties recorded as commercial, belonging to this species. However, until now no further detailed characterization studies have been conducted including isoenzymatic markers, as

de caracterización más detallados que incluyan los marcadores isoenzimáticos, así como un mayor número de especies de este género.

La electroforesis de isoenzimas favorece el empleo de marcadores genéticos, que generalmente son más eficientes que los morfológicos, a pesar de estar influidos por la acción ambiental y depender del tejido y estadio de desarrollo de la planta que se evalúa. Asimismo, son relativamente sencillos, poco costosos y codominantes; permiten distinguir los genotipos homocigóticos y heterocigóticos y desarrollar, por tanto, estudios de mapeo y ligamiento, de genética poblacional, entre otros (Álvarez, 2005).

Atendiendo a lo anteriormente expuesto, se desarrolló el presente trabajo con el objetivo de valorar el grado de diversidad existente en un grupo de accesiones de *Leucaena*, provenientes del banco de germoplasma de la EEPF "Indio Hatuey", según sus caracteres morfoagronómicos e isoenzimáticos.

Materiales y Métodos

El trabajo relacionado con los caracteres morfoagronómicos se desarrolló en áreas de la EEPF "Indio Hatuey" y el de las isoenzimas en el Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN), en La Habana.

Caracterización morfoagronómica del germoplasma

Localización. El estudio se realizó en las áreas de la EEPF "Indio Hatuey", la cual se encuentra ubicada en los 22° 48' y 7" de latitud Norte y los 79° 32' y 2" de longitud Oeste, a una altitud de 19,9 msnm, en el municipio de Perico, provincia de Matanzas, Cuba (Academia de Ciencias de Cuba, 1989).

Características del suelo. El experimento se llevó a cabo en un suelo de topografía llana, con pendiente de 0,5 a 1,0% y clasificado por Hernández *et al.* (2003) como Ferralítico Rojo lixiviado, húmico nodular ferruginoso hidratado, de rápida desecación, arcilloso y profundo sobre calizas. Este tipo es equivalente al grupo de los Ferrosoles, en el sistema de clasificación de la FAO-UNESCO (Alonso, 2003). La profundidad promedio hasta la caliza es de 150 cm.

well as a higher number of species from this genus.

Isoenzyme electrophoresis favors the use of genetic markers, which are generally more efficient than the morphological ones, in spite of being influenced by the environmental action and depending on the tissue and development stage of the evaluated plant. Likewise, they are relatively simple, little costly and codominant; they allow distinguishing between homozygous and heterozygous genotypes and thus developing mapping and binding, and population genetics studies, among others (Álvarez, 2005).

Considering the above-mentioned facts, this work was developed in order to evaluate the existing diversity degree in a group of *Leucaena* accessions, from the germplasm bank of the EEPF "Indio Hatuey", according to their morphoagronomic and isoenzymatic traits.

Materials and Methods

The work related to the morphoagronomic characteristics was developed in areas of the EEPF "Indio Hatuey" and the work with isoenzymes was conducted at the Center of Technological Applications and Nuclear Development (CEADEN), in Havana.

Morphoagronomic characterization of the germplasm

Location. The study was conducted in areas of the EEPF "Indio Hatuey", which is located at 22° 48' and 7" latitude north and 79° 32' and 2" longitude west, at an altitude of 19,9 masl, in the Perico municipality, Matanzas province, Cuba (Academia de Ciencias de Cuba, 1989).

Soil characteristics. The trial was conducted on a soil of plain topography, with slope from 0,5 to 1,0% and classified by Hernández *et al.* (2003) as lixiviated Ferralitic Red, hydrated ferruginous nodular humic, of rapid desiccation, clayey and deep on limestones. This type is equivalent to the Ferralsol group, in the FAO-UNESCO classification system (Alonso, 2003). The average depth to the limestone is 150 cm.

Plant material used. From the 180 existing accessions in the *Leucaena* spp. collection

Material vegetal utilizado. De las 180 accesiones que existen en la colección de *Leucaena* spp. (conservada en el banco de germoplasma de la Institución) se tomaron 23 (tabla 1) como representativas de la población, las cuales fueron evaluadas anteriormente en condiciones de vivero; de cada una de ellas se evaluaron cuatro plantas.

Tabla 1. Especies y accesiones estudiadas.
Table 1. Studied species and accessions.

Especie	No. de accesiones
<i>L. leucocephala</i>	11
<i>L. lanceolata</i>	3
<i>L. diversifolia</i>	2
<i>L. macrophylla</i>	5
<i>L. esculenta</i>	2
Total	23

Establecimiento. En el período experimental no se utilizó riego ni fertilización. El experimento se inició cuando las plántulas alcanzaron aproximadamente entre los 30 y 45 cm (tres meses de edad), con una apariencia saludable; se trasplantaron al campo cuatro plántulas de cada una de las accesiones, en surcos espaciados a 6 m y con una separación de 3 m entre plantas.

La altura de las plantas se midió a partir del momento del trasplante, con una regla graduada en centímetros, ubicada en posición perpendicular y siempre en contacto con el suelo. También se contó el número de ramas y se midió el grosor del tallo con un pie de rey. Todas estas mediciones se realizaron en las cuatro plantas trasplantadas y con una periodicidad mensual, hasta que se consideró que estaban establecidas en función de los criterios predeterminados.

De acuerdo con lo planteado por Seguí *et al.* (2002), las accesiones debían cumplir con dos o más de los criterios evaluativos considerados: altura de 1,5 a 2,0 m; número de ramas mayor que 10; grosor del tallo entre 0,5 y 0,8 cm; y rendimiento de biomasa comestible de 0,75 (o más) kg de MS/planta en un período no mayor de 14 meses.

Fase de floración y fructificación. En esta fase se observó el comportamiento de los patro-

(preserved at the germplasm bank of the institution) 23 were taken (table 1) as representative of the population, which had previously been evaluated under nursery conditions; four plants were evaluated from each accession.

Establishment. In the experimental period neither irrigation nor fertilization was used. The trial started when the seedlings reached approximately 30-45 cm (three months old), with a healthy appearance; four seedlings of each accession were transplanted to the field, in rows spaced at 6 cm and a separation of 3 m between plants.

Plant height was measured since the transplant moment, with a ruler graduated in centimeters, in perpendicular position and always in contact with the soil. In addition, the number of branches was counted and stem diameter was measured with a caliper. All these measurements were monthly performed in the four transplanted plants, until they were considered established regarding the predetermined criteria.

According to Seguí *et al.* (2002), the accessions should fulfill two or more of the considered evaluative criteria: height, 1,5 to 2,0 m; number of branches higher than 10; stem diameter between 0,5 and 0,8 cm; and edible biomass yield 0,75 (or more) kg DM/plant in a period no longer than 14 months.

Flowering and fructification stage. In this stage the performance of the phenological flowering and fructification patterns was observed in all the accessions, with a weekly frequency, and 50% or more of flowers and fruits was considered. For that purpose the symbology established by Machado *et al.* (1999) was used.

In addition, the number of pinnae per leaf and pinnules per pinna was counted; pinnule length (mm) and width (mm), quantity of pods per capitulum, pod length (mm) and width (mm) were measured. The shape of the pinnae, the type and position of the glands and the color of the flowers were taken into consideration. These measurements and observations, in the case of leaves and their components, were made on 15 leaves per plant and equal number for flowers and fruits (Cronquist, 1981).

nes fenológicos de floración y fructificación en todas las accesiones, con una frecuencia semanal, y se consideró el 50% o más de flores y de frutos. Para ello se utilizó la simbología establecida por Machado *et al.* (1999).

Además, se contó el número de pinnas por hoja y de pinulas por pinna; se midió la longitud (mm) y el ancho de las pinulas (mm), la cantidad de legumbres por cabezuela, la longitud de las legumbres (mm) y el ancho (mm). Se tuvo en cuenta la forma de las pinnas, el tipo y la posición de las glándulas y el color de las flores. Estas mediciones y observaciones, en el caso de las hojas y sus componentes, se realizaron en 15 hojas por planta e igual número para el caso de las flores y los frutos (Cronquist, 1981).

La disponibilidad de biomasa se estimó mediante la simulación del ramoneo que realizan los animales (Lamela, 1998), según la altura de consumo (hasta 2 m). Para ello se aplicó la técnica del ordeño de las partes más tiernas de las plantas, las hojas y los tallos finos, hasta aproximadamente 3 mm de diámetro. El material verde se pesó y se separó de forma manual en sus diferentes fracciones –el material comestible y el no comestible– e inmediatamente se pesaron ambas partes y se calculó el valor de cada material por árbol. Asimismo, se determinó el rendimiento en el corte de establecimiento; para ello se extrajeron muestras de 300 g de forraje verde, a las cuales se les calculó el porcentaje de materia seca.

Detección del polimorfismo enzimático

Material vegetal y extracción enzimática.

Para los análisis isoenzimáticos se emplearon rebrotes nuevos (de las hojas) de cada una de las accesiones. Las muestras se tomaron en horas tempranas de la mañana (7:00 a 9:00 a.m.), se guardaron en la nevera y posteriormente se congelaron a -70°C. Las extracciones se realizaron en frío, según lo recomendado por González (2002) y Álvarez (2005).

Preparación de las muestras y electroforesis. Se maceraron en un mortero 0,5 g de hojas en nitrógeno líquido y se les añadió 500 µL de sacarosa al 20% (Soltis y Soltis, 1989).

Biomass availability was estimated through simulation of the browsing made by the animals (Lamela, 1998), according to the consumption height (up to 2 m). For that purpose the milking technique of the fresher parts of the plants, leaves and fine stems, to approximately 3 mm of diameter, was applied. The green material was weighed and separated manually in its different fractions –edible and non edible material– and both parts were immediately weighed and the value of each material per tree was calculated. Likewise, the yield in the establishment pruning was determined; for that purpose 300-g-samples of green forage were extracted, to which the dry matter percentage was calculated.

Detection of the enzymatic polymorphism

Plant material and enzymatic extraction.

For the isoenzymatic analyses new regrowths (of the leaves) from each one of the accessions were used. The samples were taken in early morning hours (7:00-9:00 a.m.), were put in a cooler and later frozen at -70°C. Cold extractions were performed according to the recommendations made by González (2002) and Álvarez (2005).

Sample preparation and electrophoresis.

In a mortar 0,5 g of leaves were macerated in liquid nitrogen and 500 µL of 20% sucrose was added (Soltis and Soltis, 1989). The extracts were put in Eppendorf tubes of 0,5 µL at -4°C, until their later utilization. The first electrophoretic runs were performed in polyacrylamide gel (PAGE), using a separating gel of 8,5% with Tris-Glycine running buffer 0,04 M of pH 8,3, and 4% concentration gel in vertical electrophoresis chamber (Model V 16) and discontinuous buffer systems for the isoenzymes peroxidases, α - and β - esterases, malate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase, according to the methodologies described by Álvarez *et al.* (2000). In all runs 30 µL of each sample and 10 µL of loading buffer (LB) were added.

Based on the isoenzymatic studies reported for species of this genus (such as *Leucaena shannonii*), a test was made with the extraction buffer used by Chamberlain *et al.* (1996), with which very tenuous and still little-defined bands

Los extractos se guardaron en tubos Eppendorf de 0,5 µL a -4°C, hasta su posterior utilización. Las primeras corridas electroforéticas se realizaron en gel de poliacrilamida (PAGE), utilizando un gel de separación de 8,5% con tampón de corrida Tris-Glicina 0,04 M de pH 8,3, y gel concentrador de 4% en cámara de electroforesis vertical (Model V 16) y en sistemas tampón discontinuos para las isoenzimas peroxidases, α - y β -esterasas, malato deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, según las metodologías descritas por Álvarez *et al.* (2000). En todas las corridas se añadieron 30 µL de cada una de las muestras y 10 µL de tampón de carga (BC).

Sobre la base de los estudios isoenzimáticos reportados para especies de este género (como *Leucaena shannonii*), se probó con el tampón de extracción empleado por Chamberlain *et al.* (1996), con el cual se observaron bandas muy tenues y aún poco definidas. Se le hicieron varios ajustes a este protocolo, hasta que se estandarizó el método de extracción de los sistemas isoenzimáticos utilizados. En este sentido, se maceraron 0,5 g del tejido foliar en nitrógeno líquido y se añadió tampón de extracción 1/1 (m/v). El extracto se centrifugó a 14 000 rpm durante tres minutos y se colectó el sobrenadante para la electroforesis. Se empleó un tampón Tris-Citrato pH 8,3 al que se añadió KCl 0,08%, MgCl₂ 0,2%, EDTA 0,04%, 0,5 mL de Tritón x 100 1%, 2 mL 10% DTT y 25 mg PVP-40 4%.

Las corridas se efectuaron en cámaras de electroforesis vertical (Model V 16) y geles de poliacrilamida (al 8,5% para peroxidases y alcohol deshidrogenasas y al 12% para esterases), a 4°C, a 120 V, 20 mA, durante cuatro horas.

Tinción. Se realizaron las tinciones específicas para peroxidases (Prx EC. 1.11.1.7), α - y β -esterasas (Est EC. 3.1.1.-), malato deshidrogenasa (Mdh EC. 1.1.1.37) y alcohol deshidrogenasa (Adh EC. 1.1.1.1), según Álvarez *et al.* (2000). Las corridas electroforéticas se repitieron tres veces y sólo se registraron las bandas consistentes y reproducibles. Los fenotipos isoenzimáticos de cada accesión se registraron como presencia/ausencia de cada banda (1/0, respectivamente).

were observed. Several adjustments were made to this protocol until the extraction method of the isoenzymatic systems used was standardized. In this sense, 0,5 g of the leaf tissue were macerated in liquid nitrogen and extraction buffer 1/1 (m/v) was added. The extract was centrifuged at 14 000 rpm during three minutes and the supernatant was collected for the electrophoresis. A Tris-Citrate buffer pH 8,3 was used, to which KCl 0,08%, MgCl₂ 0,2%, EDTA 0,04%, 0,5 mL of Triton x 100 1%, 2 mL 10% DTT and 25 mg PVP-40 4% were added.

The runs were performed in vertical electrophoresis chambers (Model V 16) and polyacrylamide gels (at 8,5% for peroxidases and alcohol dehydrogenases and at 12% for esterases), at 4°C, 120 V, 20 mA, during four hours.

Staining. The specific staining for peroxidases (Prx EC. 1.11.1.7), α - and β -esterases (Est EC. 3.1.1.-), malate dehydrogenase (Mdh EC. 1.1.1.37) and alcohol dehydrogenase (Adh EC. 1.1.1.1), were made, according to Álvarez *et al.* (2000). The electrophoretic runs were repeated three times and only the consistent and reproducible bands were recorded. The isoenzymatic phenotypes of each accession were recorded as presence/absence of each band (1/0, respectively).

Statistical processing. The results were processed by the principal component analysis (PCA) (Morrison, 1967), in which those principal components that showed values higher than one and sum or preponderance factors higher than 0,70 were taken as criterion.

The cluster analysis was applied for the grouping and selection of the accessions, using as similarity index the Euclidean distance, from the results obtained in the PCA (Torres *et al.*, 2006), and the mean and standard deviation stadigraphs were determined for the analyzed variables in this stage. Thus there were species groups which allowed doing a simpler and more objective analysis of their performance. All the analyses were made through the statistical program SPSS® version 11.5 for Microsoft® Windows® (Visuata, 1998).

Procesamiento estadístico. Los resultados se procesaron mediante el análisis de componentes principales (ACP) (Morrison, 1967), en el cual se tomó como criterio aquellas componentes principales que presentaron valores propios superiores a uno y factores de suma o de preponderancia mayor que 0,70.

Se aplicó el análisis de conglomerados para la agrupación y selección de las accesiones, utilizando como índice de similitud la distancia euclidiana, a partir de lo obtenido en el ACP (Torres *et al.*, 2006), y se determinaron los estadígrafos media y desviación estándar para las variables analizadas en esta etapa. De esta forma se dispuso de grupos de especies que permitieron hacer un análisis más sencillo y objetivo de su comportamiento. Todos los análisis se realizaron a través del programa estadístico SPSS® versión 11.5 para Microsoft® Windows® (Visuata, 1998).

La matriz binaria de datos isoenzimáticos se usó para generar una matriz de similitud genética entre todos los pares de genotipos, expresada como el complemento del coeficiente de Dice (Dice, 1945), usando el programa SIMQUAL del paquete estadístico NTSYS-pc versión 2 (NTSYS-pc, 1997). Se hizo un análisis de conglomerados, basado en la matriz de similitud de Dice; para ello se generó un dendrograma en el programa SHAN, del mismo paquete estadístico. El criterio de agregación utilizado fue el Método de la Media Aritmética de Grupos no Ponderada (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973). También se determinó la correlación cofenética (r), para hallar la homogeneidad entre la matriz de similitud y el dendrograma, y para representar la exactitud de la técnica utilizada (NTSYS-pc, 1997).

Resultados y Discusión

Caracterización morfoagronómica

En la tabla 2 se muestra el comportamiento de las accesiones en la etapa de establecimiento, además del tiempo que demoró cada una en alcanzar 1,50 m de altura. Se comprobó que algunas accesiones podrían comenzar a explotarse antes de los 12 meses de trasplantadas, como

The binary matrix of isoenzymatic data was used to generate a matrix of genetic similarity among all the genotype pairs, expressed as the complement of Dice's coefficient (Dice, 1945), using the program SIMQUAL of the statistical pack NTSYS-pc version 2 (NTSYS-pc, 1997). A cluster analysis was made, based on Dice's similarity matrix; for that purpose a dendrogram was generated in the program SHAN, of the same statistical pack. The aggregation criterion used was the Unweighted Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973). The cophenetic correlation (r) was also determined, to find the homogeneity between the similarity matrix and the dendrogram, and to represent the accuracy of the technique used (NTSYS-pc, 1997).

Results and Discussion

Morphoagronomic characterization

Table 2 shows the performance of the accessions in the establishment stage, besides the time each one took to reach 1,50 m of height. It was proven that some accessions could begin to be exploited before 12 months after being transplanted, as it occurred with *L. leucocephala* CIAT-17480; this was the first to reach the prefixed height, only seven months after being planted, and by the end of the stage it was 3,65 m high and showed an edible biomass yield of 0,82 kg DM/plant.

There were significant differences ($P \leq 0,05$) among the accessions regarding height, stem diameter and number of branches. It could be observed that the first seven accessions stood out as compared to the commercial varieties *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Peru and cv. CNIA-250 in such indicators. The performance of this last cultivar coincides with the results obtained by Machado and Núñez (1994) and Wencomo (2008).

The height was similar for all accessions, except for *L. diversifolia* CIAT-17503 and CIAT-17270, which showed lower values in diameter and number of branches. In most cases the tallest plants coincided with the ones with the highest number of branches; this indicates

Tabla 2. Comportamiento de las accesiones en la etapa de establecimiento.

Table 2. Performance of the accessions in the establishment stage.

Especie	Accesión	Altura (m)	Diámetro (cm)	NR	RBC (kg MS/planta)	TE (meses)
<i>L. leucocephala</i>	CIAT-17480	3,65 ^a	4,40 ^a	47 ^a	0,82 ^a	7
<i>L. leucocephala</i>	CIAT-9438	2,70 ^{ab}	3,40 ^{bc}	41 ^a	0,65 ^{bcd}	8
<i>L. leucocephala</i>	CIAT-7988	3,22 ^a	4,25 ^{ab}	44 ^a	0,69 ^{cd}	9
<i>L. esculenta</i>	CIAT-17225	3,60 ^a	4,37 ^a	37 ^{ab}	0,65 ^{def}	9
<i>L. esculenta</i>	CIAT-17229	3,60 ^a	4,35 ^a	27 ^b	0,63 ^f	9
<i>L. leucocephala</i>	CIAT-7384	2,92 ^{ab}	4,15 ^{ab}	37 ^{ab}	0,67 ^{cde}	10
<i>L. leucocephala</i>	CIAT-751	2,25 ^{abc}	3,37 ^{bc}	42 ^a	0,64 ^f	10
<i>L. leucocephala</i>	Cunningham	2,60 ^{ab}	3,51 ^{bc}	20 ^c	0,81 ^a	12
<i>L. leucocephala</i>	Perú	2,58 ^{ab}	3,21 ^{bc}	27 ^b	0,72 ^{bc}	12
<i>L. leucocephala</i>	CNIA-250	2,57 ^{ab}	3,21 ^{bc}	26 ^{bc}	0,68 ^{bcd}	11
<i>L. leucocephala</i>	CIAT-9119	2,55 ^{ab}	3,18 ^{bc}	38 ^{ab}	0,78 ^{ab}	13
<i>L. leucocephala</i>	CIAT-7929	2,54 ^{ab}	3,18 ^{bc}	39 ^{ab}	0,67 ^{cde}	13
<i>L. leucocephala</i>	cv. Ipil-Ipil	2,64 ^{ab}	4,10 ^b	29 ^{ab}	0,77 ^b	14
<i>L. lanceolata</i>	CIAT-17255	2,75 ^{ab}	4,17 ^b	27 ^b	0,64 ^f	14
<i>L. lanceolata</i>	CIAT-17501	2,55 ^{ab}	3,13 ^c	26 ^b	0,66 ^{bcd}	14
<i>L. lanceolata</i>	CIAT-17253	2,54 ^{ab}	3,11 ^c	27 ^b	0,63 ^f	13
<i>L. macrophylla</i>	CIAT-17240	2,77 ^{ab}	3,51 ^{bc}	31 ^{ab}	0,69 ^{cd}	15
<i>L. macrophylla</i>	CIAT-17233	2,75 ^{ab}	3,42 ^{bc}	35 ^{ab}	0,63 ^f	16
<i>L. macrophylla</i>	CIAT-17232	2,76 ^{ab}	3,51 ^{bc}	37 ^{ab}	0,65 ^{bcd}	16
<i>L. macrophylla</i>	CIAT-17238	2,77 ^{ab}	3,42 ^{bc}	31 ^{ab}	0,63 ^f	16
<i>L. macrophylla</i>	CIAT-17231	2,74 ^{ab}	3,39 ^{bc}	37 ^{ab}	0,66 ^{bcd}	15
<i>L. diversifolia</i>	CIAT-17503	2,09 ^c	3,13 ^c	25 ^c	0,82 ^a	14
<i>L. diversifolia</i>	CIAT-17270	2,05 ^c	3,13 ^c	21 ^c	0,67 ^{cde}	14
EE±		0,036*	0,034*	0,023*	0,036*	-

a,b,c,d,e,f Valores con diferentes letras dentro de cada componente difieren estadísticamente a $P < 0,05$; TE: tiempo que demoró en alcanzar 1,50 m de altura (meses); NR: número de ramas; RBC: rendimiento biomasa comestible (kg de MS/planta).

ocurrió en *L. leucocephala* CIAT-17480; esta fue la primera que alcanzó la altura prefijada, con sólo siete meses de plantada, y al concluir la etapa presentó una altura de 3,65 m y un rendimiento de biomasa comestible de 0,82 kg de MS/planta.

Hubo diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las accesiones en cuanto a la altura, el diámetro del tallo y el número de ramas. Se pudo constatar que las siete primeras accesiones se destacaron con respecto a las variedades comerciales *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú y cv. CNIA-250 en dichos indicadores. El comportamiento de este último cultivar coincide con los resultados de Machado y Núñez (1994) y Wencomo (2008).

that in these accessions a higher biomass production or availability could be obtained, which is very important for forage production and, thus, for animal feeding. In this sense, Dávila and Urbano (1996) reported similar results in 13 cultivars of *L. leucocephala*, in which the lowest height values coincided with the lowest in diameter, number of branches and average dry matter yield.

L. leucocephala CIAT-17480 and CIAT-7988 were the accessions with the highest number of branches (47 and 44, respectively), followed by *L. leucocephala* CIAT-751 and CIAT-9438 (with 42 and 41 for each). More regrowths were found in the tallest and more vigorous plants. The commercial varieties *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Peru and cv. CNIA-250, in spite of being among the

La altura fue similar para todas las accesiones, excepto para *L. diversifolia* CIAT-17503 y CIAT-17270, las cuales mostraron valores más bajos en el diámetro y el número de ramas. En la mayoría de los casos, las plantas que presentaron la mayor altura coincidieron con las de mayor número de ramas; ello indica que en estas accesiones se pudiera obtener una mayor producción o disponibilidad de biomasa, lo cual es muy importante para la producción de forraje y, por ende, para la alimentación animal. En este sentido, Dávila y Urbano (1996) informaron similares resultados en 13 cultivares de *L. leucocephala*, en los cuales los valores más bajos de altura coincidieron con los más bajos en diámetro, número de ramas y rendimiento promedio de materia seca.

L. leucocephala CIAT-17480 y CIAT-7988 fueron las accesiones con mayor número de ramas (47 y 44, respectivamente), seguidas de *L. leucocephala* CIAT-751 y CIAT-9438 (con 42 y 41 para cada una). Se encontraron más brotes en las plantas más altas y vigorosas. Las variedades comerciales *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú y cv. CNIA-250, a pesar de encontrarse dentro de las accesiones que alcanzaron con mayor rapidez el establecimiento, tuvieron un comportamiento poco sobresaliente en cuanto a la altura y el número de ramas a los 14 meses (tabla 2).

Es probable que el lento crecimiento inicial en las plantas de las accesiones de este género sea de índole específica, y la accesión, pese a las diferencias existentes, no parece desempeñar un papel decisivo cuando se trata de obtener un material con un establecimiento mucho más rápido. La lentitud en la especie *L. leucocephala*, en sus primeros estadios, fue indicada también por Cooksley (1974) y constituye una de las limitaciones más adversas en Cuba para su establecimiento; las observaciones parecen indicar que esto sucede de forma similar en las accesiones de las otras especies de *Leucaena*.

Ello pudiera estar relacionado, además, con la cantidad de área foliar, la dinámica del crecimiento y la expansión foliar (Díaz, 2006), al igual

accesiones which reached establishment earlier, had a little outstanding performance regarding height and number of branches after 14 months (table 2).

The slow initial growth in plants of the accessions from this genus is likely to be specific, and the accession, in spite of the existing differences, does not seem to play a decisive role when obtaining a material with faster establishment. The slowness in the species *L. leucocephala*, in its first stages, was also indicated by Cooksley (1974) and constitutes one of the most adverse limitations in Cuba for its establishment; the observations seem to indicate that this occurs similarly in the accessions of the other *Leucaena* species.

This could also be related to the quantity of leaf area, the growth dynamics and leaf expansion (Díaz, 2006), as well as to the biomass partition with certain priority during the first weeks towards the root system; this is confirmed with the studies conducted by Shelton (2000), who stated that this organ in trees has a high component of permanent structural roots, as well as a rootlet system which is responsible for the assimilation of water and nutrients.

The increase that occurs afterwards in plant growth could be related to a marked leaf production (Stür *et al.*, 1994) or to the arrival at satisfactory values of leaf area index, indicator which according to Díaz (2006) is closely related to plant growth and development. In general, it was evident that the plant establishment dynamics in the species from this genus showed differences in its performance among the accessions; for such reason, it should not be statically and arbitrarily analyzed, but taking into consideration different biotic as well as abiotic factors.

During this evaluation stage all the accessions fulfilled the predetermined selection criteria, although not in the same time, which could have been associated to the genotypic characteristics of the plant, to the utilization capacity of the nutrients present in the soil or to the efficiency with which they were utilized by the plants. The accessions *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú, CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751,

que con la partición de la biomasa con cierta prioridad durante las primeras semanas hacia el sistema radical; ello se confirma con las investigaciones realizadas por Shelton (2000), quien afirmó que este órgano en los árboles tiene un alto componente de raíces permanentes estructurales, así como un sistema de raicillas que son las responsables de la asimilación del agua y los nutrientes.

El aumento que ocurre posteriormente en el crecimiento de las plantas puede que esté vinculado con una marcada producción de hojas (Stür *et al.*, 1994) o con el arribo a niveles satisfactorios de índice de área foliar, indicador que según Díaz (2006) está muy relacionado con el crecimiento y desarrollo de las plantas. De manera general, fue evidente que la dinámica de establecimiento de las plantas en las especies de este género presentó diferencias en su comportamiento entre las accesiones; por ello, no debe ser analizada de forma estática y arbitraria, sino tomando en consideración diferentes factores tanto bióticos como abióticos.

Durante esta etapa de evaluación todas las accesiones cumplieron con los criterios de selección predeterminados, aunque no en el mismo tiempo, lo cual pudo estar asociado a las características genotípicas de la planta, a la capacidad de utilización de los nutrientes presentes en el suelo o a la eficiencia con que estos fueron utilizados por las plantas. Se destacaron las accesiones *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú, CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929, CIAT-17480, cv. Ipil-Ipil y cv. CNIA-250; *L. lanceolata* CIAT-17255 y CIAT-17501, y *L. diversifolia* CIAT-17270. La presencia de estas tres últimas en el mismo grupo que las de *L. leucocephala* puede indicar que se comportan de manera muy similar en función de los indicadores evaluados.

La fenología es un elemento interesante que se debe tener en consideración en esta etapa y en otras del desarrollo del vegetal, incluso durante su explotación, ya que puede servir como pauta en el manejo de la plantación. Por ello, la comprensión del ciclo de los eventos fenológicos (floración, fructificación y producción de hojas),

CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929, CIAT-17480, cv. Ipil-Ipil and cv. CNIA-250; *L. lanceolata* CIAT-17255 and CIAT-17501, and *L. diversifolia* CIAT-17270, stood out. The presence of the last three in the same group as those of *L. leucocephala* can indicate that they behave very similarly regarding the evaluated indicators.

Phenology is an interesting element which should be taken into consideration in this stage and others of plant development, even during its exploitation, because it can serve as a guide in the plantation management. For such reason, the understanding of the cycle of phenological events (flowering, fructification and leaf production), management, planning of the resources for the collection, harvest, seed processing and conservation, are necessary and essential for the efficient planning of seed collection. A particular analysis of this factor will be detailed below.

Tables 3 and 3a show the phenotypic or morphological differences among accessions. All the species of the *Leucaena* genus have bipinnate leaves and they and the pinnule are opposite. The accessions of the species *L. lanceolata* and *L. macrophylla* show oval or elliptical pinnae, with weakly asymmetric basis; while those of the species *L. esculenta*, *L. diversifolia* and *L. leucocephala* have lineal or lineal-oblong pinnae with strongly asymmetric basis. The number of pinnae pairs per leaf varies from 4 to 18 and the number of pinnule pairs per pinna oscillates from 10 to 50; although in other species they can reach higher values (Hughes, 1998).

Likewise, the *L. leucocephala* accessions showed elliptical and concave glands; while the *L. lanceolata* accessions were round elliptical, dome-shaped, except for the accession CIAT-17253 in which the presence of these glands was not observed, although it is one of the characteristics of the species as such. In the case of *L. diversifolia* accessions discoid, little deep, cup-shaped and elliptical or round triangular glands were found; while those of *L. macrophylla* were elliptical, convex, round and conical, except for the accession CIAT-17231 which did not have gland either. In the

el manejo, la planificación de los recursos para la colecta, la cosecha, el procesamiento de la semilla y su conservación, son necesarios e imprescindibles para la eficiente planificación de las colectas de semillas. Un análisis particular de este factor se detallará a continuación.

En las tablas 3 y 3a se observan las diferencias fenotípicas o morfológicas entre las accesiones. Todas las especies del género *Leucaena* poseen hojas bipinnadas y estas y las pínulas son opuestas. Las accesiones de las especies *L. lanceolata* y *L. macrophylla* presentan pinnas ovaladas o elípticas, con base débilmente asimétrica; mientras que las de las especies *L. esculenta*, *L. diversifolia* y *L. leucocephala* tienen pinnas lineales o lineales-oblongas con

L. esculenta accesiones the glands were flat, elliptical, large, little deep, concave and cup-shaped. According to Hughes (1997), the glands constitute an indicator for the identification of the species from this genus, because their number and arrangement are very variable.

All the accessions had oval light brown to dark brown seeds, like the pods; they showed white flowers, except *L. diversifolia* CIAT-17270 which flowers were pink, reddish or light purple. According to Anon (2003), the flowers, fruits and seeds are indicators that serve to identify the species from this genus.

The phenotypical differences in each of the *Leucaena* species and accessions had been reported by Hughes (1998). Knowing about these differences is importance when using the species

Tabla 3. Principales características morfológicas de las accesiones evaluadas.

Table 3. Main morphological characteristics of the evaluated accessions.

No.	Accesión	Pínulas (mm)		Forma de las pinnas
		Longitud	Ancho	
1	cv. Cunningham	1-1,2	1,5-2	Ff _b
2	cv. Perú	1-1,4	1,5-3	Ff _b
3	CIAT-9119	1-1,2	1,5-2	Ff _b
4	CIAT-9438	1-1,2	1,5-2	Ff _b
5	CIAT-751	1-1,1	1,5-2	Ff _b
6	CIAT-7988	1-1,1	1,5-2	Ff _b
7	CIAT-7384	1-1,3	1,5-2	Ff _b
8	CIAT-7929	1-1,3	1,5-3	Ff _b
9	CIAT-17480	1-1,2	1,5-2	Ff _b
10	cv. Ipil Ipil	1-1,3	1,5-3	Ff _b
11	cv. CNIA 250	1-1,1	1,5-2	Ff _b
12	CIAT-17255	1-1,3	2-2,1	Ff _a
13	CIAT-17501	1-1,3	2-2,3	-
14	CIAT-17253	1-1,3	2-2,1	-
15	CIAT-17503	2-2,4	1-1,2	Ff _b
16	CIAT-17270	2-2,2	1-1,3	Ff _b
17	CIAT-17232	1-0,5	1-2,0	-
18	CIAT-17233	1-0,8	1-1,8	Ff _b
19	CIAT-17240	1-0,5	1-1,8	Ff _b
20	CIAT-17238	1-0,5	1-2,0	-
21	CIAT-17231	1-0,5	1-2,0	-
22	CIAT-17225	2-2,9	2-3,5	-
23	CIAT-17229	2-2,5	2-3,5	Ff _a

Leyenda: Pinnas: Ff_a Pinnas ovaladas o elípticas y bases débilmente asimétricas, Ff_b Pinnas lineales o lineales-oblongas con bases fuertemente asimétricas.

Color de la flor: F_b Flores blancas; F_r Flores rosadas, rojizas o morado pálido

Especies y accesiones: 1-11 *L. leucocephala*, 12-14 *L. lanceolata*, 15-16 *L. diversifolia*, 17-21 *L. macrophylla*, 22-23 *L. esculenta*

Tabla 3. Principales características morfológicas de las accesiones evaluadas.

Table 3. Main morphological characteristics of the evaluated accessions.

No.	Accesión	Número (u)		Glándulas (mm)			Color de la flor
		Pinnas/hoja	Pínulas/pinna	Tipo	Longitud	Ancho	
1	cv. Cunningham	16-18	36-38	G ₁	1,2	0,5	F _b
2	cv. Perú	14-16	34-36		1,5	0,5	F _b
3	CIAT-9119	14-16	34-36		1,2	1,0	F _b
4	CIAT-9438	16-18	28-30		1,0	1,0	F _b
5	CIAT-751	16-18	34-36		2,2	1,5	F _b
6	CIAT-7988	16-18	36-38		1,0	0,5	F _b
7	CIAT-7384	16-18	32-34		2,5	1,0	F _b
8	CIAT-7929	12-14	36-38		2,2	1,5	F _b
9	CIAT-17480	10-12	32-34		0,5	0,5	F _b
10	cv. Ipil Ipil	8-10	32-34		1,2	1,0	F _b
11	cv. CNIA 250	10-12	28-30	2,1	1,5	F _b	
12	CIAT-17255	6-8	16-18	G ₂	1,0	1,0	F _b
13	CIAT-17501	4-6	16-18		1,0	1,0	F _b
14	CIAT-17253	4-6	16-18	NG	1,5	1,0	F _b
15	CIAT-17503	6-8	32-34	G ₃	0,5	0,5	-
16	CIAT-17270	6-8	32-34		2,1	1,5	F _r
17	CIAT-17232	16-18	48-50	G ₄	3,0	2,0	F _b
18	CIAT-17233	16-18	46-48		3,0	1,2	-
19	CIAT-17240	14-16	46-48		2,0	1,0	F _b
20	CIAT-17238	14-16	46-48		1,5	0,5	F _b
21	CIAT-17231	14-16	46-48	NG	1,1	1,0	F _b
22	CIAT-17225	8-10	10-12	G ₅	2,5	1,5	F _b
23	CIAT-17229	8-10	10-12		2,0	1,0	-

Leyenda: Glándulas: G₁. Glándula elíptica, cóncava, G₂. Glándula redonda elíptica, en forma de cúpula, G₃ Glándula discoide poco profunda, en forma de taza, elíptica o triangular redonda, G₄ Glándula elíptica, convexa, redonda cónica, G₅ Glándula plana elíptica, grande, poco profunda, cóncava, en forma de taza, NG No se observaron.

Color de la flor: F_b Flores blancas; F_r Flores rosadas, rojizas o morado pálido

Especies y accesiones: 1-11 *L. leucocephala*, 12-14 *L. lanceolata*, 15-16 *L. diversifolia*, 17-21 *L. macrophylla*, 22-23 *L. esculenta*

base fuertemente asimétrica. El número de pares de pinnas por hoja varía de 4 a 18 y el número de pares de pínulas por pinna de 10 hasta 50; aunque en otras especies pueden llegar a alcanzar valores superiores (Hughes, 1998).

Asimismo, las accesiones de *L. leucocephala* presentaban glándulas elípticas y cóncavas; mientras que las de *L. lanceolata* eran redondas elípticas, en forma de cúpula, excepto para la accesión CIAT-17253 en la que no se observó la presencia de estas a pesar de ser una de las características de la especie como tal. En el caso de las accesiones de *L. diversifolia* se encontraron glándulas discoides, poco profundas, en forma de taza y elípticas o triangulares redon-

in the promotion of a certain system (silvopastoral or other), because it has a remarkable influence in the management they are given or the productive purpose for which they are destined. For example, the differences in the performance of the phenological flowering and fructification patterns of each one of them would provide the possibility to use them indistinctly in the same area unit: some for seed production and harvest and others for biomass production, for future breeding studies or to define when pruning can be made or not.

Detection of isoenzymatic polymorphism

From the tested isoenzymatic systems – peroxidases (*Prx*), α - and β - esterases (*Est*),

das; mientras que las de *L. macrophylla* eran elípticas, convexas, redondas y cónicas, excepto para la accesión CIAT-17231 que tampoco presentó glándula. En las accesiones de *L. esculenta* estas eran planas, elípticas, grandes, poco profundas, cóncavas y en forma de taza. Según Hughes (1997), las glándulas constituyen un indicador de identificación de las especies de este género, ya que su número y disposición es muy variable.

Todas las accesiones tenían semillas ovaladas y coloración de carmelita claro a carmelita oscuro, al igual que las legumbres; presentaban flores blancas, excepto *L. diversifolia* CIAT-17270 que tenía flores rosadas, rojizas o morado pálido. Según Anon (2003) las flores, los frutos y las semillas son indicadores que sirven para identificar las especies de este género.

Las diferencias fenotípicas en cada una de las especies y accesiones de *Leucaena* fueron informadas por Hughes (1998). El conocimiento de estas diferencias es importante al utilizar las especies en el fomento de un determinado sistema (silvopastoril o no), ya que ello tiene una marcada influencia en el manejo que se les dé o en el propósito productivo para el cual sean destinadas. Por ejemplo, las diferencias en el comportamiento de los patrones fenológicos de floración y fructificación de cada una de ellas brindarían la posibilidad de poder usarlas indistintamente en la misma unidad de área: unas para la producción y cosecha de semillas y otras en función de la producción de biomasa, para estudios futuros de mejoramiento o para definir cuándo debe realizarse o no la poda.

Detección del polimorfismo isoenzimático

De los sistemas isoenzimáticos probados –peroxidasas (*Prx*), α - y β -esterasas (*Est*), malato deshidrogenasa (*Mdh*) y alcohol deshidrogenasa (*Adh*)– los primeros fueron polimórficos, a diferencia de los últimos en los cuales no se visualizaron las bandas. El análisis cualitativo de la composición electroforética de los sistemas en el tejido foliar permitió apreciar un total de 23 bandas en las 23 accesiones estudiadas.

Con respecto a las isoenzimas α - y β -*Est*, se debe señalar que están constituidas por un grupo

malate dehydrogenase (*Mdh*) and alcohol dehydrogenase (*Adh*)– the first two were polymorphic, unlike the last ones in which the bands were not visualized. The qualitative analysis of the electrophoretic composition of the systems in the leaf tissue, allowed appreciating a total of 23 bands in the 23 studied accessions.

With regards to the isoenzymes α - and β -*Est*, they are constituted by a complex group of proteins associated to specific intracellular proteins, which show a total of eight polymorphic sites in the case of tomato (Florido *et al.*, 2002). The marked polymorphism which is present in this system has been also reported by other authors when studying the polyploidy rate in banana clones (Román *et al.*, 1997), in the leaf tissue of tomato (Florido *et al.*, 2002) and in the characterization of cassava clones (Schmidt *et al.*, 2003), which has allowed differentiating accessions in these crops.

Likewise, it could be observed that no *Adh* and *Mdh* isoforms appeared in the leaf tissue; this result is in correspondence with statements made by Menezes *et al.* (1995), who reported that under normal conditions the enzymatic activity of these systems disappears in very early stages of plant development, although it can be induced when anaerobiosis conditions are present (Iglesias, 1994); it cannot be discarded that this may be caused by concentration problems of the samples, their management or the sensitivity of the technique.

From the above-explained facts, it is reaffirmed that not all buffer systems and extraction procedures are effective for all the enzymes of a tissue, or for all laboratory conditions. An example is Ramírez *et al.* (1987), who tested 16 isoenzymatic systems in five cassava tissue types and only recommended α - and β -*Est* for the characterization and identification of collection duplicates of the above-mentioned crop. For such reason, it could be inferred that for the studied accessions only the systems of peroxidases and α - and β -esterases can be recommended, independently from the fact that tests should be made with other systems which have been used in different crops. In this regard, it is known that plants generally require

complejo de proteínas asociadas con proteínas intracelulares específicas, que muestran un total de ocho sitios polimórficos en el caso del tomate (Florido *et al.*, 2002). El marcado polimorfismo que se presenta en este sistema ha sido informado también por otros autores al estudiar el nivel de poliploidía en clones de plátano (Román *et al.*, 1997), en el tejido foliar de tomate (Florido *et al.*, 2002) y en la caracterización de clones de yuca (Schmidt *et al.*, 2003), lo que ha permitido diferenciar accesiones en estos cultivos.

De igual forma se pudo constatar que no aparecieron isoformas *Adh* y *Mdh* en el tejido foliar; este resultado se corresponde con lo planteado por Menezes *et al.* (1995), quienes informaron que en condiciones normales la actividad enzimática de estos sistemas desaparece en etapas muy tempranas del desarrollo de las plantas, a pesar de que puede inducirse cuando se presentan condiciones de anaerobiosis (Iglesias, 1994). No se debe descartar que esto puede deberse a problemas de concentración de las muestras, el manejo de estas o la sensibilidad de la técnica.

A partir de lo antes señalado se reafirma que no todos los sistemas tampones y procedimientos de extracción son efectivos para todas las enzimas de un tejido, ni para todas las condiciones de laboratorio. Como ejemplo se puede citar a Ramírez *et al.* (1987), quienes probaron 16 sistemas isoenzimáticos en cinco tipos de tejidos de yuca y sólo recomendaron α - y β -*Est* para la caracterización e identificación de duplicados de la colección del mencionado cultivo. Por ello pudiera inferirse que para las accesiones estudiadas sólo pueden recomendarse los sistemas de peroxidasas y α y β esterasas, independientemente de que debe probarse con otros que se hayan utilizado en diferentes cultivos. Al respecto, se conoce que las plantas requieren generalmente más de una isoforma de una enzima particular, de manera tal que se garantice una catálisis eficiente (Álvarez, 2005).

Asimismo, debe considerarse que las isoenzimas son de expresión génica y, por lo tanto, dependen del tipo de tejido y de su desarrollo; por ello la ausencia de bandas en los diferentes patrones isoenzimáticos no solo se debe a las ne-

more than one isoform of a particular enzyme, so that an efficient catalysis is guaranteed (Álvarez, 2005).

Likewise, it should be considered that isoenzymes are of gene expression and, thus, depend on the tissue type and development; that is why the absence of bands in the different isoenzymatic patterns is due not only to the needs for those enzymes in the different tissues, but also to the co-migration of proteins and the difference of geographical zones, because although most of them are not influenced by the environment, according to Schmidt *et al.* (2003), the electrophoretic patterns of a few systems (including *Prx*, *Est*, *Aps*, *Sod* and *Cat*) can be modified by biotic and abiotic factors, so that under these conditions the function of the genes that codify for those enzymes is altered. Similarly, it should be stated that isoenzymes can also vary according to the evaluated species, age, management, climate, presence or absence of diseases and position of the sampled organ, among others.

Table 4 shows the frequency of each pattern in the 23 accessions. The detected level of isoenzymatic polymorphism in the sample could be considered moderate, because most of the patterns showed very high frequencies (60 and 80% of the sample with the same pattern for *Est* and *Prx*, respectively) and very few accessions showed unique patterns (seven for *Est* and two for *Prx*).

The existence of a high electrophoretic resolution for such systems was proven (table 5), which indicates that they are useful in the evaluation of varietal polymorphism in this material; the enzymes peroxidasas and esterasas were shown to be the most recommended, for their polymorphism, as referred by Schmidt *et al.* (2003).

Similar results were obtained when making the integral analysis of the enzymatic variability in *L. leucocephala* (Harris *et al.*, 1994a) and in *L. shannonii* (Chamberlain *et al.*, 1996), as well as in rice mutants of the variety J-112 (Díaz *et al.*, 2001), in which the existence of some sites of polymorphic enzymatic activity was detected

cesidades de esas enzimas en los diferentes tejidos, sino también a la comigración de proteínas y a la diferencia de zonas geográficas, pues a pesar de que la mayoría no son influidas por el ambiente, según Schmidt *et al.* (2003), los patrones electroforéticos de unos pocos sistemas (entre los que se incluye *Prx*, *Est*, *Aps*, *Sod* y *Cat*) pueden ser modificados por factores bióticos y abióticos, de manera tal que en esas condiciones se altere el funcionamiento de los genes que codifican para esas enzimas. De igual forma, debe señalarse que las isoenzimas también pueden variar según las especies que se evalúen, la edad, el manejo, el clima, la presencia o no de enfermedades y la posición del órgano que se muestrea, entre otros.

En la tabla 4 se muestra la frecuencia de cada patrón en las 23 accesiones. El nivel de polimorfismo isoenzimático detectado en la muestra pudiera considerarse medio, ya que la mayoría de los patrones presentaron frecuencias muy altas (60 y 80% de la muestra con un mismo patrón para *Est* y *Prx*, respectivamente) y muy pocas accesiones mostraron patrones únicos (siete para *Est* y dos para *Prx*).

Se comprobó la existencia de una alta resolución electroforética para dichos sistemas (tabla 5), lo que indica que son de utilidad en la evaluación del polimorfismo varietal en este material; se demostró que las enzimas peroxidasas y esterases son las más recomendadas, por su polimorfismo, como refirieron Schmidt *et al.* (2003).

Tabla 4. Frecuencia de cada patrón isoenzimático.
Table 4. Frequency of each isoenzymatic pattern.

<i>Est</i>		<i>Prx</i>	
Patrón	Frecuencia	Patrón	Frecuencia
1	0,6	1	0,8
2	0,04	2	0,04
3	0,04	3	0,04
4	0,04	4	0,1
5	0,04	-	
6	0,04	-	
7	0,04	-	
8	0,04	-	
9	0,13	-	

(González, 1996). In general, the isoenzymes peroxidases and esterases are among the most polymorphic systems in plants (Fuentes, 2003).

Considering the results of the isoenzymatic analysis, the systems α - and β - esterases turned out to be the ones with higher polymorphism regarding the number of polymorphic bands that allowed detecting the number of electrophoretic patterns and their frequency in the sample; this is in correspondence with the reports about the high polymorphism in this system for other plant species (Schmidt *et al.*, 2003).

From the appearance frequency of the bands of the isoenzymatic systems, through the SHAN program, the dendrogram was obtained (fig. 1), in which the grouping of the accessions in three groups (I, II and III) is shown. Group I was formed by two subgroups (IA and IB). Subgroup IA included all the *L. leucocephala* accessions, two *L. lanceolata* accessions (CIAT-17255 and CIAT-17501) and one of *L. diversifolia* (CIAT-17270); while subgroup IB turned out to be heterogeneous, including *L. macrophylla* (three accessions), *L. esculenta*, *L. lanceolata* and *L. diversifolia*, the last two represented by an accession each. Group II included *L. macrophylla* CIAT-17232 and group III had *L. macrophylla* CIAT-17238 and *L. esculenta* CIAT-17225.

Group I includes the accessions that had an outstanding morphoagronomic performance regarding the indicators, together with the commercial varieties currently used in silvopastoral systems, all of them with an acceptable productive potential. It should be emphasized that within this group the genetic affinities were higher. The other accessions had a different performance in their phenotype, as compared to those in group I.

The varietal groups were formed at low values of genetic distance, considering a truncation value of 0,35, which suggests a high level of genetic similarity for the tested enzymatic systems. This was to be expected, given they are isoenzymatic markers which correspond to codifying and highly preserved regions in the genome. Although the sample included varieties of five different

Tabla 5. Análisis integral de la variabilidad genética.
Table 5. Integral analysis of the genetic variability.

	<i>Est</i>	<i>Prx</i>
Bandas polimórficas	11	10
Bandas monomórficas	1	-
Bandas totales	12	10
Índice de polimorfismo (%)	92	100

Resultados similares fueron obtenidos al realizarse el análisis integral de la variabilidad enzimática en *L. leucocephala* (Harris *et al.*, 1994a) y en *L. shannonii* (Chamberlain *et al.*, 1996), al igual que en mutantes de arroz de la variedad J-112 (Díaz *et al.*, 2001), donde se detectó la existencia de algunos sitios de actividad enzimática polimórfica (González, 1996). En general, las isoenzimas peroxidasas y esterasas se encuentran entre los sistemas más polimórficos en las plantas (Fuentes, 2003).

Atendiendo a los resultados del análisis isoenzimático, los sistemas α - y β - esterasas resultaron ser los de mayor polimorfismo en cuanto al número de bandas polimórficas que permitieron detectar, el número de patrones electroforéticos y su frecuencia en la muestra; ello se corresponde con lo reportado acerca del alto polimorfismo de este sistema para otras especies vegetales (Schmidt *et al.*, 2003).

A partir de la frecuencia de aparición de las bandas de los sistemas isoenzimáticos, mediante el programa SHAN, se obtuvo el dendrograma (fig. 1), en el que se muestra el agrupamiento de las accesiones en tres grupos (I, II y III). El grupo I estuvo formado por dos subgrupos (IA y IB). El subgrupo IA incluyó todas las accesiones de *L. leucocephala*, dos accesiones de *L. lanceolata* (CIAT-17255 y CIAT-17501) y una de *L. diversifolia* (CIAT-17270); mientras que el subgrupo IB resultó heterogéneo, se incluyeron *L. macrophylla* (tres accesiones), *L. esculenta*, *L. lanceolata* y *L. diversifolia*, representadas estas últimas por una accesión. En el grupo II se incluyó *L. macrophylla* CIAT-17232 y en el grupo III *L. macrophylla* CIAT-17238 y *L. esculenta* CIAT-17225.

En el grupo I se encuentran las accesiones que tuvieron un comportamiento morfo-

Leucaena species, a full correspondence could not be appreciated among the groups and main analyzed species, with the exception of *L. leucocephala* (subgroup IA).

It is valid to state that differentiating the species *L. leucocephala* from the others, although the differentiation among its accessions could not be achieved, constitutes a valuable contribution to this type of study and the breeding future of the species from this genus. In the case of the other species genetic similarity was observed; however, this also meant a step forward in the genetic study and characterization, aspect which must be closely related to the fact that *L. leucocephala* has been object of diverse breeding programs with regards to the others, of which there is little information in that sense, because according to reports presented by Chamberlain *et al.* (1996) they are only taken into consideration as ancestors in the above-mentioned programs.

These results show the relatively narrow basis of existing isoenzymatic variation in the evaluated material and are in correspondence, in general, with the statements by Harris *et al.* (1994a) and Chamberlain *et al.* (1996), who reported about the large isoenzymatic homogeneity present in the *Leucaena* genus; this is corroborated with the studies conducted by Harris *et al.* (1994b), which revealed the presence of a low polymorphism level even when using molecular techniques, such as restriction fragment length polymorphism (RFLP).

Through this study the possibility of duplicate genotypes could be discarded, which would have been impossible to determine through morphological characterization and evaluation. In this sense it would be useful to increase the number of isoenzymatic systems in the analysis, in order to achieve higher cover of the genome, among them: aspartate aminotransferase (AAT), phosphoglucose isomerase (PGI), isocitrate dehydrogenase (IDH), phosphoglucomutase (PGM) and shikimate dehydrogenase (SDH); they have shown polymorphism in the genetic diversity studies conducted in other *Leucaena* species (Harris *et al.*, 1994b; Chamberlain *et al.*,

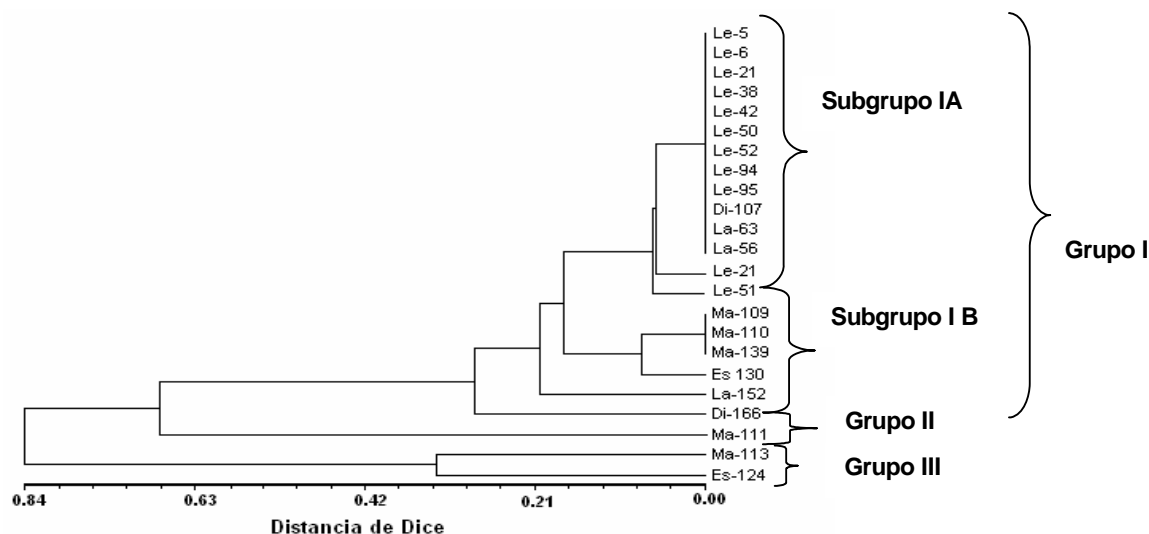


Fig. 1. Dendrograma UPGMA obtenido mediante el análisis de conglomerados de los resultados de los sistemas isoenzimáticos (Le: *leucocephala*; Ma: *macrophylla*; La: *lanceolata*; Di: *diversifolia*; Es: *esculenta*).
 Fig. 1. Dendrogram (UPGMA) obtained through the cluster analysis of the results of the isoenzymatic systems (Le: *leucocephala*; Ma: *macrophylla*; La: *lanceolata*; Di: *diversifolia*; Es: *esculenta*).

agronómico destacado en cuanto a los indicadores, a las que se unen las variedades comerciales actualmente utilizadas en los sistemas silvopastoriles, todas ellas con un potencial productivo aceptable. Se debe destacar que dentro de este grupo las afinidades genéticas fueron mayores. El resto de las accesiones tuvieron un comportamiento diferente en su fenotipo, con respecto a las del grupo I.

Los grupos varietales se formaron a valores bajos de distancia genética, considerando un nivel de truncadura de 0,35, lo que sugiere un alto nivel de similitud genética para los sistemas enzimáticos probados. Ello era de esperar, dado que se trata de marcadores isoenzimáticos que corresponden a regiones codificantes y altamente conservadas en el genoma. A pesar de que la muestra incluyó variedades de cinco especies diferentes de *Leucaena*, no se pudo apreciar una correspondencia completa entre los grupos y las principales especies analizadas, con la excepción de *L. leucocephala* (subgrupo IA).

Es válido señalar que el hecho de poder diferenciar la especie *L. leucocephala* de las demás, aunque no se lograra la diferenciación entre sus accesiones, constituye un valioso aporte a este

1996) and in such crops as tomato, rice, banana and cassava (Florido *et al.*, 2002; Fuentes, 2003; Schmidt *et al.*, 2003).

According to the results it is concluded that the evaluated morphoagronomic indicators accounted for the variability regarding the performance in the establishment. *Leucaena* spp. showed its flowering and fructification capacity, with differences among the studied individuals. In this sense, the following accessions stood out: *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Peru, CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929, CIAT-17480, cv. Ipil-Ipil and cv. CNIA-250; *L. lanceolata* CIAT-17255 and CIAT-17501, and *L. diversifolia* CIAT-17270. The isoenzymatic systems α - and β -esterases and peroxidases were standardized in the determination of the isoenzymatic polymorphism of these species. The analysis of the isoenzymatic patterns α - and β -esterases and peroxidases allowed differentiating *L. leucocephala* more clearly than the others, although no better differentiation was made within the species and the esterases were the most polymorphic. It was proven that there were no duplicate genotypes in the *Leucaena* collection; genetic homogeneity was detected at

tipo de estudio y al futuro del mejoramiento genético de las especies de este género. En el caso de las demás especies se observó similitud genética; sin embargo, ello también significó un paso de avance en el estudio genético y en la caracterización, aspecto que debe estar relacionado estrechamente con que *L. leucocephala* ha sido objeto de diversos programas de mejoramiento con respecto a las demás y de las cuales se tiene poca información en este sentido, ya que según reportes de Chamberlain *et al.* (1996) solo se tienen en cuenta como progenitores en los programas anteriormente mencionados.

Estos resultados evidencian la base relativamente estrecha de variación isoenzimática existente en el material evaluado y se corresponden, en general, con lo planteado por Harris *et al.* (1994a) y Chamberlain *et al.* (1996), quienes informaron acerca de la gran homogeneidad isoenzimática presente en el género *Leucaena*; ello se corrobora con las investigaciones efectuadas por Harris *et al.* (1994b), que revelaron la presencia de un bajo nivel de polimorfismo incluso al utilizar técnicas moleculares, como el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

A través de este estudio se pudo descartar la posibilidad de que existieran genotipos duplicados, lo cual hubiese sido imposible determinarlo a través de la caracterización y evaluación morfológica. En este sentido sería útil aumentar el número de sistemas isoenzimáticos en el análisis, con vistas a lograr mayor cobertura del genoma, entre ellos: aspartato aminotransferasa (AAT), fosfogluco isomerasa (PGI), isocitrato deshidrogenasa (IDH), fosfoglucomutasa (PGM) y shikimato deshidrogenasa (SDH); estos han mostrado polimorfismo en los estudios de diversidad genética realizados en otras especies de *Leucaena* (Harris *et al.*, 1994b; Chamberlain *et al.*, 1996) y en cultivos tales como el tomate, el arroz, el plátano y la yuca (Florido *et al.*, 2002; Fuentes, 2003; Schmidt *et al.*, 2003).

De acuerdo con los resultados se concluye que los indicadores morfoagronómicos evaluados explicaron la variabilidad en cuanto al comportamiento en el establecimiento. *Leucaena*

isoenzymatic level in the accessions and genetic affinity among them.

For such reason, combining the morphoagronomic and genetic-biochemical analyses for the characterization of germplasm banks is recommended, in addition to continuing the search for new polymorphic forms of the crop, incorporating, as much as possible, techniques that detect higher polymorphism, which allow revealing the existing variation at DNA level and having enough genetic variability to utilize in *Leucaena*. Including a higher number of accessions from the little represented species in this work (*L. lanceolata*, *L. diversifolia*, *L. macrophylla* and *L. esculenta*) is recommended.

--End of the English version--

spp. mostró su capacidad de floración y fructificación, con diferencias entre los individuos estudiados. En este sentido se destacaron las accesiones *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú, CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929, CIAT-17480, cv. Ipil-Ipil y cv. CNIA-250; *L. lanceolata* CIAT-17255 y CIAT-17501, y *L. diversifolia* CIAT-17270. Se estandarizaron los sistemas isoenzimáticos α - y β -esterasas y peroxidasas en la determinación del polimorfismo isoenzimático de estas especies. El análisis de los patrones isoenzimáticos α - y β -esterasas y peroxidasas permitió diferenciar a *L. leucocephala* con mayor claridad que el resto, aunque no se ganó en diferenciación dentro de la especie y las esterases fueron las más polimórficas. Se comprobó que no existían genotipos duplicados en la colección de *Leucaena*; se detectó homogeneidad genética a nivel isoenzimático en las accesiones y afinidad genética entre ellas.

Por ello, se recomienda combinar los análisis morfoagronómicos y genético-bioquímicos para la caracterización de los bancos de germoplasma, además de continuar con la búsqueda de nuevas formas polimórficas del cultivo, incorporando, en lo posible, técnicas que detecten un mayor polimorfismo, que permitan revelar la variación

existente a nivel de ADN y contar con la variabilidad genética suficiente para explotar en *Leucaena*. Se sugiere incluir un mayor número de accesiones de las especies poco representadas en este trabajo (*L. lanceolata*, *L. diversifolia*, *L. macrophylla* y *L. esculenta*).

Referencias bibliográficas

- Academia de Ciencias de Cuba. 1989. Nuevo Atlas Nacional de Cuba. Instituto Cubano de Geodesia y Cartografía. La Habana, Cuba. p. 41
- Acosta, R. 1999. Caracterización citogenética, morfoagronómica y genético-bioquímica de diez clones de plátano burro (*Musa spp.*, Grupo ABB). Tesis de Grado. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba. 65 p.
- Alonso, J. 2003. Factores que intervienen en la producción de biomasa de un sistema silvopastoril leucaena (*Leucaena leucocephala* cv. Perú) y guinea (*Panicum maximum* cv. Likoni). Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba. 109 p.
- Álvarez, A. 2005. Análisis de la diversidad genética de variedades tradicionales de arroz (*Oryza sativa* L.) basado en marcadores morfoagronómicos y moleculares. Tesis en opción al Título de Máster en Biología vegetal. Mención Biología vegetal. La Habana, Cuba. 95 p.
- Álvarez, A. *et al.* 2000. Genetic diversity analysis in rice mutants using isozyme and morphological markers. *Cultivos Tropicales*. 21 (4): 39
- Anon. 2003. *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. <http://www.rockfound.org.mx/pumilabies.html/2002> [Consulta: noviembre 2008]
- Chamberlain, J.R. *et al.* 1996. Patterns of isozyme variation in the *Leucaena shannonii* Alliance (*Leguminosae: Mimosoidae*). *Silvae Genetica*. 45:1
- Cooksley, D.G. 1974. A study of preplanting herbicide, nitrogen, burning and post-emergence cultivation on the establishment of *Leucaena leucocephala*. *Qd. J. Agric. Anim. Sci.* 31:271
- Cronquist, A. 1981. An Integrated system of clasification of flowering plants. Colombia University Press, New York. 1262 p.
- Dávila, C. & Urbano, D. 1996. Leguminosas arbóreas en la zona sur del Lago de Maracaibo. En: Leguminosas forrajeras arbóreas en la agricultura tropical. (Ed. T. Clavero). Centro de Transferencia de Tecnología en Pastos y Forrajes. Universidad del Zulia, Venezuela. p. 101
- Díaz, M. 2006. Fotosíntesis. En: Compendio de Conferencias del Programa de la Maestría en Pastos y Forrajes. Curso: Fundamentos de la Producción de Pastos. EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. 13 p.
- Díaz, S. *et al.* 2001. Caracterización bioquímica de accesiones de arroz (*Oryza sativa* L.). *Cultivos Tropicales*. 22: 47
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*. 26: 297
- Florido, M. *et al.* 2002. Caracterización morfoagronómica y bioquímica de 20 accesiones de tomate (*Lycopersicon* spp.). *Cultivos Tropicales*. 23: 61
- Fuentes, J.L. 2003. Diversidad genética y utilización comercial de variedades de arroz en Cuba. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencia Agrícolas. La Habana, Cuba. 140 p.
- Funes, F. 2004. Sistemas ganaderos agroecológicos. Experiencias del Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes y su red de estaciones experimentales. Simposio Internacional sobre Ganadería agroecológica. La Habana, Cuba. p. 1
- González, C. 2002. Detección del polimorfismo genético mediante marcadores bioquímicos en plantas. En: Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. (Eds. M.T. Cornide *et al.*). Editorial Félix Varela, La Habana, Cuba. p. 36
- González, L.M. 1996. Uso de la radioinducción de mutaciones en la obtención de genotipos de arroz tolerantes a la salinidad. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto "Jorge Dimitrov". Granma, Cuba. 92 p.
- Harris S.A. *et al.* 1994a. Genetic variation in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (*Leguminosae: Mimosoidae*). *Silvae Genetica*. 43:2
- Harris, S.A. *et al.* 1994b. A phylogenetic analysis of *Leucaena* (*Leguminosae:Mimosoideae*). *Pl. Sys. Evol.* 191:1
- Hernández, A. *et al.* 2003. Nuevos aportes a la clasificación genética de suelos en el ámbito nacional e internacional. Instituto de Suelos. Ministerio de la Agricultura. AGRINFOR. La Habana, Cuba. 145 p.
- Hughes, C.E. 1997. Species delimitation and new taxa and combinations in *Leucaena* (*Leguminosae*). *Contributions University Michigan Herbarium*. 21:277
- Hughes, C.E. 1998. *Leucaena*. Manual de recursos genéticos No. 37. Oxford Forestry Institute.

- Department of Plant Sciences. University of Oxford. p. 91
- Iglesias, L. 1994. Utilización de marcadores bioquímicos y moleculares en el mejoramiento genético de la papa. *Cultivos Tropicales*. 15:108
- Lamela, L. 1998. Métodos de muestreo y mediciones en sistemas silvopastoriles. En: Compendio de conferencias para el Diplomado en Silvopastoreo. EEPF "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba.
- Machado, R. *et al.* 1994. Caracterización de variedades de *Leucaena leucocephala* para la producción de forrajes. I. Establecimiento. *Pastos y Forrajes*. 17:13
- Machado, R. *et al.* 1999. Metodología para la colecta, conservación y caracterización de especies herbáceas, arbóreas y arbustivas útiles para la ganadería. *Pastos y Forrajes*. 22:181
- Morrison, D. 1967. Multivariate statistical methods. Mc Graw-Hill Book Company. New York, USA. 150 p.
- Murgueitio, E. 2003. Investigación participativa en sistemas silvopastoriles integrados: La experiencia de CIPAV en Colombia. En: Taller Internacional "Ganadería, desarrollo sostenible y medio ambiente". La Habana, Cuba. 207 p.
- NTSYS-pc. 1997. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0. Exeter Software, Setauket, New York.
- Ramírez, H. *et al.* 1987. Isozymes electrophoregrams of sixteen enzymes in five tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties. *Euphytica*. 36: 39
- Román, M.J. *et al.* 1997. Caracterización isoenzimática de 17 clones diploides de plátano fruta *Musa* spp. *Biología*. 11:61
- Ruiz, T.E. & Febles, G. 2006. Agrotecnia para el fomento de sistemas con leguminosas. En: Recursos forrajeros herbáceos y arbóreos. (Ed. Milagros Milera). EEPF "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba-Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. p. 103
- Schmidt, A. *et al.* 2003. Caracterización de clones de yuca (*Manihot esculenta*) mediante marcadores proteicos e isoenzimáticos. *Interiencia*. 28:690
- Seguí, E. *et al.* 2002. Informe final del proyecto "Caracterización botánica y morfoagronómica de una colección de *Leucaena* spp. y selección de las mejores accesiones para los sistemas agroforestales". PNCT "Mejoramiento vegetal y recursos fitogenéticos". CITMA, La Habana/EEPF "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba. 50 p. (Mimeo).
- Shelton, H.M. 2000. Potential and limitation of *Leucaena* spp. for Silvopastoral System. En: Simposio Internacional: Sistemas Agroforestais Pecuários na América de Sul (cd rom), Brasil.
- Sneath, P. & Sokal, R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco, EE.UU. 73 p.
- Soltis, D.E. & Soltis, P. 1989. Isozymes in plant biology. Department of Botany, Washington State University, Pullman, Washington. 45 p.
- Stür, W.W. *et al.* 1994. Desfoliation and management of forage tree legumes. In: Tree legumes in tropical agriculture (Eds. R.C. Gutteridge and H.M. Shelton). CAB International. Wallingford, UK. p. 144
- Torres, V. *et al.* 2006. Modelo estadístico para la medición del impacto de la innovación o transferencia tecnológica en la rama agropecuaria. Informe técnico. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba
- Visuata, B. 1998. Análisis estadístico con SPSS para Windows. Vol. II. Estadística multivariante (Ed. C. Fernández). Madrid, España. p. 24
- Wencomo, H.B. 2008. Evaluación morfoagronómica e isoenzimática y selección de accesiones de *Leucaena* spp. con fines silvopastoriles. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba. 191 p.

Recibido el 14 de noviembre del 2011

Aceptado el 1 de diciembre del 2011