



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y MEJORAMIENTO



ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE PASTOS Y FORRAJES
"INDIO HATUEY"

*Evaluación morfoagronómica e isoenzimática y
selección de accesiones de *Leucaena* spp. con fines
silvopastoriles*

Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en
Ciencias Agrícolas

Aspirante: Ing. Hilda Beatriz Wencomo Cárdenas

Tutor: Ing. Rodobaldo Ortiz Pérez Dr. C

Cotutor: Ing. Rey L. Machado Castro Dr. C

La Habana, 2008

*....."EL ÚNICO CAMINO ABIERTO A LA PROSPERIDAD CONSTANTE
Y FÁCIL, ES EL DE CONOCER, EL DE INVESTIGAR INFATIGABLEMENTE
LA NATURALEZA".*

JOSÉ MARTÍ

AGRADECIMIENTOS

La elaboración y culminación de un trabajo de tesis, además del sacrificio y del esfuerzo personal, indudablemente lleva implícito el apoyo y la cooperación de personas y de instituciones a las cuales deseo extender mis más sinceros agradecimientos, espero que el orden no determine diferencia alguna de mérito. También quisiera pedirle disculpas a los que no mencione debido a problemas de espacio.

✓ A la Revolución que me permitió, siendo hija de una humilde familia de obreros negros, estudiar y prepararme como profesional capacitado para contribuir al desarrollo de mi país y de otros países del mundo.

✓ A mi tutor el Dr. Rodobaldo Ortiz Pérez investigador de gran experiencia y prestigio nacional e internacional en el tema de la genética, por haberme sabido guiar en este camino tan escabroso; además de su especial dedicación en la concepción, preparación y revisión de los resultados plasmados en esta tesis; por ello y por ser mi amigo, le estaré eternamente agradecida.

✓ A la Lic. Nayda Armengol López, por ser mi amiga, por su ayuda en la revisión, corrección del material de tesis, búsqueda de bibliografía y por su apoyo en los momentos de flaqueza.

✓ Al Dr. Arístides Pérez, por ser mi amigo y por sus acertadas y oportunas críticas, buenos consejos e ideas, y por la minuciosa revisión del material de tesis.

✓ Al Dr. Orlando Coto por su ayuda incondicional en la realización en una de las etapas de esta tesis.

✓ A la Dra Maykelis Díaz Solares, por su ayuda, su apoyo incondicional y por su gran aporte de conocimientos.

✓ A la Dra Verena Torres Cárdenas, matemática y a los integrantes de su colectivo, del Instituto de Ciencia Animal (ICA), por su asesoría y colaboración en el procesamiento matemático de los resultados de esta tesis.

✓ Al Dr. Rafael Herrera, por sus oportunas críticas, sugerencias y ayuda en el arreglo de este documento.

✓ Al colectivo de trabajadores del INCA, especialmente el del Departamento de Genética, en el cual me sentí como en familia y a los integrantes del Consejo Científico y de la Comisión de Grado Científico de dicha institución, quienes con su sabia sugerencia y críticas oportunas, permitieron la mejor elaboración y presentación de esta tesis.

✓ Al Dr. Alberto Hernández y al Técnico Juvenal por los muestreos y análisis de suelo al inicio y final del período experimental.

- ✓ Al Dr. Walfredo Torres de la Noval, por su gran ayuda, confianza y constante preocupación por mi salud y por la terminación del trabajo de tesis.
- ✓ A la Dra Liana Babbar y al Dr. Ismael Hernández, por su ayuda incondicional.
- ✓ A Omaidá Lanz, Teresa Martínez, Claribel Benítez, Daysi Castañeda, Rosario Companioni, MSc. Taymer Miranda, MSc. Antonio Suset, MSc. Juan Carlos Lezcano, MSc Yuseika Olivera, MSc Milagros Milera, Dr. Félix Ojeda, a Marlene Prieto; a la Ing. Yudith Lugo, al Ing. Pedro Duquesne y al Lic. Luis Cepero, por su amistad, ayuda desinteresada y por creer en mi capacidad como profesional.
- ✓ A Marilyn Ruz, por su responsabilidad, calidad y rigor en todas las mediciones y evaluaciones realizadas en el área experimental, así como a otros técnicos, entre ellos: Julia Cáceres, Alberto Hernández, Julio Brunet, Yudith Lugo, Elsa Sánchez-Quiróz, que colaboraron sistemáticamente, al igual que a los obreros.
- ✓ Al colectivo del laboratorio central de la EEPF "Indio Hatuey", en especial a Ramona Casanova, Suilan Serrano y Yasneysi Rodríguez, quienes realizaron los análisis químicos de esta investigación.
- ✓ A la Lic. Alicia Ojeda y a Nancy Pérez, quienes trabajaron arduamente en la revisión de estilo, corrección y edición de todo el material de tesis, al igual que a la Lic. Nidia Amador, Lic. Anabel Barroso, y a las técnicas Edriagni Bárzaga y Teresa Daniel, miembros del colectivo de ICT de la EEPF "Indio Hatuey", por todo su apoyo.
- ✓ A numerosos colegas que me ofrecieron su amistad, cariño solidario y conocimientos, entre ellos: Dr. Manuel Riera, Dr. Luperio Barroso, MSc. Sandra Díaz, Dr. Alexander Miranda. Además a mis compañeros de las casitas del INCA, a los cuales nunca olvidaré.
- ✓ Al colectivo de trabajadores de la EEPF "Indio Hatuey", del cual me siento muy honrada de pertenecer, pues su ejemplaridad, responsabilidad, sentido de pertenencia y sensibilidad humana, lo hacen acreedor de mi respeto y consideración.
- ✓ Al colectivo de trabajo del Laboratorio de Radiobiología del CEADEN, por su ayuda desinteresada en la realización de la fase experimental de isoenzimas, en especial a la MSc. Alba Álvarez, a Leonor Mora, a Damaris, a Alena, a Eliseo, a Livia Santiago y a Sandra Carro.
- ✓ A Yudelmis Madruga, por su ayuda desinteresada en el momento más decisivo de la investigación.
- ✓ Y finalmente, a todas las personas que involuntariamente omití y que de una forma u otra contribuyeron con la realización y culminación de este trabajo.

A todos, muchas gracias

A mi hija, mi semilla y esperanza para el futuro, por ser fuente de mi inspiración, por el tiempo que no le dediqué a su educación y a quien deseo pedirle que si algo bueno puede ver en mí, sea el ejemplo que le he dado de dedicación y entrega total al estudio y al trabajo.

A mi madre, por su apoyo incondicional, por su sacrificio y abnegación

A mi padre, por su sacrificio, confianza y por la educación brindada

A mi familia, por creer en mí como profesional y como persona

A mis amigos y compañeros íntimos, por su ayuda y confianza

ABREVIATURAS

% Porcentaje

Adh Alcohol deshidrogenadas

ADN Ácido desoxirribonucleico

ANOVA Análisis de varianza

BC Buffer de carga

Ca Calcio

Cat Catalasas

cm Centímetro

CSIRO Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization

cv. Cultivar

DIVMS Digestibilidad *in vitro* de la materia seca

DS Desviación estándar

DTT Ditriotietol

EDTA Ácido etilendiamino tetracético

EM Energía metabolizable

EE Error estándar

ELL Época lluviosa

EPLL Época poco lluviosa

Est Esterasas

EU Estados Unidos

FAD Fibra ácida detergente

FB Fibra bruta

FC Fibra cruda

FND Fibra neutra detergente

g Gramos

há Hectárea

ICA Instituto de Ciencia Animal

K Potasio

KCL Cloruro de potasio

kg Kilogramo

m Metro

Mdh Malato deshidrogenasa

mg Miligramo

MgCl₂ Cloruro de magnesio

mL Mililitro

mm Milímetro

MO Materia orgánica

MS Materia seca

msnm Metros sobre el nivel del mar

OFI Oxford Forestry Institute

P Fósforo

PB Proteína bruta

Prx Peroxidasas

α- alpha

β beta

μL Microlitro

SÍNTESIS

Con el objetivo de seleccionar las accesiones más sobresalientes para ser estudiadas en el fomento de nuevas áreas en las que se empleen sistemas silvopastoriles, se realizó la evaluación de 23 accesiones *Leucaena* spp., incluidas cinco especies: (*L. leucocephala* (11), *L. lanceolata* (3), *L. diversifolia* (2), *L. macrophylla* (5) y *L. esculenta* (2), mediante la técnica de electroforesis de enzimas y algunos indicadores morfoagronómicos, en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas. Los resultados mostraron que los indicadores que mejor definieron la variabilidad de las accesiones evaluadas fueron: en **condiciones de vivero**: la altura de la planta, el número de brotes foliares, la biomasa seca de la parte aérea, la longitud y la masa seca de la raíz; en la **etapa de establecimiento**: la altura de la planta, el grosor del tallo, el número de ramas, el rendimiento de materia seca; en la **capacidad de recuperación ante la poda**: el número de rebrotes, su longitud, el grosor del tallo, el número de ramas y el rendimiento y en la **selección de especies**: la altura, el grosor de tallo, el número de ramas, el rendimiento, la disponibilidad de biomasa (comestible y leñosa) y el contenido de proteína bruta. Las especies y accesiones de este género, de forma general, mostraron alta capacidad de recuperación después de la poda. El análisis de los patrones isoenzimáticos permitió diferenciar la especie *L. leucocephala* con mayor claridad que el resto, aunque no se ganó en diferenciación dentro de la especie, y detectar diferencias entre las accesiones; las esterasas fueron las más polimórficas. Se comprobó que no existían genotipos duplicados en la colección de germoplasma analizada. Los resultados, permitieron seleccionar las accesiones *L. leucocephala* CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929, CIAT-17480, *L. lanceolata* CIAT-17255, CIAT-17501 y *L. diversifolia* CIAT-17270, para ser estudiadas en el fomento de nuevas áreas con sistemas silvopastoriles y las no seleccionadas para utilizarlas en estos sistemas con otros fines (árboles de sombra, cortinas rompevientos, cercas vivas o como abono verde por la fácil descomposición de sus hojas y contenido de N). Se recomienda introducir estos resultados en los programas de pregrado y de posgrado de las facultades, centros de investigación e institutos politécnicos agropecuarios.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Clasificación taxonómica y descripción botánica del género <i>Leucaena</i>	6
2.2 Origen, distribución y ecología	10
2.3 Tipología y variedades de <i>L. leucocephala</i>	12
2.4 Agronomía y manejo	14
2.4.1.1 Tratamiento a la semilla	15
2.4.1.2 Siembra	16
2.4.1.3 Época de siembra.....	17
2.4.1.4 Profundidad de siembra	18
2.4.1.5 Dosis de siembra	18
2.4.1.6 Plagas y enfermedades.....	19
2.5 Usos potenciales	20
2.6 Colecciones de germoplasma y mejora genética.....	22
2.7 Isoenzimas	25
2.7.1 Electroforesis de isoenzimas	27
2.7.1.1 Procedimiento para electroforesis.....	28
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	32
3.1 Descripción del área	33
3.1.1 Ubicación del área experimental.....	33
3.1.2 Características del clima.....	33
3.1.3 Características del suelo.....	33
3.2 Descripción de la investigación	34
3.2.1 Material vegetal utilizado	34
3.2.2 Evaluación de las accesiones en condiciones de vivero	34
3.2.3 Evaluación de las accesiones durante la etapa de establecimiento	36
3.2.3.1 Fase de floración y fructificación	37
3.2.4 Capacidad de recuperación a la poda	37
3.2.4.1 Incidencia de enfermedades e insectos potencialmente plagas	38
3.2.5 Disponibilidad de biomasa y composición química.....	38
3.2.6 Detección del polimorfismo enzimático.....	39
3.2.6.1 Material vegetal y extracción enzimática	39

3.2.7 Procesamiento estadístico.....	40
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1 Evaluación de las accesiones en condiciones de vivero.....	43
4.2 Evaluación de las accesiones en condiciones de establecimiento	49
4.2.1 Fase de floración y fructificación	58
4.3 Capacidad de recuperación ante la poda.....	63
4.3.1 Incidencia de enfermedades e insectos potencialmente plagas	71
4.4 Disponibilidad de biomasa y composición química.....	74
4.5 Detección del polimorfismo isoenzimático.....	85
CAPÍTULO 5. CONSIDERACIONES FINALES	95
CONCLUSIONES	101
RECOMENDACIONES.....	103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Contenido de nutrientes en tres especies de <i>Leucaena</i>	7
Tabla 2.2 Composición química del follaje de <i>L. leucocephala</i> comparado con <i>Medicago sativa</i>	8
Tabla 3.1 Características químicas del suelo del área experimental	34
Tabla 3.2 Accesiones estudiadas y su procedencia	35
Tabla 3.3 Criterios evaluados para la selección de las especies	42
Tabla 4.1 Resultados del ACP y relación entre los indicadores evaluados	44
Tabla 4.2 Distribución de los individuos, media y desviación estándar según el Análisis de Conglomerados	46
Tabla 4.3 Matriz de las correlaciones fenotípicas	49
Tabla 4.4 Resultados del ACP y relación entre los indicadores evaluados	50
Tabla 4.5 Distribución de los individuos, media y desviación estándar según el Análisis de Conglomerados	52
Tabla 4.6 Comportamiento de las accesiones en la etapa de establecimiento	54
Tabla 4.7 Principales características morfológicas de las accesiones evaluadas	60
Tabla 4.8 Matriz de las correlaciones fenotípicas	63
Tabla 4.9 Resultados del ACP y relación entre los indicadores evaluados	64
Tabla 4.10 Distribución de los individuos, media y desviación estándar según el Análisis de Conglomerados	65
Tabla 4.11 Comportamiento de la incidencia de las enfermedades foliares en las accesiones*	71
Tabla 4.12 Producción media de biomasa según la época del año (kg MS/planta)	75
Tabla 4.13 Composición química según la época del año	78
Tabla 4.14 Resultados del ACP y relación entre los indicadores evaluados	81
Tabla 4.15 Distribución de los individuos, media y desviación estándar según el Análisis de Conglomerados	82
Tabla 4.16 Frecuencia de cada patrón isoenzimático en la muestra de 23 accesiones	90
Tabla 4.17 Análisis integral de la variabilidad genética	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Distribución de <i>L. leucocephala</i> en Cuba (tomado de Menéndez 1982)	12
Figura 3.1 Secuencia experimental.....	32
Figura 4.1 Diagrama de líneas con una curva de ajuste que aproxima la relación entre la altura (cm) y los días por grupos.....	55
Figura 4.2 Comportamiento en los patrones fenológicos de floración y fructificación de las especies de <i>Leucaena</i>	59
Figura 4.3 Diagrama de líneas con una curva de ajuste que aproxima la relación entre el número de rebrotes y los días por grupos.....	66
Figura 4.4 Diagrama de líneas con una curva de ajuste que aproxima la relación entre la longitud de los rebrotes y los días por grupos.....	67
Figura 4.5 Patrones del sistema isoenzimático peroxidadas (<i>Prx</i>)	87
Figura 4.6 Patrones del sistema isoenzimático esterasas (<i>Est</i>)	88
Figura 4.7 Dendrograma UPGMA obtenido mediante el análisis de conglomerados de los resultados de los sistemas isoenzimáticos.....	92

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

En Cuba, las áreas ganaderas han sufrido una drástica reducción de sus arboledas por efecto de la tala, la quema y el empleo de postes de cemento o madera seca en sus cercados, lo que redujo sensiblemente las áreas de sombra natural, las cercas de postes vivos y una de las posibles fuentes de alimento para el ganado, así como influyó en el aumento de la degradación de los pastizales.

Una alternativa que podría atenuar esta difícil situación (Benavides 2003) es la creación de los sistemas agroforestales o la agroforestería, ya que esta estrategia (Hernández *et al.* 2000) presupone un concepto en el que los sistemas diseñados involucran el uso de árboles o arbustos con cultivos o animales en la misma unidad de terreno, en los cuales se crea fuerte interacción ecológica entre los componentes arbóreo, animal, cultivo/pasto, suelo y otros entes de índole biótica y abiótica.

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

En este contexto, el estudio de los sistemas silvopastoriles alcanza una importancia creciente como alternativa viable para la producción, sostenimiento e incremento de la biodiversidad dentro de la ganadería comercial (Rosales *et al.* 1999 e Ibrahim y Mora 2003), ya que ofrecen una opción para producir leche y carne bovina, con uso mínimo de fertilizantes; estas plantas tienen la capacidad de reciclar y movilizar las reservas de fósforo y potasio entre otros macro y microelementos presentes en el suelo y, como ventaja adicional, constituyen una vía de conservación del entorno, al promover el mantenimiento de la cubierta arbórea en las explotaciones ganaderas.

Es por ello que se consideran como sumideros de carbono y hábitat amigable para diversos organismos, lo cual permite desarrollar la interrelación entre diversos ecosistemas más estables (Alonso, *et al.* 2006; Harvey 2006 e Ibrahim y Mora 2006).

No obstante, 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, introducción, evaluación y selección de estos importantes fitorrecurso, como una fase imprescindible para su futura extensión. En relación con ello, es válido mencionar que la introducción de nuevas especies y variedades es una tarea vital para el mejoramiento de la cantidad y la calidad de la dieta alimenticia de los animales, y surge por la necesidad de reemplazar los ecotipos de bajo valor nutritivo y productividad existentes (Machado y Seguí 1997 y Guillot *et al.* 2002).

Asimismo, se le concede un papel esencial a las condiciones físicas y químicas presentes en el ecosistema, representadas principalmente por el suelo y el clima del entorno natural donde se desarrollan los organismos vivos, al modelar el tipo de comunidad biológica, así como su adaptación al ambiente físico (Corzo *et al.* 1999), los cuales determinan la eficiencia y supervivencia de las especies en su competencia por la luz solar, el agua, los nutrimentos y el espacio (López *et al.* 2002).

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.

En los sistemas silvopastoriles que se explotan en la actualidad, la especie arbórea *L. leucocephala* (Lam.) de Wit del género *Leucaena* es la más utilizada en todo el mundo y la más estudiada por diferentes investigadores, tales como Merrill (1912); Hutton y Gray (1959); Ruiz y Febles (1999, 2001a) e Iglesias *et al.* (2006), sobre todo en el plano de la alimentación animal, tanto en asociaciones bimodales, como en bancos de proteína o

multiasociaciones. Las investigaciones realizadas al respecto, según informa Clavero (1998), demostraron que representa un alimento completo de elevado valor, al ser comparada con otros como la alfalfa (*Medicago sativa*) y la soya (*Glycine max*).

En Cuba, en la mayor parte de los estudios realizados en ese sentido por un grupo de investigadores tales como: Menéndez (1982), Tang (1994), Ruiz y Febles (1987, 2001a, 2005) y Simón (2001, 2005), sólo se han empleado las variedades registradas como comerciales: *L. leucocephala* cv. Ipil-Ipil; cv. Perú; cv. Cunningham y cv. CNIA-250, en las modalidades de sistemas de bancos de proteína, en asociaciones con pastos y en multiasociaciones de especies herbáceas y leñosas; según refiere Simón (2001), se obtuvieron producciones de leche de 2 934, 3 147 y 5 347 kg/ha/año, respectivamente, en todos los casos superiores a las alcanzadas con gramíneas en monocultivo (1 790 kg/ha/año).

No obstante, los diferentes estudios realizados se centraron fundamentalmente en variables morfológicas y agronómicas en condiciones de campo, o en experimentos que incluyeron secuencias de trabajo diferentes a la que se propone en esta investigación, y las plantas más utilizadas fueron las cuatro mencionadas con anterioridad, por lo que se hace imprescindible la caracterización y evaluación de otras especies y accesiones de este género, de forma tal que sea posible la mejor comprensión de su comportamiento, adaptabilidad y potencialidad.

En el caso de Cuba, país en el que se trabaja exhaustivamente con accesiones de la especie *L. leucocephala*, en los estudios realizados no se incluyeron otras especies y accesiones de este género, no se siguió una secuencia experimental como la utilizada en esta investigación, ni se determinó el polimorfismo isoenzimático, con el fin de tener conocimientos más amplios y profundos en función de su comportamiento; ello permitiría incrementar el número de especies arbóreas a utilizar en estos sistemas, al igual que definir diferentes propósitos productivos, de manera tal que se puedan emplear variantes o alternativas para contrarrestar los inconvenientes (relacionados con el estrés, el ataque de enfermedades, insectos potencialmente plagas u otras) o seleccionar accesiones que puedan optimizar los sistemas.

Un instrumento de trabajo indispensable de esta opción multidisciplinaria es la evaluación sistemática de germoplasma mediante descriptores morfoagronómicos y matemáticos

adecuados, que permitan arribar a similitudes y diferencias entre el conjunto de especies estudiadas (Ruiz y Febles 2003 y Alonso 2003). El término evaluación es muy amplio y debe adaptarse a la situación particular que se estudia. En esta investigación la evaluación de las especies es desde etapas tempranas del desarrollo del vegetal.

Investigaciones conducidas en Cuba y en otras regiones tropicales plantean que la inclusión de las plantas de *Leucaena*, especialmente de la especie *L. leucocephala* en los sistemas silvopastoriles que se explotan en la actualidad, constituye una opción viable para el desarrollo de la ganadería; a pesar de ello, existe poca información acerca del uso de otras accesiones, tanto de esta como de otras especies, al igual que sobre su comportamiento, por lo que se requiere desarrollar otros estudios con el objetivo de incrementar la diversidad biológica a utilizar en dichos sistemas.

Hipótesis de trabajo:

Los árboles de *L. leucocephala* constituyen una opción a emplear en la ganadería; sin embargo, pocas accesiones de esta y de otras especies del género *Leucaena* han sido probadas en Cuba. De ahí que es posible que la evaluación a partir de indicadores morfoagronómicos y la determinación de polimorfismo isoenzimático de 23 accesiones de este género, aporten resultados alentadores que impliquen la selección de las más sobresalientes para ser estudiadas en el fomento de nuevas áreas en las que se empleen los sistemas silvopastoriles e incrementar así la diversidad biológica de especies arbóreas a utilizar en dichos sistemas en las condiciones particulares del país.

Objetivo general:

- ✓ Evaluar accesiones de *Leucaena* spp., mediante la técnica de electroforesis de enzimas e indicadores morfoagronómicos, con el fin de seleccionar las más sobresalientes para ser estudiadas en el fomento de nuevas áreas donde se empleen sistemas silvopastoriles.

Objetivos específicos:

- ✓ Evaluar accesiones de *Leucaena* spp., atendiendo a características morfoagronómicas.
- ✓ Determinación del polimorfismo de las accesiones de *Leucaena* spp mediante tres sistemas isoenzimáticos.
- ✓ Seleccionar las accesiones más sobresalientes para ser estudiadas en el fomento de nuevas áreas donde se empleen sistemas silvopastoriles.

NOVEDAD CIENTÍFICA

Por primera vez en Cuba:

- ✓ Se utiliza la secuencia experimental empleada en esta investigación desde etapas tempranas del desarrollo del vegetal (condiciones de vivero, etapa de establecimiento, capacidad de recuperación a la poda, disponibilidad de biomasa comestible y composición química y electroforesis).
- ✓ Se realiza la determinación del polimorfismo isoenzimático e indicadores morfoagronómicos que permiten la evaluación y selección de especies y accesiones de *Leucaena* spp.
- ✓ Se estandariza el método de extracción y los ensayos electroforéticos para esterasas y peroxidasas en *Leucaena*.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Clasificación taxonómica y descripción botánica del género *Leucaena*

El género *Leucaena* pertenece a la subfamilia Mimosoideae de la familia Leguminosae o Fabaceae (Barreto 1990 y Watson y Dalwitz 1999). Desde el punto de vista botánico las especies de este género se caracterizan por ser árboles o arbustos de porte bajo (generalmente se observan como arbustos de 3 m), aunque pueden alcanzar hasta 20 m de altura. En cuanto a este indicador, según Brewbaker y Sorensson (1994) y Brewbaker (1998) existe variación entre las diferentes especies, al igual que en términos de ramificación y arquitectura de la copa.

Hughes (1998b) plantea que las especies de *Leucaena* poseen una raíz principal profunda, fuerte, penetrante, de rápido crecimiento, con algunas raíces laterales de menor diámetro; este sistema, según el autor, casi siempre se asocia con la altura del árbol.

El follaje en las especies de *Leucaena* es perenne y casi siempre verde. Las ramas más jóvenes son densamente pubescentes y las más viejas glabras; las estipelas son pequeñas y caedizas, y varían en tamaño y forma en función de la especie (Anon 2001b); lo mismo ocurre con las pinnas, los pecíolos, las inflorescencias y las legumbres. Las inflorescencias de estas plantas son de color blanco, rojizas o amarillas y se encuentran en forma de cabezuelas solitarias o en pares, las cuales contienen de 100 a 180 flores suavemente perfumadas.

Las flores de las especies de este género, en su mayoría, están dispuestas en capítulos multifloros, cilíndricos, de uno a tres en las axilas, con pedúnculos de 3,5-4 cm de largo. Los capítulos se encuentran en racimos terminales; las brácteas son pectadas y ciliadas, de 2,5-3 mm de largo; el cáliz, dentado, de 2,5-3 mm de largo, y en el ápice externamente ciliado; los dientes miden 0,5 mm de largo; presenta cinco pétalos libres, externamente ciliados en el ápice de 1-4,5 mm de largo; los estambres son 10, de color amarillo blancuzco y de 10-11 mm de largo; las anteras son ciliadas.

El fruto es una legumbre solitaria o puede estar dispuesta en grupos, es alargada, aplanada, dehiscente, brillante, de color verde cuando está tierna y se torna de color café o parda cuando madura, glabra, solo pubescente en estado joven, lineal, aguzada en el ápice y ensanchada en la base, de 11-33 cm de largo y de 16-25 mm de ancho (Bässler 1998).

La semilla es ligeramente elíptica, aplanada, aovada, oblonga, de color café brillante, nítido, liso, de 6-11 mm de largo y de 4-7 mm de ancho, con un pleurograma del 75%. Una legumbre presenta entre 15 y 25 semillas y un kilogramo entre 15 000 y 18 000, lo cual depende del cultivar o variedad (Anon 2003), el patrón de siembra y la época del año (Torres *et al.* 2002).

Las especies de *Leucaena* contienen altas concentraciones de PB cuando se comparan con las gramíneas tropicales; no obstante, existen diferencias dentro del género, donde se destaca *L. leucocephala* con mayor DIVMS y menor contenido de taninos y fibra (tabla 2.1).

Tabla 2.1 Contenido de nutrientes en tres especies de *Leucaena* (tomado de Norton *et al.* 1994).

Especie	PB (%) ¹	FND (%) ¹	FAD (%) ¹	DIVMS (%) ¹	TC (%) ²
<i>L. leucocephala</i>	22,8 ^a	32, 0 ^d	18,1 ^b	66,3 ^a	6,6 ^c
<i>L. pallida</i>	15,5 ^c	37,3 ^a	20,6 ^a	56,4 ^c	8,5 ^b
<i>L. diversifolia</i>	20,6 ^b	34,1 ^a	20,5 ^a	54,2 ^c	12,0 ^a

1. Determinado en las hojas

2. Taninos condensados (libres y atrapados)

a, b Medias con letras diferentes dentro de cada columna difieren estadísticamente a $P < 0,05$ (Duncan 1955) * $P < 0,05$

En sentido general, se conoce que la *Leucaena* representa un alimento completo de elevado valor en términos de PB, energía, digestibilidad y palatabilidad, y que es capaz de sustituir a la soya en las dietas para rumiantes (Clavero 1998). En la tabla 2.2 se muestra una comparación entre la composición bromatológica del follaje de esta leguminosa con respecto a la alfalfa, considerado un forraje de alta calidad en las zonas templadas. Se puede notar que sus contenidos de nutrientes (excepto la energía y el contenido de taninos) son semejantes, y en algunos casos, superiores a los de esta planta.

En Cuba se realizaron numerosos estudios de la composición bromatológica y el valor nutritivo de esta especie. Al respecto, González y Cáceres (2002) evaluaron el efecto de la época en la composición química de *L. leucocephala* cv. Cunningham y encontraron un

comportamiento diferente en la proteína bruta para la época lluviosa y la poco lluviosa, que fue de 17,8 y 24,1%, respectivamente.

Tabla 2.2 Composición química del follaje de *L. leucocephala* comparado con *Medicago sativa* (NAS, citado por Shelton y Brewbaker 1994).

Indicador	<i>L. leucocephala</i>	<i>Medicago sativa</i>
Proteína bruta (%)	25,9	26,9
Cenizas (%)	11,0	16,6
Calcio (%)	2,4	3,2
Fósforo (%)	0,2	0,4
β-caroteno (mg/g)	536,0	253,0
Taninos (mg/g MS)	10,2	0,1
Energía bruta (kJ/g MS)	20,1	18,5

La especie *L. leucocephala* presenta valores de la FND entre 40,5 y 48,5% y para la FAD de 19,1-32,2%, que varían según las condiciones edafoclimáticas de la región en la cual esté sembrada (Singh *et al.* 2005 y Gómez *et al.* 2006).

Gutiérrez *et al.* (2005) evaluaron el consumo y la digestibilidad de la materia seca total en vacas en pastoreo durante la época de lluvia, con bancos de proteína de *Leucaena*, y obtuvieron consumos totales para el sistema de 15,3 kg de MS/día, equivalentes al 3% del peso vivo de los animales; mientras que Sandoval *et al.* (2005) encontraron menor consumo de materia seca en *L. leucocephala* al compararla con *Brosimum alicastrum*, al realizar una prueba de cafetería con vacas. Los valores obtenidos fueron de 15,6 y 55,4 g MS/kg de peso metabólico (PM), vinculado a la presencia de mayor concentración de factores antinutricionales en la *Leucaena*.

Los factores antinutricionales pueden ser definidos como aquellas sustancias generadas por el metabolismo natural de las especies vegetales, y que por diferentes mecanismos (inactivación de los nutrientes o alteración en los procesos digestivos) provocan efectos contrarios a la nutrición óptima de los animales (Williams 2000). Dentro de las especies arbóreas que contienen estas sustancias se encuentran: *L. leucocephala*, *Indigofera spicata*, *Acacia giraffae*, *Acacia cunninghamii*, *Acacia sieberiana*, *Albizia stipulata* y *Sesbania sesban*, entre otras. Además existen otros compuestos, como los polifenoles (taninos y lignina), que están presentes en todas las plantas (Kumar 1992).

L. leucocephala contiene niveles moderados de taninos condensados (1,4-7,8%) que protegen la proteína de la degradación ruminal (55 y 60%). En este sentido, Bamualin *et al.*

(1984) informan que el 34% de la proteína de las hojas del cv. Cunningham puede pasar a través del rumen sin degradarse.

Es importante destacar que la presencia de niveles moderados de taninos en *L. leucocephala*, le confiere ventajas desde el punto de vista nutricional. Este compuesto se une a las proteínas presentes en el forraje, lo cual trae como consecuencia que no sean degradadas por los microorganismos del rumen y escapen a las partes bajas del tracto gastrointestinal como una fuente de proteína verdadera para el rumiante.

La mimosina es un aminoácido no proteico de estructura similar a la tirosina y está presente en todas las especies del género *Leucaena* (Kumar 1992). Es conocido que el contenido de aminoácidos de este género varía de acuerdo con la especie, la variedad, la época del año y la madurez de la planta. Su determinación en 10 variedades de *L. leucocephala* muestra que los menores contenidos de este aminoácido se encontraron en el cv. CNIA-250, P III-150, cv. Perú y cv. Cunningham, mientras que la de mayor contenido fue el cv. Ipil-Ipil (Escobar *et al.* 1989).

Este compuesto se puede encontrar en todas las partes de la planta, pero las mayores concentraciones se hallan en los puntos de crecimiento de los tallos (8-12% de la MS), en las hojas jóvenes y en las semillas (4-5%) (Jones 1994). A la *Leucaena* se le atribuyen efectos alelopáticos en la germinación y el desarrollo de las plantas indeseables, por su contenido de mimosina (De Moura *et al.* 2001).

Dado que en Cuba los rumiantes poseen bacterias capaces de realizar la destoxificación de estos compuestos y que no se han encontrado síntomas clínicos adversos, por los resultados de diferentes investigaciones realizadas al respecto (Gutiérrez *et al.* 2005 e Iglesias *et al.* 2006) se ha llegado a la conclusión que esta leguminosa en la dieta de vacas lecheras, lejos de provocar trastornos nutricionales, constituye una valiosa alternativa para mejorar el balance de nutrientes de la ración. Además, por razones de manejo la *Leucaena* constituye menos del 30% de la dieta.

Cuando esta especie se siembra en banco de proteína con densidad media y alta, forma parte del 25-30% del área de pastoreo y el tiempo de acceso a ella es limitado (de una a cuatro horas). En sistemas asociados, para garantizar la disponibilidad de materia verde del estrato herbáceo se disminuye la densidad de plantas por hectárea, razón por la cual el

porcentaje de inclusión de esta especie en la dieta de los bovinos tampoco sobrepasa el 30% (Sánchez 2007b).

Es importante señalar, de manera general, que todas las especies de *Leucaena* constituyen un forraje nutritivo y palatable para la dieta animal; aunque debido al complejo significado de “calidad”, la apreciación no debe limitarse a la composición bromatológica o química de las hojas y a la digestibilidad y contenido de fibra *in vitro*, sino que son necesarias pruebas de aceptabilidad y alimentación *in vivo* como un indicador del valor nutritivo de las diferentes especies. En este sentido, debe investigarse un poco más en lo referente a la formación de complejos taninos-proteínas de las nuevas especies y a la degradación de estos en el tracto digestivo de los rumiantes.

2.2 Origen, distribución y ecología

El género *Leucaena* es originario de Centroamérica (Hughes 1998a). Funes (1980) refiere que la especie *L. leucocephala* es originaria específicamente de los estados de Oaxaca y Yucatán en México; mientras que Anon (2002) sitúa las especies de este género desde Jalisco hasta Michoacán, en Chiapas y en Yucatán. En el caso de *L. collinsii* y *L. magnifica*, se plantea que son originarias de Guatemala; *L. lempirana*, de Honduras y *L. salvadorensis* de El Salvador (Anon 2002).

Según Brewbaker (1997) *L. leucocephala* se encuentra naturalizada en las Bahamas, Trinidad y Tobago, Tejas, Florida, Brasil y Cuba. También fue ubicada en Hawaii, las Islas del Pacífico (Filipinas, Indonesia, Papua, Nueva Guinea y Malasia) y en África Oriental y Occidental (Mahecha *et al.* 1999).

Leucaena, como género, fue reconocido inicialmente por Bentham (1842) con cuatro especies: *L. glauca*, *L. pulverulenta*, *L. diversifolia* y *L. trichodes*. Posteriormente, Bentham (1846) realizó otro reconocimiento que contó con dos nuevas especies, y luego en 1875 reconoció nueve en total. Sin embargo, atendiendo a los resultados de las investigaciones realizadas por Hughes (1998a), existen 22 especies reconocidas con seis taxas intraespecíficos y dos híbridos espontáneos.

La primera introducción de la especie *L. leucocephala* fuera de México y Centroamérica fue del tipo ‘común’ perteneciente a la subespecie *leucocephala*, que se reporta haber sido introducida en las Filipinas de Blanco antes de 1815 (Merrill 1912). Para finales del siglo XIX, la subespecie *leucocephala* estaba diseminada ampliamente a través de Asia y África,

y ahora es pantropical y registrada en la mayoría de los países tropicales y subtropicales (Brewbaker 1998). También en esa época se encontraba en el Caribe (Brewbaker y Sun 1996).

La mayoría de las especies se adaptan al período seco; los rangos de precipitación y su longitud en este período pueden variar de 550 a 700 mm; para el caso de *L. collinsii* y *L. esculenta* puede ser de siete meses y para *L. diversifolia* y otras de 1 500 hasta 3 500 mm de precipitación con 2-3 meses de estación seca (Hughes 1998b). La temperatura, la radiación solar, las precipitaciones y las condiciones del suelo influyen en la adaptabilidad de estas plantas, lo que a su vez puede alterar los rendimientos forrajeros y su comportamiento.

Según las investigaciones realizadas por Hutton y Gray (1959), la temperatura óptima para el crecimiento de las diferentes especies de *Leucaena* se encuentra entre los 22 y 30°C; mientras que Shelton (2000) encontró que a mayores altitudes y latitudes dentro del trópico, su crecimiento se redujo notablemente. Por otra parte, Ruiz y Febles (1987) indicaron que la mejor temperatura para el crecimiento de *L. leucocephala* en Cuba coincidía con la estación de primavera, cuyos valores fluctúan entre 23 y 26°C durante los meses de abril y junio. Pocas veces esta planta se desarrolla satisfactoriamente a temperaturas por debajo de 15,5°C.

El estrés provocado por la humedad daña la producción de hojas y tallos de estas leguminosas y en condiciones de sequía prolongada se produce una reducción tanto en el número y tamaño de las pínulas como en el número de pinnas, así como en el número y elongación de los tallos (Anon 2003). Como resultado de este proceso las pínulas comienzan a secarse y caen rápidamente. No obstante, las especies de *Leucaena* se consideran resistentes a la sequía.

Las especies de este género abarcan 40° de latitud y 2 500 m en altitud, aunque se localizan especies por encima de los 1 350 y 1 500 msnm (Arcos 1998 y Anon 2002) y crecen en variadas condiciones de clima y suelo (pueden sobrevivir y crecer en los muy secos y marginales). De manera natural se encuentran en laderas, suelos volcánicos, en bosques deciduos o matorrales, a veces cerca del mar. Pueden desarrollarse, además, en los arcillosos, profundos, alcalinos, con buena fertilidad, humedad y pH neutro, y también pueden sobrevivir y crecer en los moderadamente mal drenados y marginales (Anon 2002).

Estas especies se localizan en lugares rocosos y escarpados donde hay poco suelo. Sin embargo, se desarrollan mejor en los que son profundos, bien drenados, neutros y calcáreos. En el caso de la especie *L. leucocephala* se conoce que no tolera los de pH bajo y alta toxicidad de aluminio; asimismo, se desarrolla mal en los superficiales, ya que entorpecen su crecimiento radical, y en los que presentan alta acidez y bajos niveles de calcio (Anon 2003).

La distribución de *L. leucocephala* en Cuba es bastante general; según indica Menéndez (1982), en su trabajo de prospección se encontraba presente en casi todos los suelos (figura 2.1): Fersialíticos Pardos-Rojizos, Pardos con Carbonatos, Aluviales, Escabrosos, Húmicos-Carbonatados y Costeros; aunque este autor notó mayor preferencia por las regiones costeras como Varadero, el sur de la provincia La Habana y Cienfuegos.



Figura 2.1 Distribución de *L. leucocephala* en Cuba (tomado de Menéndez 1982).

Es válido señalar que la distribución de las especies y accesiones de *Leucaena* en la actualidad en disímiles condiciones y en diferentes ambientes, se incrementó a partir de los años 90, debido a la introducción de bancos de proteína, asociaciones de árboles con gramíneas y sistemas silvopastoriles; aunque las variedades comerciales (sobre todo los cultivares Cunningham, Perú e Ipil-Ipil) de la especie *L. leucocephala* siguen siendo las más utilizadas. Según informa Simón (2005), están ampliamente extendidas en las empresas ganaderas y ocupan aproximadamente más 20 000 ha.

2.3 Tipología y variedades de *L. leucocephala*

Hutton y Gray (1959) reconocieron tres tipos bien definidos de *L. leucocephala*, entre los cuales se encuentran las variedades más estudiadas y difundidas en la agricultura tropical (*L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú, cv. Ipil-Ipil y cv. CNIA-250), por su naturaleza

multipropósito y versatilidad. Primeramente, estos autores reconocieron dos tipos importantes basados fundamentalmente en su hábito de crecimiento, tamaño y uso, denominados Común y Salvador o Gigante.

1. **Tipo Común:** Nativo de las costas de México, ampliamente diseminado por el trópico; se utiliza como leña, carbón y para dar sombra a los cultivos (Cardona 1996). Es resistente a la sequía.

El 80% de las 344 líneas de las plantas de *Leucaena* en la colección mundial pertenecen a este tipo (Brewbaker 1997), la cual agrupa pequeños arbustos de alrededor de 5 m de altura, de floración temprana (4-6 meses de edad), no fotoperiódicas; su rendimiento en madera es pobre comparado con los restantes tipos, según refiere este autor. Su floración continua produce muchas semillas y puede llegar a convertirse en agresiva maleza, como plantean Cronk y Fuller (1995) y Gordon y Thomas (1997), quienes afirman además que esta floración puede ser detenida por la humedad. Se destacan los biotipos **K45** y **K31**.

2. **Tipo Salvador o Gigante:** También conocido como arbóreo o Guatemala. Es común en los bosques de América Central y originaria del Departamento de Morazán en El Salvador (Brewbaker 1980). Algunas de las accesiones de este tipo son extremadamente altas (hasta 20 m de altura) y se han plantado para producir madera y para la industria del combustible (Hernández *et al.* 1993). Son árboles de altos rendimientos y producen el doble de biomasa que el tipo común y gran cantidad de legumbres y de semillas.

La floración tiende a ser tardía, seguida por un extenso período vegetativo de crecimiento. Dentro de este tipo se distinguen dos variedades comerciales, 'Salvador' y 'Guatemala' y se encuentran las variedades más productoras de madera.

Posteriormente aparece un tercer tipo, reconocido por Gray (1968) y Brewbaker y Hutton (1979), basados en un material introducido en Australia desde Argentina. No obstante, Hughes (1998a) asevera que esta variante es de supuesto origen peruano. Esta tiene el porte erguido del **Tipo Gigante**, pero con la ramificación del **Tipo Común**, y es actualmente llamado **Tipo Perú**.

3. **Tipo Perú:** Este es un intermedio entre los dos tipos anteriores y se caracteriza por ser plantas de 15 a 20 m de altura, con follaje de muy buena calidad y con ramificación profusa en la base del tallo (Matías 2000 y Anon 2001a), lo que la hace idónea para el ramoneo cuando su altura está por debajo de los 2 m. En Cuba el cultivar (cv.) Perú es una de las

variedades recomendadas para la alimentación de los rumiantes (La O *et al.* 2005) y a su vez una de las de mayor uso en los sistemas de producción animal (Espinosa *et al.* 2001).

Dentro de este tipo existe una accesión importante para la ganadería, el cultivar Cunningham (variedad comercial), el cual fue obtenido por un cruce artificial entre la variedad 'Perú' y la línea CPI 18228, logrado entre 1956 y 1958 por Gray en la CSIRO (División de Agronomía, Laboratorio de Cunningham) y formalmente registrada por Hutton y Beattie (1976). Este cultivar combina el vigor y porte erguido del **Tipo 'Salvador'** con la abundancia de ramas del **Tipo 'Perú'**. Sus semillas son grandes, aunque la producción de éstas por planta es baja (Batson *et al.* 1984), y posee gran potencialidad para competir con las gramíneas en pastoreo cuando se somete a buen manejo (Hernández *et al.* 1993).

En la actualidad se mantiene esta clasificación y de hecho las variedades más utilizadas en los sistemas ganaderos son las seleccionadas como variedades comerciales por el Servicio de Inspección y Certificación de Semillas y Registro de variedades del MINAGRI de Cuba (*L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú, cv. Ipil-Ipil y cv. CNIA-250).

2.4 Agronomía y manejo

2.4.1 Establecimiento

El establecimiento es el período que incluye la siembra, emergencia, crecimiento y manejo temprano del pastizal y constituye una de las etapas más importantes en el desarrollo de las plantas. Lograr un buen establecimiento significa sentar las bases científico-prácticas necesarias para poder utilizar eficientemente las especies vegetales y prolongar su vida útil en función de la alimentación animal (Ruiz y Febles 2006).

Las especies vegetales sometidas a cultivo para beneficio del hombre presentan requerimientos específicos para la germinación de las semillas en cuanto a: adecuada temperatura ambiental y del suelo, luz, suficientes nutrientes, oxígeno y agua para la supervivencia de las plantas en germinación y las emergidas, así como para su continuo crecimiento posterior.

Por ello, resulta válido resaltar la destacada importancia que tienen los estudios edafoclimáticos y ecológicos vinculados a las comunidades vegetales. Independientemente de la amplia distribución espacial y temporal que tienen las leguminosas, no cabe dudas que cada especie o conjunto de ellas deben ser sembradas en aquellos espacios donde puedan expresar todo su potencial genético e interacción con el ambiente circundante.

Según reseñan Ruiz y Febles (2006) las plántulas de *Leucaena*, principalmente las de la especie *L. leucocephala*, tienen lento establecimiento y puede tardar de 12 a 18 meses para alcanzar alturas de 1,5-2 metros, por lo que las pequeñas plántulas son muy vulnerables a la competencia con las malezas, destrucción y defoliación durante el período de establecimiento, debido a las entradas anticipadas de animales a las áreas de siembra, ataque de enfermedades e insectos potencialmente plagas u otras causas. De igual forma, estos autores coinciden en afirmar que en esta etapa es preciso combinar de forma favorable las condiciones inherentes al clima y el suelo, los factores de carácter fitotécnico y las características de la variedad.

En este sentido, según refiere Clavero (1998) se deben considerar una serie de factores que incluyen el pretratamiento de la semilla, la selección del lugar de la siembra, la preparación del suelo y los sistemas de siembra. Por su parte, Anon (2003) plantea que la preparación adecuada del suelo para el establecimiento de las especies, es aquella que sea capaz de propiciar buen contacto entre la semilla y el suelo, con la eliminación (en el mayor grado posible) de un factor de riesgo tan importante como es la competencia con la vegetación espontánea durante esta primera etapa de desarrollo de la especie.

Sin embargo, estos autores no toman en consideración aspectos de vital importancia como la calidad de las semillas, su inoculación con *Rhizobium*, la época, la densidad, la distancia, la profundidad y la dosis de siembra, además del tipo de suelo, la humedad presente en este y la aireación, entre otros, los cuales también influyen significativamente en esta etapa.

2.4.1.1 Tratamiento a la semilla

El tratamiento a la semilla es uno de los aspectos esenciales a considerar en la siembra de esta leguminosa. La impermeabilidad de la cubierta de las semillas, el grosor y la constitución de su cubierta le confiere un alto grado de dormancia exógena. Al mismo tiempo, presentan poca dormancia endógena, por lo cual las semillas frescas pueden tener elevado porcentaje de germinación cuando se rompe su testa (Lezcano 2005).

La dormancia es uno de los mecanismos que limitan la germinación en condiciones que pueden o no ser adecuadas para el establecimiento de una especie. Según Hilhorst y Bradford (2000), las semillas dormantes son aquellas que no germinan aun cuando se les brindan las condiciones que normalmente favorecen el proceso de germinación: humedad

adecuada, régimen apropiado de temperatura y atmósfera normal, y en algunos casos la presencia de luz. Ello ha motivado el empleo de diferentes formas de reblandecimiento (química, física y mecánica) de las capas externas, conocidas como métodos de escarificación (Iriondo y Pérez 1999).

En *L. leucocephala* los tres métodos ofrecen buenos resultados; sin embargo, desde el punto de vista económico sólo dos son los recomendados: el físico y el mecánico (Teles *et al.* 2000). Entre las variantes del método físico, el tratamiento con agua caliente por cinco minutos (Cakmakci y Aydinoglu 1999 y Amodu *et al.* 2000) o por dos minutos (González *et al.* 1998) son los más recomendados. Es posible emplear también, como método físico, el remojo de las semillas en agua a temperatura ambiente durante 12 a 24 horas antes de la siembra.

Con relación al método mecánico, la variante de mayor empleo es el corte de la semilla en la zona opuesta al embrión (Sarmiento y Shifino-Wittman 2000). Poulsen y Stubssgard (2000) plantean que este es altamente eficaz cuando se realiza cuidadosamente y, a diferencia de otros métodos, tiene la ventaja de evitar el sobretratamiento (daño) y la manipulación en las cercanías de la región radicular.

También se conoce del uso del ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), el cual causa algún tipo de combustión húmeda en la corteza seminal y es igualmente efectivo en leguminosas y no leguminosas; sin embargo, el método no es aplicable a las semillas que fácilmente se convierten en permeables, debido a que el ácido penetra y daña el embrión. La duración de este pretratamiento debe tener como objetivo el alcance de un balance en el cual la corteza de la semilla (o pericarpio) sea suficientemente rota para permitir la imbibición, pero sin que el ácido alcance al embrión (Navarro 2002).

2.4.1.2 Siembra

El suelo se prepara para mejorar sus condiciones físicas (porosidad y capacidad de almacenamiento de agua), reduciendo así de forma total o parcial la competencia entre las plantas de *Leucaena* y la vegetación presente. La intensidad óptima de labranza depende de la textura y el grado de pendiente del suelo y de la magnitud de las lluvias (Anon 2003).

Clavero (1998) indica en sus investigaciones que la preparación convencional del suelo, es muy efectiva para eliminar la vegetación presente. Por su parte, Pezo e Ibrahim (1999) plantean que lo ideal es lograr que quede un poco rugoso, de modo que permita el anclaje,

el cubrimiento y la rápida germinación de las semillas establecidas (en caso de que se siembre de forma directa); mientras que en Cuba, Ruiz y Febles (2006) informan que la preparación para la siembra de esta leguminosa puede ser de dos formas: preparando el área total que se sembrará o en franjas si la siembra se efectúa sobre pastizales naturales o mejorados.

Es importante tomar en consideración que independientemente del sistema que se emplee, las plántulas deben estar en condiciones favorables para competir con las malezas, por lo que el lecho de siembra debe quedar bien mullido.

Ruiz y Febles (2006) plantean además que cuando se selecciona la preparación en franjas, el técnico debe valorar la población de pasto del área, que no se preparará con el fin de determinar si es necesario realizar en ella alguna labor mecánica o física para su rehabilitación; también indican que el tipo de gramínea puede influir en el establecimiento de la *Leucaena* cuando ésta se quiere intercalar en un pasto establecido. Así, *Paspalum notatum* afecta el crecimiento de *Leucaena*, lo que no ocurre en áreas de jiribilla (*Dichanthium caricosum*) y de guinea (*Panicum maximum*).

Asimismo, hacen alusión a que es necesario quemar antes de que comiencen las lluvias e inmediatamente realizar las labores de preparación de las franjas (aradura-picadura-cultivador), cuando se quiere lograr el intercalamiento de *Leucaena* en área de pasto estrella establecido, y que es imprescindible mantener la vigilancia en el comportamiento de las malezas durante los primeros 90 días posteriores a la emergencia de la leguminosa.

2.4.1.3 Época de siembra

Con relación a la época de siembra, Ruiz *et al.* (1989) y Shelton (2000) consideran que el momento óptimo es muy dependiente de la localidad. Por su parte, Jones *et al.* (1982) en Queensland, Australia, recomiendan que las siembras deben realizarse en suelos humedecidos por las propias lluvias. En las zonas semiáridas de Timor, donde la estación seca de primavera se extiende de marzo a diciembre, Piggitt *et al.* (1995) encontraron que *L. leucocephala* se estableció satisfactoriamente en agosto, octubre y diciembre, que coincide con la época de primavera en el hemisferio sur.

En ese sentido, en Cuba, Wencomo *et al.* (2001) observaron que cuando las plantas de *Leucaena* se plantan entre septiembre y octubre (final del período lluvioso en Cuba) demoran de 10 a 14 meses para alcanzar 2 m de altura; similares resultados fueron

encontrados por Ruiz y Febles (2006), los que señalan este período como la mejor época de siembra de esta leguminosa en Cuba. Ello indica el efecto tan marcado que tiene la época de siembra en el crecimiento de estas plantas, por cuanto este factor debe ser tomado en consideración si se aspira a un éxito total en su establecimiento.

2.4.1.4 Profundidad de siembra

Aunque la siembra de las plantas de *Leucaena* puede realizarse a través de semilla sexual, semilla asexual y mediante injertos (Anon 2002), la vía ideal de propagación de la especie y la forma más barata y práctica lo constituye la utilización de la semilla (Torres *et al.* 2002).

Piggin *et al.* (1987) compararon profundidades de siembra de *Leucaena* en suelos alcalinos de Timor. Estos autores informaron que se alcanzó el 80% de emergencia en siembras a 5 cm de profundidad, que disminuyó a 20-25% cuando ésta fue en la superficie y a sólo 0,8% a 15 cm de profundidad. Por su parte, Ruiz *et al.* (1985) en investigaciones realizadas en Cuba plantean que la siembra de las semillas (a pesar de ser grandes) de estas especies debe efectuarse a poca profundidad, de 2 a 4 cm en los suelos Pardos tropicales y 2 cm en los suelos Ferralíticos y Latosólicos, condición en la que se reportan los mayores porcentajes de germinación; en este sentido, Ferreira y Andrade (2000) obtuvieron resultados similares.

2.4.1.5 Dosis de siembra

La dosis de siembra depende de la densidad poblacional que se requiere disponer en el campo, el peso y la viabilidad de la semilla, así como por el espaciamiento entre surcos y la supervivencia; es decir, existe una relación entre el espaciamiento y la dosis. Algunos autores como Jones *et al.* (1982) sugieren que la dosis de siembra cuando hay precipitación puede variar entre 0,5 y 5 kg de semilla/ha, en dependencia del lecho de siembra y el espaciamiento. Asimismo debe considerarse el propósito final de la plantación.

Con respecto a este último factor existen diversos criterios Ruiz y Febles (1987), por su parte, plantean que los mejores resultados para el fomento de sistemas silvopastoriles se alcanzan sembrando surcos dobles a 0,70 m entre sí, espaciados a 3 m, y depositar la semilla a 0,50 m, por golpes; mientras que los resultados de Shelton (2000) recomiendan espaciamientos entre 1,5 y 5 m en función del objetivo productivo del área.

2.4.1.6 Plagas y enfermedades

Otro aspecto vinculado con el establecimiento de esta leguminosa es la presencia o no de plagas y enfermedades. En condiciones de vivero las plántulas pueden ser atacadas por un amplio rango de hongos patógenos, insectos y virus. Los daños más comunes provienen de hongos e insectos, especialmente de los géneros *Rhizoctonia*, *Phytium* y *Phytophthora*, los cuales pueden provocar afectaciones severas en la biomasa aérea de las plántulas y, en muchos de los casos, la muerte de estas.

Entre los insectos que más daños ocasionan a las plantas de las especies de este género se encuentran: el psílido (*Heteropsylla cubana*, Hemiptera: Psyllidae) (Chunjie *et al.* 2000) y las hormigas cortadoras o bibijaguas (*Atta insularis*, Gue.), asociados al follaje. Estas últimas constituyen una plaga importante en la posgerminación; durante esta etapa se ha detectado la presencia de áfidos y coleópteros, que también han sido observadas en Cuba (Ruiz y Febles 1987).

El principal daño en el follaje es causado por el hongo *Camptomeris leucaenae*, que provoca la mancha foliar. Este hongo ha sido observado en el Caribe y en diversos países de Latinoamérica; también se encontró en plantaciones cubanas, particularmente en áreas de evaluación de la EEPF "Indio Hatuey", y su acción reduce la producción y la calidad del forraje (Lezcano 1999). Dicha enfermedad provoca la defoliación del cultivo. Las especies del género *Leucaena* más sensibles a ella son: *L. leucocephala* y *L. collinsi*; se reconocen como más resistentes: *L. lanceolata*, *L. trichodes*, *L. diversifolia*, *L. pulverulenta* y *L. shannonii* (Clavero 1998).

Igualmente, debe tenerse en consideración el manejo de las plantas para el establecimiento; uno de los aspectos más importantes es el control de las malezas, al igual que conocer cuándo las plantas están en condiciones para ser utilizadas en la alimentación del ganado o para realizarles el primer corte.

La información brindada en este acápite referente a los factores que influyen en el establecimiento de las plantas de *Leucaena*, es válida y puede ser utilizada tanto a nivel nacional como internacional, ya que los elementos aportados constituyen nuevas opciones para poder utilizar estas plantas tanto en asociaciones con gramíneas en los sistemas ganaderos actuales, como para otros fines.

Es importante resaltar que en el momento de aplicar estas técnicas es necesario efectuar las adecuaciones pertinentes, tomando en consideración que se está trabajando con una entidad biológica susceptible a variaciones en su interacción con el medio y a la variabilidad, especialmente en las especies menos domesticadas. Además, el lugar o entorno en que se desarrolle la tecnología, así como las condiciones, posibilidades y la disponibilidad de recursos con los que cuenta el productor, son también otros componentes esenciales que deben ser valorados para alcanzar el éxito deseado.

2.5 Usos potenciales

Según plantea Hughes (1998a), de las 22 especies del género *Leucaena* sólo 13 son utilizadas como alimento, tanto animal como humano. Esta práctica prevalece a través de todo el sur-centro de México y los márgenes noroccidentales de Guatemala, principalmente en Huechuetenango, y es común e intensiva en los estados de Chiapas, Oaxaca, Puebla, Guerrero y Morelos, en México. Más al norte, las semillas de unas pocas especies, y particularmente *L. leucocephala*, son recogidas y consumidas por los hombres de forma esporádica (Kaninnen 2001).

El uso más importante, sobre todo de la especie *L. leucocephala* en los momentos actuales, es como alimento animal. Ello está dado por su excelente calidad nutricional (Palma *et al.* 1999) y su elevada aceptabilidad y digestibilidad (Shelton 2000). Las hojas de esta especie pueden ser utilizadas en forma de ramoneo por las cabras (Baba *et al.* 2000); la harina, proveniente de la parte aérea, se usa como suplemento proteico en cerdos (Zakayo *et al.* 2000); y el heno es muy empleado para alimentar conejos en crecimiento (Scapinello *et al.* 2000).

En el caso particular de Cuba, se realizan ingentes esfuerzos en cuanto a la investigación y el empleo de leguminosas arbóreas, especialmente *L. leucocephala*, en la ganadería bovina (Lamela *et al.* 2001). Ojeda (1996) reportó que cuando se utilizó en bancos de proteína, a nivel comercial, se lograron producciones anuales promedio superiores a 9 litros/vaca/día, con diferencia de más de un litro en relación con los animales que no tuvieron acceso a esta arbórea. Además, no sólo se obtuvo mayor producción de leche, sino también los animales presentaron mejor estado reproductivo, lo que se interpretó como respuesta al nivel de alimentación balanceado.

El cultivar Perú se utiliza en bancos de proteína para suplementar ovinos (Espinosa *et al.* 2001) y como suplemento proteico para alimentar cabras (Banda y Ayoade 2004). En el caso de *L. leucocephala* cv. Cunningham, se empleó en bancos de proteína por Lamela *et al.* (2001) para alimentar vacas $\frac{3}{4}$ Holstein x $\frac{1}{4}$ Cebú, con el propósito final de aumentar la producción de leche. También Tapia *et al.* (2000) utilizan esta planta en la alimentación de no rumiantes (aves, cerdos, conejos y patos). Según afirman estos autores, las semillas, los tallos comestibles y los frutos pueden ser usados como alimentos únicos o como suplemento en las dietas basales. Esto propició, en todos los casos, aumento en la producción de carne y leche, además de demostrar el nivel balanceado del alimento ofrecido.

L. leucocephala sirve en todo el mundo como fuente importante de leña, pulpa para papel y rayón, madera para la construcción de muebles, postes y embalajes, y sombra para el café y el cacao. También se reporta que las semillas son de gran utilidad para artesanías (Brewbaker 1998 y Bässler 1998). Además, se emplea como cortina rompevientos, en sistemas agroforestales con cultivos intercalados como maíz, soya y frijol (Carvalho *et al.* 1999 y Reyes *et al.* 2000), como mulch o abono verde para mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Sharma *et al.* 2001 y Cháves y Calegary 2001), y para el control de la erosión y la salinidad (Shelton 2000).

En Cuba se usa para mantener el adecuado balance de nutrientes en el suelo: nitrógeno, fósforo y potasio (Hernández *et al.* 2000); en la estimulación de la cantidad, la calidad y la productividad de los pastos (Lamela *et al.* 1999); para la fijación simbiótica del dinitrógeno atmosférico cuando es adecuadamente inoculada y como biocontrol de agentes fitopatógenos, tales como *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum fsp. lycopersici* (Castañeda 2001 y García *et al.* 2003).

De acuerdo con los resultados de Castillo *et al.* (1992), para la producción de carne bovina basada en *P. maximum* y *Leucaena*, sin riego y fertilización, se sugiere la utilización de bancos de proteína de libre acceso, donde la *Leucaena* se siembre en el 50% o el 30% del área total del pastizal, preferiblemente con 2 animales/ha y sin suplementación. Con estos sistemas las ganancias de peso vivo fluctúan entre 500 y 560 g/animal/día, con pesos al sacrificio superiores a los 400 kg.

En investigaciones realizadas por Iglesias *et al.* (2006), se pudo constatar que con la inclusión de *L. leucocephala* en toda el área de pastoreo cubierta por pastos naturales, se obtienen ganancias individuales de 715 g/animal/día e incrementos de 51% en la producción de carne/ha con relación a la obtenida con pasto nativo solamente. En las condiciones donde se presentó una sequía extrema durante el año, el sistema silvopastoril logró mantener una ganancia individual anual superior a los 400 g/día.

Los resultados en relación con el comportamiento animal demuestran la superioridad de los sistemas asociados sobre los sistemas tradicionales con insumos, sin diferencias entre ellos en cuanto a la ganancia de peso y la producción de leche. Es importante reconocer que la inclusión de arbóreas en los sistemas, en sentido general, evidencia la potencialidad de su uso tanto para la producción de leche como para la ceba bovina con bajos insumos.

Es válido señalar que en dichos sistemas se observaron mejoras sustanciales en el volumen y la calidad del pasto base, sobre todo en la época poco lluviosa, lo cual es importante, ya que constituye la fuente fundamental para satisfacer los requerimientos de materia seca del animal, lo que se puede traducir en mejor comportamiento en términos de ganancia diaria y de producción de leche, sin efectos negativos en la salud. Con estos sistemas el uso de fertilizantes a utilizar puede ser mínimo, ya que toda la gramínea recibe los efectos beneficiosos del aporte de nitrógeno por parte de la *Leucaena* a través de la fijación simbiótica (siempre que se inocule) y el reciclaje de la hojarasca.

Aunque la información brindada según los resultados de investigaciones realizadas al respecto por diferentes autores (Iglesias *et al.* 2006 y Sánchez 2007b) indican la ventaja del sistema con 100% de *Leucaena* en la totalidad del potrero, es necesario acotar que también pueden utilizarse otras opciones de árboles de la familia de las leguminosas, tales como *Albizia lebbek* y *Bauhinia purpurea* (Ruiz y Febles 2006), teniendo en consideración las condiciones, las prácticas locales y la disponibilidad de recursos del ganadero.

2.6 Colecciones de germoplasma y mejora genética

Aunque las primeras introducciones (antes del 1850) fueron aparentemente dedicadas a *L. leucocephala*, otras especies se introdujeron en Asia y en algunas islas del Caribe como árboles de sombra del café y el cacao (a partir de la segunda mitad del siglo XIX). *L. pulverulenta*, *L. diversifolia* y posiblemente *L. trichandra* fueron introducidas por los forestales holandeses en Indonesia a finales del 1800 (Dijkman 1950) y *L. diversifolia* en

África Occidental (Camerún y Costa del Marfil) y en el Caribe (Jamaica y la República Dominicana) alrededor de este período, según asevera este autor. La introducción de las restantes especies fuera de Centroamérica ocurrió en las dos últimas décadas (Hughes 1998a).

Con la aceptación de las especies del género *Leucaena* como plantas importantes para forraje, las colecciones sistemáticas de semillas comenzaron en los años 60 y desde entonces se crearon tres colecciones importantes: una en la Universidad de Hawaii, Estados Unidos de América; otra en la Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), Australia; y la tercera en el Oxford Forestry Institute (OFI) del Reino Unido.

Los esfuerzos para explorar y coleccionar semillas de las poblaciones naturales de las especies del género *Leucaena* comenzaron a finales de los años 60, con una expedición realizada por Brewbaker en 1967 a México y a los países vecinos de Centroamérica. Esta colección incluía por primera vez un amplio rango de diferentes especies, aparte de *L. leucocephala*.

Desde mediados de los años 50 hasta mediados de los 70 la CSIRO reunió una colección de 200 accesiones, principalmente de *L. leucocephala*, de fuentes no nativas. Se hicieron colecciones extensivas de forma dirigida en México y Colombia, desde 1978 a 1979 por Robert Reid, quien trabajó en este sentido con Sergio Zárate (Bray 1994). También se les prestó especial atención (Anon 2003) a las plantas de la especie *L. pulverulenta* (con el objetivo de incluirla en el mejoramiento para disminuir los niveles de mimosina), al igual que a las de *L. leucocephala* provenientes de los ambientes marginales, tanto los más secos como los frescos. El trabajo de la CSIRO se basó, fundamentalmente, en aumentar el rango de variación interespecífico e intraespecífico.

Por su parte el OFI comenzó a reunir, a mediados de 1980, una nueva colección de semillas de especies de *Leucaena*, impulsado por el descubrimiento, o redescubrimiento, de varias especies poco conocidas y potencialmente valiosas en Guatemala y Honduras, que aparentemente habían sido pasadas por alto en expediciones anteriores de recolección y por el hecho de que varias de estas especies estaban en peligro significativo de erosión genética e incluso de extinción (Hellin y Hughes 1993).

Actualmente se conoce que dentro de México y en Centroamérica varias agencias mantienen colecciones de semillas forestales, como es el caso de Guatemala, Honduras y Nicaragua, las que son notables en este aspecto y regularmente coleccionan semillas de rodales naturales de diferentes especies de este género, para uso directo en proyectos de siembra de árboles o en proyectos de mejoramiento genético.

En sus inicios, el mejoramiento de variedades se realizó mediante la selección sobre la base del fenotipo; sin embargo, debido a la influencia del ambiente esta selección no constituye una expresión real del potencial genético de las plantas. La evaluación morfológica y agronómica de variedades de interés económico, como parte de la medición de la variabilidad de un cultivo, puede ser complementada por estudios más directos del genoma a través de la técnica de electroforesis de enzimas y proteínas o del uso de marcadores moleculares (ADN), los cuales según afirman Rodríguez y Arencibia (2002) pueden ser utilizados para la selección de caracteres agronómicos, en la construcción de mapas genéticos y en la identificación y aislamiento de genes o de grupos de éstos (para el caso de los marcadores de ADN).

Por su parte, Cornide *et al.* (2002) plantean que la genética, en su sentido más amplio, será uno de los ejes principales del desarrollo tecnológico y el conocimiento impulsor de la economía mundial del siglo XXI.

En el campo de las plantas, el hombre fabricaba sus variedades desde tiempos inmemorables y la genética ofreció al mejorador los conocimientos para hacer más eficiente este trabajo, emplear caracteres heredables y velar por el manejo varietal en aquellos casos cuya expresión estuviera muy influida por la interacción con el ambiente.

Cornide *et al.* (2002) plantean que la casi totalidad de las variedades modernas provienen del mejoramiento tradicional. Otros métodos, tales como la inducción de mutaciones, la variación somaclonal y la transferencia de genes foráneos por ingeniería genética, se han usado en la mejora para caracteres específicos, a fin de extender la vida agrícola de las variedades seleccionadas.

A partir de la última década del siglo XX, las técnicas de marcadores moleculares dieron un vuelco al conocimiento genético de las especies vegetales, posibilitaron localizar genes y marcarlos para hacer más eficiente su selección; es por esto que los marcadores constituyen una herramienta biotecnológica en la actualidad y una alternativa a la

transgénesis para obtener nuevas variedades por métodos tradicionales (Cornide *et al.* 2002). A continuación se hará referencia a las isoenzimas y al uso de la técnica de electroforesis.

2.7 Isoenzimas

El descubrimiento de las isoenzimas favoreció el empleo de marcadores genéticos más eficientes que los morfológicos, ya que por lo general permiten distinguir los genotipos homocigóticos y heterocigóticos e igualan el fenotipo con sus respectivos genotipos (González 2002).

También se conoce la existencia de otras técnicas de mayor precisión que las isoenzimas, conocidas como marcadores moleculares o marcadores de ADN (marcadores del ácido desoxirribonucleico), los cuales según afirman Rodríguez y Arencibia (2002) revelan sitios de variación de la secuencia de ADN y, a diferencia de los marcadores morfológicos, las variaciones no se muestran por sí mismas en el fenotipo, porque pueden tener diferencias en un solo nucleótido del gen o en una secuencia repetitiva del ADN, además de ser mucho más numerosos que los morfológicos.

Independientemente de que con los marcadores moleculares se logra un polimorfismo que sobrepasa el de otras variantes genéticas, incluyendo las isoenzimas, estas últimas en colecciones de germoplasma son muy útiles e importantes para el reporte y mantenimiento de la diversidad genética. Las isoenzimas se han utilizado para estudiar la dinámica poblacional, agrupar los sistemas de varias especies y según reporta González (2002), permiten estimar la variabilidad genética presente en especies y variedades de diferentes cultivos y en la caracterización de *loci* potencialmente marcadores.

Existe considerable cantidad de literatura relacionada con el estudio de proteínas y enzimas, en la cual los resultados de la electroforesis muestran alta correlación con las relaciones taxonómicas, mediante criterios morfológicos y citológicos, especialmente cuando los electroforetogramas muestran considerable número de bandas (González *et al.* 1999).

El término 'isoenzimas' fue propuesto por Markert y Moller (1959) para designar cada una de las múltiples formas enzimáticas que catalizan una misma reacción, con similar o idéntica especificidad de sustrato y que están presentes en el mismo organismo. En este sentido, González (2002) plantea que debe ser restringido a formas moleculares múltiples

de enzimas que deriven del mismo tejido u órgano con orígenes genéticos similares, ya que posee actividades catalíticas muy semejantes, no exactamente superpuestas.

Este mismo autor refiere que la multiplicidad isoenzimática puede ser el resultado de diferencias en las secuencias de aminoácidos o deberse a las modificaciones post-traduccionales. En el primer caso, las isoenzimas pueden haber sido codificadas por distintos alelos del mismo *locus* (aloenzimas o aleloenzimas), o por diferentes *loci* (isoenzimas no alélicas); y en el segundo caso, ocurren cambios conformacionales o de dobleces en la estructura terciaria por mecanismos epigenéticos (isoenzimas conformacionales).

De forma general, puede plantearse que la presencia de isoenzimas en las células permite una serie de variantes a la hora de realizar las funciones que éstas desempeñan, tanto en la regulación metabólica y la transformación de las señales, como en la regulación de la expresión diferencial de los genes.

El descubrimiento y utilización de los marcadores isoenzimáticos en plantas a finales de los años 70, permitió elevar el número de marcadores genéticos disponibles en, al menos, un orden (Ferreira y Grattapaglia 1998). Entre sus principales ventajas radica el hecho de ser una técnica relativamente accesible con respecto a los marcadores de ADN, en análisis que no requieren amplio muestreo del genoma. Los alelos isoenzimáticos son codominantes, lo que permite estimar directamente los indicadores de análisis genético, como las frecuencias genotípicas, las frecuencias alélicas, los coeficientes de diversidad genética y la heterocigosidad, entre otros.

Los marcadores isoenzimáticos constituyen herramientas muy útiles en la clasificación de diferentes cultivos en una extensa escala geográfica (Glaszmann 1988) y contribuyen, de manera importante, al entendimiento de su estructura genética y de poblaciones naturales de especies silvestres (Gao *et al.* 2000). Sin embargo, el limitado número de sistemas (entre 20 y 30 por especie) y de *loci* isoenzimáticos que pueden ser resueltos, así como la detección del polimorfismo sólo en regiones modificantes del genoma, pueden influir en la precisión de los estimados de diversidad genética a partir de estos marcadores (Gao *et al.* 2002).

Por su parte, el análisis del polimorfismo a nivel de ADN puede brindar el estimado de diversidad genética, que tiene varias ventajas sobre los marcadores morfológicos y

bioquímicos. Estos se basan en el muestreo directo del genoma, pueden ser determinados para cualquier combinación de genotipos, están libres de influencias ambientales y carecen de efecto pleiotrópico. El valor de los marcadores de ADN es mayor entre genotipos muy cercanos o cuando los datos de genealogía no son seguros (Fuentes 2003).

A pesar de los avances logrados en este campo, hasta el momento no se dispone de conocimientos bioquímicos suficientes que permitan la utilización, sin riesgos, de las isoenzimas en los programas de selección de plantas. Sin embargo, en algunos casos se postularon posibles funciones en diversas enzimas particulares, sobre las cuales se establecieron relaciones importantes; ejemplo de ello lo constituye la utilización de isoenzimas peroxidasas en la viabilidad del polen y las semillas (Song *et al.* 1990).

2.7.1 Electroforesis de isoenzimas

Las proteínas o isoenzimas pueden ser separadas en su movimiento relativo a través de un medio polarizado. Colocando extractos de tejidos en un medio y aplicando un campo eléctrico, las moléculas de proteínas migrarán a una velocidad determinada, sobre la base de su carga neta, el peso molecular y el pH del medio.

Las enzimas activas pueden ser separadas en bandas discretas y su posición se hace visible por el uso de tinciones enzimáticas específicas (tinciones histoquímicas). La técnica de electroforesis, según refiere González (2002), consiste en la aplicación de estos principios; para la transmisión de la corriente eléctrica, los medios electroforéticos emplean soluciones buffer, las cuales varían de acuerdo con el sistema que se estudie. Asimismo, plantea que el pH óptimo para el buffer depende de la carga de la proteína, teniendo en cuenta la proporción de sus grupos carboxilos y aminos que estén cargados. Además del efecto de la carga eléctrica neta de la proteína, la separación puede ser igualmente alterada por el efecto del filtro molecular del medio electroforético.

Esta autora refiere también que existen diferentes medios o soportes de separación, entre los que se encuentran: el papel de filtro, el acetato de celulosa, el gel de agar, el gel de almidón, el gel de agarosa y el gel de poliacrilamida (PAGE). Este último es el más utilizado en la actualidad, ya que conjuntamente con el efecto de atracción eléctrica se agrega el efecto mecánico como característica propia de los soportes «activos». La principal ventaja de este gel radica en su propiedad de tamiz molecular, capaz de separar también las proteínas en función de sus dimensiones y formas.

De esta manera, el movimiento de las proteínas de peso molecular elevado se retarda por la pequeña dimensión de los poros de la malla del gel; mientras que las moléculas de menor peso migran más libremente en función de su carga iónica. Así, es posible separar proteínas de carga idéntica pero de dimensiones diferentes.

Es importante señalar que otra de las ventajas de este gel sobre el de almidón estriba en que permite variar la concentración de los geles desde 5 hasta 30%, con lo que se modifican notablemente las dimensiones de la malla del gel. De igual forma, posibilita la construcción de geles con diversas concentraciones sucesivas, lo que le permite aumentar su efecto de tamiz, tolerar rangos de pH más amplio y lograr mayor poder resolutivo, transparencia y reproducibilidad.

Entre los estudios realizados en los que se emplearon electroforesis de isoenzimas y proteínas totales en plantas se encuentran los referidos a: determinación de las relaciones filogenéticas entre diferentes entidades, relación entre especies cultivadas y silvestres, diferenciación entre híbridos fértiles e infértiles, caracterización de géneros, especies y variedades, y detección de duplicados en bancos de germoplasma, entre otros (Álvarez 2005).

Es necesario destacar que existen ciertos factores que influyen en el metabolismo de las plantas, como son la nutrición mineral, las plagas y enfermedades y el estrés ambiental, los cuales pueden causar la aparición o desaparición de diferentes formas moleculares. Por ello es de gran importancia el empleo de muestras de tejidos comparables, con similar estadio de desarrollo y que resulten representativas de la población en estudio. De igual manera, se hace evidente la necesidad de llevar a cabo la rigurosa estandarización de las técnicas, a fin no sólo de alcanzar alta resolución electroforética, sino también de efectuar la adecuada interpretación de los resultados.

2.7.1.1 Procedimiento para la electroforesis

González (2002) plantea que la electroforesis implica el movimiento de los diversos componentes de una mezcla dada, a lo largo de un canal donde se encuentran además, las moléculas del solvente. De igual forma, señala que la velocidad de migración de una proteína o cualquier molécula en un campo eléctrico depende de la fuerza del campo, de la carga neta de la proteína y del coeficiente de fricción, y éste último depende tanto de la masa y la forma de la molécula que migra como de la viscosidad del medio.

Deben tenerse en cuenta también otros factores que alteran la velocidad de migración de las macromoléculas, como son: la fuerza iónica de la solución, la temperatura, el grado de evaporación y electroósmosis, al igual que los efectos inherentes al medio de soporte empleado.

Fernández-Santarén (1999) plantea que entre las técnicas electroforéticas más empleadas en plantas se encuentra la electroforesis en lámina vertical, cuya ventaja es que permite analizar varias muestras simultáneamente y colocarlas en paralelo, lo cual constituye un buen método para comparar muestras semejantes. Este mismo autor plantea que los análisis electroforéticos se realizan de forma fácil y rápida en cualquier laboratorio, ya que sólo requieren extractos crudos y equipamiento relativamente poco costoso. Estos extractos pueden ser obtenidos a partir de órganos vegetativos (hojas, raíces y tallos) o de órganos reproductores (flores, frutos o semillas), empleando soluciones extractoras apropiadas o *buffer* de extracción.

Una vez terminada la electroforesis, el gel es removido y sometido a la tinción correspondiente al sistema isoenzimático en cuestión o a la tinción de proteínas totales. El conjunto de bandas reveladas puede ser representado por un esquema o fotografía del gel, llamado electroforetograma (Sánchez-Yelamo 1999). En el electroforetograma debe indicarse la cantidad de bandas monomórficas (iguales para todos los individuos) y las polimórficas (no presentes en todos los individuos), sobre la base de su posición relativa y el porcentaje de bandas polimórficas del sistema enzimático en estudio.

El número de bandas de un individuo es el valor de todas las bandas que aparecen en su electroforetograma. Para determinar el número de bandas en los diferentes estados de polimerismos y variados números de subunidades, Shaw en 1964 desarrolló la siguiente

fórmula (Brewer y Sing, 1971):
$$i = \frac{(s + p - 1)!}{p!(s - 1)!}$$

Donde: i-número de isoenzimas, p-número de polímeros y s-número de subunidades diferentes. La posición relativa de las bandas se determina por la movilidad relativa (Rf) de cada banda, dada por: $R_f = (d/D \times 100)$

Donde: d-distancia recorrida por la molécula, D-distancia total recorrida por la línea frontal del marcador de migración electroforética.

Otra posibilidad para construir los electroforetogramas es medir en centímetros la posición de cada banda y colocarla en papel milimetrado, tomando como origen el comienzo del gel de separación.

Es importante conocer que la selección del material a utilizar depende del objetivo que persigue el investigador, ya que algunas isoenzimas sólo pueden detectarse en determinados tejidos y en un momento dado de desarrollo. En este sentido, Álvarez (2005) recomienda siempre el empleo de tejidos jóvenes provenientes de plantas que se encuentran en un mismo estadio de desarrollo ontogénico y presentan buen estado fitosanitario.

En relación con la preparación de las muestras para la realización de electroforesis en PAGE, esta autora plantea que las extracciones deben realizarse, de ser posible, en frío, ya que las enzimas pueden desnaturalizarse, además de emplear un *buffer* de extracción adecuado para impedir la alteración del material biológico por cambios de pH.

Igualmente, se debe tener en consideración la presencia de proteasas y otras enzimas degradativas, las cuales se liberan durante la lisis, de conjunto con la extracción de las proteínas de interés. Por ello, por lo general se efectúa la centrifugación de la muestra homogenizada para eliminar los restos celulares.

El tiempo de la corrida electroforética, es variable, ya que depende, entre otros factores, de la concentración de los geles empleados y del voltaje e intensidad de corriente aplicado. Según refiere González (2002), generalmente se utiliza una intensidad de corriente entre 40 y 50 mA y la duración de la corrida oscila de 2 a 6 horas, en dependencia de la cubeta vertical empleada. A su vez, las tinciones histoquímicas dependen del sistema isoenzimático empleado (González 2002).

Existe considerable cantidad de literatura relacionada con el estudio de proteínas y de enzimas en diferentes cultivos tales como la yuca, utilizados para la caracterización e identificación de duplicados (Ramírez *et al.* 1987) y para complementar el análisis de caracterización morfológica (Schmidt *et al.* 2003); en el plátano para comprobar el número cromosómico y la caracterización genético-bioquímica a los clones del subgrupo Cavendish (Román *et al.* 1997); en estudios de diversidad genética en cultivos como el arroz, (Díaz *et al.* 2001 y Fuentes 2003), y el tomate (Florido *et al.* 2002) entre otros. Los resultados de las electroforesis mostraron alta correlación con las relaciones taxonómicas obtenidas,

mediante criterios morfológicos y citológicos (especialmente cuando los electroforetogramas tienen un considerable número de bandas).

Sin embargo, en la base de datos disponible se encontraron pocos reportes con relación al uso de técnicas de electroforesis en plantas de las especies del género *Leucaena*, y sólo hacen alusión a estudios de diversidad genética realizados en *L. leucocephala* (Harris *et al.* 1994a y Harris *et al.* 1994b); en *L. shannonii* (Chamberlain *et al.* 1996) y en *L. diversifolia* (Pan 1988). Es significativo destacar que en estos se reportó bajo nivel de diversidad isoenzimática. Por ello, la evaluación de accesiones de diferentes especies de este género en los bancos de germoplasma, mediante el uso de la electroforesis de enzimas como complemento de los trabajos de caracterización morfológica, constituye un aspecto de primordial importancia.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La secuencia experimental está estructurada de la siguiente forma (figura 3.1): una primera etapa que trata sobre el comportamiento de las accesiones en condiciones de vivero; una segunda que está relacionada con el comportamiento durante el establecimiento, el cual incluye la fase de floración y fructificación y la caracterización morfológica; una tercera que versa sobre la capacidad de recuperación de las plantas ante la poda e incluye la incidencia de enfermedades y de insectos potencialmente plagas; y otra que se refiere al comportamiento de la disponibilidad de biomasa y su composición química. Posteriormente se procedió a realizar la electroforesis, para corroborar la caracterización y evaluación morfoagronómica de las accesiones evaluadas.

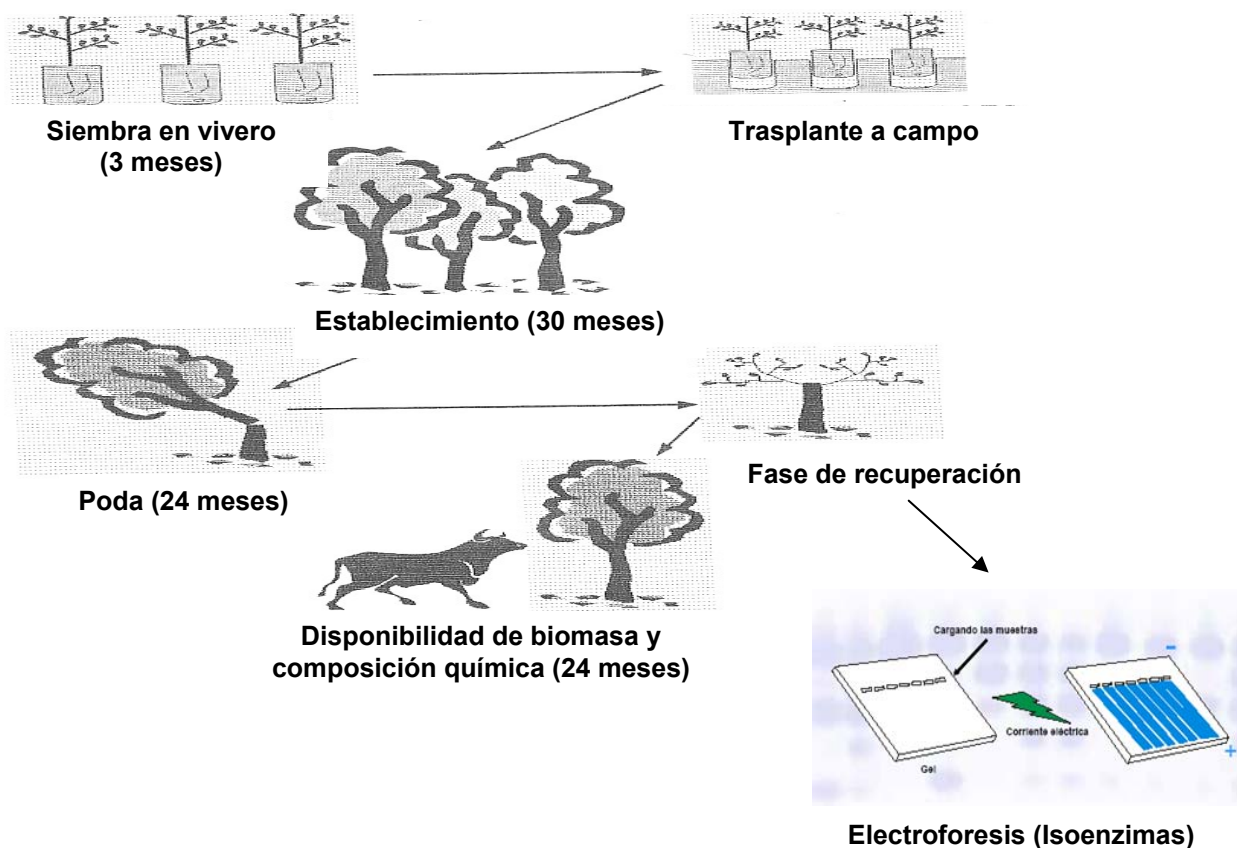


Figura 3.1 Secuencia experimental.

3.1 Descripción del área

3.1.1 Ubicación del área experimental

El estudio se realizó durante seis años, en las áreas de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes "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).

3.1.2 Características del clima

En los últimos 15 años la temperatura promedio anual de la zona fue de 24,3⁰C, julio fue el mes más cálido, con 28,6⁰C y enero el más frío, con 20,6⁰C. Las temperaturas máximas alcanzan 33,4⁰C en agosto y las mínimas bajan hasta 14,2⁰C en enero. La suma promedio de la precipitación anual es de 1 331,18 mm, con el mayor valor en junio (235,8 mm) y el menor en febrero (solo 27,4 mm). La lluvia caída durante la estación lluviosa (mayo-octubre) representa, como promedio, el 79,8% del volumen total anual. La evaporación en la zona aumenta a partir de enero, con valores máximos en abril (220 mm). La humedad relativa promedio anual es de 82,6%, con el mayor valor en julio (89,0%) y el menor en abril (75,5%).

3.1.3 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. Los resultados de su composición química del suelo se muestran en la tabla 3.1.

De acuerdo con dichos indicadores, el suelo de esta área tiende a ser ligeramente ácido, mientras que el contenido de materia orgánica es alto, superior a lo señalado por Hernández (2000), que es de 2 a 3%. Los valores del contenido de nitrógeno total son considerados medios; tiene bajos tenores de fósforo disponible y las bases intercambiables (K, Ca, Mg) muestran valores de moderados a altos. En función de estas características puede considerarse de mediana fertilidad.

Presenta baja densidad aparente, alta porosidad total y estructura granular media, condiciones que favorecen el buen desarrollo radical, la aireación y el movimiento del agua.

La retención de agua es baja, lo cual puede acentuar los problemas derivados de la sequía estacional (Hernández *et al.* 2003).

Tabla 3.1 Características químicas del suelo del área experimental.

Indicador	Valor medio	Método analítico
pH (H ₂ O)	6,34	Potenciométrico
Materia orgánica (%)	5,42	Oniani
Nitrógeno total (%)	0,22	Kjeldahl
P ₂ O ₅ (mg/100g suelo)	3,75	Walkley-Black
K ⁺ (meq/100g de suelo)	0,19	Maslova
Ca ⁺⁺ (meq/100g de suelo)	17,1	Maslova
Mg ⁺⁺ (meq/100g de suelo)	2,30	Maslova
Na ⁺ (meq/100g de suelo)	0,19	Maslova

3.2 Descripción de la investigación

3.2.1 Material vegetal utilizado

Para esta investigación se tomaron 23 accesiones (de cada una de ellas se evaluaron cuatro plantas) de las 180 que existen en la colección de *Leucaena* spp que se conserva en el banco de germoplasma de la Institución. De ellas, 19 son procedentes del CIAT de Colombia, una de Australia, una de Antigua y Barbudas y dos de origen desconocido. Estas se evaluaron según la secuencia experimental mencionada anteriormente.

3.2.2 Evaluación de las accesiones en condiciones de vivero

Esta etapa se desarrolló desde el 16 de abril de 1996 hasta el 16 de julio de 1996 (duración de tres meses). Las semillas sin inocular, previamente seleccionadas y escarificadas (inmersión en agua caliente a 80⁰C durante tres minutos) se sembraron en bolsas horadadas de 26 x 14 cm, en las cuales se depositó un sustrato compuesto por 70% de suelo (el cual fue tamizado de forma manual) y 30% de materia orgánica (cachaza).

Se sembraron seis bolsas por cada especie, las cuales se colocaron de forma vertical con su costura en el sentido del eje largo del cantero, en hileras definidas. Todo el material sembrado en el vivero al aire libre recibió un riego diario de aproximadamente 200 mL de agua por bolsa para mantener la humedad necesaria y facilitar la germinación, la emergencia, el desarrollo inicial de las plántulas, así como para estabilizar la mezcla y evitar la elevación de las temperaturas, además de que germinara la mayor cantidad posible de plantas indeseables (las que fueron eliminadas oportunamente). Posteriormente

se realizó la labor de raleo (cuando alcanzaron los 30 días de germinada la semilla) y se dejó una sola plántula en cada bolsa.

Tabla 3.2 Accesiones estudiadas y su procedencia.

No.	Clave	Especie	Accesión	Procedencia
1	5	<i>L. leucocephala</i>	cv. Cunningham	Australia
2	6		cv. Perú	Antigua y Barbudas
3	21		CIAT-9119	Colombia
4	26		CIAT-9438	Colombia
5	38		CIAT-751	Colombia
6	42		CIAT-7988	Colombia
7	50		CIAT-7384	Colombia
8	51		CIAT-7929	Colombia
9	52		CIAT-17480	Colombia
10	94		cv. Ipil-Ipil	-
11	95		cv. CNIA-250	-
12	63	<i>L. lanceolata</i>	CIAT-17255	Colombia
13	65		CIAT-17501	Colombia
14	152		CIAT-17253	Colombia
15	166	<i>L. diversifolia</i>	CIAT-17503	Colombia
16	107		CIAT-17270	Colombia
17	109	<i>L. macrophylla</i>	CIAT-17240	Colombia
18	110		CIAT-17233	Colombia
19	111		CIAT-17232	Colombia
20	113		CIAT-17238	Colombia
21	139		CIAT-17231	Colombia
22	124		<i>L. esculenta</i>	CIAT-17225
23	130	CIAT-17229		Colombia

Durante esta etapa se determinó la altura de la planta a los 30 días, en las seis plantas, con una frecuencia semanal hasta que las plántulas alcanzaron de 30 a 45 cm. Para ello se empleó una regla graduada en centímetros, cuya posición fue perpendicular y siempre en contacto con el suelo, según Toral *et al.* (2006).

Se contó, además, el número de brotes foliares, a los 30 días después de la siembra y en el momento del trasplante a campo; al igual que el grosor del tallo (cm), mediante un pie de rey colocado a 25 cm de altura a partir de la superficie del suelo; la biomasa seca de la parte aérea en gramos (g), la longitud de la raíz (cm) y el peso de la masa seca de la raíz (g).

Para las tres últimas mediciones se utilizaron dos plantas por accesión (las cuales se escogieron tomando en consideración que fueran lo más homogéneas posible en relación con los indicadores evaluados); el corte se realizó en el cuello de la raíz de cada una de las plantas y las mediciones se tomaron en el momento de trasplante a campo. En esta etapa se trabajó con un total de 3 864 datos.

3.2.3 Evaluación de las accesiones durante la etapa de establecimiento

Antes de efectuar el trasplante, se eliminaron las malezas y el área se mantuvo chapeada durante todo el tiempo de establecimiento. En el período experimental no se utilizó riego ni fertilización. Para la preparación del suelo se empleó el método convencional (arado, grada, cruce, grada y surcado), tomando en consideración el tipo de suelo, el cultivo precedente y el grado de infestación por malezas.

Este experimento se inició cuando las plántulas alcanzaron aproximadamente entre los 30 y 45 cm (tres meses de edad), con una apariencia saludable; fueron trasplantadas al campo cuatro plántulas de cada una de las accesiones evaluadas, en surcos espaciados a 6 m y con una separación de 3 m entre plantas. El período experimental tuvo una duración total de 30 meses (se desarrolló desde julio de 1996 hasta enero de 1999) y se dividió en establecimiento inicial (con una duración de aproximadamente 16 meses) y establecimiento final (con una duración de 14 meses, que incluyó la fase de floración y fructificación de las plantas y la caracterización morfológica de las accesiones evaluadas, las cuales se detallarán posteriormente).

En esta etapa la altura de la planta se midió a partir del momento del trasplante, con una regla graduada en centímetros, cuya posición fue 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 con este fin.

Según los criterios de selección establecidos (Seguí *et al.* 2002), las plantas debían alcanzar las siguientes condiciones en un período no mayor de 14 meses:

- ✓ Altura de 1,50 m a 2 m.
- ✓ Número de ramas mayor que 10.
- ✓ Grosor del tallo entre 0,5 y 0,8 cm.

✓ Rendimiento de biomasa comestible 0,75 o más kg MS/planta

Asimismo, se determinó el rendimiento en el corte de establecimiento $\text{Rend MV} = \% \text{ MS} \times \text{Peso seco}/100$; para ello se extrajeron muestras de 200 g de forraje verde, a las cuales se les calculó el contenido de MS.

Una vez que que las plantas se encontraban establecidas, se procedió a realizar las siguientes observaciones:

3.2.3.1 Fase de floración y fructificación

En esta fase se observó el comportamiento de los patrones fenológicos de floración y fructificación en todas las accesiones, con una frecuencia semanal, y se consideró en la información el 50% o más de flores y de frutos. Para ello se utilizó la simbología establecida con este fin (Machado *et al.* 1999).

Además, se contó el número de pinnas por hoja y de pínulas por pinnas; se midió la longitud (mm) y el ancho de las pínulas (mm), la cantidad de legumbres por cabezuela, la longitud de las legumbres (cm) y el ancho de las mismas (cm), la longitud (mm) y su 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, para 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 de los frutos (Cronquist 1981). En esta etapa se trabajó con un total de 13 708 datos.

3.2.4 Capacidad de recuperación ante la poda

Esta etapa tuvo una duración de dos años (desde 1999 hasta el 2001). La poda se efectuó en la época poco lluviosa de cada uno de estos años (en el mes de noviembre, según lo informado por Hernández 2000).

Cuando las plantas sobrepasaban los 2 m (altura que oscilaba entre los 3 y 4 m), se realizó la poda de uniformidad a un 1 m de altura sobre el nivel del suelo, según lo recomendado por Francisco, Simón y Soca (1998). Las mediciones relacionadas con la capacidad de recuperación de las accesiones fueron: grosor del tallo (en la base con un pie de rey) y número de rebrotes. Para esta última se realizó el conteo de los rebrotes emitidos por las plantas y su longitud, con una frecuencia semanal, a partir de la cual se calculó la velocidad de crecimiento ($V_c = h_1 - h_0 / t_1 - t_0$) de cada accesión.

Este procedimiento se llevó a cabo en los cinco rebrotes más desarrollados (Torral *et al.* 2006), con una frecuencia semanal, hasta que las plantas podadas alcanzaron los 2 m o más de longitud y se determinó además el rendimiento.

3.2.4.1 Incidencia de enfermedades e insectos potencialmente plagas

Durante las podas se realizaron observaciones fitosanitarias; se estimó la incidencia de insectos potencialmente plagas y enfermedades foliares (a través de la manifestación de los síntomas); para ello se muestreó cada accesión con una frecuencia mensual. En la estimación de incidencia de las enfermedades se utilizó la escala gradológica descrita en la metodología para la evaluación de los pastos y forrajes (anexo 1), elaborada por Machado *et al.* (1997).

En toda esta etapa se trabajó con un total de 28 428 datos.

3.2.5 Disponibilidad de biomasa y composición química

Este experimento tuvo una duración de dos años (desde el 2002 hasta el 2004), y abarcó las dos épocas: la lluviosa (mayo-octubre) y la poco lluviosa (noviembre-abril).

Simulando el ramoneo que realizan los animales (Lamela 1998), según la altura de consumo (hasta 2 m), se estimó la disponibilidad de biomasa. 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.

Posteriormente se tomó una muestra de 200 g de forraje verde para determinar algunos de los indicadores de la composición química. También se midió el grosor del tallo (en la base con un pie de rey) y la altura (con una regla graduada), y se contó el número de ramas por planta.

Cada muestra se pesó en una balanza técnica Owa-Labor, con capacidad para 1 000 g y se introdujo en una estufa de circulación de aire de 60°C, hasta alcanzar peso seco constante para determinar el contenido de MS. El material sin procesar, se molió en un molino de martillo Culatte typs MFC, con un tamiz de 1 mm de diámetro. Las muestras se envasaron en frascos de cristal herméticamente cerrados y se almacenaron a temperatura ambiente, hasta su posterior análisis (Herrera *et al.* 1986).

- ✓ Porcentaje de la materia seca de las fracciones: Para obtener esta variable, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Peso muestra seca}}{\text{Peso muestra verde}} \times 100$$

Se analizaron, además, los contenidos de PB, de FC y de Ca, según las técnicas descritas por la AOAC (1990). El contenido de P se determinó mediante el método de Amaral (1972). En esta etapa se trabajó con un total de 28 428 datos.

3.2.6 Detección del polimorfismo enzimático

3.2.6.1 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 neveras y posteriormente se congelaron a -70°C . Las extracciones se realizaron en frío, según lo recomendado por González (2002) y Álvarez (2005).

3.2.6.1.1 Preparación de las muestras y electroforesis

Se maceraron en un mortero 0,5 g de hojas en nitrógeno líquido, a los cuales se les añadió 500 μL de sacarosa al 20% (Soltis y Soltis 1989). Los extractos se guardaron en tubos *ependorf* 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 *buffer* 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 *buffer* discontinuos para las isoenzimas peroxidasas, α - y β - esterases y alcohol deshidrogenasas, según las metodologías descritas por según Álvarez *et al.* (2000). En todas las corridas se añadieron 30 μL de cada una de las muestras y 10 μL de *buffer* de carga (BC).

Posteriormente se utilizó el método recomendado por Chamberlain *et al.* (1996), el que se ajustó (anexo 2) debido a que las bandas observadas no estaban bien definidas. Se maceraron 0,5 g del tejido foliar en nitrógeno líquido y se añadió *buffer* 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 *buffer* Tris-Citrato pH 8,3 al que se añadió KCl 0,08%, MgCl_2 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 peroxidasas y alcohol deshidrogenasas y al 12% para esterasas), a 4°C, a 120 V, 20 mA, durante cuatro horas.

3.2.6.1.2 Tinción

Se realizaron las tinciones específicas (anexo 2) para peroxidasas (**Prx EC. 1.11.1.7**), α - y β -esterasas (**Est EC. 3.1.1-**) y alcohol deshidrogenasas (**Adh EC. 1.1.1.1**), según Álvarez *et al.* (2005).

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 (0/1, respectivamente).

3.2.7 Procesamiento estadístico

Los resultados (en condiciones de vivero, en el establecimiento, en la capacidad de recuperación ante la poda y en la selección de especies) se procesaron mediante el análisis de componentes principales (ACP) (Morrison 1967), en el cual se tomó como criterio de análisis aquellas componentes principales que presentaron valores propios superiores a 1 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 estas etapas. De esta forma se dispuso de grupos de especies que permitieron hacer un análisis más sencillo y objetivo de su comportamiento.

Se utilizó además el análisis de correlación y regresión lineal para conocer la interrelación entre las variables y los modelos de mejor ajuste. Se consideró como variables independientes los días y como variable dependiente: la altura, el número de rebrotes y su longitud. Como norma de selección de la ecuación de mejor ajuste se tomaron en consideración los criterios según Guerra *et al.* (2003):

- ✓ Nivel de significación.
- ✓ Coeficiente de determinación, R^2 mayor que 0,70.
- ✓ Varianza residual $V(e)$.
- ✓ Análisis de residuos (e_1).
- ✓ Error estándar de los parámetros estimados ES (β_i).

Los resultados de disponibilidad de biomasa de las accesiones de *Leucaena* spp. y sus componentes, al igual que los de la composición química, se sometieron a un ANOVA según modelo lineal de clasificación simple, considerando el efecto de la época y de las accesiones y las medias fueron comparadas mediante la dócima de Duncan (Duncan 1955) para un 5% de significación, después de verificarse que cumplían con el ajuste de distribución normal y de homogeneidad de varianza.

Todos los análisis mencionados anteriormente se realizaron a través del programa estadístico SPSS® versión 11,5 para Microsoft® Windows® (Visuata 1998).

La matriz binaria de datos isoenzimáticos (eliminando las bandas redundantes) se usó para generar una matriz de distancias genéticas 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 distancia 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 distancia y el dendrograma, y para representar la exactitud de la técnica utilizada (NTSYS-pc 1997).

Selección de las accesiones

En el proceso de selección se evaluó el comportamiento demostrado por cada accesión en las variables que más contribuyeron en la formación de los componentes de cada etapa (tabla 3.3) y tomando en consideración algunas de las características deseables (tanto agronómicas y nutricionales) que deben reunir los árboles y arbustos utilizados en los sistemas silvopastoriles, según criterios de Borel (1997), Gómez *et al.* (2002) y Simón *et al.* (2005). Se estableció que las accesiones seleccionadas debían cumplir con dos o más de los criterios evaluativos considerados.

Tabla 3.3 Criterios evaluados para la selección de las especies.

Variable	Límite de los criterios
Rendimiento de MS anual (kg/planta)	Mayor que 0,75 kg/planta
Respuesta a la poda o ramoneo	Capaz de rebrotar más de 0,25 cm/día
Altura para el establecimiento	De 1,50 m a 2 m (en un período no mayor de 14 meses)
Persistencia	Más de 5 años
Composición química	% PB mayor de 25
Resistencia a enfermedades	Inmunes o resistentes (valores 1 y 2 de la escala)

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de las accesiones en condiciones de vivero

El vivero constituye un eslabón previo e importante en el proceso de establecimiento, pues en él se cultivan las especies de las futuras plantaciones; es por ello que se le debe prestar especial atención. La función principal del vivero es la de reproducir plantas de buena calidad, según el objetivo para el cual sean destinadas. Se utiliza para asegurar la germinación y sobrevivencia de las plántulas, evitar la competencia y llevar al campo una planta sana, fuerte y vigorosa. Éste necesita recursos, es costoso y no se aplica como línea general, pero en este tipo de estudio resulta muy importante, debido a las características que presentan las semillas de las especies y accesiones de este género.

Aunque la literatura disponible no ofrece mucha información acerca de los estudios realizados en condiciones de vivero para las leguminosas arbóreas, Shelton *et al.* (1991) plantearon que para solucionar los problemas asociados con el lento crecimiento de las plántulas, éstas frecuentemente se cultivan en vivero antes de ser sembradas directamente en el campo, de forma tal que las plantas estén vigorosas y bien establecidas y, por ello, con más posibilidades de enfrentarse a los daños causados por estrés tanto biótico como abiótico, criterio que se relaciona con los resultados de estudios similares a estos, realizados por Hernández y Seguí (1998) y Wencomo *et al.* (2003).

En la tabla 4.1 se muestran los resultados del Análisis de Componentes Principales (ACP). Se detectó una varianza acumulada de 84,01% en las dos primeras componentes. Las variables que mejor explicaron la varianza en la primera componente (63,10%) fueron el número de brotes foliares, la altura de la planta, la biomasa seca de la parte aérea y la longitud de la raíz, las cuales estuvieron positivamente relacionadas entre sí; mientras que la segunda componente extrajo una varianza de 20,91%, la que estuvo explicada principalmente por la masa seca de la raíz.

Tabla 4.1 Resultados del ACP y relación entre los indicadores evaluados.

Indicador	Componente principal	
	CP 1	CP 2
Altura de la planta (cm)	0,953	-0,021
Número de brotes foliares	0,964	-0,038
Grosor del tallo (cm)	-0,455	-0,658
Biomasa seca parte aérea (g)	0,930	0,103
Longitud de la raíz (g)	0,884	0,246
Masa seca de la raíz (g)	-0,153	0,905
Valor propio	3,78	1,25
Varianza (%)	63,10	20,91
Acumulado (%)	63,10	84,01

Puede observarse que la variable grosor del tallo no se incluye en ninguna de las dos componentes, debido al valor que posee su factor de suma o de preponderancia (-0,658 inferior a 0,70), por lo que se pudiera prescindir de ella a la hora de realizar otras evaluaciones en circunstancias semejantes a esta investigación en condiciones de vivero.

La expresión de la variabilidad adquiere notable trascendencia, ya que se relacionó, fundamentalmente, con variables estructurales tan importantes como el número de brotes foliares, la altura de la planta, la biomasa seca de la parte aérea y la longitud de la raíz. Incluso la masa seca de la raíz, que tuvo un valor de r de 0,905, contribuyó con el 20,91% de la variabilidad extraída por la segunda componente, cuyo valor propio fue superior a 1; este índice puede considerarse aceptable (Philippeau 1986) en el momento de seleccionar cualquiera de las variables para futuros análisis, en función de dichos componentes de la arquitectura de las plantas. Por tales razones, éste se puede denominar eje de los componentes aéreos de la planta. Por otra parte, el resto de la varianza acumulada fue aportada por la masa seca de la raíz.

Según plantea Philippeau (1986), el valor propio debe ser 1 o mayor que 1, para que la variabilidad correspondiente a cada indicador esté mejor relacionada con cada eje en correspondencia con este tipo de análisis. Ello se pudo comprobar en el presente trabajo, en el que la variabilidad estuvo bien distribuida, ya que dicho indicador en todos los casos fue superior a 1. Por tal razón, todos los indicadores evaluados, excepto el grosor del tallo, se incluyeron en la agrupación de estas accesiones.

Al respecto, Seguí *et al.* (1989) plantearon la gran importancia que tiene el conocimiento de las asociaciones de indicadores en el proceso de selección y demostraron que estas

pueden ser ventajosas o no, ya que cuando se selecciona para un indicador determinado, este puede estar asociado a otro deseable o no deseable.

Aunque existen pocos trabajos relacionados con la evaluación de plantas de leguminosas arbóreas o de *Leucaena* en condiciones de vivero, Clavero (1998) plantea que en estas condiciones crecen más rápido y que sus plántulas deben sembrarse en el campo cuando tengan una altura entre 20 y 50 cm, lo que evita que las raíces perforen las bolsas y se fijen al suelo y que los tallos se alarguen demasiado; además este autor de prefija la altura como única variable a tener en consideración para el momento del trasplante.

Estos resultados demuestran que para definir el momento óptimo de trasplante es posible tomar en consideración, además, los indicadores número de brotes foliares, biomasa seca de la parte aérea y longitud de la raíz, ya que están muy relacionados con el desarrollo de la plántula en esta etapa. Wencomo *et al.* (2003), al evaluar accesiones de *Leucaena* aviveradas en un sustrato de suelo ácido, también observó una correlación muy positiva entre los mismos indicadores medidos en esta investigación.

En este sentido, en el plano económico y en los estudios de evaluación de plantas, es importante tener en cuenta los planteamientos anteriores, ya que ello repercutiría en la disminución de los costos en que se incurre con el fomento y desarrollo de viveros; además de evitar que las raíces se salgan de las bolsas y se dañen, lo cual influiría de forma negativa en el crecimiento y desarrollo de las plántulas cuando se trasplanten al campo.

La variabilidad hallada puede relacionarse, entre otros factores, con la respuesta individual de las accesiones al clima y al manejo y con la heterogeneidad del material. Machado y Núñez (1993) obtuvieron similar comportamiento al estudiar una colección del género *Centrosema*, entre las que se incluían las especies *C. plumieri*, *C. schottii*, *C. schiedianum* y *C. brasilianum*, en asociación con la bermuda 68.

Por ello, independientemente de que se conocen las diferencias que en este sentido existen entre las especies y las accesiones y entre las gramíneas y las leguminosas, se considera que estos resultados pudieran revelar, como elementos trascendentes, que en esta colección fue posible encontrar una sensible diferenciación desde etapas tan tempranas como la de vivero, lo que debe constituir un elemento alentador para dar continuidad al trabajo evaluativo y selectivo en etapas posteriores, e igualmente permitiría conocer el comportamiento de cada accesión en función de los indicadores evaluados.

Lo anteriormente planteado permite sugerir que el equilibrio fisiológico en estas plantas, como afirmara Brouwer (1983), fue más importante que el equilibrio morfológico, ya que la interacción de los componentes aéreos dependió mucho más de las relaciones entre estos que de las establecidas con la parte subterránea, cuyo peso en la varianza total fue mucho menor e independiente al estar representada en la CP2. No obstante, resulta interesante destacar que en el caso de las arbóreas la variación del peso del sistema radical cobra un especial significado, más si se tiene en cuenta que constituye un órgano de reserva para los rebrotes, además de sus funciones de anclaje y nutrición.

Mediante el análisis de conglomerados sobre la base de los resultados del ACP, se formaron tres grupos (anexo 3). En la tabla 4.2 se muestran las accesiones pertenecientes a cada uno de los grupos formados con sus medias y desviaciones estándar.

Tabla 4.2 Distribución de los individuos, media y desviación estándar según el Análisis de Conglomerados.

Indicador	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
	X	DS	X	DS	X	DS
Altura (cm)	29,72	1,54	25,54	0,53	22,20	0,42
NBF	6,66	0,22	5,61	0,42	4,50	0,28
BSPA (g)	3,75	0,21	2,68	0,39	2,20	0,14
Lraíz (g)	29,65	1,18	22,90	1,69	22,00	1,41
MSraíz (g)	8,50	0,48	7,42	0,47	10,55	0,07
Grupos	Cantidad	Accesiones				
I	14	<i>L. leucocephala</i> cv. Cunningham, cv. Perú, CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929, CIAT-17480, cv. Ipil-Ipil, cv. CNIA-250, <i>L. lanceolata</i> CIAT-17255, CIAT-17501, <i>L. diversifolia</i> CIAT-17270				
II	7	<i>L. lanceolata</i> CIAT-17253, <i>L. diversifolia</i> CIAT-17503, <i>L. macrophylla</i> CIAT-17240, CIAT-17233, CIAT-17232, CIAT-17238, CIAT-17231				
III	2	<i>L. esculenta</i> CIAT-17225, CIAT-17229				

NBF: Número de brotes foliares; BSPA Biomasa seca de la parte aérea; Lraíz: Longitud de la raíz; MSraíz: Masa seca de la raíz; X: Media, DS: Desviación estándar

Según los resultados, se puede inferir que 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, pertenecientes al grupo I, se caracterizan por ser las plantas de mayor altura, con mayor número de brotes foliares, de mayor biomasa seca de la parte aérea y de raíces más largas; no así para el indicador masa seca de las raíces.

En este sentido, es importante mencionar que en este grupo se encuentran las conocidas variedades comerciales (*L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú y cv. Ipil-Ipil), las cuales en la actualidad son las utilizadas en los sistemas silvopastoriles que se explotan en aproximadamente más de 20 000 ha del país.

Las accesiones *L. lanceolata* CIAT-17253, *L. diversifolia* CIAT-17503, *L. macrophylla* CIAT-17240, CIAT-17233, CIAT-17232, CIAT-17238 y CIAT-17231, pertenecientes al grupo II, presentaron valores aceptables para todos los indicadores; mientras que *L. esculenta* CIAT-17225 y CIAT-17229, pertenecientes al grupo III, se caracterizaron por ser las plantas con mayor masa seca de las raíces.

Aunque en la práctica el método más corriente de sembrar *Leucaena* es con semilla sexual llevada directamente al campo, por ser un método relativamente rápido y económico con respecto a la siembra en vivero, bajo esta última se podría inferir el comportamiento de las plántulas en condiciones campo. Es válido señalar que en esta etapa no se discriminó ninguna de las accesiones evaluadas y todas fueron trasplantadas independientemente de su comportamiento. 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 (pertenecientes al grupo I) sobresalieron con respecto a las demás en función de los indicadores medidos.

Ello pudiera indicar que estas accesiones deben ser fuertemente monitoreadas en las etapas sucesivas del proceso de evaluación, de manera tal que sea posible verificar si mantienen la posición ventajosa o no en relación con las accesiones evaluadas, o si por el contrario, son superadas por otras que mantuvieron un comportamiento menos sobresaliente en esta etapa inicial, cuando las condiciones no son típicas si se les compara con las existentes en condiciones de campo.

En Cuba, y en muchos otros países, las áreas ganaderas se establecen en los lugares que no son seleccionados para los cultivos priorizados, cuya estrategia tecnológica se sustenta en los mejores suelos en términos de fertilidad, adaptación al cultivo y con un mínimo de factores limitantes. Para la ganadería vacuna se emplean los suelos con más limitaciones, de manera que la estrategia ganadera se basa en la búsqueda de plantas para estos suelos y con frecuencia también es necesario buscar el sistema de producción y el tipo de animal

apropiado. Esta heterogeneidad de condiciones constituye un problema para lograr recomendaciones precisas y generalizables en cuanto a las tecnologías.

De ahí que la siembra o plantación sea el punto de partida en el fomento del componente vegetal de cualquier sistema de producción agropecuario; de su eficiencia y efectividad depende, en buena medida, que se logre un buen establecimiento como preámbulo obligado para conseguir el éxito en etapas posteriores de su explotación. En sentido general, el establecimiento debe ser considerado como un sistema integrado por la siembra, la emergencia, el crecimiento y el manejo temprano del elemento vegetal, lo cual influye en el tiempo necesario para comenzar la explotación de las áreas, o sea, la siembra, el manejo para el establecimiento y la puesta en explotación (Ruiz y Febles 2006). Además, en esta etapa se puede conocer el comportamiento de las plantas evaluadas (en condiciones no controladas); es decir, si son capaces o no de expresar todo su potencial genético e interactuar con el ambiente circundante, según las condiciones edafoclimáticas y ecológicas de la localidad donde son sembradas o plantadas, sobre todo conociéndose que las plantas arbóreas o arbustivas tienen lento establecimiento. A continuación se discuten aspectos relacionados con esta temática.

4.2 Evaluación de las accesiones en condiciones de establecimiento

Son numerosos los trabajos en los que se señala que las leguminosas, en general, manifiestan serias dificultades para establecerse, debido a factores de la más diversa índole (Maasdorp 1992 y Ruiz y Febles 2006), lo cual las hace vulnerables a la competencia con las malezas y los predadores y a las defoliaciones durante el establecimiento, así como al pastoreo y la vida silvestre. En este sentido, Ruiz y Febles (2001a) y Padilla (2001) indicaron que el éxito del manejo de la pastura durante su establecimiento está basado en el uso eficiente y oportuno de los factores genéticos, ambientales y tecnológicos de que se dispone. Al actuar de esta forma se podrá cambiar, al asumir costos y riesgos mínimos, una vegetación improductiva por otra de alta productividad y sostenibilidad.

Dentro del género *Leucaena*, Sorensson *et al.* (1993) encontraron diferencias en cuanto al establecimiento tanto entre especies como entre accesiones; por ejemplo, la especie *L. pallida* y sus híbridos mostraron un vigor superior que *L. leucocephala* cv. Cunningham. Por ello, el estudio de las accesiones de una especie durante la etapa de establecimiento, su caracterización y evaluación representan, de hecho, una vía muy eficaz para conocer la posible diferenciación o similitud existente, y resultan, sin lugar a dudas, un complemento eficaz entre los atributos a tomar en cuenta en el proceso de selección.

En la tabla 4.3 se presenta la correlación que se presenta entre los indicadores evaluados. Por la importancia que se le atribuye a las interrelaciones entre el rendimiento y sus componentes, se puede destacar la existencia de correlaciones fuertes y positivas entre éste y la altura, el número de ramas y el grosor del tallo. Similares resultados se encontraron en investigaciones realizadas por Machado y Núñez (1994b) y Gómez *et al.* (2006) en Cuba.

Tabla 4.3 Matriz de las correlaciones fenotípicas.

Indicador	Altura	Nramas	Grosor del tallo	Rendimiento
Altura	-			
Nramas	0,914**	-		
Grosor del tallo	0,920**	0,847**	-	
Rendimiento	0,797**	0,867**	0,680**	-

** La correlación es significativa al nivel 0,01

Nramas: Número de ramas

En relación con ello, se conoce que el rendimiento de las plantas de *Leucaena* en ocasiones depende de las condiciones climáticas y de la composición varietal empleada; de ahí que existan diversas opiniones acerca de las correlaciones que se establecen entre el rendimiento y sus componentes, por lo que se recomienda el estudio de las causas de la variación para cada situación dada (Morejón *et al.* 2001).

Al realizar el análisis de componentes principales se obtuvo una sola componente, la cual explica el 87,94% de la variación total (tabla 4.4). En esta componente todos los indicadores contribuyeron a expresar la varianza extraída. Con este análisis se corroboró la estrecha relación entre los indicadores.

Tabla 4.4 Resultados del ACP y relación entre los indicadores evaluados.

Indicador	Componente principal
	CP 1
Altura de la planta (cm)	0,970
Número de ramas	0,969
Grosor del tallo (cm)	0,921
Rendimiento (kg MS/planta)	0,889
Valor propio	3,51
Varianza (%)	87,94
Acumulado (%)	87,94

La variabilidad mostrada a través de los indicadores puede que se deba a la alta relación que existió entre estos en la etapa, aspecto que permite la agrupación de las accesiones y su posterior selección en función de ellos. El alto porcentaje de la variación explicada por la componente, sugiere que esta contiene indicadores que pueden discriminar bien las accesiones en estudio. Por ello, pudiera plantearse que la variabilidad estuvo relacionada con el contraste en el comportamiento de estas especies y accesiones, y no con el hábito de crecimiento que las caracteriza.

Resultados similares en términos de variación obtuvieron Machado y Núñez (1994a) al evaluar ocho accesiones de *L. leucocephala*, en suelos de mediana fertilidad, en la cual encontraron varianza acumulada de 81,7% en las dos primeras componentes, cuando utilizaron los mismos indicadores de dicho estudio; al igual que en investigaciones realizadas por Machado (2006) en el establecimiento de accesiones de esta especie en suelos hidromórficos del humedal Ciénaga de Zapata.

Ello pudiera indicar que, independientemente de las condiciones edafoclimáticas existentes, las poblaciones, y en particular las accesiones de las especies del género *Leucaena*, pudieron expresar una marcada variación entre individuos para algunos indicadores y agruparse en función de esas variables, lo que puede representar un elemento positivo en el trabajo de caracterización y evaluación. En ello pudo influir, la variabilidad inter e intraespecífica existente en la muestra estudiada, ya que está conformada por varias especies con sus respectivas accesiones, las cuales varían de forma marcada desde el punto de vista morfológico.

Asimismo, puede plantearse que a pesar de que en el establecimiento de árboles y arbustos, al igual que en el de otras especies vegetales, debe considerarse un grupo de indicadores que relacionen los conceptos de crecimiento y desarrollo; también se debe hacer énfasis en las características biológicas de las especies, de forma tal que permita sentar las bases sobre las cuales deben apoyarse los trabajos futuros de evaluación y caracterización. Por ejemplo, el valor de r obtenido en el grosor del tallo puede deberse a varios factores. Por un lado, a la estimulación del crecimiento radical, lo que evidentemente favorece el establecimiento de las especies, como fue informado para los géneros *Erythrina* y *Gliricidia* en áreas tropicales (Pezo e Ibrahim 1999 y Murgueitio 2003).

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que el crecimiento en grosor es una característica de particular interés para el desarrollo de una planta leñosa que desea establecerse mediante determinados métodos agronómicos, lo cual se debe a la vinculación de la morfología del tallo con el crecimiento vegetal. Según refiere Bonilla (2002), es conocido que el anillo de *cámbium* que se encuentra entre el xilema y el floema del haz del libero leñoso, es el encargado de promover la aparición de nuevos elementos del tejido vascular para garantizar una parte esencial de la nutrición. En este caso, tal incremento no se debe apartar del posible crecimiento del sistema radical y es muy posible que ambos, al interactuar, favorezcan el crecimiento.

En correspondencia con el alto valor alcanzado por la varianza acumulada y el valor propio de la CP_1 , es posible asumir que la variabilidad fenotípica fue suficientemente propicia para que estos indicadores fuesen incluidos, en su totalidad, en el análisis de conglomerados, y de esta forma determinar la diferenciación o similitud entre las especies y accesiones.

El análisis de conglomerados sobre la base de los resultados del ACP (anexo 4) durante esta etapa, permitió la formación de tres grupos. Las accesiones pertenecientes a cada uno de ellos se muestran en la tabla 4.5, al igual que la media y la desviación estándar de cada uno de los grupos formados.

Tabla 4.5 Distribución de los individuos, media y desviación estándar según el Análisis de Conglomerados.

Indicador	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
	X	DS	X	DS	X	DS
Altura de la planta (cm)	175,86	2,26	156,47	3,36	161,12	3,36
Número de ramas	36,85	1,91	23,25	0,95	23,25	0,95
Grosor del tallo (cm)	1,20	0,02	0,80	0,12	0,85	0,12
Rendimiento (kg MS/planta)	28,75	0,61	22,80	2,589	22,80	2,58
Grupo	Cantidad	Accesiones				
I	14	<i>L. leucocephala</i> cv. Cunningham, cv. Perú, CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929, CIAT-17480, cv. Ipil-Ipil, cv. CNIA-250, <i>L. lanceolata</i> CIAT-17255, CIAT-17501, <i>L. diversifolia</i> CIAT-17270				
II	4	<i>L. lanceolata</i> CIAT-17253, <i>L. diversifolia</i> CIAT-17503, <i>L. esculenta</i> CIAT-17225, CIAT-17229				
III	5	<i>L. macrophylla</i> CIAT-17240, CIAT-17233, CIAT-17232, CIAT-17238, CIAT-17231				

X: Media, DS: Desviación estándar

Atendiendo a los resultados de esta tabla, se puede deducir que 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, pertenecientes al grupo I, se caracterizaron por ser las plantas más altas, más ramificadas, de mayor grosor y de mayores rendimientos, con respecto a las accesiones pertenecientes a los grupos II y III.

Es válido resaltar que las accesiones que conformaron el grupo I en esta etapa fueron las mismas que se agruparon en condiciones de vivero, por lo que pudiera plantearse que desde dicha etapa pueden seleccionarse o discriminarse accesiones sin tener que realizar posteriores evaluaciones. En estos resultados se muestra el comportamiento diferenciado de las accesiones que pertenecen al grupo I, con respecto a las pertenecientes a los demás grupos. Ello pudiera revelar que en las poblaciones de las especies de este género, se pueden hallar individuos capaces de mostrar o no mejor un comportamiento en suelos como el estudiado; se conoce que, en general, estas especies (*L. diversifolia*, *L. esculenta*,

L. macrophylla, *L. shannonii*) poseen la capacidad de adaptación a este tipo de suelo (Skerman *et al.* 1991), lo que pudiese estar asociado a la posibilidad que posee el genoma individual de responder o no al medio circundante (Hidalgo 2003).

Un patrón similar al de las accesiones sobresalientes de *L. leucocephala* fue el observado por Machado (2006) en las accesiones *L. leucocephala* cv. Cunningham, CIAT-482, PI-14, cv. México y CNIA-250, y en *C. molle* CIAT-482, con excelentes características de adaptabilidad, en contraste con *C. molle* IH-129 y Centrosema híbrido CIAT-423, aprobadas como variedades comerciales (Machado y Seguí 1997), y el CIAT-5151, de sobresaliente comportamiento en suelo Ferralítico Rojo (Machado y Núñez 1993), lo que reafirma las aseveraciones anteriores.

En la tabla 4.6 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 (meses). Se pudo comprobar que algunas accesiones pueden comenzar a explotarse antes de los 12 meses de trasplantadas; ejemplo de ello es *L. leucocephala* CIAT-17480, la primera que alcanzó dicha altura con sólo siete meses de plantada, y al concluir la etapa evaluada contaba con una altura de 3,65 m y un rendimiento de biomasa comestible de 0,82 kg MS/planta.

Se pudo constatar también que las siete primeras accesiones mostraron mejor comportamiento en la etapa de establecimiento que las variedades comerciales *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú y cv. CNIA-250 en cuanto a los indicadores altura, diámetro y número de ramas, a pesar de que no hubo diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las accesiones en relación con los indicadores mencionados. En el caso de este último cultivar los resultados coinciden con los obtenidos por Hernández y Seguí (1998) en condiciones de vivero, con los de Machado y Núñez (1994a) y los de Wencomo *et al.* (2001) cuando lo evaluaron en la etapa de establecimiento, donde también mostró un comportamiento similar.

Del mismo modo, se pudo observar que la altura fue similar para todas las accesiones, excepto para *L. diversifolia* CIAT-17503 y CIAT-17270, las cuales mostraron valores más bajos en diámetro y número de ramas. En la mayoría de los casos, las plantas que presentaron la mayor altura coincidieron con las de mayor número de ramas y viceversa; similares resultados informaron Dávila y Urbano (1996) 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. 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 alimentación animal.

Tabla 4.6 Comportamiento de las accesiones en la etapa de establecimiento.

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 $P < 0,05$; EE±: Error estándar; TE: Tiempo que demoró en alcanzar 1,50 m de altura (meses), NR: Número de ramas, RBC: Rendimiento biomasa comestible (kg MS/planta)

Igualmente se puede apreciar en esta tabla el comportamiento del indicador número de ramas; *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, comparado con el resto, en cuanto al número de ramas a los 14 meses y a la altura.

En la figura 4.1 se muestra un diagrama de líneas con una curva de ajuste, que aproxima la relación entre la altura y los días en cada uno de los grupos formados. Esta figura permite visualizar la tendencia creciente de la altura en cada grupo a medida que transcurren los días. El modelo que explicó con mayor bondad de ajuste esta relación ($R^2=0,99^{***}$) fue el cúbico (anexo 5). Como se puede observar para todas las accesiones, hasta los 60 días (posteriores al trasplante) se observó un ritmo de crecimiento lento a pesar de que se efectuaron dos labores de limpieza del área, la cual se mantuvo chapeada durante todo el tiempo del establecimiento de las plantas.

Esto pudiese estar motivado por el estrés sufrido por las plantas en el momento del trasplante. No obstante, ello no pareció desempeñar un papel decisivo en términos de velocidad de establecimiento, ya que la recuperación que siguió a esta primera etapa permitió alcanzar un aceptable desarrollo de todas las especies y accesiones de ambos grupos, las que demoraron como promedio entre 14 y 16 meses para establecerse, con muy pocas excepciones; aunque es válido mencionar que en las accesiones correspondientes al grupo I esto ocurrió de forma más acelerada que en las de los grupos II y III. Posteriormente, el ritmo de crecimiento se incrementó con la edad hasta los 210 días para todos los grupos.

Es probable que la problemática del 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 que posea un establecimiento mucho más rápido, lo cual coincide con las observaciones efectuadas por Sierra (citado por Ruiz y Febles 1987), quien determinó alturas promedio de 120 cm en los primeros 150 días en 90 variedades de *L. leucocephala*. La lentitud en esta especie en sus primeros estadios fue indicada también por Harding (1972) y Cooksley (1974) y constituye una de las limitaciones más adversas en Cuba para su establecimiento; por lo aquí observado todo parece indicar que esto se revela de forma similar para las accesiones de las otras especies de *Leucaena*.

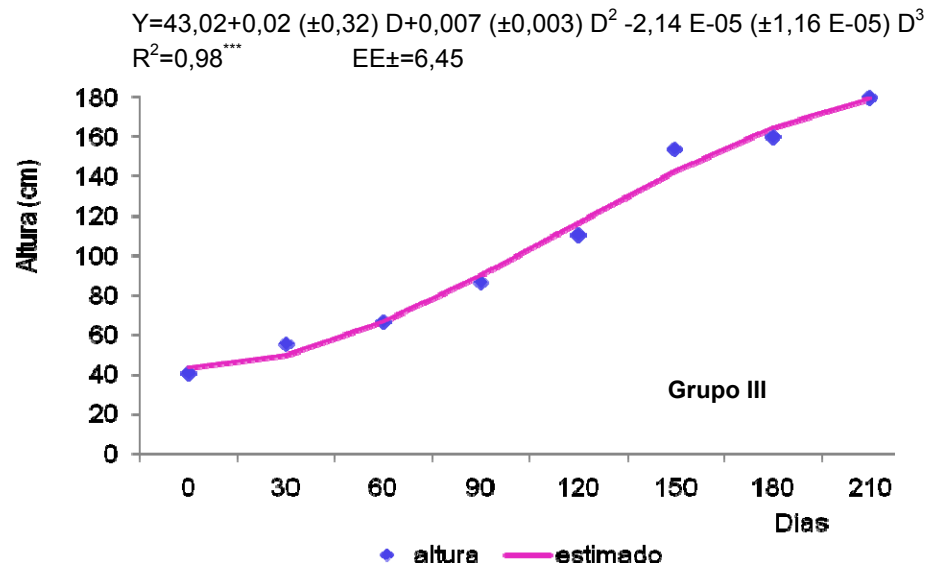
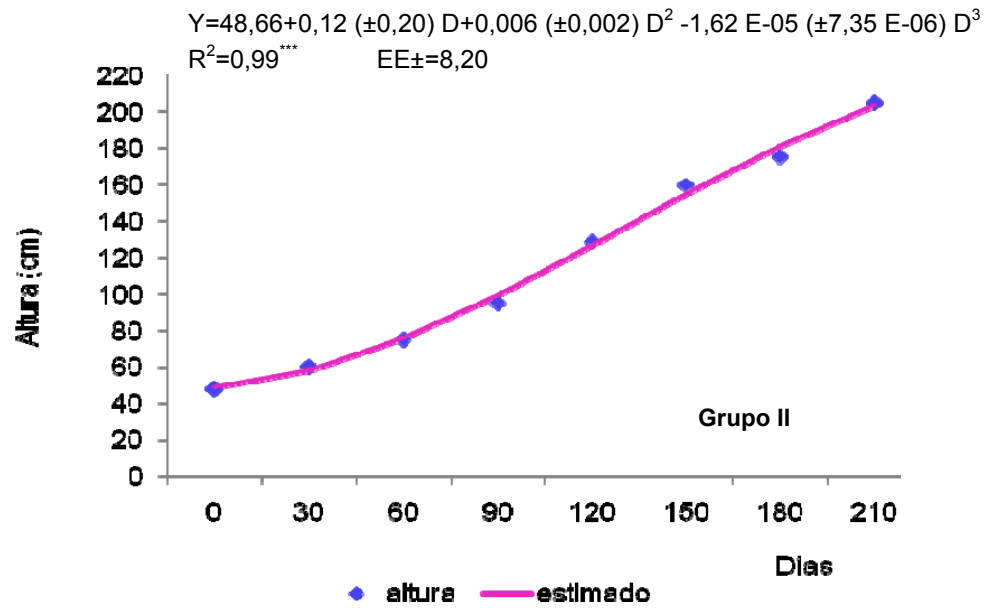
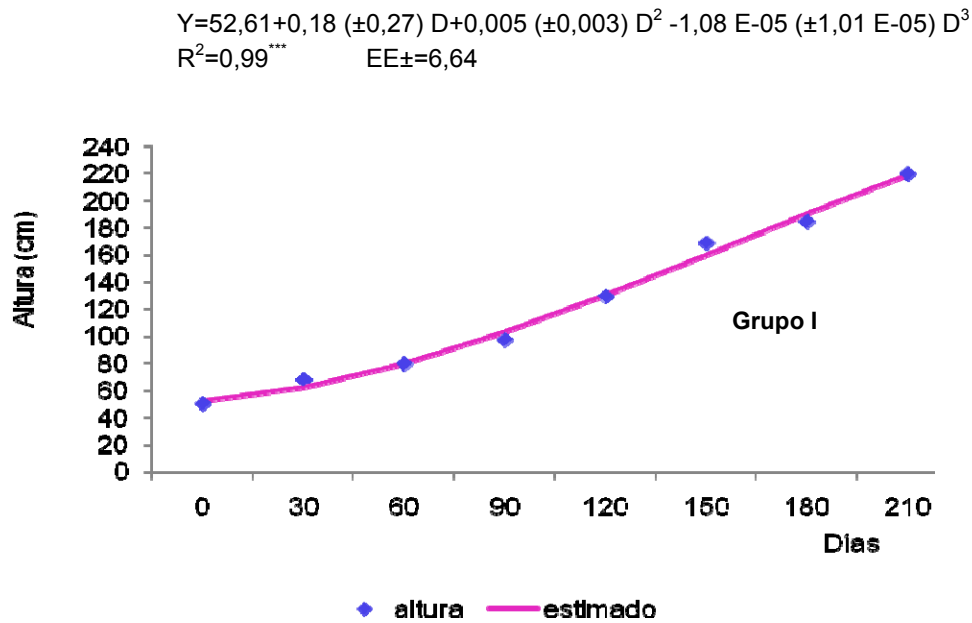


Figura 4.1 Diagrama de líneas con una curva de ajuste que aproxima la relación entre la altura (cm) y los días por grupos.

El lento crecimiento inicial en los tres grupos estuvo relacionado con la poca cantidad de área foliar; también puede que se relacione con la dinámica del crecimiento y la expansión foliar (Díaz 2006b), al igual que con la partición de la biomasa con cierta prioridad durante las primeras semanas hacia el sistema radical, lo cual se confirma con las investigaciones realizadas por Shelton (2000) en este sentido, quien afirma 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 de agua y nutrientes. Una gran proporción de las sustancias asimiladas son translocadas a la parte estructural no productiva de la raíz del árbol.

Este mismo autor plantea que los árboles disponen de baja densidad radicular, que oscila entre 0,8 y 0,7 cm/cm³ (para el caso de *L. leucocephala* este oscila entre 0,5 y 2 cm/cm³) en comparación con una densidad radicular entre 100-4 000 cm/cm³ en gramíneas acompañantes, lo cual hace que sus raíces tengan la dificultad para acceder a aquellos nutrientes de poco movimiento en el suelo como H₂PO₄⁻, K⁺ y NH₄. Consideraciones similares fueron realizadas por Ruiz y Febles (2006).

Debido a que la mayor proporción de raíces de los árboles en las primeras etapas de crecimiento y de establecimiento (especialmente en la etapa de plántula) se encuentra en una profundidad de suelo entre 15-30 cm, es evidente que las gramíneas tienen ventajas para competir (Ruiz y Febles 2006). Es por esto que las malezas, y particularmente las gramíneas, deben ser cuidadosamente controladas durante esta etapa, aspecto que se tuvo en consideración en esta investigación.

El aumento en el crecimiento de las plantas que se produce después de los 60 días para los tres grupos, de forma más eficiente en las accesiones del grupo I que en las de los grupos II y III, puede que esté vinculado con una marcada producción de hojas (Stür *et al.* 1994) o con el arribo de las plantas a niveles satisfactorios de índice de área foliar, indicador que según Díaz (2006b) está muy relacionado con el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este índice, para el caso de las plantas herbáceas, está entre 3-4 m²/m², y en de las leñosas entre 4-6 m²/m².

Es válido acotar que en este análisis se debe incluir, además, el papel que pudieron ejercer en el crecimiento de estas accesiones las hormonas vegetales (Bonilla 2002). En investigaciones realizadas en este sentido, se demostró que las auxinas no sólo regulan el

crecimiento diario de las plantas, sino que intervienen también en algunas de sus respuestas a los estímulos exteriores (Bonilla 2002). Se han realizado numerosos intentos por explicar que existe una concentración de auxinas más alta en las zonas sombreadas de la planta que puede determinar una elongación celular mayor. Esta elongación, como indica Díaz (2006b), puede producir debilitamiento de las paredes celulares al no haber deposición de lignina. Al respecto, se demostró que la reducción de la pared es el indicador por el cual esta hormona induce el alargamiento celular.

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 evaluadas; 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 fueron utilizados estos por parte de las plantas. En esta investigación, aunque es cierto que el área se mantenía limpia de malezas, no se puede obviar la presencia de las raíces de las gramíneas que permanecieron debajo de la superficie del suelo, por lo que este tipo de estrés ambiental competitivo por nutrientes y agua no puede descartarse.

Otro elemento a considerar es el relacionado con la fertilidad del suelo, el que no se fertilizó ya que está catalogado de mediana fertilidad (Hernández 2000). Un factor adicional, unido en mayor o menor grado a los ya citados como probables, pudiera ser la falta de humedad del suelo producto del déficit de precipitaciones durante el período seco, que pudo afectar a la joven planta en crecimiento. Resultados similares fueron reportados en las investigaciones reportadas por Toral (2005) al evaluar germoplasma arbóreo promisorio para sistemas agroforestales.

Asimismo, esta etapa permitió conocer el comportamiento del establecimiento de las diferentes accesiones en condiciones naturales, las cuales no se presentaron en la etapa de vivero donde se garantizaron condiciones semicontroladas para el desarrollo de las plántulas, principalmente el suministro de humedad suficiente y estable. Con relación a ello y a los criterios de selección predeterminados, 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 accesiones en el mismo grupo que las de la especie *L. leucocephala*, puede que indique que presentan comportamientos muy similares en función de los indicadores evaluados.

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

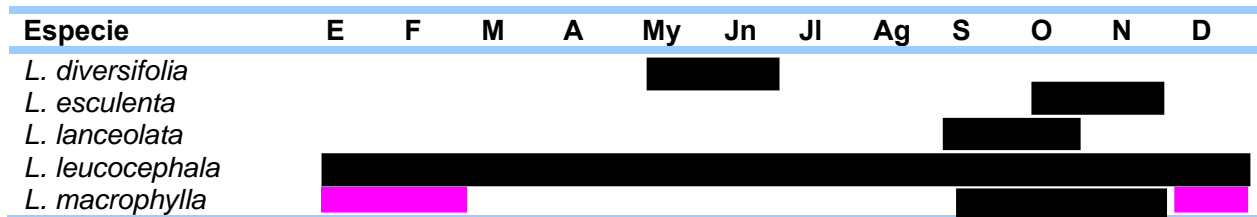
4.2.1 Fase de floración y fructificación

Las principales características de todo patrón fenológico son su frecuencia, su amplitud (intensidad de respuesta), su duración (corta o extensa), la fecha y la sincronía en que se expresa. Según refiere Hughes (1998a), los datos de fenología para las especies de *Leucaena* están limitados a resúmenes a nivel de especies, basados solamente en datos de observaciones obtenidos en expediciones de recolección de semillas, datos de especímenes de herbarios o de observaciones realizadas en lugares donde estas especies se cultivaron como exóticas. Esta situación se mantiene vigente aún.

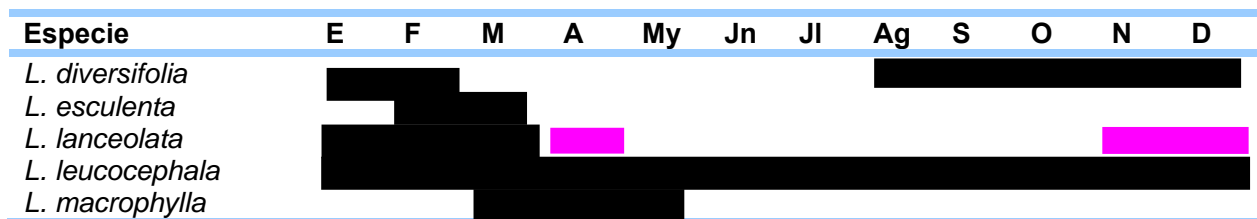
La aparición de flores y frutos en las especies de este género, según indica Hughes (1998a), ocurre de forma diferente y puede ser anual en alguna de ellas (figura 4.2). Es importante señalar que de acuerdo con las observaciones en campo, las accesiones de cada especie tuvieron un comportamiento similar, tanto en lluvia como en seca, excepto *L. diversifolia* CIAT-17503, *L. macrophylla* CIAT-17233 y *L. esculenta* CIAT-17229 (las cuales se mantuvieron en fase vegetativa), y por ello sólo se muestra en la figura el comportamiento por especies y no por accesiones, por cuanto constituye un carácter específico y no de las variantes poblacionales de las especies. Lo observado en dichas accesiones coincide con los resultados de las investigaciones de Sacandé (2000) y Venter Van De (2000), quienes refieren que en determinados ambientes algunas especies puede

que no den frutos, como sucedió en *L. esculenta* cuando se estableció en elevaciones bajas de Hawai.

FLORACIÓN



FRUCTIFICACIÓN



■ Período principal ■ Período extendido de floración o fructificación
 E: Enero; F: Febrero; M: Marzo; A: Abril; My: Mayo; Jn: Junio; Jl: Julio; Ag: Agosto; S: Septiembre; O: Octubre, N: Noviembre; D: Diciembre

Figura 4.2 Comportamiento en los patrones fenológicos de floración y fructificación de las especies de *Leucaena* (50% o más).

Como se puede apreciar en la figura mencionada, en las accesiones de *L. diversifolia* el período de floración se produjo de mayo a junio y el de fructificación de agosto a febrero; las accesiones de *L. esculenta* florecieron de octubre a noviembre y fructificaron de febrero a marzo. Por su parte, las accesiones de *L. lanceolata* florecieron en el período de septiembre a octubre y fructificaron de noviembre a marzo, y de acuerdo con las observaciones realizadas en el campo, perdieron la mayoría de sus hojas, al igual que las accesiones de *L. esculenta*, durante el período de diciembre a abril (estación de seca), respuesta que pudiera estar relacionada con el estrés fisiológico al que se exponen en esta época, que puede afectar a unas especies más que a otras, según su capacidad de respuesta a factores bióticos o abióticos. En este sentido, Brewbaker y Sun (1996) encontraron un comportamiento similar al evaluar estas especies fuera de sus zonas de origen.

Las accesiones de *L. leucocephala* produjeron flores y frutos prácticamente durante todo el año, debido a que como plantean González *et al.* (2005), esta es una especie de floración heterogénea, cuyas semillas no maduran al mismo tiempo; aunque es importante plantear

que presentaron dos picos bien marcados de floración masiva, uno de febrero a marzo (con cosecha entre mayo y julio) y otra entre agosto y septiembre (con cosecha entre octubre y diciembre), según la accesión; mientras que las de *L. macrophylla* florecieron en el período de septiembre a diciembre y fructificaron de marzo a mayo.

El comportamiento de las accesiones de *L. lanceolata*, las cuales alargaron su ciclo de fructificación de noviembre a abril, y las de *L. macrophylla* de diciembre a febrero, puede que se deba a que los patrones fenológicos pueden manifestarse de forma muy diferente cuando los árboles crecen fuera de sus zonas nativas. Por otra parte, pudieron influir las condiciones edafoclimáticas presentes, las cuales en determinados lugares no son las idóneas para que las plantas manifiesten su capacidad de reproducción y adaptación al medio en que se encuentran, como refiere Hidalgo (2003); a la expresión genética de las plantas en determinados ambientes o a estreses fisiológicos. Por ejemplo, Anon (2002) observó en Taiwán que el florecimiento de todas estas especies tenía lugar de junio a agosto, excepto para *L. esculenta* que florecía de noviembre a enero. Similar comportamiento fue observado en Cuba por Machado (2006) en la Ciénaga de Zapata, donde predominan condiciones de suelo y clima diferentes a las del presente estudio.

En la tabla 4.7 se observan las diferencias fenotípicas o morfológicas entre en las accesiones. Todas las especies del género *Leucaena* poseen hojas bipinnadas y éstas y las pínulas son opuestas (anexo 6). 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 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 (anexo 7) pueden llegar a alcanzar valores superiores.

Igualmente, se observa que las accesiones de *L. leucocephala* presentan glándulas elípticas y cóncavas; mientras que las de *L. lanceolata* son redondas elípticas, en forma de cúpula, excepto para la accesión CIAT-17253, en la que no se observó la presencia de éstas a pesar de ser una de las características de la especie como tal.

Tabla 4.7 Principales características morfológicas de las accesiones evaluadas.

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

Leyenda:

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

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*

En el caso de las accesiones de *L. diversifolia* se encontraron glándulas discoideas, poco profundas, en forma de taza y elípticas o triangulares redondas; mientras que en las de *L. macrophylla* son elípticas, convexas, redondas y cónicas, excepto para la accesión CIAT-17231, que tampoco presentó glándula; para las accesiones de *L. esculenta* (anexo 8) son 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. También se les conoce como nectarios extraflorales (Hughes 1998a), debido a que se presentan en las hojas y secretan néctar; no todas lo hacen todo el tiempo, con frecuencia aparecen secas e inactivas, específicamente en las hojas más viejas.

Todas las accesiones tienen semillas ovaladas y coloración de carmelita claro a carmelita oscuro, al igual que las legumbres; presentan flores blancas, excepto *L. diversifolia* CIAT-17270 que tiene flores rosadas, rojizas o morado pálido. Como refiere Anon (2002) las flores, los frutos y las semillas son indicadores que sirven para identificar las especies de este género.

Durante las observaciones se apreció que las flores individuales de las especies y accesiones de *Leucaena* generalmente son pequeñas, de 5-15 mm de largo y arregladas en cabezuelas; según informes de Anon (2002), las anteras, los filamentos de estambres y el estilo son los que determinan el color de la flor, y no la corola y el cáliz, que están más cerca de la base.

Es conveniente resaltar que las flores individuales dentro de la cabeza son sostenidas por pequeñas brácteas (anexo 9); estas casi siempre son peltatas (están adjuntas a la superficie basal en vez de estar al margen de las brácteas, como en una sombrilla). Las brácteas sólo se observan cuando las flores están en la yema, momento en que cubren la cabeza, se esconden cuando éstas se abren y en la mayoría de las especies son redondas. Es válido señalar además que las flores de las especies y accesiones de este género están dispuestas en grupos de dos a cinco, en ocasiones hasta siete en los nudos, en los tallos y en las axilas de las hojas jóvenes en desarrollo o brácteas. En las accesiones de las especies *L. leucocephala* y *L. diversifolia*, los tallos en floración siguen creciendo y forman hojas después de la floración, con las legumbres formadas debajo del ápice del tallo. Según

Anon (2003) estos tallos tienen crecimiento indeterminado y se les llama auxotéticos. En este caso las legumbres maduran dentro y no en la periferia de la copa del árbol.

En las accesiones de las especies *L. lanceolata*, *L. macrophylla* y *L. esculenta*, las legumbres aparecen en grupos de uno a cuatro por cabezuela, pero en algunas especies puede haber de seis a 15 y hasta 45 (anexo 10); el tallo florecido deja de crecer después de florecer, las legumbres se forman en las puntas de los tallos en la periferia de la copa del árbol; a este tipo de tallo que tiene crecimiento determinado se le conoce con el nombre de anauxotético. Estos mueren después que maduran las legumbres.

Esta característica de producir flores, legumbres y semillas durante la etapa de establecimiento es muy importante, ya que manifiesta la lucha de las especies con el ambiente por la supervivencia. La importancia de esto radica en que la semilla es el punto de partida para cualquier sistema agropecuario que se desee fomentar y los agroforestales (silvopastoriles) no son una excepción. Por ello, es necesario y primordial el conocimiento del período de floración y fructificación de las plantas arbóreas, las características de sus semillas, al igual que su procesamiento después de la cosecha y los indicadores y condiciones para su almacenamiento, con vistas a lograr lotes de semillas de alta calidad que posibiliten el fomento de los sistemas silvopastoriles, los cuales garantizan **a posteriori** la biomasa comestible necesaria para incrementar la producción animal.

Las diferencias fenotípicas encontradas en cada una de las especies y accesiones de *Leucaena*, fueron informadas en estudios realizados por Hughes (1998a) y Ruiz y Febles (1987). El conocimiento de estas diferencias es de suma importancia a la hora de utilizarlas en el fomento de un determinado sistema, sea silvopastoril o no, ya que ello tiene marcada influencia en relación con el manejo que se les dé o 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 de definir cuándo debe realizarse o no la poda.

4.3 Capacidad de recuperación ante la poda

La fisiología de la defoliación y el rebrote constituyen asuntos medulares de la biología de las plantas, ya que constituyen los elementos básicos del manejo de los pastizales. En el orden práctico se busca respuesta a la influencia de la altura y frecuencia de defoliación (corte o pastoreo) en la dinámica de crecimiento y en el rendimiento durante el período de rebrote. La biomasa aérea de los árboles y los arbustos presentes en los sistemas silvopastoriles proporciona una parte de los alimentos a los animales que allí se desarrollan, por lo que el conocimiento adecuado de su manejo es fundamental para lograr un mayor nivel y estabilidad en la producción de biomasa a través de todo el año.

Dentro de este género, la especie *L. leucocephala* es una de las más estudiadas y utilizadas en los sistemas silvopastoriles (Hernández *et al.* 2000), lo cual está avalado, entre otros aspectos, por su alto valor proteico, además de ser utilizada como fuente de sombra (Molina *et al.* 2001), conservar y mejorar el suelo, producir grandes cantidades de biomasa y permitir el reciclaje de nutrientes (Sánchez 2007a), así como tener la capacidad de rebrotar después de ramoneada o cosechada de forma mecánica y de restablecerse rápidamente del estrés biótico o abiótico (Ruiz y Febles 2001b), aspecto muy importante a tener en cuenta cuando se emplea en dichos sistemas. A pesar de ello, el comportamiento entre las accesiones es diferente.

En la tabla 4.8 se presenta la relación de los caracteres evaluados en esta etapa. Se evidencian correlaciones significativas y que todas las variables están correlacionadas entre sí. No obstante, es necesario destacar las que se establecen entre el rendimiento y sus componentes por la importancia que revisten. Estos resultados coinciden con los obtenidos por diversos autores (Machado y Núñez 1994b y Anon 2002) en investigaciones de este tipo.

Tabla 4.8 Matriz de las correlaciones fenotípicas.

Indicador	Longitud del rebrote	Grosor del tallo	Rendimiento	Nrebrotos
Longitud del rebrote	-			
Grosor del tallo	0,783**	-		
Rendimiento	0,894**	0,847**	-	
Nrebrotos	0,809**	0,944**	0,942**	-

** La correlación es significativa al nivel 0,01
Nrebrotos: Número de rebrotos

Al realizar el ACP se obtuvo una sola componente, la cual explica el 86,11% de la variación total (tabla 4.9); todos los indicadores contribuyeron a expresar la varianza acumulada.

Tabla 4.9 Resultados del ACP y relación entre los indicadores evaluados.

Indicador	Componente principal
	CP 1
Longitud del rebrote (cm)	0,888
Número de ramas	0,865
Grosor del tallo (cm)	0,917
Rendimiento (kg MS/planta)	0,979
Número de rebrotes	0,985
Valor propio	4,31
Varianza (%)	86,11
Acumulado (%)	86,11

La variabilidad mostrada a través de los indicadores puede que se deba a la alta relación que existió entre estos en la etapa, o a la dinámica de crecimiento de cada accesión en particular (Dávila y Urbano 1996), lo cual puede estar relacionado con la reserva acumulada por las plantas y con la capacidad de utilización de ésta, y es expresión de la potencialidad genética particular de las especies de *Leucaena*. Dicho aspecto es de sumo interés para los sistemas silvopastoriles, ya que la capacidad de rebrote así como su adecuado desarrollo y rápido crecimiento, determinan su capacidad de utilización y pueden contribuir como indicadores de suma importancia a la selección de especies y accesiones forrajeras.

Es importante enfatizar lo señalado por Seguí *et al.* (1989), quienes plantearon que el conocimiento de las relaciones entre los caracteres de interés agronómico desempeña un papel significativo en el proceso de selección e indicaron que pueden ser ventajosas o no (relaciones deseables o no deseables). De esta forma, las accesiones que combinen caracteres deseables, como aceptable longitud de los rebrotes y número de rebrotes, se convierten en un material a considerar para los fines de explotación en los sistemas silvopastoriles en los que coexisten animales y plantas.

El análisis de conglomerados sobre la base de los resultados del ACP durante esta etapa permitió la formación de tres grupos (anexo 11), los cuales se presentan en la tabla 4.10, al igual que sus medias y desviaciones estándar.

Tabla 4.10 Distribución de los individuos, media y desviación estándar según el Análisis de Conglomerados.

Indicador	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS
Longitud del rebrote (cm)	6,37	0,25	5,32	0,17	5,83	0,02
Número de ramas	288,05	2,17	207,35	33,65	81,75	1,06
Grosor del tallo (cm)	22,31	0,27	13,04	3,93	13,60	0,14
Rendimiento (kg MS/planta)	28,81	0,38	21,90	0,88	21,90	0,14
Número de rebrotes	46,95	0,48	35,41	1,88	31,55	0,21
Grupo	Cantidad	Accesiones				
I	14	<i>L. leucocephala</i> cv. Cunningham, cv. Perú, CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929, CIAT-17480, cv. Ipil-Ipil, cv. CNIA-250, <i>L. lanceolata</i> CIAT-17255, CIAT-17501, <i>L. diversifolia</i> CIAT-17270				
II	7	<i>L. lanceolata</i> CIAT-17253, <i>L. diversifolia</i> CIAT-17503, <i>L. macrophylla</i> CIAT-17240, CIAT-17233, CIAT-17232, CIAT-17238, CIAT-17231				
III	2	<i>L. esculenta</i> CIAT-17225, CIAT-17229				

Atendiendo a los resultados de esta tabla, se puede deducir que 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, pertenecientes al grupo I, se caracterizaron por ser las plantas de mayor longitud de los rebrotes, de mayor grosor, mayor número de rebrotes y de mayores rendimientos, con respecto a las accesiones pertenecientes a los grupos II y III.

Es válido resaltar que el grupo I, tanto en condiciones de vivero como de establecimiento, está formado por las mismas accesiones, aspecto muy interesante ya que corrobora la posibilidad de seleccionar especies y accesiones desde etapas iniciales de evaluación (condiciones de vivero), sin necesidad de otras evaluaciones. Ello pudiera revelar, como ocurrió en condiciones de vivero y en la etapa de establecimiento, que se pueden encontrar individuos capaces de mostrar o no mejor comportamiento en relación con la capacidad de respuesta o de recuperación después de la poda, o como plantea Hidalgo (2003) pudiese estar asociado a la posibilidad genética de cada individuo de responder o no a las condiciones edafoclimáticas en las que se desarrollan, independientemente de la interacción de otros factores.

En la figura 4.3 se muestra un diagrama de líneas con una curva de ajuste que aproxima la relación entre el número de rebrotes y los días en cada uno de los grupos formados, donde se visualiza la tendencia ascendente de la emisión de nuevos rebrotes en cada uno de los grupos a medida que transcurren los días. El modelo que explicó con mayor bondad de ajuste esta relación ($R^2=0,98^{***}$, $R^2=0,96^{***}$ y $R^2=0,97^{***}$ respectivamente) fue el cuadrático (anexo 12). Como se puede observar para todas las accesiones, en los primeros 28 días, hubo una lenta emisión de nuevos rebrotes y a partir de los 35 días fue rápido su incremento, fundamentalmente en las que conformaron el grupo I.

Ello revela que estas accesiones, de modo general, mostraron capacidad de recuperación después de la poda de forma ascendente, aspecto que pudo estar influido por su capacidad de reciclar las reservas acumuladas durante el período de establecimiento. Este comportamiento quizás sea de índole específica de la especie (Pezo e Ibrahim 1999), pero es posible atribuirlo también a: la repartición de las reservas de carbohidratos no estructurales entre las diferentes partes de la planta (aérea y subterránea), la capacidad fotosintética del área foliar residual (Greaves *et al.* 1999), la presencia de un área adecuada de tejido parenquimático reservante y de tejido meristemático activo; y la capacidad de movilización y utilización de esas reservas; todos ellos son necesarios en el desarrollo del rebrote (Francisco y Simón 2001) y en esta investigación parece haber ocurrido de forma más eficiente en las accesiones pertenecientes al grupo I que en las de los demás grupos.

Con relación a ello, en estudios anteriores se determinó que las plantas de este género, especialmente de la especie *L. leucocephala*, poseen alta capacidad de rebrote aun en plena sequía, debido a las características de su sistema radical, el cual tiene un alto componente de raíces permanentes estructurales, así como un sistema de raicillas que son las responsables de la asimilación de agua y nutrientes en las capas más profundas del suelo, como aseveran Pezo e Ibrahim (1999). Al respecto, Ruiz y Febles (1987) refieren que las plantas del género *Leucaena*, especialmente las accesiones de la especie *L. leucocephala*, tienen la capacidad de rebrotar después de la poda o el ramoneo a través de la emisión de rebrotes. Sin embargo, de las demás especies no se conoce con exactitud cómo ocurre, por ser las menos utilizadas tanto a nivel nacional como internacional en las investigaciones realizadas. No obstante, se pudo comprobar que esto ocurre de forma diferente tanto entre especies como entre accesiones.

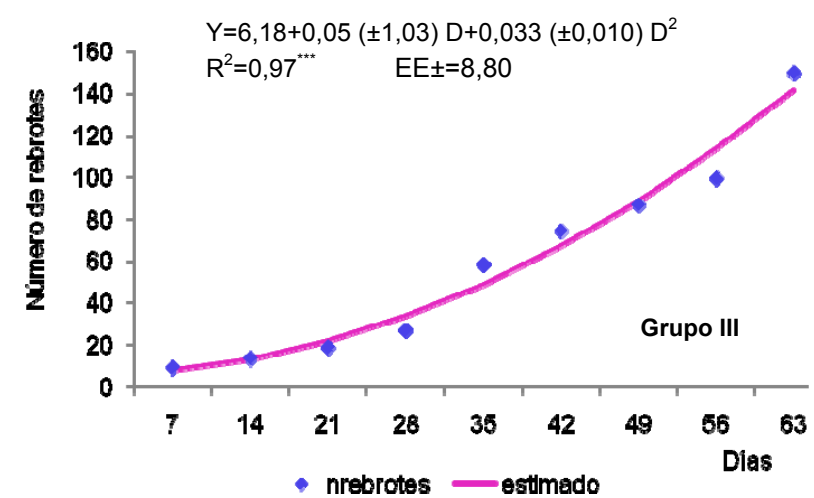
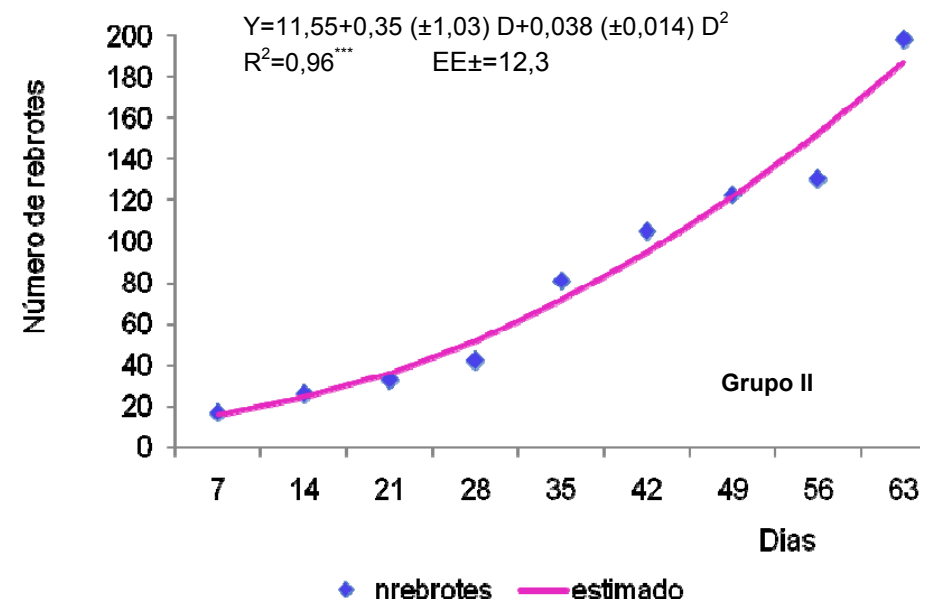
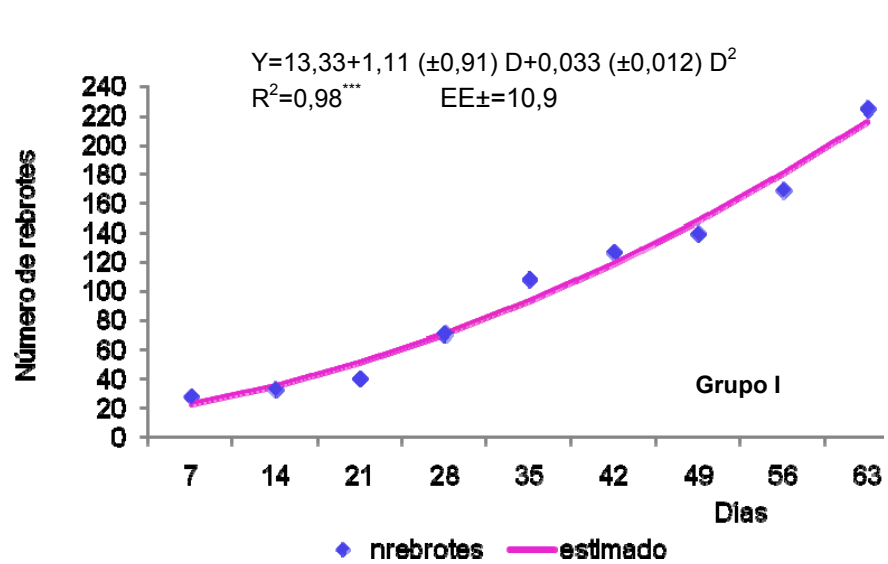


Figura 4.3 Diagrama de líneas con una curva de ajuste que aproxima la relación entre el número de rebrotes y los días por grupos.

En relación con lo planteado, existe consenso generalizado de que las reservas son importantes en los primeros días de rebrote (entre seis y ocho semanas) y que a partir de ese momento, el área foliar creada es capaz de suplir los carbohidratos y otras sustancias necesarias para el aumento ulterior y se hace evidente cuando se ha producido un período prolongado de reposo, sobre todo durante la época poco lluviosa. Sin embargo, este comportamiento en los primeros días puede ser variable, como se observó en las accesiones pertenecientes a los grupos II y III, en las cuales esta variabilidad se evidenció más que en las accesiones que forman el grupo I. En investigaciones realizadas al respecto en Cuba, Díaz (2006b) demostró que el consumo de lípidos fue intenso, entre las primeras dos y cuatro semanas, variando para la época lluviosa y la poca lluviosa.

No se debe olvidar que, a su vez, los elementos anteriores están vinculados con la disponibilidad de los recursos abióticos, como el agua y los nutrientes, y que las deficiencias nutricionales y el estrés hídrico disminuyen el rango de formación del rebrote y la actividad del tejido fotosintético, lo cual puede acelerar la senescencia de la hoja y disminuir la producción de biomasa comestible, aspectos que pueden sucederse independientemente de las similitudes y contrastes que pueden existir entre los grupos e incluso entre las accesiones que los conforman, como pudo haber ocurrido en esta investigación.

En la figura 4.4 se muestra un diagrama de líneas con una curva de ajuste que aproxima la relación entre la longitud de los rebrotes y los días en cada uno de los grupos formados. El modelo que explicó con mayor bondad de ajuste esta relación ($R^2=0,95^{***}$, $R^2=0,95^{***}$ y $R^2=0,96^{***}$ respectivamente) fue el cúbico (anexo 13). Se observa que a medida que transcurrieron los días hubo un incremento en la velocidad de crecimiento de los rebrotes para los tres grupos hasta los 56 días, independiente de la respuesta particular de las accesiones en estos grupos; aunque de manera análoga a la emisión de rebrotes, su crecimiento para el grupo I fue más acelerado que para las del grupo II. No obstante, entre los 56 y 63 días disminuyó la velocidad de crecimiento de las plantas, el cual coincidió con la altura de 2,48 y 180,6 cm.

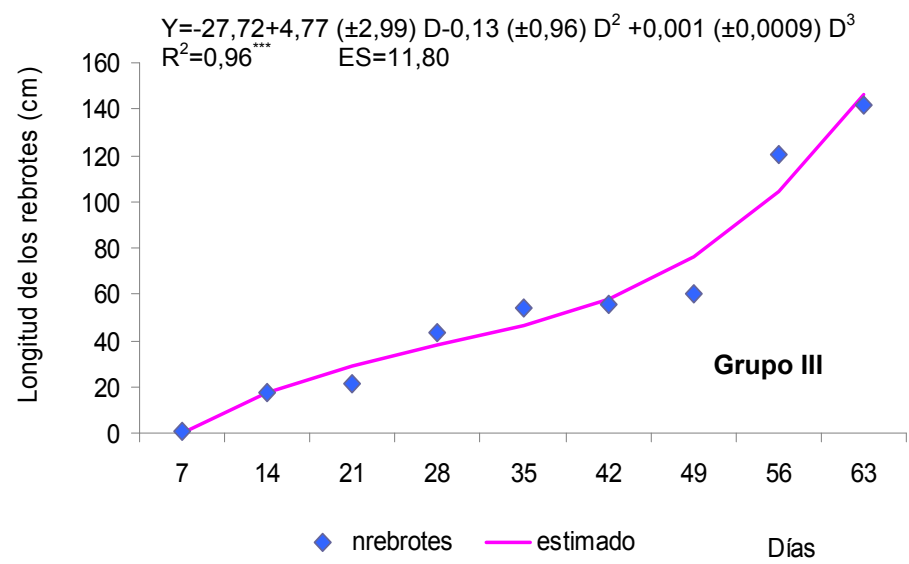
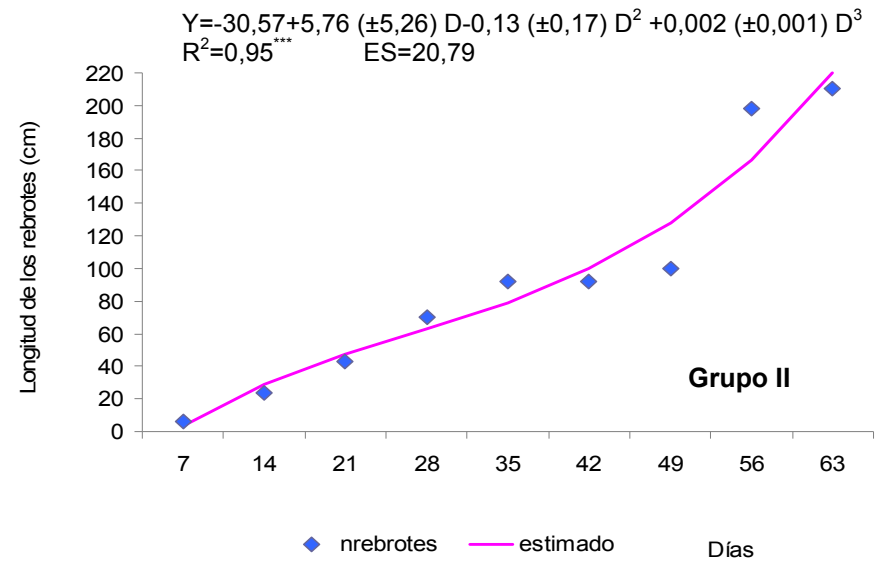
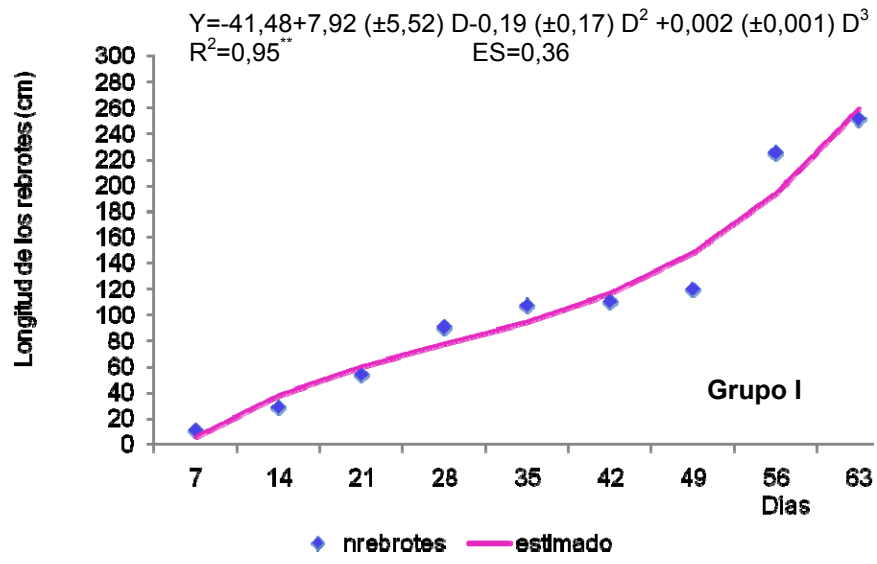


Figura 4.4 Diagrama de líneas con una curva de ajuste que aproxima la relación entre la longitud de los rebrotes (cm) y los días por grupos.

En el grupo I se constató la agrupación de tres accesiones (*L. lanceolata* CIAT-17255, CIAT-17501 y *L. diversifolia* CIAT-17270) que no son de la especie *L. leucocephala*, lo cual pudiese indicar que en ellas el ritmo de crecimiento de los rebrotes es muy similar al de esta especie, en lo que influye no sólo la accesión en cuestión, sino también la integración de varios factores. En este sentido, Voisin (1963) refirió que todas las plantas en su dinámica de crecimiento, en condiciones climáticas estables, describen una curva sigmoidea en tres etapas, a la cual le llamó la curva biológica universal. Los órganos de cualquier organismo también presentan estas características, de manera que el crecimiento de una planta cualquiera resulta de la integración de muchas curvas de cada uno de sus órganos, aspecto señalado también por Stür *et al.* (1994) para el caso de árboles medianos como la *Leucaena*.

En condiciones de campo, por efecto de las condiciones climáticas, estas curvas suelen alternarse en ocasiones, de manera que el carácter sigmoide de la curva no se observa de forma clara. En las condiciones de Cuba, varios autores, entre ellos Blanco (1996), han descrito curvas de crecimiento para los pastos tropicales, donde puede observarse que los intervalos de tiempo en que se producen sus estadios difieren de lo informado para los pastos templados. En el caso de los árboles y arbustos con fines forrajeros, estos principios también son válidos. Las plantas leñosas, sobre todo los árboles, se caracterizan por crecer muy lentas, si se comparan con las gramíneas, lo que constituye una dificultad en la etapa de establecimiento y posterior a esta en los sistemas silvopastoriles.

Al respecto, Díaz (2006b) plantea que las causas de este fenómeno en el caso de las gramíneas o las leguminosas herbáceas están relacionadas, en primera instancia, con la dinámica de crecimiento y expansión foliar, que es muy lento en sus inicios, sin descontar la partición de la biomasa con cierta prioridad durante las primeras semanas, hacia el sistema radical. Este último aspecto tiene mayor peso para las plantas adaptadas a condiciones de aridez (como buffel y alfalfa) y para las plantas leñosas está vinculado con el costo energético de la producción de tejido lignificado.

Como se puede observar en la figura 4.4, para los tres grupos hasta los 28 días hubo un lento crecimiento de los rebrotes, el cual puede depender de la especie y el grado de intensidad con que fue defoliada (por corte o por pastoreo con animales). Este comportamiento puede que esté relacionado con la poca cantidad de área foliar, la

capacidad de utilización de la reserva acumulada en las raíces y en la base de los tallos, el desarrollo del sistema asimilativo y la distribución de los fotoasimilados en los diferentes órganos. Según refiere Díaz (2006a) en este período la tasa fotosintética es alta y la respiración es baja, lo cual establece una relación positiva en la asimilación neta de la planta y, por consiguiente, un aumento en la acumulación de masa seca con predominio en las hojas.

Desde los 35 hasta los 56 días el crecimiento de los rebrotes se incrementó para todas las accesiones de los tres grupos, pero de forma más acelerada en las pertenecientes al grupo I. En este período, según indica Stür *et al.* (1994), se produce un marcado aumento en el área foliar, con un balance positivo entre la fotosíntesis y la respiración hasta alcanzar la máxima producción fotosintética. En esta etapa el crecimiento se hace relativamente constante e independiente de la variable que se mide, la cual expresa la tasa máxima de crecimiento del cultivo y acumulación de reservas.

Como informa Bonilla (2002) este período también se caracteriza por retrasarse la tasa de muerte de las estructuras morfológicas de la planta, en relación con el correspondiente aumento en la tasa del crecimiento de los tallos, lo que hace que se exprese una alta tasa de producción de tejidos y una tasa pequeña de muerte de los distintos componentes de la planta. Por ello, según refiere Díaz (2006a) la producción máxima por hectárea puede que no se corresponda con la fotosíntesis máxima, ya que depende de cómo se comporte la tasa de pérdida del tejido por muerte.

El comportamiento que presentaron las accesiones del grupo I con respecto a las de los grupos II y III puede que se deba a la interacción de diversos factores, independientemente de la respuesta de cada accesión en particular; debe considerarse además la respuesta de las plantas a las condiciones climáticas presentes, sobre todo las lluvias caídas, que aunque no sean tan significativas propician el buen desarrollo de los rebrotes y resultar más efectivas en unas accesiones que en otras.

La altura de corte (la cual en esta investigación fue a 1 m sobre el nivel del suelo) es otro de los elementos (Benjamín *et al.* 1999) que pudieron influir en el comportamiento observado, tanto en la emisión de rebrotes como en su crecimiento; a pesar de ello, la respuesta de las accesiones fue diferente. En este sentido, debe tenerse en consideración su profundo sistema radical y la cantidad de sustancias de reserva que tenga la planta.

Se debe señalar también que el corte del forraje en las distintas estaciones del año (seca y lluviosa) y en diferentes estadios de desarrollo (floración y vegetativo), tiene una estrecha relación y actúa en el comportamiento del rebrote. Los cortes al inicio o durante la etapa poco lluviosa, donde existe disminución del área fotosintéticamente activa y de la disponibilidad de agua, según describen Llamas *et al.* (2001), pueden provocar el agotamiento de las reservas orgánicas (como máxima fuente de su sustento), lo que conduce a la disminución del rango de formación del rebrote y los procesos de crecimiento de las plantas, como parece haber ocurrido en las accesiones pertenecientes a los grupos II y III.

A pesar de ello, la poda en esta etapa presenta diferentes ventajas (Cordero y Boshier 2003), entre las que se pueden mencionar: facilidad de realizarla cuando los árboles tienen poco follaje, rápido secado de los cortes y bajo riesgo de enfermedades, al haber menos humedad y cicatrización rápida de los cortes. Asimismo, es válido mencionar que se conoce que las podas reducen el follaje fotosintético, pero el remanente puede estar mejor expuesto a la radiación solar y aumentar la eficiencia de la conversión de energía, por lo que un árbol con baja densidad de área foliar puede interceptar mayor número de fotones por unidad de área foliar que un árbol con alta densidad, aunque como pudo observarse algunos responden de forma diferente. Como indican Berninger *et al.* (2000) la defoliación puede determinar en el nivel de agua de la planta, al aumentar la conductividad hídrica de la raíz a la hoja, y reducir las limitaciones causadas por el desajuste entre el suministro de humedad del suelo (raíces) y la demanda evaporativa (hojas).

El incremento de la emisión de rebrotes y su longitud de manera general, demostró la capacidad de recuperación de las accesiones; mientras que las diferencias entre los tres grupos formados evidenciaron contrastes entre las especies según su capacidad de utilización de las reservas acumuladas. La dinámica de emisión de rebrotes y la velocidad de crecimiento de éstos en forma acelerada, tanto en la etapa de establecimiento como en la recuperación después de la poda, es de gran importancia, ya que no sólo le permite al cultivo la supervivencia, sino también que sea utilizado como alimento animal, especialmente en la época poco lluviosa. Las accesiones mostraron capacidad de recuperación aceptable ante la poda a través del incremento de los rebrotes y su crecimiento; se destacaron, en este sentido, *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, pertenecientes al grupo I.

La emisión de nuevos rebrotes por parte de las plantas de este género, al igual que su crecimiento, mostró diferenciación en el comportamiento entre los grupos formados; por ello, la capacidad de recuperación después de la poda no debe indicarse de forma estática, sino tomando en consideración la interacción de diversos factores tanto bióticos como abióticos, así como la posibilidad o capacidad del genoma individual de cada accesión de responder o no al medio circundante.

En este período se realizaron también observaciones sobre el comportamiento de las afectaciones ocasionadas por enfermedades e insectos potencialmente plagas, aspecto que se trata a continuación, ya que constituye un elemento a considerar en el fomento y explotación de los sistemas silvopastoriles.

4.3.1 Incidencia de enfermedades e insectos potencialmente plagas

En las observaciones realizadas con relación a la incidencia de insectos potencialmente plagas, no hubo representatividad de las lesiones ocasionadas por ellos en las plantas muestreadas, que permitieran su cuantificación y análisis posterior. Sin embargo, con respecto a las enfermedades se observó la presencia de los síntomas que originan los agentes fungosos: a) *Meliola* sp. (Fumagina), b) *Camptomeris leucaenae* (Mancha foliar por *Camptomeris*) y c) *Colletotrichum capsici* (Mancha foliar o antracnosis), los cuales coinciden con los descritos por Lezcano y Alonso (2002) cuando evaluaron estas accesiones en condiciones de campo.

En la tabla 4.11 se hace referencia al índice de infección provocado por cada hongo en las accesiones evaluadas durante la época lluviosa y la poca lluviosa. En la primera época todas las accesiones fueron infectadas por las enfermedades antes mencionadas, excepto *L. lanceolata* CIAT-17501, *L. diversifolia* CIAT-17503 y *L. diversifolia* CIAT-17270, en las cuales no se observaron síntomas de la enfermedad foliar provocada por *Meliola* sp. Por su parte, *L. leucocephala* CIAT-9438 y *L. lanceolata* CIAT-17253 se mostraron inmunes a *C. leucaenae*; mientras que *L. macrophylla* CIAT-17232 y *L. macrophylla* CIAT-17238 se mantuvieron sin ser afectadas por *Meliola* sp. y *C. capsici*.

En esta época las tres enfermedades detectadas se manifestaron indistintamente en las accesiones muestreadas durante todos los meses (anexo 1). En mayo y octubre se

produjeron los mayores daños, lo que indica que se favoreció la presencia de dichos patógenos. En el caso de *L. leucocephala* cv. Cunningham, *L. leucocephala* cv. Perú, *L. leucocephala* cv. Ipil-Ipil y *L. leucocephala* cv. CNIA-250 (variedades comerciales), a pesar de no ser las más dañadas y que se consideran como resistentes (según la escala gradológica del anexo 1), se observó la presencia de dichas enfermedades.

Tabla 4.11 Comportamiento de la incidencia de las enfermedades foliares en las accesiones*.

No.	Especie	Accesión	Índice de infección/hongos					
			ELL			EPLL		
			a	b	c	a	b	c
1	<i>L. leucocephala</i>	cv. Cunningham	1,54	3,01	3,87	5,38	4,51	4,76
2		cv. Perú	1,54	3,01	3,47	5,38	4,51	4,76
3		CIAT-9119	3,55	3,01	3,18	4,91	4,51	4,56
4		CIAT-9438	3,55	0	3,47	5,38	4,51	4,56
5		CIAT-751	1,54	3,01	3,47	5,38	4,51	4,56
6		CIAT-7988	3,55	2,78	3,87	4,91	4,51	4,56
7		CIAT-7384	3,55	2,78	3,47	5,38	4,51	4,56
8		CIAT-7929	3,55	3,01	3,47	5,38	4,51	4,56
9		CIAT-17480	1,54	3,01	3,87	4,91	4,16	4,76
10		cv. Ipil-Ipil	1,54	3,01	3,18	5,38	4,51	4,56
11		cv. CNIA-250	1,54	3,01	3,18	5,38	4,51	4,56
12	<i>L. lanceolata</i>	CIAT-17255	1,54	3,01	3,87	5,38	4,51	4,56
13		CIAT-17501	0	2,78	3,87	5,38	4,51	4,56
14		CIAT-17253	1,54	0	3,47	5,38	4,51	4,56
15	<i>L. diversifolia</i>	CIAT-17503	0	2,78	3,47	4,91	4,16	4,07
16		CIAT-17270	0	2,78	3,47	5,38	4,51	4,07
17	<i>L. macrophylla</i>	CIAT-17240	3,55	2,78	3,87	4,61	4,51	4,07
18		CIAT-17233	1,54	3,01	3,47	5,38	4,51	4,07
19		CIAT-17232	0	3,01	0	4,61	3,93	0
20		CIAT-17238	0	2,78	0	3,99	3,93	0
21		CIAT-17231	3,55	2,78	3,87	4,91	3,93	4,07
22	<i>L. esculenta</i>	CIAT-17225	3,55	2,78	3,18	4,91	4,51	4,07
23		CIAT-17229	3,55	2,78	3,87	5,38	4,51	4,07

ELL: Época lluviosa; **EPLL:** Época poco lluviosa; **Enfermedades:** a= *Meliola sp.*, b= *Camptomeris leucaenae*, c= *Colletotrichum capsici*. * Tabla resumen del Anexo 1

La incidencia de las enfermedades en la época poco lluviosa mostró un comportamiento similar al de la anterior; todas las accesiones fueron atacadas por estas enfermedades fungosas, excepto *L. macrophylla* CIAT-17232 y *L. macrophylla* CIAT-17238 que se mantuvieron sin daños provocados por *C. capsici*.

Al igual que en la época lluviosa, los síntomas de las tres enfermedades aparecieron en la mayoría de las accesiones, pero con la diferencia de que los porcentajes de infectación fueron relativamente más altos. El bimestre marzo-abril (anexo 1) fue el de mayor

infectación, lo que indica que en estos meses se favoreció la presencia de dichos patógenos; ello puede que esté asociado a las condiciones climáticas, a las temperaturas y a la localidad donde se realizó el estudio. Resultados similares fueron informados por Lezcano y Alonso (2002).

Es válido resaltar que los resultados de este estudio, específicamente los referentes a la presencia de *C. leucaenae* en las accesiones de *L. leucocephala*, coinciden con los planteados por Lenné (1991), quien refirió que las accesiones de la especie anteriormente señalada son muy susceptibles a esta enfermedad; sin embargo, no se cumple lo expuesto por la autora con relación a la resistencia a dicho patógeno en las accesiones de *L. macrophylla*, *L. esculenta* y *L. lanceolata*, en las cuales también se observaron los síntomas causados por esta enfermedad, aunque en menor cuantía, lo cual pudiera revelar que en las condiciones de Cuba todas las especies son dañadas en mayor o menor grado.

Durante el período de evaluación la mayoría de las accesiones mostraron daños en el follaje; sin embargo, la presencia de enfermedades no ocasionó grandes afectaciones al área foliar como para que pudiera influir fuertemente en los rendimientos. Por lo tanto, se considera que este efecto no rebasó el umbral económico en el desarrollo de las plantas, ya que los valores de dichos indicadores se encuentran en el rango de inmunes a tolerantes, según se refleja en el anexo 1. Tales resultados coinciden con los informados por Toral *et al.* (2006), al evaluar germoplasma arbóreo forrajero de diferentes géneros (incluidas varias accesiones de *Leucaena*) en las condiciones de Cuba.

Tener en cuenta la incidencia de enfermedades e insectos potencialmente plagas en el germoplasma evaluado constituye un aspecto muy interesante, ya que los efectos negativos ocasionados por cualquier tipo de estrés, incluyendo las infecciones fungosas, pueden ocasionar cuantiosas pérdidas de la biomasa en términos cuantitativos y cualitativos, lo que ha sido objeto de innumerables trabajos (Olivera 2004; Lezcano y Alonso 2002) desarrollados con el germoplasma de estas y otras especies, tanto de las leguminosas como de las gramíneas. Con ello se demuestra que todas las accesiones se adaptaron en mayor o menor grado, a las condiciones de la investigación, y fueron tolerantes de acuerdo con el régimen de explotación al que fueron sometidas. No obstante, la incidencia de enfermedades e insectos potencialmente plagas es uno de los aspectos que deben ser estudiados con mayor profundidad.

4.4 Disponibilidad de biomasa y composición química

En los países tropicales, que no son productores por excelencia de granos y cereales, la búsqueda de estrategias de suplementación del ganado con los recursos propios que se generen en el área, constituye uno de los rasgos esenciales en la piedra angular de su panorama pecuario y en el grado de independencia y competitividad que este pueda alcanzar.

El follaje de los árboles y los arbustos se emplea en la alimentación animal desde tiempos remotos y parece ser el forraje preferido por los bovinos y algunas razas ovinas, particularmente en las sabanas áridas. En tiempos recientes, estas plantas son introducidas en sistemas de cultivo y pastoreo para suministrar forraje verde con alta concentración en proteína suplementaria para dietas de baja calidad; se cultivan en bancos o cercas, entre cultivos (cultivo de callejón) o como componentes de los pastizales y también como árboles para sombra; y se ha demostrado, con resultados palpables en la práctica, su potencial de contribución para los sistemas de producción animal en los trópicos (Leng 1997 y Sánchez 1999).

Uno de los indicadores más importantes en el proceso de evaluación y determinación de la potencialidad de las especies para incluirlas en los sistemas productivos es la producción de biomasa total, la fracción comestible y su aceptabilidad por parte de los animales. Partiendo de esta premisa, se desarrolló un ensayo durante dos años en el que se determinó, en las plantas establecidas, la biomasa total, la biomasa comestible, la biomasa leñosa, el grosor del tallo y el número de ramas de cada accesión.

En la tabla 4.12 se exponen los resultados de la producción media de biomasa de las accesiones de *Leucaena* y sus componentes, tanto en la época lluviosa como en la poca lluviosa de los dos años; este indicador no presentó diferencias significativas entre las accesiones, pero sí entre las épocas (excepto en la biomasa total).

En la biomasa comestible y sus componentes (hojas y tallos tiernos) existieron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las épocas de los dos años. Se pudo constatar que la producción en la época lluviosa fue mayor que en la poca lluviosa y aunque no hubo diferencias entre la producción media de biomasa de las accesiones (anexo 14), algunas de ellas produjeron más que otras. En este sentido, es válido acotar que en esta época del año las precipitaciones son mayores, al igual que la temperatura y la radiación solar, lo cual

favorece el crecimiento de todas las especies de plantas. Ello pudiera estar determinado por su capacidad para la movilización de las reservas dentro de la planta, que facilitó la emisión de rebrotes, como ha ocurrido en la especie *Gliricidia sepium* (García *et al.* 2001). Al respecto, Berninger *et al.* (2000) señalaron que las frecuencias de corte imponen cambios en la dinámica de todas las partes de la biomasa y, a su vez, en la movilización de las reservas de los carbohidratos, tan esenciales y determinantes para proporcionar el crecimiento de los rebrotes.

Tabla 4.12 Producción media de biomasa según la época del año (kg MS/planta).

Época	Biomasa comestible	Biomasa leñosa	Biomasa total
Primer año			
Época lluviosa	0,72	0,80	1,52 ^{ns}
Época poco lluviosa	0,69	0,82	1,51 ^{ns}
EE±	0,007*	0,007*	0,013^{ns}
Segundo año			
Época lluviosa	0,71	0,79	1,51 ^{ns}
Época poco lluviosa	0,68	0,81	1,49 ^{ns}
EE±	0,006*	0,006*	0,012^{ns}

*P<0,05, EE ±: Error estándar

El comportamiento de la disponibilidad de biomasa comestible en las demás accesiones (las de menor producción) puede que se deba a que, desde el punto de vista funcional, tuvieron mayor necesidad de uso de los carbohidratos de reserva de la raíz para sustentar el rebrote. Del mismo modo, pudieron haber influido otros factores tales como el CO₂, la luz, el uso de los nutrientes, la eficiencia de la fotosíntesis, la efectividad de la movilización de las reservas y, como refieren Llamas *et al.* (2001), las condiciones climáticas, ya que en los momentos en que la humedad del suelo se reduce, los procesos de crecimiento de las plantas son lentos y no todas las accesiones responden de la misma forma.

En este sentido, Whiteman y Lulham (1970) sugirieron que las interrupciones en el crecimiento, causadas por los cortes, en algunos casos provocan la movilización de los azúcares desde las raíces para apoyar el desarrollo de las nuevas hojas y esto afecta severamente su formación, lo cual puede ocurrir de manera diferente para cada una de las accesiones. Por su parte, Hernández *et al.* (2000) plantean que posiblemente esta afectación sea mayor si no están los recursos ambientales disponibles (principalmente agua) para que se logre un adecuado rebrote.

En cuanto a la cantidad de tallo leñoso (biomasa leñosa) también se observaron diferencias significativas entre las épocas y no entre las accesiones. La mayor producción ocurrió en la época poco lluviosa. Es aceptado por muchos investigadores, de manera general, que para todas las accesiones los intervalos de corte resultan en mayores cantidades de material leñoso y ello puede que se deba a la posibilidad que tiene la planta, al cortarse en períodos de tiempo más prolongados, de invertir mayor número de recursos en la formación de tejido leñoso. Según refiere Hernández (2000) este incremento guarda relación con la edad calendario de los rebrotes.

Esta respuesta puede que esté relacionada, además, con el tiempo de reposo en el que se mantuvieron las plantas antes del primer corte, lo que permitió que gran parte de las reservas acumuladas fueran utilizadas para alcanzar su máxima producción y una parte de los recursos excedentes fueran invertidos en la formación de tejidos leñosos (Stür *et al.* 1994) como consecuencia de la madurez de la plantación; mientras que la cantidad de hojas permaneció estable y la presencia de tallos tiernos fue escasa.

De la misma forma, debe señalarse que existe una relación directa entre la edad del rebrote y la presencia de tejido leñoso: a medida que se incrementa la edad (a partir del espaciamiento entre cortes) y el tiempo de permanencia del tejido en la planta, existe elevación de la adultez de las hojas y de la deposición de fracción leñosa (Nygren *et al.* 2000), lo cual ocurre de forma diferente, tanto para las especies como para las accesiones, como pudo haber sucedido en esta investigación.

Según informes de Stür *et al.* (1994) los efectos de la defoliación en los rendimientos en hojas, tallos tiernos y tallos leñosos de árboles medianos, en los que se incluyen las especies de *Leucaena*, representan una curva sigmoideal de crecimiento en tres etapas: la primera que ocurre después del corte (0-4 semanas) y se caracteriza por un lento rebrote debido a la poca cantidad de área foliar; esta seguida por un período de máxima productividad (4-10 semanas), en la cual se observa un marcado aumento de la producción de hojas; mientras que en la etapa final (10-24 semanas) se produce una alta intercepción de la luz y comienzan a caer las hojas viejas. Durante esta última etapa, según indican dichos autores, los árboles presentan incrementos en la altura y en la producción de biomasa leñosa, al contrario de lo que ocurre en la cantidad de hojas, la cual tiene pequeños incrementos o se mantiene más o menos estable.

En el caso de la biomasa total no se encontró diferencias significativas entre las épocas, lo que pudo estar relacionado con que las raíces de la *Leucaena* penetran en los estratos profundos del suelo y propician la extracción del agua; unido a esto presentan ruta fotosintética C₃, por lo que necesitan menos intensidad luminosa que las gramíneas, que tienen ruta fotosintética C₄ (Pérez-Infante 1977; Simón 1998). Este resultado coincide con el obtenido por Sánchez (2007b). De igual forma, este comportamiento puede que se deba al corte realizado en función de conocer la disponibilidad de biomasa de las plantas, ya que según plantean Papanastasis *et al.* (1998) los intervalos entre cortes o la frecuencia con que es podada la planta es un factor determinante en la proporción de la fracción vegetal (biomasa total, comestible o leñosa).

Por su parte, Hernández-Daumás *et al.* (2001) refieren que cuando se prolongan los intervalos, generalmente la cantidad de biomasa total se eleva y se presenta acumulación de tejido leñoso, a la vez que existe declinación de la fitomasa comestible; por el contrario, cuando se disminuyen los intervalos, la producción de biomasa decrece. En este sentido, es importante conocer que el momento óptimo para cosechar el follaje de las especies arbóreas es cuando existe la máxima producción de biomasa comestible; esto ocurre cuando dicha fracción representa del 50 al 60% del total producido (Francisco 2003) y se inicia la caída de las hojas en las ramas inferiores, lo cual varía con la especie, la densidad de plantación y las condiciones climáticas.

Asimismo, esta conducta puede que esté condicionada por la mayor cantidad de sustancias de reserva acumuladas en el tallo y la raíz durante el período de reposo (establecimiento) que antecedió a la evaluación y que puede que resulte más efectivo en unas accesiones que en otras, como se evidenció en la presente investigación, lo cual coincide con los resultados de Sánchez *et al.* (2000) y García *et al.* (2001), quienes plantean además que existe una relación directa entre los componentes de reserva en la producción de biomasa y la fortaleza del rebrote en las plantas arbóreas, así como una mayor inversión de recursos en los tejidos en la primera evaluación, debido a la máxima cantidad de reservas presentes en las plantas en el momento de la defoliación inicial, lo que hace que respondan con más vigor en su crecimiento.

En general, los valores de disponibilidad alcanzados para las accesiones de *Leucaena* fueron satisfactorios, si se toma en consideración (anexo 15) que permitió una oferta de

materia seca total entre 1,38 y 1,74 kg/árbol para ambas épocas; dichos valores fueron superiores a los encontrados por Toral *et al.* (2006) al evaluar el comportamiento del germoplasma arbóreo forrajero con especies de éste y de otros géneros, lo que pudiera sugerir que dentro del sistema debe valorarse la inclusión de especies de otro género, que crearía situaciones contrastantes en relación con su manejo.

En la tabla 4.13 se presentan los resultados de la composición química de las accesiones, en las épocas lluviosa y poco lluviosa de los dos años; no se hallaron diferencias significativas en el contenido de fibra bruta, de proteína bruta, de calcio y de fósforo en las especies y accesiones evaluadas (anexo 15), pero sí entre las épocas del año ($P \leq 0,05$), para todos los indicadores.

Tabla 4.13 Composición química según la época del año.

Época	FB	PB	Ca	P
Primer año				
Época lluviosa	19,93	25,96	1,88	0,19
Época poco lluviosa	22,90	23,96	1,76	0,17
EE±	0,459*	0,325*	0,038*	0,002*
Segundo año				
Época lluviosa	19,91	25,94	1,86	0,19
Época poco lluviosa	22,89	23,93	1,74	0,17
EE±	0,458*	0,323*	0,036*	0,002*

* $P < 0,05$, FB: Fibra bruta (%); PB: Proteína bruta (%); Ca: Calcio; P: Fósforo; EE ±: Error estándar. Como se puede observar, a diferencia de lo que de forma frecuente ocurre con otras plantas forrajeras como las gramíneas y las leguminosas herbáceas en similares condiciones agrotécnicas, ninguno de los indicadores sufrió variación a nivel de accesiones en sus valores por el efecto de la época. Esta característica posiblemente se deba a la menor dependencia de los nutrientes y el agua disponibles en las capas más superficiales del suelo, que presentan las plantas arbustivas y sobre todo las arbóreas, lo que les permite manifestar un comportamiento más estable a través de todo el año en cuanto a la composición química de su biomasa.

A pesar de que no se observaron diferencias significativas en la composición química entre las accesiones, se pudo apreciar que los valores en la época lluviosa fueron superiores a los de la poca lluviosa en los dos años, lo cual pudiera asimismo explicarse a través de la maduración de las plantas, en las cuales este proceso ocurre de forma más rápida, ya que según Cáceres *et al.* (2006) en este período se produce una mayor proporción de tallos que

de hojas, existe una mayor dilución de los nutrientes y un efecto adverso en el fisiologismo animal, lo que provoca que el valor nutritivo sea menor en una planta determinada a la misma edad y ocurre lo contrario en la poca lluviosa, en especial cuando se utiliza el riego y la fertilización.

En esta investigación se pudo constatar que la concentración de los componentes estructurales (fibra bruta) se comportó, para la totalidad de las especies estudiadas, entre el 18 y 25% (anexo 15). Los intervalos de corte (en este caso, la simulación del pastoreo) pudieron influir en la calidad del material cosechado, ya que se conoce que las frecuencias de defoliación pueden aumentar el contenido proteico y reducir la fibra bruta, con la remoción del follaje y su reemplazo por tejido más joven. Con relación a esto, Ferrer *et al.* (1999) consideran que los cortes disminuyen los contenidos de Ca e incrementan los de P; mientras que Clavero y Razz (1999) encontraron incremento del contenido de fibra neutro detergente (FND) y disminución de la proteína cruda a medida que transcurría el ciclo biológico de la planta, debido al aumento de los elementos estructurales y la reducción del número de hojas jóvenes.

Los análisis correspondientes a la composición química de las accesiones de *Leucaena* mostraron que poseen contenidos de proteína cruda superiores a los de los pastos tropicales y en varios casos también a los de los concentrados comerciales. Los valores hallados fueron superiores al 20%, lo cual coincide con lo informado por Pinto *et al.* (2002), Gutiérrez *et al.* (2000), Baldizán (2003), La O *et al.* (2005) y García *et al.* (2007). Resultados similares en cuanto a los contenidos proteicos han sido reportados también para éstas y otras accesiones de arbóreas por Aganga *et al.* (2000); González y Cáceres (2002), Cáceres *et al.* (2003) y Galindo *et al.* (2005). Los contenidos de PB observados permiten aseverar que las especies y accesiones evaluadas, de este género, tienen elevada homogeneidad en los contenidos proteicos. En el caso de la FB puede que indique la poca variación presentada por estas plantas en la fracción fibrosa.

Por ello, sería válido afirmar que los resultados en cuanto a los contenidos de PB y de FB están muy relacionados y que dependen de varios factores, tanto internos como externos, entre los cuales se señalan como fundamentales: la especie y la variedad, el estado de crecimiento y desarrollo, la edad, la fertilización o fertilidad del suelo, el uso de riego o no, la

época del año, las condiciones climáticas, los sistemas de explotación, la especie animal y la suplementación con otros alimentos, entre otros (Cáceres *et al.* 2006).

En relación con los últimos aspectos anteriormente mencionados, no debe olvidarse que a medida que las plantas crecen aumenta la necesidad de tejidos de sostén y de carbohidratos estructurales, entre ellos celulosa, hemicelulosa y lignina; disminuye el contenido de sustancias nitrogenadas y otras sustancias orgánicas, y por consiguiente su valor nutritivo. Debido a ello, este es máximo en los forrajes jóvenes y se mantiene elevado hasta el principio de la floración, para decrecer más o menos rápidamente, en dependencia de las condiciones climáticas y la fertilización (que pueden ejercer una influencia importante, al acelerar o retardar el estado fisiológico de la planta), además de la especie o variedad.

A pesar de que no se observaron diferencias significativas entre las accesiones, las pertenecientes a *L. leucocephala* presentaron mayores contenidos de PB que las de las demás especies (anexo 15), por lo que es válido aclarar que la mayoría de los individuos evaluados son diploides, excepto las pertenecientes a la mencionada especie que son tetraploides; de ahí que su valor nutritivo sea mayor que en las demás, aspecto que coincide con lo reportado por Cáceres *et al.* (2006).

Los contenidos de calcio (Ca) y fósforo (P) en las accesiones se hallaron dentro del rango de valores para este género (Shelton y Brewbaker 1994 y Anon 2000). No obstante, según reportes de Sánchez (2007b) se pueden catalogar de bajos para la producción animal; de ahí la necesidad de la suplementación con este mineral a los animales que las pastorean, si se tiene en consideración su importancia en la reproducción de las vacas y en su metabolismo. Es significativo señalar que la carencia de P en las dietas constituye un problema para la nutrición adecuada de los animales, debido al bajo contenido que presentan los pastos tropicales, lo cual se acentúa en los suelos deficientes en este mineral (Rolo 1999). Es reconocido que la composición botánica del pastizal, la disponibilidad de materia seca y el valor nutritivo de los forrajes son indicadores indispensables, entre otros, para valorar la potencialidad de un sistema tanto para la producción de leche como de carne, ya que desempeñan un papel fundamental en la utilización del alimento disponible por parte de los animales.

Según informes de varios investigadores (Funes y Paretas 1986; Valdés y Planas 1999 y Molina *et al.* 2000), los pastos y los forrajes representan el cultivo más extendido en la agricultura cubana y constituyen la base de la alimentación del ganado; dentro de ellos, los pastizales naturalizados o nativos representan la mayor parte de las especies vegetales que hoy se encuentran presentes en los ecosistemas ganaderos cubanos, los cuales poseen características genéticas desarrolladas de resistencia, que les permiten adaptarse a las condiciones desfavorables del medio ambiente. No obstante, se ha demostrado la incapacidad que tienen la mayoría de las especies para lograr producciones de alimentos en la cantidad y con la calidad que requieren los animales (Funes *et al.* 1986 y Gómez *et al.* 2006).

De ahí que la inclusión de árboles y arbustos en la ganadería y el fomento de sistemas silvopastoriles, se deba a la necesidad de reemplazar los ecotipos de bajo valor nutritivo y productividad (Guillot *et al.* 2002) y que en las condiciones actuales alcance un valor altamente significativo, debido a todos los beneficios que reportan de manera general, además de posibilitar el aumento de la biodiversidad. Por ello, la introducción de nuevas especies y accesiones de éstos, es una tarea de vital importancia para el mejoramiento de la dieta alimenticia de los animales (en términos de cantidad y calidad).

Basado en la problemática descrita, se procedió a seleccionar las accesiones de mejor comportamiento en función de los indicadores evaluados y considerando diferentes criterios evaluativos (tabla 3.3). Las accesiones seleccionadas debían cumplir con dos o más de los criterios considerados. Para ello se realizó un análisis de componentes principales (ACP), que permitió constatar que en la formación de las dos primeras componentes se extrajo el 69,95% de la variabilidad (tabla 4.14).

En la primera componente, los indicadores que más contribuyeron en su formación fueron el contenido de proteína, el rendimiento de MS (kg/planta), la disponibilidad de biomasa comestible, la disponibilidad de biomasa leñosa, el número de ramas y el contenido de fibra cruda, los cuales estuvieron positivamente relacionados entre sí y explicaron el 47,13% de la varianza; mientras que la segunda componente extrajo el 22,81% de la varianza total, explicada por los indicadores altura de la planta y grosor del tallo.

A pesar de que el contenido de fibra cruda se encuentra dentro de los indicadores que más influyeron en la formación de la CP1, se debe enfatizar que esta influye en que el alimento

sea más o menos consumido o aprovechado. Generalmente los alimentos más fibrosos son menos apetecibles (Iglesias *et al.* 2006) para los animales y ello repercute de forma negativa en la producción animal (tanto en la producción de leche como en la de carne), a pesar de que debe existir un balance adecuado entre el contenido de proteína y el de fibra, para mantener el buen funcionamiento del rumen. La variabilidad encontrada se relacionó con indicadores de gran importancia, los cuales pueden ser valorados como componentes morfológicos del rendimiento, de la composición química y de la arquitectura de la planta.

Tabla 4.14 Resultados del ACP y relación entre los indicadores evaluados.

Indicador	Componente principal	
	CP 1	CP 2
Altura de la planta (cm)	-0,325	0,887
Grosor del tallo (cm)	0,604	0,716
Número de ramas	0,709	0,064
Rendimiento (kg MS/planta)	0,779	0,160
Biomasa comestible (kg MS/planta)	0,730	0,145
Biomasa leñosa (kg MS/planta)	0,708	0,212
Fibra cruda	0,700	-0,554
Proteína bruta	0,843	0,597
Valor propio	3,77	1,82
Varianza (%)	47,13	22,81
Acumulado (%)	47,13	69,95

A partir del análisis de los resultados (anexo 16) se elaboró la tabla 4.15. En esta aparecen tres grupos (clusters), formados de acuerdo con un criterio conjunto entre la estadística multivariada y el comportamiento biológico, y se analizan todos los indicadores que se presentan en la tabla 4.14. Se puede plantear que las accesiones pertenecientes al grupo I se caracterizaron por ser las plantas más altas, más ramificadas, con mayores rendimientos, mayor disponibilidad de biomasa comestible y mayor contenido de proteína bruta, respecto a las pertenecientes a los demás grupos formados y, por ende, son las seleccionadas, ya que cumplen con seis de los criterios evaluativos considerados. Dentro de este grupo se encuentran las accesiones *L. leucocephala* CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929 y CIAT-17480; *L. lanceolata* CIAT-17255 y CIAT-17501, y *L. diversifolia* CIAT-17270, además de las cuatro variedades conocidas como comerciales: *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú, cv. Ipil-Ipil y cv. CNIA-250.

Las asociaciones halladas entre los diferentes indicadores se corresponden con lo señalado por diversos autores (Hughes 1998a y García *et al.* 2007), quienes informaron asociaciones

entre la altura, el número de ramas, el grosor del tallo y el rendimiento de biomasa, entre otros. De este modo, resultaría conveniente emplear las fuentes de las especies menos utilizadas para un mejor aprovechamiento de la variabilidad genética, en especial como fuentes de tolerancia a factores medioambientales no óptimos, aunque se deben señalar los beneficios que se lograrían utilizando en los programas de mejoramiento genético del cultivo, accesiones de *L. diversifolia*, *L. shannonii* y *L. gregii*, para lograr individuos resistentes a diferentes condiciones limitantes (Hughes 1998b).

Tabla 4.15 Distribución de los individuos, medias y desviación estándar según el Análisis de Conglomerados.

Indicador	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
	X	DS	X	DS	X	DS
Altura de la planta (cm)	6,77	0,21	4,32	0,17	6,25	0,07
Grosor del tallo (cm)	4,80	0,33	2,40	0,08	3,10	0,14
Número de ramas	164,60	2,76	123,57	1,82	113,25	3,18
Rendimiento (kg MS/planta)	15,77	1,12	14,42	0,70	14,45	0,10
Biomasa comestible (kg MS/planta)	0,70	0,07	0,64	0,26	0,64	0,02
Biomasa leñosa (kg MS/planta)	0,69	0,05	0,74	0,02	0,74	0,01
Proteína bruta	26,75	1,54	22,62	0,39	24,79	0,21
Fibra cruda	20,48	0,68	22,32	2,94	25,90	0,26
Grupos	Cantidad		Accesiones			
I	14		<i>L. leucocephala</i> cv. Cunningham, cv. Perú, CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929, CIAT-17480, cv. Ipil-Ipil, cv. CNIA-250, <i>L. lanceolata</i> CIAT-17255, CIAT-17501, <i>L. diversifolia</i> CIAT-17270,			
II	7		<i>L. lanceolata</i> CIAT-17253, <i>L. diversifolia</i> CIAT-17503, <i>L. macrophylla</i> CIAT-17240, CIAT-17233, CIAT-17232, CIAT-17238, CIAT-17231			
III	2		<i>L. esculenta</i> CIAT-17225, CIAT-17229			

En Cuba y en otras áreas latinoamericanas existe poca información acerca de estos estudios con grupos de accesiones de este género y de otros géneros de plantas arbóreas. Por ello, se considera que la secuencia experimental utilizada en esta evaluación constituye una metodología adecuada para identificar y seleccionar accesiones de arbóreas promisorias con fines silvopastoriles. El trabajo desarrollado mediante el empleo de dos variantes del análisis multivariado, permitió seleccionar accesiones de *Leucaena* con el objetivo de valorar sus potencialidades para incluirlas en el fomento de nuevas áreas donde se emplee el silvopastoreo.

Esta investigación facilitó definir las accesiones anteriormente mencionadas como promisorias, ya que combinaron caracteres aceptables, tales como el número de ramas, el

rendimiento de biomasa y el contenido de proteína, entre otros, lo cual las convierte en un material excelente para incluirlas en el sistema silvopastoril, donde coexisten con otras plantas y animales. Ello posibilitaría el incremento de la diversidad de plantas a utilizar, de forma tal que se puedan emplear variantes o alternativas para contrarrestar diferentes inconvenientes tales como: el estrés, el ataque de insectos potencialmente plagas y enfermedades u otras causas.

No puede dejar de mencionarse elementos de importancia, como lo relacionado con el manejo estratégico que pudiera estabilizar y prolongar, por varios años, la vida productiva de las áreas de plantas arbóreas dedicadas a la producción de alimento animal, en lo cual debe profundizarse; y además la necesidad de la replicación biológica, no sólo en espacio sino en tiempo, de dichas investigaciones o estudios. Esto último es una característica esencial en el estudio de los pastos y los forrajes, independientemente de sus objetivos, y debe ser valorada de manera adecuada y considerando los recursos locales con los que se cuenta.

4.5 Detección del polimorfismo isoenzimático

Los estudios de polimorfismo isoenzimático en colecciones de germoplasma, pueden ser útiles para el informe y mantenimiento de la diversidad genética presente en las colecciones. Las isoenzimas han sido utilizadas para estudiar la dinámica poblacional, agrupar los sistemas de varias especies y estimar la variabilidad genética presente en especies y accesiones de diferentes cultivos (Acosta 1999 y Florido 1999).

Las técnicas electroforéticas hacen posible el estudio de la variación genética y de las similitudes y diferencias entre organismos en el ámbito de su composición enzimática o proteica. Esto permite realizar la caracterización, a nivel molecular, de la cantidad y el tipo de variabilidad genética existente entre especies estrechamente relacionadas (Álvarez 2005), dado que en este caso la variación de los patrones de bandas, en general, puede ser directamente igualada a la variación en el código genético para las proteínas variantes (Harris *et al.* 1994a y Chamberlain *et al.* 1996).

El polimorfismo enzimático constituye un aspecto particularmente interesante en la variabilidad fenotípica, ya que al ser ésta representativa de sistemas genéticos bastante simples, brinda un reflejo directo de la variabilidad genética. Dada su utilidad como instrumento capaz del marcaje genético, se desarrolló este estudio encaminado a determinar el polimorfismo isoenzimático de las accesiones evaluadas, como complemento de los trabajos de caracterización y evaluación morfológica y agronómica.

Debido al alto contenido de metabolitos secundarios presentes en las accesiones del género *Leucaena* (el cual varía en dependencia de la especie), según informes de Clavero (1998) y García (2003), en las extracciones enzimáticas con sacarosa al 20%, tal y como se realiza en otros cultivos (anexo 2), se observaron muestras muy viscosas y pigmentadas, las corridas electroforéticas fueron muy lentas y los perfiles tenían poca definición. Por ello, y sobre la base de estudios isoenzimáticos reportados para especies de este género (como *L. shannonii*), se probó con el buffer de extracción empleado por Chamberlain *et al.* (1996), en el cual se utilizó gel buffer con pH 8,3 compuesto por 5,4 g Tris-base, 1,28 g ácido cítrico en 1 L de H₂O y buffer de extracción con 50 mL buffer, 40 mg KCl, 100 mg MgCl₂, 18 mg EDTA (sal disódica), 0,5 mL Tritón X-100, 2 mL 10% DTT y 2 g PVP-40, y se observaron bandas muy tenues y aún poco definidas.

Se le hicieron varios ajustes al protocolo empleado (anexo 2) por Chamberlain *et al.* (1996), hasta que se estandarizó el método de extracción de los sistemas isoenzimáticos utilizados. Se empleó un buffer Tris-Citrato pH 8.3 al que se le añadió KCl 0,08%, MgCl₂ 0,2%, EDTA 0,04%, 0,5 mL de Tritón X100 1%, 2 mL 10% DTT y 25 mg PVP-40 4%, con el cual se obtuvieron los resultados que se exponen a continuación.

De los sistemas isoenzimáticos probados, peroxidasa (*Prx*), α - y β - esterasas (*Est*) y alcohol deshidrogenasa (*Adh*), los primeros fueron polimórficos, a diferencia del último en el cual no se visualizaron las bandas. En las figuras 4.5 y 4.6 se observan los patrones isoenzimáticos para los sistemas peroxidasa y α - y β - esterasas. El análisis cualitativo de la composición electroforética de los sistemas mencionados en el tejido foliar, permitió apreciar un total de 23 bandas en las 23 accesiones estudiadas.

En el diagrama electroforético de isoenzimas peroxidasa (figura 4.5), aunque se detectaron solamente cuatro patrones isoenzimáticos en toda la muestra, se constató la existencia de alta actividad enzimática, pues este sistema presentó un total de nueve bandas bien definidas, de las cuales tres (cuatro, cinco y nueve) fueron comunes para la mayoría de las accesiones; se mostraron diferentes las accesiones *L. macrophylla* CIAT-17232 (19), perteneciente al patrón 3, y *L. esculenta* CIAT-17225 (22) y CIAT-17229 (23), pertenecientes al patrón 4.

Las bandas uno y dos resultaron ser las de mayor movilidad electroforética, con 0,630 y 0,583 unidades, y sólo estuvieron presentes en las accesiones *L. macrophylla* CIAT-17232 (19) y *L. diversifolia* CIAT-17503 (15), respectivamente. Asimismo, la banda de 0,550 unidades estuvo presente únicamente en la accesión *L. diversifolia* CIAT-17503 (15). Las bandas de 0,467 y 0,300 unidades caracterizaron a casi todas las accesiones, excepto a *L. diversifolia* CIAT-17503 (15), *L. macrophylla* CIAT-17238 (20) y *L. esculenta* CIAT-17225 (22). Estas dos últimas accesiones presentaron en común la banda seis (0,183 unidades), al igual que la banda ocho (0,167 unidades); sin embargo, la banda de 0,157 unidades, común a todas las accesiones, estuvo ausente en *L. macrophylla* CIAT-17232 (19); mientras que la banda 0,173 unidades sólo se presentó en esta accesión.

Es importante señalar que el patrón 1 (anexo 17) fue común para las accesiones *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú, CIAT-9119, cv. CNIA-250, CIAT-9438, CIAT-7929, CIAT-17480, CIAT-7384, CIAT-7988, cv. Ipil-Ipil y CIAT-751, *L. lanceolata* CIAT-

17501, CIAT-17255 y CIAT-17253, *L. diversifolia* CIAT-17270, *L. macrophylla* CIAT-17240, CIAT-17233, CIAT-17231 y CIAT-17238.

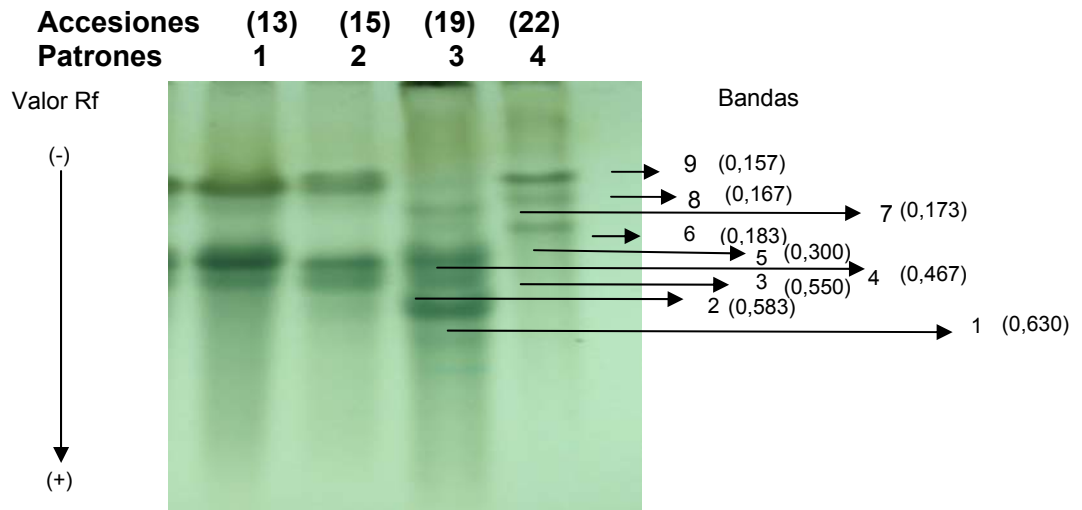


Figura 4.5 Patrones del sistema isoenzimático peroxidadas (*Prx*).

13. *L. lanceolata* CIAT-17501, 15. *L. diversifolia* CIAT-17503; 19. *L. macrophylla*, CIAT-17232; 22. *L. esculenta* CIAT-17225. Los números representan el total de bandas y los que están entre paréntesis el valor de Rf

Las isoenzimas peroxidadas (*Prx*) mostraron dos zonas principales de actividad enzimática en *L. lanceolata* CIAT-17501 (13) y *L. diversifolia* CIAT-17503 (15), al igual que lo encontrado por Harris *et al.* (1994a) para *L. leucocephala*. En el caso de *L. macrophylla* CIAT-17232 (19) y *L. esculenta* CIAT-17225 (22) fue hallada una sola zona de actividad, similar a lo reportado por Chamberlain *et al.* (1996) en *L. shannonii*.

Diversos estudios realizados han permitido conocer que este sistema de isoenzimas es uno de los más empleados en los estudios genético-bioquímicos en diferentes géneros de plantas, por ser de los más polimórficos y por la estabilidad y reproducibilidad de sus bandas, además del importante papel que ellas desempeñan, según describen Díaz *et al.* (2001), en la biosíntesis de los componentes de la pared celular, así como en la regulación del crecimiento, la diferenciación celular y su relación con la resistencia a factores adversos tanto bióticos como abióticos.

Similar polimorfismo isoenzimático (figura 4.6) se observó en la composición del sistema isoenzimático α - y β -esterasas (*Est*), que permitió apreciar mayor presencia de bandas en la accesión *L. macrophylla* CIAT-17232 (19) con respecto a las restantes accesiones. En

este sistema isoenzimático se observaron un total de 14 bandas, de las cuales la banda 14 (0,110 unidades) es común para todas las accesiones.

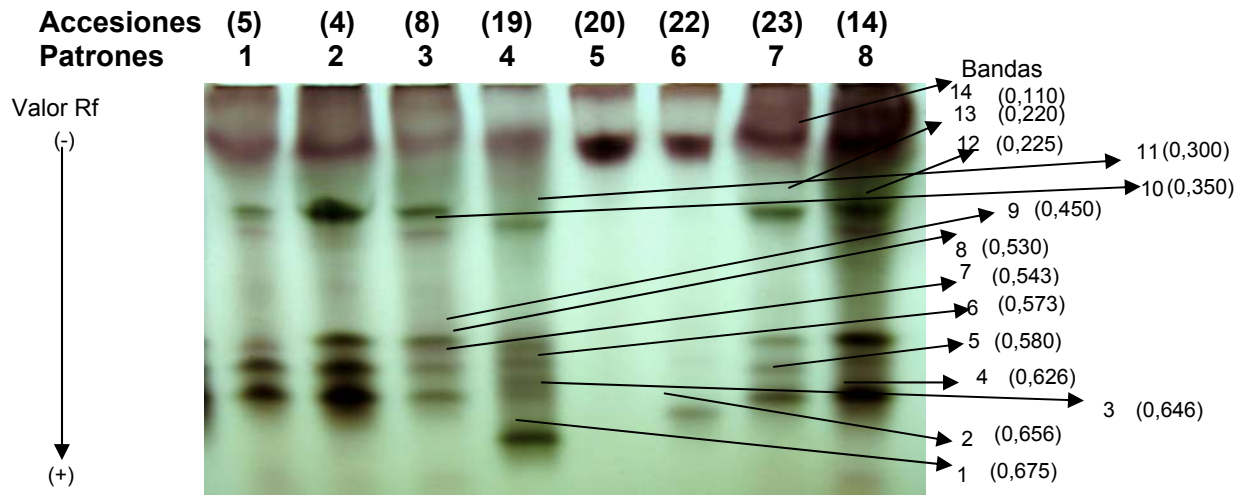


Figura 4.6 Patrones del sistema isoenzimático esterasas (*Est*).

4. *L. leucocephala* CIAT-94385; 5. *L. leucocephala* CIAT-751; 8. *L. leucocephala* CIAT-7929; 14. *L. lanceolata* CIAT-17253; 19. *L. macrophylla* CIAT-17232, 20. *L. macrophylla* CIAT-17238; 22. *L. esculenta* CIAT-17225; 23. *L. esculenta* CIAT-17229. Los números representan el total de bandas y los que están entre paréntesis el valor de Rf

En este sistema las bandas de mayor movilidad electroforética fueron la uno (0,675 unidades) y la dos (0,656), la primera es común sólo para la accesión *L. macrophylla* CIAT-17232 (19), al igual que las bandas cuatro, ocho y once (0,626, 0,530 y 0,300 unidades, respectivamente), y la segunda, en las accesiones *L. esculenta* CIAT-17225 (22) y *L. esculenta* CIAT-17229 (23). La banda tres (0,646 unidades) estuvo presente en la mayoría de las accesiones, excepto en *L. macrophylla* CIAT-17238 (20), que tiene la banda 13 (0,220 unidades) como común. La banda 12 (0,225 unidades) no está presente en *L. esculenta* CIAT-17225 (22) ni en *L. esculenta* CIAT-17229 (23), en esta última se encuentran ausentes además las bandas seis (0,573), siete (0,543), 10 (0,350) 11 (0,300) y 13 (0,220).

En este caso el patrón 1 fue común para las accesiones *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú, CIAT-9119, cv. CNIA-250, CIAT-9438, CIAT-17480, CIAT-7384, CIAT-7988, cv. Ipil-Ipil y CIAT-751, *L. lanceolata* CIAT-17255 y CIAT-17501, *L. diversifolia* CIAT-17270 y CIAT-17503; y el patrón 4 para las accesiones *L. macrophylla* CIAT-17240, CIAT-17233 y CIAT-17238 (anexo 17).

Con respecto a las isoenzimas α - y β - *Est*, se debe señalar que están constituidas por un grupo complejo de proteínas asociadas con proteínas intracelulares específicas que presentan 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* en el tejido foliar; este resultado está en correspondencia con lo planteado por Loulakis y Roubelakis (1990) y 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); aunque no debe descartarse que esto puede deberse a problemas de concentración de las muestras, manejo de estas o sensibilidad de la técnica.

Con 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. Mientras que Lefèvre y Charrier (1993), al trabajar con hojas jóvenes no expandidas y polen de yuca, encontraron polimorfismo en 10 sistemas enzimáticos. Por ello pudiera inferirse que para las accesiones estudiadas sólo pueden recomendarse los sistemas de peroxidasas y α y β estererasas, independientemente de que debe probarse con otros que se hayan utilizado en diferentes cultivos.

En cambio, en hojas adultas y raíces reservantes de yuca Polanco (1998) probó 16 sistemas isoenzimáticos y halló polimorfismo en malato deshidrogenasa (*Mdh*) para la raíz, y en α y β -*Est* para las hojas y las raíces. Es conocido que la inactividad de los sistemas enzimáticos puede deberse a las condiciones fisiológicas y la edad de la planta, mientras que la inconsistencia puede que sea por alta sensibilidad de la enzima a pequeños cambios.

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. Asimismo, debe considerarse que las isoenzimas son de expresión génica, y por lo tanto, dependen del tipo de tejido y de su desarrollo, por lo que la ausencia de bandas en los diferentes patrones isoenzimáticos no sólo se debe a las necesidades 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 que se les dé, el clima, la presencia o no de enfermedades y la posición del órgano que se muestrea, entre otros.

En la tabla 4.16 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*).

Tabla 4.16 Frecuencia de cada patrón isoenzimático en la muestra de 23 accesiones estudiadas.

<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	-	

Se comprobó la existencia de alta resolución electroforética para dichos sistemas (tabla 4.17), lo que indica que son de utilidad en la evaluación del polimorfismo varietal en este material y demuestra que las enzimas peroxidasa y esterasa son las más recomendadas por su polimorfismo, como refieren Schmidt *et al.* (2003). 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, se ha determinado que las isoenzimas peroxidasas y esterases se encuentran entre los sistemas más polimórficos en las plantas (Fuentes *et al.* 1999).

Tabla 4.17 Análisis integral de la variabilidad genética.

	Est	Prx
Bandas polimórficas	11	10
Bandas monomórficas	1	-
Bandas totales	12	10
Índice de polimorfismo	92%	100%

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, lo cual se corresponde con lo reportado acerca del alto polimorfismo de este sistema para otras especies vegetales (Schmidt *et al.* 2003).

Partiendo de la frecuencia de aparición de las bandas de los sistemas isoenzimáticos mediante el programa SHAN, se obtuvo el dendrograma de la figura 4.7, en el que se muestra el agrupamiento de las accesiones evaluadas en tres grupos (I, II y III). El grupo I estuvo conformado 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 encuentra la accesión *L. macrophylla* CIAT-17232 y en el grupo III están *L. macrophylla* CIAT-17238 y *L. esculenta* CIAT-17225.

Las especies *L. macrophylla*, *L. lanceolata* y principalmente *L. esculenta* y *L. diversifolia*, no formaron grupos bien definidos en el dendrograma, aspecto a destacar puesto que en las agrupaciones en relación con los caracteres morfoagronómicos, de forma general se observó un comportamiento similar.

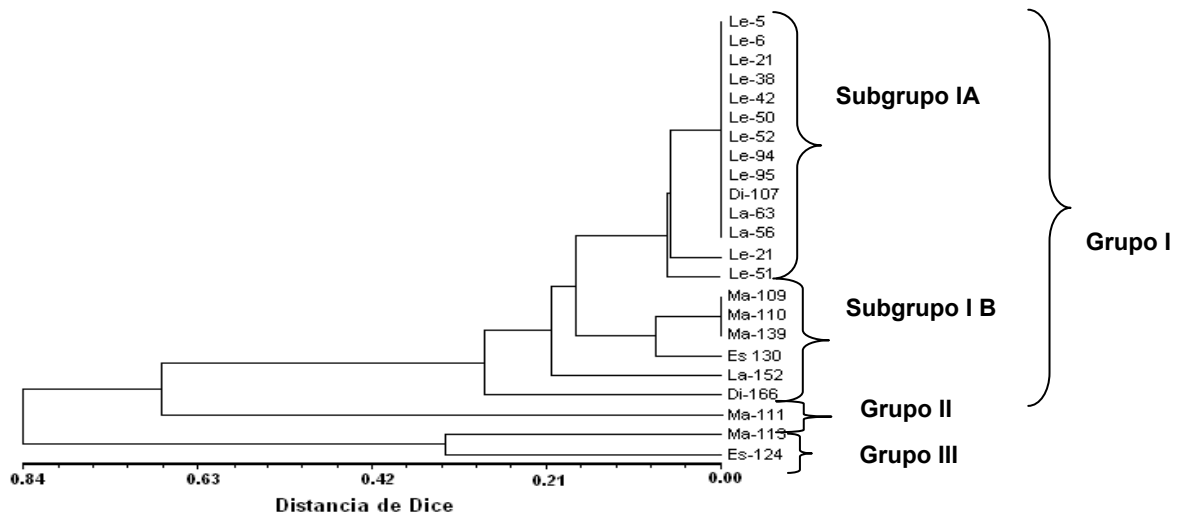


Figura 4.7 Dendrograma UPGMA obtenido mediante el análisis de conglomerados de los resultados de los sistemas isoenzimáticos. (Le: leucocephala; Ma: macrophylla; La: lanceolata, Di: diversifolia; Es: esculenta).

En el grupo I se encuentran las accesiones introducidas en nuestro país desde Colombia, Australia y Antiguas Barbudas, que tuvieron un comportamiento morfoagronómico similar, a las que se unen las variedades comerciales actualmente utilizadas en los sistemas silvopastoriles que se han implementado, todas ellas con potencial productivo aceptable. Debe destacarse que dentro de este grupo las afinidades genéticas son mayores. El resto de las accesiones tuvieron un comportamiento diferencial en su fenotipo con respecto a las del grupo I.

Los grupos varietales se formaron a valores de distancia genética bajos, considerándose un nivel de truncadura de 0.35, lo que sugiere un alto nivel de similitud genética para los sistemas enzimáticos probados. Esto era de esperarse, 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 correspondencia completa entre los grupos formados y las principales especies analizadas, con la excepción de *L. leucocephala* (subgrupo IA). Es válido acotar que aunque no se pudo diferenciar entre las accesiones de dicha especie, este estudio constituye un gran paso de avance en el estudio, caracterización y evaluación en Cuba.

Estos resultados evidencian la base relativamente estrecha de variación isoenzimática existente en el material evaluado, y se corresponden, en general, con lo planteado por Chamberlain *et al.* (1996) y Harris *et al.* (1994a), quienes han informado acerca de la gran

homogeneidad isoenzimática presente en el género *Leucaena*; ello se corrobora con las investigaciones efectuadas por Harris *et al.* (1994b), los cuales han revelado la presencia de un bajo nivel de polimorfismo, inclusive utilizando técnicas moleculares (RFLP).

Al realizar el análisis de las variables bioquímicas en conjunto, queda establecida la semejanza entre todas las accesiones evaluadas, lo cual puede que indique orígenes similares y el empleo de progenitores comunes en diferentes cruzamientos. A esto se le unen iguales objetivos en la mayoría de los programas de mejoramiento genético y selección, que son el obtener genotipos con altos rendimientos y resistencia a insectos potencialmente plagas y enfermedades. Se señala como una de las mayores limitaciones de los programas de mejoramiento de América Latina las reducidas fuentes genéticas existentes, lo que trae consigo una tendencia completamente común en dichos programas (Chamberlain *et al.* 1996 y Hughes 1998a).

La delimitación entre especies ha sido controversial en este género, tanto desde el punto de vista morfológico como de la diversidad isoenzimática. Resultados similares fueron obtenidos para *L. shannonii* (Chamberlain *et al.* 1996). Adicionalmente, dentro de la especie *L. leucocephala* (subgrupo IA) no se encontró prácticamente ninguna variación, en concordancia con los resultados de Schfing-Wittmann y Schlegel (1990). Por el contrario, Harris *et al.* (1994a) hallaron altos niveles de variabilidad intraespecífica para *L. leucocephala* con los sistemas aspartato aminotransferasas (AAT), fosfoglucosa isomerasa (PGI) y peroxidasas (Prx). Sin embargo, en este estudio con respecto a este último sistema isoenzimático ocurrió todo lo contrario, lo cual puede que se deba o que esté relacionado con factores tales como: el manejo, el clima, la especie y la edad de las muestras, entre otros.

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), fosfoglucosa isomerasa (PGI), isocitrato deshidrogenasa (IDH), fosfoglucomutasa (PGM) y shikimato deshidrogenasa (SDH), los cuales han mostrado polimorfismo en los diferentes estudios de diversidad genética realizados en otras especies de *Leucaena* (Harris *et al.* 1994b; Chamberlain *et al.* 1996) y en otros cultivos tales como el tomate, el arroz, el plátano y la yuca (Fuentes *et al.* 1999; Díaz *et al.* 2001; Florido *et al.* 2002 y Schmidt *et al.* 2003).

Sería también importante incluir más accesiones de las especies *L. lanceolata*, *L. macrophylla*, *L. diversifolia* y *L. esculenta* poco representadas en este estudio, para tener más información en cuanto a sus relaciones genéticas y lograr el agrupamiento de forma más eficiente. De hecho se ha reportado un bajo nivel de diversidad isoenzimática para algunas de estas especies. Por ejemplo, para *L. diversifolia* se encontró polimorfismo sólo en el sistema peroxidasa (Pan 1988). Sería útil además explorar la eficiencia de otros marcadores (ADN-relacionados), como los microsatélites o AFLP, para conocer el grado de diversidad genética de esta muestra; así como estudiar la correlación del polimorfismo isoenzimático con los marcadores moleculares y con los principales caracteres morfoagronómicos evaluados en estas especies.

CAPÍTULO 5. CONSIDERACIONES FINALES

En los últimos años cobra cada vez más fuerza la visión agroecológica del manejo de los pastizales, con énfasis en la búsqueda de conocimiento más acertado acerca de la relación suelo-planta-animal y el funcionamiento de la diversidad biológica. Obviamente, el reto se manifiesta en la búsqueda de nuevos sistemas de explotación que garanticen alta productividad sin provocar la destrucción de ecosistemas estables y diversos. En este sentido, los árboles de la familia de las leguminosas desempeñan un papel importante en los sistemas pecuarios, sobre todo en los países del trópico.

Entre los géneros de las familias de leguminosas con hábito de crecimiento arbóreo o arbustivo más utilizados en los sistemas silvopastoriles se encuentra *Leucaena* (principalmente *L. leucocephala*), lo cual se debe a su gran versatilidad, control de la erosión, mejorador de las propiedades físico-químicas del suelo, producción de madera y sus derivados, árbol de sombra, con altas fijaciones de N₂ y alimento para el ganado (elevado valor nutritivo), especialmente en los períodos de escasez de alimentos, así como responsable de la estabilidad en el ecosistema.

La presente investigación muestra la evaluación de 23 accesiones de cinco especies de este género, en la que se resaltan aspectos relacionados con la agronomía, la ecofisiología, algunos indicadores de la composición química, la disponibilidad de biomasa y otros elementos que contribuyen a tener una visión acertada de sus potencialidades para la alimentación animal. Además realiza modestos aportes, al menos en Cuba y en el área tropical, en la temática de caracterización isoenzimática, en la que sobresale la diferenciación de la especie *L. leucocephala*, que no por el azar y meras coincidencias resulta la que más se ha mejorado genéticamente en las últimas décadas.

Como elemento alentador, atendiendo a los resultados de esta investigación, se puede plantear que la secuencia experimental utilizada permitió realizar una preselección de las accesiones de mejor comportamiento desde sus inicios.

Los resultados en condiciones de vivero permitieron identificar varios indicadores muy relacionados con el desarrollo de las plántulas en esta etapa, entre los que se encuentran el número de brotes foliares, la biomasa seca de la parte aérea y la longitud de la raíz, elementos importantes en su rápida adaptación en el trasplante. De ahí que se considere pertinente señalar que dichos indicadores deben incluirse en investigaciones futuras en la evaluación de las plantas arbóreas, debido a que en la metodología que se utiliza actualmente sólo se fija la altura como único indicador a considerar para realizar el trasplante a la fase de campo.

Un aspecto interesante a destacar en estas condiciones fue la agrupación de las accesiones desde esta etapa, en la cual se puede realizar la selección de individuos de mejor comportamiento en relación con los indicadores evaluados, de acuerdo con diferentes propósitos (alimentación animal, sombra, cerca viva, entre otros), sin llegar a la fase de campo.

En la etapa de establecimiento todas las accesiones cumplieron con los indicadores de selección predeterminados, pero sólo el 43,5% de ellas lo hizo en el tiempo previsto, lo cual estuvo relacionado con las características genéticas del material evaluado y con su capacidad de respuesta a los factores bióticos y abióticos existentes en el área experimental (agua y nutrientes). Con relación a al comportamiento de la fenología del material estudiado, se comprobó que el 13,04% de las accesiones no mostraron la fase reproductiva, lo cual es un indicador desfavorable al no completarse para todas las accesiones la totalidad del ciclo biológico. Ello resulta determinante en la capacidad y precocidad que posee la planta para su ulterior multiplicación.

Asimismo, debe considerarse en otras investigaciones la importancia del estudio del potencial de producción de semillas de estas plantas (para asegurar el fomento de nuevas áreas donde se emplee el silvopastoreo), así como sus características específicas y todos aquellos aspectos que intervienen en la cadena tecnológica de la producción y mantenimiento de su calidad.

Por otra parte, se encontró que algunas accesiones se mostraron más caducifolias que otras en la época poco lluviosa, en dependencia de su capacidad de respuesta ante las condiciones prevalecientes en la localidad donde se sembraron. Por ello los resultados no deben extrapolarse sin efectuar las adecuaciones pertinentes, considerando que el material fitogenético evaluado es un ente vivo que puede presentar variaciones en su interacción con el medio y gran variabilidad en términos de comportamiento, principalmente en aquellas especies menos domesticadas; además de tener en consideración una serie de factores relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas, tales como: los indicadores fotosintéticos, la respiración, el funcionamiento hormonal, el área foliar, el suelo y el clima. Es importante mencionar que los indicadores evaluados se deben considerar en futuras evaluaciones de plantas arbóreas, debido a la alta variabilidad (87,94%) explicada a través de ellos.

Se conoce que las accesiones de la especie *L. leucocephala* tienen posibilidades de rebrotar después de la poda, así como capacidad de restablecerse rápidamente del estrés fisiológico o ambiental. Sin embargo, es válido señalar que a partir de estos resultados, la recuperación puede suceder de forma más acelerada en algunas accesiones con respecto a las otras y que se deben considerar aspectos tales como la disponibilidad de los recursos bióticos y abióticos, las reservas de carbohidratos, la disponibilidad de tejidos meristemáticos activos (yemas), la cantidad y capacidad fotosintética del área foliar residual, la movilización de carbohidratos disponibles y otras reservas del material de la planta que subyacen después del corte; además de las condiciones climáticas imperantes en ese período y el estado de desarrollo de la planta, los cuales son indicadores que pueden disminuir o no el rango de formación de los rebrotes vigorosos y la actividad del tejido fotosintético de forma casuística.

En este sentido, debe profundizarse en estudios relacionados con la intensidad y los intervalos de corte que pueden tolerar estas plantas, pues los resultados actuales son contradictorios y sólo se hacen comentarios especulativos, debido a que no existe información detallada acerca de los efectos subsecuentes de dicha práctica.

En cuanto a la disponibilidad de biomasa y su composición química, se puede plantear que las variaciones pudieron estar relacionadas con las condiciones ambientales (distribución de las lluvias y de la temperatura durante el tiempo de evaluación) y con el manejo

efectuado en los momentos en que coincidieron los muestreos, factores que en su conjunto influyen notablemente en el establecimiento, el nivel de producción y la vida útil de los pastos. También pudo influir la cantidad de sustancias de reservas acumuladas durante el tiempo de reposo que antecedió al período de evaluación.

Aunque existen resultados acerca de lo señalado anteriormente, se debe profundizar en la definición del empleo de estas plantas en la alimentación de rumiantes y de monogástricos no sólo en pastoreo o en forma de acarreo, sino también en forma de harina, como parte de un sistema integral de alimentación. En el caso de la composición química se hace necesario incursionar más y tratar de relacionarlo con la nutrición, la fisiología y la producción de los animales, al igual que en el estudio de los factores antinutricionales que pueden impedir el mejor aprovechamiento del árbol.

A pesar de las diferencias entre las épocas en cuanto a la disponibilidad de MS de las accesiones evaluadas, se puede afirmar que fueron satisfactorias, si se considera que permitieron ofertas de materia seca total entre 1,38 y 1,74 kg de MS/árbol para la época lluviosa y de 1,34 y 1,67 kg de MS/árbol para la poca lluviosa, lo que en términos de manejo de un supuesto sistema sería equivalente a 0,382 y 0,321 t de MS/ha/rotación y a 1,10 μ cal y 80 g PB, si se valora que 555 árboles/ha son suficientes para producir 1 L de leche/há; dichos valores fueron superiores a los encontrados en algunas de éstas y en otras especies arbóreas forrajeras evaluadas.

Los resultados y el alcance del análisis realizado a partir de caracteres tales como la altura, el número de ramas, el grosor del tallo, las afectaciones por enfermedades e insectos potencialmente plagas, la capacidad de recuperación después de la poda, la composición química, así como la disponibilidad de biomasa, posibilitaron constatar la capacidad adaptativa de las 23 accesiones de las especies del género *Leucaena* aquí incluidas, con aceptables respuestas en su comportamiento de modo general; se demostró que existe un germoplasma que pudiera ser explotado con un mínimo de insumos, que harían probablemente sostenible y sustentable, desde todos los puntos de vista, cualquier ecosistema ganadero.

A partir del análisis de los resultados, se considera oportuno recomendar la inclusión de las accesiones *L. leucocephala* CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929 y CIAT-17480; *L. lanceolata* CIAT-17255 y CIAT-17501, y *L. diversifolia*

CIAT-17270 en el fomento y desarrollo de nuevas áreas con sistemas silvopastoriles, ya que presentaron un comportamiento aceptable y similar al de las variedades comerciales *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú, cv. Ipil-Ipil y cv. CNIA-250 (presentes las tres primeras hoy en las empresas ganaderas, que ocupan aproximadamente más 20 000 ha), lo cual facilitará el incremento de la diversidad de plantas a utilizar en los sistemas mencionados, de manera tal que se puedan emplear variantes o alternativas para contrarrestar diversos inconvenientes. Por su parte, las accesiones que presentaron un comportamiento diferente al de las anteriormente citadas pudieran incluirse en estos sistemas con otros fines, tales como árboles de sombra, cercas vivas, cortinas rompevientos o como abono verde (por la fácil descomposición de sus hojas y contenido de N).

En correspondencia con los resultados de determinación de polimorfismo isoenzimático, se pudo constatar que los sistemas isoenzimáticos α y β esterasas fueron los más polimórficos. El sólo hecho de poder diferenciar la especie *L. leucocephala* de las demás, aunque no se logró la diferenciación entre sus accesiones, constituye un valioso aporte a este 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 la especie *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 sólo se tienen en cuenta en dichos programas como progenitores.

Además, 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. Sin dudas, sería importante realizar otros estudios, en los que se puedan utilizar otros sistemas isoenzimáticos, incorporando en lo posible técnicas mucho más polimórficas que permitan revelar la variación existente a nivel de ADN, como los microsatélites o AFLP, para ganar información en el grado de diversidad genética de esta muestra, así como estudiar la correlación del polimorfismo isoenzimático con los marcadores moleculares y con los principales caracteres morfoagronómicos evaluados en estas especies.

Estos resultados se corresponden con el principio de que “uno de los pasos más importantes e imprescindibles en un programa de investigación en pastos y forrajes lo constituye la introducción, caracterización, evaluación y selección de nuevas especies y accesiones que mejoren cuantitativa y cualitativamente las ya existentes, bien sean nativas, naturalizadas o introducidas”; además de poder incrementar la cantidad de ellas a utilizar en los sistemas pecuarios y en particular los silvopastoriles, por el consiguiente peligro que existe del ataque de un determinado insecto potencialmente plaga o enfermedad. La relevancia y el enfoque de lo que hasta aquí se plantea, relacionado con la evaluación morfoagronómica y el polimorfismo isoenzimático de 23 accesiones de *Leucaena*, están implícitamente en la hipótesis y en el objetivo de esta tesis.

La continuidad de un trabajo más profundo en el cual se consideren aspectos que no fueron objeto de estudio de esta investigación, que faciliten un análisis más integral con otras evaluaciones, pudiera formar parte de estas soluciones, entre los que pueden mencionarse: ampliar el conocimiento de la ecología de las cepas de *Rhizobium* (precisar diferentes condiciones ambientales que determinan su dinámica poblacional), el estudio de las interrelaciones entre las especies arbóreas y las plantas asociadas (sean leguminosas herbáceas o gramíneas o ambas), los beneficios que se le aportan al suelo, las diversas formas de incorporar los árboles a los sistemas ganaderos, su influencia en las variables climáticas locales (la temperatura del suelo y del medio, la emisión de CO₂, el viento y la humedad relativa), la inclusión de árboles y arbustos en la dieta de diferentes categorías de animales, así como el papel que desempeña el animal en estos sistemas.

CONCLUSIONES

- ✓ La secuencia experimental utilizada permitió evaluar y caracterizar las 23 accesiones de *Leucaena* spp., obtenidas del Banco de Germoplasma de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”.
- ✓ Los indicadores morfológicos que mejor explicaron la variabilidad de las accesiones evaluadas durante los estudios realizados fueron: en **condiciones de vivero**: la altura de la planta, el número de brotes foliares, la biomasa seca de la parte aérea, la longitud y la masa seca de la raíz; en la **etapa de establecimiento**: la altura de la planta, el grosor del tallo, el número de ramas, el rendimiento de materia seca, y en la **capacidad de recuperación ante la poda**: el número de rebrotes, su longitud, el grosor del tallo, el número de ramas y el rendimiento, y en la **selección de especies**: la altura, el grosor del tallo, el número de ramas, el rendimiento, la disponibilidad de biomasa (comestible y leñosa) y el contenido de proteína bruta.
- ✓ Las especies y accesiones de este género de forma general, mostraron alta capacidad de recuperación después de la poda.
- ✓ La poca afectación por enfermedades, indicó que estas especies y accesiones fueron tolerantes y se destacaron *L. macrophylla* CIAT-17232 y CIAT-17238, las cuales no manifestaron síntomas durante el período evaluado.
- ✓ Se estandarizaron los sistemas isoenzimáticos α y β esterases y peroxidasas en la determinación del polimorfismo isoenzimático de estas especies.
- ✓ El análisis de los patrones isoenzimáticos α y β esterases 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* analizada y se detectó homogeneidad genética en las accesiones, y que entre estas se presentan afinidades genéticas.
- ✓ Se seleccionaron las accesiones *L. leucocephala* CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929 y CIAT-17480; *L. lanceolata* CIAT-17255 y CIAT-17501, y *L. diversifolia* CIAT-17270, además de las variedades comerciales *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú, cv. CNIA-250 y cv. Ipil-Ipil, como promisorias para ser estudiadas en el fomento de nuevas áreas donde se emplee el silvopastoreo y las no seleccionadas incluirlas con otros fines (árboles de sombra, cortinas rompevientos, cercas vivas o como abono verde por la fácil descomposición de sus hojas y contenido de N).

RECOMENDACIONES

- ✓ Emplear la secuencia experimental utilizada en la presente investigación para la caracterización, evaluación y selección de plantas arbóreas y arbustivas, en la que se incluyan además los indicadores que más contribuyeron a explicar la variabilidad entre las accesiones por etapas.
- ✓ Combinar los análisis morfoagronómicos y genético-bioquímicos para la caracterización de los bancos de germoplasma del país, además de continuar con la búsqueda de nuevas formas polimórficas del cultivo, incorporando en lo posible técnicas que detecten mayor polimorfismo que permitan revelar la variación existente a nivel de ADN y contar con la variabilidad genética suficiente para explotar en *Leucaena*.
- ✓ Usar el método de extracción estandarizado para los sistemas α y β esterasas y peroxidasas en la determinación del polimorfismo isoenzimático de otras especies de este género.
- ✓ Incluir mayor número de accesiones de las especies poco representadas en este trabajo (*L. lanceolata*, *L. diversifolia*, *L. macrophylla* y *L. esculenta*).
- ✓ Realizar otros estudios con las accesiones *L. leucocephala* CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929 y CIAT-17480; *L. lanceolata* CIAT-17255 y CIAT-17501, y *L. diversifolia* CIAT-17270, además de las variedades comerciales *L. leucocephala* cv. Cunningham, cv. Perú, cv. CNIA-250 y cv. Ipil-Ipil en función de sus respuestas fisiológicas, que permitan completar las investigaciones acerca de las especies de este género.
- ✓ Incluir las accesiones *L. leucocephala* CIAT-9119, CIAT-9438, CIAT-751, CIAT-7988, CIAT-7384, CIAT-7929 y CIAT-17480; *L. lanceolata* CIAT-17255 y CIAT-17501, y *L. diversifolia* CIAT-17270, para ser estudiadas en el fomento de nuevas áreas donde se emplee el silvopastoreo y las no seleccionadas para incrementar la diversidad biológica de estos sistemas.
- ✓ Introducir los resultados de esta investigación en los programas de pregrado y de posgrado de las facultades, centros de investigación e institutos politécnicos agropecuarios.

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. La Habana, Cuba. 65 p
- AGANGA, A.A.; ADOGLA-BESSA, T.; OMPHILE, U.J. & TSHIRELETSO, K. 2000.** Significance of browses in the nutrition of Tswana goats. *Arch. Zootechnia.* 49:469
- 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.
- ALONSO, J.; VALENCIAGA, N. & RODRÍGUEZ, I. 2006.** Estudio de la diversidad zoológica asociada a un silvopastoreo leucaena-guinea con diferentes edades de establecimiento. Memorias: IV Congreso Latinoamericano de Agroforestería Pecuaria para la producción pecuaria sostenible. III Simposio sobre sistemas silvopastoriles para la producción ganadera sostenible. 24-28 de noviembre. Centro de Convenciones "Plaza América", Varadero-Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba. [CD-ROM]
- 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 en Biología vegetal. La Habana, Cuba 95 p.
- ÁLVAREZ, A.; FUENTES, J.L.; DEUS, J.E.; DUQUE, M.C. & CORNIDE, M.T. 2000.** Genetic diversity analysis in rice mutants using isozyme and morphological markers. *Cultivos Tropicales* 21 (4): 39-44
- AMARAL, A. 1972.** Técnicas analíticas para evaluar macronutrientes en ceniza de caña de azúcar. Laboratorio de caña. Esc. Química. Universidad de la Habana.
- AMODU, J.T.; OMOKANYA, A.T.; ONIFADE, O.S. & BALOGUN, R.O. 2000.** The effect of hot water and acid treatment on establishment of *Leucaena leucocephala*. *Seed Research.* 28 (2):226-228
- ANON. 2000.** Tablas de valor nutritivo y requerimientos para el ganado bovino. *Pastos y Forrajes.* 23:105

- ANON. 2001 a.** Consulta de Expertos FAO. "Protección de los recursos naturales en sistemas ganaderos: Los sistemas agroforestales pecuarios en América Latina". Juiz de Fora, M. G., Brasil. p 38
- ANON. 2001 b.** *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. http://www.rockfound.org.mx/deeringiana_biesp.html.2001
- ANON. 2002.** *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. <http://www.rockfound.org.mx/pumilabies.html/2002>
- ANON. 2003.** Propagation of *Leucaena leucocephala*. <http://instruct1.cit.cornell.edu/-Courses/hort400/mpts/leucprop.html>
- AOAC 1990.** Official Methods of Analysis. 15 Ed. Association of official Agricultural Chemists. 1298 p.
- ARCOS, J.C. 1998.** Recursos arbóreos. En: Gramíneas y leguminosas. Consideraciones agrozootécnicas para la ganadería del trópico bajo (Ed. D. R. Chamorro; J. E. Gallo B; J. C. Arcos D y M. A. Vanegas R). CORPOICA-Centro de investigación "Nataima". El espinal. Tolima, Colombia. p 146.
- BABA, A.S.H.; SEMBIRING, M.; NORAI, I & STONE, G.M. 2000.** The effects of supplementation with selected browse plants on feed intake, production and composition of milk in lactating Katjang-cross goats. In: Animal production for a consuming world. Vol. B. Proceedings of the 9th Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies and 23rd Biennial Conference of the Australian Society of Animal Production. 3-7 July, 2000, Sydney, Australia. p 369
- BALDIZÁN, A. 2003.** Producción de biomasa y nutrimentos de la vegetación del bosque seco tropical y su utilización por rumiantes a pastoreo en los Llanos Centrales de Venezuela. Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Edo Aragua, Venezuela. 288 p.
- BAMUALIN, A.; WESTON, R.H.; HARZAN, J.P. & MURRAY, R.M. 1984.** The contributions of *Leucaena leucocephala* to post ruminal digestible protein to sheep fed tropical pastures hay supplemented with urea and minerals. ***Proceedings of the Australian Society of Animal Production.*** 15:255
- BANDA, J.L. & AYOADE, J.A. 2004.** *Leucaena leucocephala* cv. Perú as proteic supplement for Malawian goats chopped Maite stover. <http://www.fac.org./wairdocs/ilril/x5487elx5487eOi.htm>

- BARRETO, A. 1990.** Botánica de las leguminosas. Instituto de Ecología y Sistemática. La Habana, Cuba. Mimeo. 30 p
- BÄSSLER, M. 1998.** *Leucaena leucocephala* En: Flora de la República de Cuba. Serie A. Plantas Vasculares. Fascículo 2. Mimosoideae. Koelty Scientific Book, Federal Republic of Germany. p. 57
- BATSON, H.F.; FERGUSON, T.U. & ARCHIBALD, K.A.E. 1984.** Variability in *Leucaena* and its potential in the Caribbean. Unpublished paper presented at the 2nd Annual Meeting of the OAS Caribbean *Leucaena* Project, Kingston, Jamaica.
- BENAVIDES, J. 2003.** Árboles y arbustos forrajeros: Una alternativa para la sostenibilidad en la ganadería. En: Taller Internacional Ganadería Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente. La Habana, Cuba. 157 p.
- BENJAMÍN, A.K.; SHELTON, H.M. & GUTTERIDGE, R.C. 1999.** Productivity of five tree legumes species in the tropics. In: AAAP-ASAP Congress. Sydney, Australia. [CD-ROM].
- BENTHAM, G. 1842.** Notes on Mimoseae, with a short synopsis of species. Hooker`s. *London Journal of Botany* 1: 526-527
- BENTHAM, G. 1846.** Revisión of the suborder Mimoseae. Transactions of the Linnean Society of London 30: 335 - 668
- BERNINGER, F.; NIKINMAA, E.; SIEVÄNEN, R. & NYGREN, P. 2000.** Modelling of reserve carbohydrate dynamics, regrowth and nodulation in a N₂-fixing tree managed by periodic prunings. *Plant, Cell and Enviroment*. 23:1025
- BLANCO, F. 1996.** Dinámica de crecimiento y variación de las reservas en *Andropogon gayanus* CIAT-621. *Pastos y Forrajes*. 19:47
- BONILLA, I. 2002.** Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. En: Azcón-Bieto, J y Talón, M. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ediciones Universitat de Barcelona. 198 p.
- BOREL, R. 1997.** Diseño y manejo de los sistemas silvopastoriles. En: L. Krishnamurthy. Vol. II. VI Curso Internacional de Entrenamiento. Centro de Agroforestería para el Desarrollo Sostenible. Universidad Autónoma de Chapingo. México. p 442-458

- BRAY, R.A. 1994.** The *Leucaena* psyllid. In: Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture. (Eds. R.C. Gutteridge and H.M. Shelton). CAB International. Wallingford, UK. p. 283
- BREWBAKER, J.L. 1980.** What is "giant" *Leucaena* ?. *Leucaena Research Reports*. 1: 43 - 44
- BREWBAKER, J.L. 1997.** Common *Leucaena*, not Hawaiian *Leucaena*. *LEUCNET News* 4: 7
- BREWBAKER, J.L. 1998.** *Leucaena leucocephala*. Un árbol versátil fijador de nitrógeno. En: Una guía útil para los árboles de uso múltiple. <http://www.inrock.org/forestry.factpub/Spleucaena.html>.2001
- BREWBAKER, J.L. & HUTTON, E.M. 1979.** *Leucaena* versatile tree legume. Pp. 207-233, in the Ritchie, G. A. (Eds.) New agricultural crops. American Association for the Advancement of Science Selected Symposium 38. Westview Press, Colorado.
- BREWBAKER, J.L. & SORENSSON, C.T. 1994.** Domestication of lesser-known species of *Leucaena*. Pp. 195-204. En: Lerkey, R. R. B. and Newton, A. C. (Eds.), Tropical Trees: the potential for domestication and rebuilding of forest resources HMSO, London.
- BREWBAKER, J.L.; & SUN, W. 1996.** Improvement of nitrogen-fixing trees for enhanced site quality. Pp 437-442. En: Dieters, J. M.; Matheson, A. C. Nikles, D. G. Harwood, C. E. and Walker, S. M. (Eds.). Tree improvement for Sustainable Tropical Forestry. Proceedings QFRI-IUFRO, Conference, Queensland, Australia.
- BREWER, G.J. & SING, C.F. 1971.** Introduction to Isozyme Techniques. Acad. Press. New York. 186 p
- BROUWER, R. 1983.** Functional equilibrium: sense or nonsense?. *Netherlands Journal of Agricultural Science*. 31:335
- CÁCERES, O.; GONZÁLEZ, E. & ARECE, J. 2003.** Nota técnica: Valor nutritivo del follaje de árboles y arbustos tropicales. V. *Bauhinia purpurea*. *Pastos y Forrajes*. 26:243
- CÁCERES, O.; OJEDA, F.; GONZÁLEZ, E.; ARECE, J.; SIMÓN, L.; IGLESIAS, J.M.; ESPERANCE, M.; MONTEJO, I. & SOCA, M. 2006.** Valor nutritivo de los principales recursos forrajeros en el trópico. Capítulo VI. En: Recursos Forrajeros Herbáceos y

- Arbóreos. (Ed. Milagros Milera). EEPF "Indio Hatuey" Matanzas, Cuba-Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. p. 231
- CAKMAKCI, S & AYDINOGLU, B. 1999.** Effects of different pre-germination treatments on seedling vigour of *Leucaena leucocephala* L seeds. *Ziraat-Fakultesi Dergisi, Akdeniz-Universitesi*. 12 (1):87-92
- CARDONA, M.C. 1996.** La *Leucaena leucocephala* en banco de proteína y asociada con gramíneas. En: Sistemas Silvopastoriles: Alternativa para una ganadería moderna y competitiva. II Seminario Internacional (Ed. A. Francisco). Oribe Calad. India. p. 61.
- CARVALHO, O.S.; CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, O.; SANTOS, J.W. DA SILVA, O; & DOS-SANTOS, J.W. 1999.** Effect of *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit intercropping in annual cotton cultivation. *Revista de Oleaginosas e Fibrosas*. 3 (2): 83
- CASTAÑEDA, R.F. 2001.** Identificación de hifomicetes causantes de enfermedades en hortalizas comunes en Cuba. Tesis Presentada en Opción al Grado en Doctor en Ciencias Agrícolas (Resumen). Ministerio de la Agricultura. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt". INIFAT. La Habana, CUBA. 30 p.
- CASTILLO, E.; RUIZ, T.E.; FEBLES, G.; RAMÍREZ, R.; PUENTES, R.; BERNAL, G. & DÍAZ, L.E. 1992.** Producción de carne bovina basada en *Panicum maximum* Jacq., dos proporciones de *Leucaena leucocephala* y diferentes cargas. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 26:255
- CHAMBERLAIN, J.R.; HUGHES, C.E. & GALWEY, N.W. 1996.** Patterns of isozyme variation in the *Leucaena shannonii* Alliance (Leguminosae: Mimosoidae). *Silvae Genetica* 45: 1
- CHAVES, J.C. & CALEGARY, A. 2001.** Green manures and crop rotation. *Informe Agropecuario*. 22:212
- CHUNJIE, I.; ZHIBIAO, N.; LI, C.J. & NAN, Z.B. 2000.** Seed-borne fungi of lucerne and their pathogenicity to lucerne seed and seedling. *Acta Prataculturae Sinica*. 9(1):27:36

- CLAVERO, T. 1998.** *Leucaena leucocephala*. Alternativa para la alimentación animal. Centro de transferencia de Tecnologías en Pastos y Forrajes. Universidad del Zulia, Venezuela. 78 p.
- CLAVERO, T. & RAZZ, R. 1999.** Valor nutritivo de la *Gliricidia sepium* en condiciones de bosque seco tropical. *Rev. Cubana Ciencia Agrícola* 33:97
- 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
- CORDERO, J. & BOSHIER, D. 2003.** Árboles de Centroamérica. Un Manual para extensionistas. Department of Plant Sciences. University of Oxford. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. CATIE. Costa Rica. 1079 p
- CORNIDE, M.T.; ARENCIBIA, A.; BEROVIDES, V.; CALVO, D.; CANALES, E.; COTO, O; GONZÁLEZ, C.; RODRÍGUEZ, M.; SÁNCHEZ, J.; SIGARROA, A & XIQUÉS, X. 2002.** Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y selección de las plantas. Editorial Felix Varela. La Habana, Cuba. 367 p.
- CORZO, J.A.; GARCÍA, L.A.; SILVA, J.J.; PÉREZ, E. & GEERKEN, C. 1999.** El ecosistema agropecuario. En: Zootecnia general. Un enfoque ecológico. Editorial Félix Varela. La Habana, Cuba. p. 1
- CRONK, Q.C.B. & FULLER, J.L. 1995.** Changing weeds and changing worlds. Pp 3-14. En: Stirton, C. H. (Ed.). Weeds in a changing world. British Crop Protection Council Symposium Proceedings 64. British Crop Protection Council, Surrey.
- CRONQUIST, A. 1981.** An Integrated system of clasification of flowering plants Colombia, University Press New York.
- 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.
- DE MOURA, N.; TEIXEIRA, H.; PEREIRA, I.A.; SILVÉRIO, R. & LESSA, T.C. 2001.** Atividade alelopática da *leucaena* sobre espécies de plantas daninhas. *Sci. Agric.* 58 (1):57

- DÍAZ, M. 2006a.** Fisiología del crecimiento y el desarrollo. En: Compendio de Conferencias del Programa de la Maestría en Pastos y Forrajes. Curso: Fundamentos de la Producción de Pastos. Matanzas, Cuba 25 p
- DÍAZ, M. 2006b.** Fotosíntesis. En: Compendio de Conferencias del Programa de la Maestría en Pastos y Forrajes. Curso: Fundamentos de la Producción de Pastos. Matanzas, Cuba 13 p
- DÍAZ, S.; MOREJÓN, R.; GONZÁLEZ, C. & XIQUE S. 2001.** Caracterización bioquímica de accesiones de arroz (*Oryza sativa* L.). **Cultivos Tropicales.** 22: 47-52
- DICE, L.R. 1945.** Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology** 26: 297-302.
- DIJKMAN, M.J. 1950.** Leucaena-a promising soil erosion control plant. **Economic Botany** 4: 337-349
- DUNCAN, D.B. 1955.** Multiple range and multiple F test. **Biometrics** 11:1
- ESCOBAR, A.; ALFONSO, H & RAMÍREZ, R. 1989.** ¿Es potencialmente tóxica la planta de *L. leucocephala*?. **Revista ACPA.** 1:20
- ESPINOSA, F.; ARAQUE, C.; LEÓN, L.; QUINTANA, H. & PERDOMO, E. 2001.** Efecto del banco de proteína sobre la utilización del pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) en pastoreo con ovinos. **Zootecnia tropical.** 19 (3):27
- FERNÁNDEZ-SANTARÉN, J. 1999.** Curso de técnicas instrumentales biológicas (I). Separación de macromoléculas biológicas. Centrifugación, electroforesis y cromatografía. La Habana, Cuba. Mimeo. 57 p
- FERREIRA, D. & ANDRADE, M. 2000.** Potencial forrajero de leguminosas arbustivas. En: Pastagens para gado de Leite em Regiões de influencia de Mata Atlântica. Eds. Mosquita Carbalho, Maurilio José Alvin. EMBRAPA. Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. p 41.
- FERREIRA, M. & GRATTAPAGLIA, D. 1998.** Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1. EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia, Brasil. Mimeo 220 p.
- FERRER, O.; CLAVERO, T. & RAZZ, R. 1999.** Frecuencia de defoliación y densidad de siembra en el contenido mineral del Matarratón (*Gliricidia sepium*) **Revista Cubana de Ciencia Agrícola.** 33:325

- FLORIDO, M. 1999.** Caracterización de variedades y especies silvestres de tomate atendiendo a características morfoquímicas y tolerancia al calor. Tesis presentada en opción al Título de Máster en Biología. Facultad de biología. Universidad de la Habana. La Habana, Cuba. 87 p
- FLORIDO, M.; ÁLVAREZ, M.; LARA, R. M.; PLANA, D.; VARELA, M.; SHAGARODSKY, T. & MOYA, C. 2002.** Caracterización morfoagronómica y bioquímica de 20 accesiones de tomate (*Lycopersicon* spp.) ***Cultivos Tropicales***. 23: 61-69
- FRANCISCO, G. & SIMÓN, L. 2001.** Estudios del nivel de poda en una plantación de *Leucaena leucocephala* CNIA-250. ***Pastos y Forrajes***. 24:139
- FRANCISCO, G.; SIMÓN, L. & SOCA, M. 1998.** Efecto de tres alturas de corte en el rendimiento de biomasa de *Leucaena leucocephala* cv. CNIA-250. ***Pastos y Forrajes***. 21:337
- 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.
- FUENTES, J.L.; ESCOBAR, F.; ÁLVAREZ, A.; GALLEGO, G.; DUQUE, M.; FERRER, M.; DEUS, J.E. & THOME, J. 1999.** Analysis of genetic diversity in Cuban rice varieties using AFLP, RADP and isoenzyme marker. ***Euphytica***.83:1-9
- FUNES, F. 1980.** *Leucaena*. Una nueva posibilidad para la alimentación ganadera en Cuba. ***Agropecuaria Popular***. 1 (3):19
- 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
- FUNES, F.; FEBLES, G. & PÉREZ-INFANTE, F. 1986.** Los pastos y el desarrollo ganadero en Cuba. En: Los Pastos en Cuba. Tomo 1. Producción. EDICA. La Habana, Cuba. 801 p.
- FUNES, F.; PARETAS, J.J. 1986.** Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes. ***Rev. ACPA***. 5 (4):52
- GALINDO, J.; DELGADO, D.; PEDRAZA, R. & GARCÍA, D.E. 2005.** Impacto de los árboles, los arbustos y otras leguminosas en la ecología ruminal de animales que consumen dietas fibrosas. ***Pastos y Forrajes***. 28:59

- GAO, L.Z.; GE, S. & HONG D.Y. 2000.** Allozymic diversity and genetic structure of common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. In China. *Theor Appl Genet* 101: 494-502.
- GAO, L.Z.; SCHAAL, B.A.; ZHANG, C.H.; JIA J.Z. & DONG, Y.S. 2002.** Assessment of population genetic structure in common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. using microsatellite and allozyme markers. *Theor Appl Genet* 106: 173-180.
- GARCÍA, D.E. 2003.** Efectos de los principales factores que influyen en la composición fotoquímica de *Morus alba* (Linn.). Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en Pastos y Forrajes. Matanzas, Cuba. 92 p.
- GARCÍA, D.E., MEDINA, M.G.; OJEDA, F.; HUMBRÍA, J.; DOMÍNGUEZ, C.E.; BALDIZÁN, A. & TORAL, O. 2007.** Variabilidad fitoquímica y repercusión antinutricional potencial en especies del género *Albizia*. *Pastos y Forrajes*, 29:153-168.
- GARCÍA, H.; NYGREN, P. & DEFONTAINES, L. 2001.** Dynamics of non-structural carbohydrates and biomass yield in a fodder legume tree under different harvest intensities. *Tree Physiol.* 21:523
- GARCÍA, S.E.; PERMUY, A.N & CHAVECO, P.O. 2003.** Factores que influyen en la pérdida de los granos. En: Principios elementales en la poscosecha de los granos básicos. Holguín, Cuba. 31 p.
- GLASZMANN, J.C. 1988.** Geographical pattern of variation among Asian native rice cultivars (*Oryza sativa* L.) base don 15 isozyme loci. *Genome* 30:782-792.
- GÓMEZ, H.; NAHED, J.; TEWOLDE, A.; PINTO, R. & LÓPEZ, J. 2006.** Áreas con potencial para el establecimiento de árboles forrajeros en el centro de Chiapas. *Técnica Pecuaria en México.* 44:219
- GÓMEZ, I.; ESPINOSA, R. & OLIVERA, Y. 2006.** Selección de especies de leguminosas forrajeras en el Valle del Cauto. *Pastos y Forrajes.* 29:237
- GÓMEZ, M.E.; RODRÍGUEZ, L.; MURGUEITIO, E.; RÍOS, C.; MOLINA, C.H.; MOLINA, C.H.; MOLINA, E. & MOLINA, J.P. 2002.** Árboles utilizados en la alimentación animal como fuente proteica: Matarratón (*Gliricidia sepium*), Nacedero (*Trichanthera gigantea*), Pízamo (*Erythrina fusca*) y Botón de oro (*Tithonia diversifolia*). Centro para la investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria (CIPAV). Colombia. p 3-11

- GONZÁLEZ, C. 2002.** Detección del polimorfismo genético mediante marcadores bioquímicos en plantas. Capítulo 2. En: Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. (Ed. Cornide, M.T.; Arencibia, A.; Berovides, V.; Calvo, D.; Canales, E.; Coto, O; González, C.; Rodríguez, M.; Sánchez, J.; Sigarroa, A & Xiqués, X). Editorial Félix Varela, La Habana, Cuba. p. 36-66
- GONZÁLEZ, C.; XIKUÉS, X.; ROMÁN, M. I. RODRÍGUEZ, A. GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; DIOSDADO, E.; GONZÁLEZ, S. & SIGARROA, A. 1999.** Caracterización de bancos de germoplasma mediante técnicas isoenzimáticas y citogenéticas. Proceedings del II Simposio de Recursos para la América Latina y el Caribe (SIRGEALC). Soporte electrónico. Brasil.
- GONZÁLEZ, E. & CÁCERES, O. 2002.** Valor nutritivo de árboles, arbustos y otras plantas forrajeras para los rumiantes. *Pastos y Forrajes*. 25:15
- 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. 92 p
- GONZÁLEZ, Y.; HERNÁNDEZ, A. & MENDOZA, F. 1998.** Comportamiento de la germinación y la viabilidad de las semillas de leguminosas arbustivas. I. *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham. En: Memorias III Taller Internacional Silvopastoril. "Los árboles y arbustos en la ganadería". EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p 107
- GONZÁLEZ, Y.; MATÍAS, C.; PÉREZ, A. & NAVARRO, M. 2005.** Producción, beneficio y conservación de semillas de plantas arbóreas. En: El Silvopastoreo: Un nuevo concepto de pastizal (Ed. L. Simón). Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba-Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. p. 53-69
- GORDON, D.R. & THOMAS, K.P. 1997.** Florida's invasion by non-indigenous plants: history, screening and regulation. Pp 21-37, En: Simberloff, D.; Schmitz, D. C. and Brown, T.C. (Eds.). Strangers in Paradise: impact and management of non-indigenous species in Florida. Island Press. Washington DC.
- GRAY, S.G. 1968.** A review of research on *Leucaena leucocephala*. *Tropical Grasslands*. 2: 19-30

- GREAVES, A.J.; HENTON, S.M.; PILLER, G.J.; MEEKINGS, J.S. & WALTON, E.F. 1999.** Carbon supply from starch reserves to spring growth: Modelling spatial patterns in kiwifruit canes. *Annals of Botany*. 83:431
- GUERRA, C.W.; CABRERA, A. & FERNÁNDEZ, L. 2003.** Criterios para la selección de modelos estadísticos en la investigación científica. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 73:3
- GUILLOT, J.; VIGIL, M.C.; & ACUÑA, B. 2002.** Hierba buffel: una solución para la ganadería de la franja costera sur de Guantánamo. *Rev. ACPA*. 21 (3):14
- GUTIÉRREZ, O.; DELGADO, D.; ORAMAS, A. & CAIRO, J. 2000.** Consumo y selección animal de vacas en pastoreo de gramíneas con o sin bancos de proteína. Memorias. IV Taller Internacional Silvopastoril "Los árboles y arbustos en la ganadería tropical". EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 119
- GUTIÉRREZ, O.; GALINDO, J.; DELGADO, D.; ORAMAS, A.; RODRÍGUEZ, V. & CAIRO J. 2005.** Consumo y digestibilidad de materia seca y nitrógeno total en vacas en pastoreo durante la época de lluvia, con banco de proteína o sin ellos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 39:593
- HARDING, W.A.T. 1972.** The contribution of plant introduction to pasture development in the tropics of Queensland. *Tropical Grasslands*. 6:191
- HARRIS, S.A.; HUGHES, C.E.; ABBOT, R.J. & INGRAM, R. 1994a.** Genetic variation in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (Leguminosae:Mimosoideae). *Silvae Genetica* 43:159-167
- HARRIS, S.A.; HUGHES, C.E.; INGRAM, R. & ABBOT, R.J. 1994b.** A phylogenetic analysis of *Leucaena* (Leguminosae:Mimosoideae). *Pl. Sys. Evol.* 191:1-26
- HARVEY, C. 2006.** La conservación de la biodiversidad en sistemas silvopastoriles. En: Memorias de una conferencia electrónica: "Potencialidades de los sistemas silvopastoriles para la generación de servicios ambientales". (Eds. M. Ibrahim, J. Mora y M. Rosales). CATIE. Turrialba, Costa Rica. p. 23
- HELLIN, J.J. & HUGHES, C.E. 1993.** *Leucaena salvadorensis*: conservación y utilización en Centroamérica. Serie Miscelánea de CONSEFORD, Siguatepeque, Honduras 15 – 15/92: 1-45
- HERNÁNDEZ, A.; ASCANIO, M.; CABRERA, A.; MORALES M.; MEDINA, N. & RIVERO, L. 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.
- HERNÁNDEZ, I. 2000.** Utilización de las leguminosas arbóreas *L. leucocephala*, *A. lebeck* y *B. purpurea* en sistemas silvopastoriles. Tesis presentada en opción al grado de Dr. en Ciencias Agrícolas. Instituto de Ciencia Animal. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba. 118 p.
- HERNÁNDEZ, I.; BENAVIDES, J.E & SIMÓN, L. 2000.** Utilización de *L. leucocephala*, *A. lebeck* y *B. purpurea* en sistemas silvopastoriles. Memorias. IV Taller Internacional Silvopastoril "Los árboles y arbustos en la ganadería tropical". EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p 284.
- HERNÁNDEZ, I.; MATÍAS, C.; HERNÁNDEZ, R.; RUZ, & ROLO, R. 1993.** Comportamiento de asociaciones de gramíneas y leguminosas en el Sur del Oeste de Matanzas. *Pastos y Forrajes* 16: 243
- HERNÁNDEZ, L. A. & SEGUÍ, E. 1998.** Comportamiento de *Leucaena* spp. en fase de vivero. *Pastos y Forrajes*. 21:47
- HERNÁNDEZ-DAUMÁS, S.; RUSSELL, G. & ARAH, J. 2001.** Modelling carbon and nitrogen cycling in a humid tropical silvopastoral systems. En: International Symposium on Silvopastoral Systems. Second Congress of Livestock Production in Latin America. San José, Costa Rica. p. 178
- HERRERA, R.S.; GONZÁLEZ, S.B.; GARCÍA, M.; RÍOS, C. & OJEDA, F. 1986.** Análisis químico del pasto. En: Los pastos en Cuba. Vol. I. Producción, 2^{da} Ed. Capítulo XVI. La Habana, Cuba. p 701
- HIDALGO, R. 2003.** Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. En: Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos (Franco, T.L. e Hidalgo, R., Eds.). Boletín técnico No. 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Cali, Colombia. 89 p.
- HILHORST, H.W & BRADFORD, K.J. 2000.** Seed physiology. International Course on Seed Production and Seed Technology. IAC. Wageningen, The Netherlands. 74 p
http://florawww.eeb.vconn.edu/ac_num/199300010.html.2003
- HUGHES, C.E. 1997.** Species delimitation and new taxa and combinations in *Leucaena* (leguminosae). *Contributions University Michigan Herbarium*. 21: 277-290

- HUGHES, C.E. 1998a.** *Leucaena*. Manual de Recursos Genéticos. No. 37. Oxford Forestry Institute. Department of Plant Sciences. University of Oxford. P. 91
- HUGHES, C.E. 1998b.** Características de la especie. En: *Leucaena*. Manual de Recursos Genéticos. Department of Plant Sciences. University of Oxford. 280 p.
- HUTTON, E.M. & BEATTIE, W.M. 1976.** Yield characteristics in tree bred lines of the legume *Leucaena leucocephala*. *Tropical Grasslands*. 10: 187
- HUTTON, E.M. & GRAY, S.G. 1959.** Problems of adapting *Leucaena glauca* as a forage for the Australian tropics. *Empire Journal Agriculture*. 27: 187-196
- IBRAHIM, M. & MORA, J. 2003.** Criterios y herramientas para la promoción de una ganadería eco-amigable en el trópico americano. Taller Internacional Ganadería, Desarrollo sostenible y Medio Ambiente. Memorias. p. 23
- IBRAHIM, M. & MORA, J. 2006.** Potencialidades de los sistemas silvopastoriles para la generación de servicios. En: Memorias de una conferencia electrónica "Potencialidades de los sistemas silvopastoriles para la generación de servicios ambientales". (Eds. M. Ibrahim, J. Mora y M. Rosales). CATIE. Turrialba, Costa Rica. p. 10
- IGLESIAS, J.M.; CASTILLO, E.; VALDÉS, L.R.; VALDÉS, G.; SIMÓN, L.; HERNÁNDEZ, C.A.; HERNANDEZ, D.; RUIZ, T. & HERNÁNDEZ, I. 2006.** Sistemas de pastoreo para el engorde bovino. Capítulo VIII. Parte 3. En: Recursos Forrajeros Herbáceos y Arbóreos. (Ed. Milagros Milera). EEPF "Indio Hatuey" Matanzas, Cuba-Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. p. 386
- IGLESIAS, L. 1994.** Utilización de marcadores bioquímicos y moleculares en el mejoramiento genético de la papa. *Cultivos Tropicales*. 15: 108-121
- IRIONDO, J.M. & PÉREZ, C. 1999.** Propagation from seeds and seed preservation. En: A colour atlas of plant propagation and conservation. (B. G. BOWES, Ed.). Mason Publishing, London. p 46
- JONES, R.J. 1994.** Management of antinutritive factors with special reference to tropical agriculture. In: Forage tree legumes in tropical agriculture. (Eds. R.C. Gutteridge y H.M. Shelton). CAB International. Wallingford, UK. p. 216
- JONES, R.J.; JONES, R.M. & COOKSLEY, D.G. 1982.** Agronomy of *Leucaena* tropics. *World Animal Review*. 31: 13

- KANINNEN, M. 2001.** Sistemas silvopastoriles y almacenamiento de carbono: Potencial para América Latina. En: Plataforma electrónica sobre ganadería y medio ambiente. LEAD/FAO/CATIE. <http://www.leadvirtualcenter.org/es/ele/conferencia3/articulo1.htm>
- KUMAR, R. 1992.** Antinutritional factors, the potential risks of toxicity and methods to alleviate them. En: Legume trees and other fodder trees as protein sources for livestock. (Eds. A. Speedy y P.L. Pugliese). FAO, Rome. p. 145
- LA O, O.; CHONGO, B.; DELGADO, D.; RUIZ, T. E.; ELÍAS, A.; STUART, J. & TORRES, V. 2005.** Degradabilidad ruminal de materia seca y nitrógeno total de 6 ecotipos de *Leucaena*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 37:267
- 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.
- LAMELA, L.; MATÍAS, C.; FUNG, C. & VALDÉS, R. 2001.** Efecto del banco de proteína de *Leucaena* en la producción de leche. *Pastos y Forrajes*. 23:259
- LAMELA, L.; MATÍAS, C. & GÓMEZ, A. 1999.** Producción de leche en un sistema con banco de proteína. *Pastos y Forrajes*. 22:339
- LEFÉVRE F. & CHARRIER, A. 1993.** Heredity of seventeen isozyme diversity loci in cassava (*Manihotesculenta*). *Euphytica* 66: 171-178.
- LENG, R.A. 1997.** Tree foliage, in ruminant nutrition. FAO Animal Production and Health Paper, Rome. 102 p.
- LENNÉ, J.M. 1991.** Diseases of *Leucaena* species. *Tropical Pest Management*. 37:281
- LEZCANO, J.C. 1999.** Las enfermedades en plantas arbóreas de interés para la ganadería. *Pastos y Forrajes* 22:159
- LEZCANO, J.C. 2005.** Micoflora asociada a semillas almacenadas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. Tesis presentada en opción al Título de Maestro en Ciencias en Sanidad Vegetal. Mención Micología vegetal. CENSA, La Habana, Cuba. 96 p.
- LEZCANO, J.C. & ALONSO, O. 2002.** Evaluación de la incidencia de los patógenos foliares que afectan las accesiones de *Leucaena spp.* Informe final de tarea. 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. EEPF “Indio Hatuey”. 20 p. (Mimeo).
- LLAMAS, E.; CASTILLO, J.B.; SANDOVAL, C. & BAUTISTA, F. 2001.** Trees forage production and quality on a quarry soil in Mérida, Yucatán, México. En: International Symposium on Silvopastoral Systems. Second Congress of Livestock Production in Latin America. San José, Costa Rica. p. 355
- LÓPEZ, C.M.; ITURRALDE, M.A.; CLARO, R.; RUÍZ, L.; CABRERA, G.J.; MOLEIRO, M.; CHAMIZO, A.R.; GARCÍA, L.; GERHARTZ, J.L.; GARCÍA, G.; PÉREZ, H.; PINO, A.; SENTÍ, M.M.; BORROTO R. & RODRÍGUEZ, Y. 2002.** Introducción al medio ambiente. En: Tabloide Universidad para todos. Editora ACC. La Habana, Cuba. 31 p.
- LOULAKIS, C.A.; ROUBELAKIS, K.A. 1990.** Immunocharacterization of NADH-Glutamate dehidrogenase from *Vitis vinifera*. *Plant Physiol.* 94: 109-113.
- MAASDORP, B.V. 1992.** Adaptation of genus *Leucaena* to high altitude, subhumid conditions in Zimbabwe. Agroforestry Research in Southern Africa. Summary Proceedings International Workshop. ICRAF. Nairobi, Kenya. p. 127
- MACHADO, R. 2006.** Adaptabilidad de gramíneas y leguminosas en suelos hidromórficos del humedal Ciénaga de Zapata. Establecimiento. *Pastos y Forrajes.* 29:155
- MACHADO, R. & NÚÑEZ, C.A. 1993.** Comportamiento y selección de variedades de *Centrosema* spp. asociadas a bermuda 68 bajo condiciones de pastoreo simulado. *Pastos y Forrajes.* 16:123
- MACHADO, R. & NÚÑEZ, C. A. 1994a.** Caracterización de variedades de *Leucaena leucocephala* para la producción de forrajes. I. Establecimiento. *Pastos y Forrajes.* 17:13
- MACHADO, R. & NÚÑEZ, C. A. 1994b.** Caracterización de variedades de *Leucaena leucocephala* para la producción de forrajes. II. Variabilidad morfológica y rendimiento. *Pastos y Forrajes.* 17:107
- MACHADO, R.; ROCHE, R.; TORAL, O. & GONZÁLEZ, E. 1999.** Metodología para la colecta, conservación y caracterización de especies herbáceas, arbóreas y arbustivas útiles para la ganadería. *Pastos y Forrajes.* 22:181

- MACHADO, R. & SEGUÍ, E. 1997.** Introducción, mejoramiento y selección de variedades comerciales de pastos y forrajes. *Pastos y Forrajes*. 20:1
- MACHADO, R. SEGUÍ, E. & ALONSO, O. 1997.** Metodica para la evaluación EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. (Mimeo).
- MAHECHA, L.; ROSALES, M.; MOLINA, C.H. & MOLINA, E.J. 1999.** Un sistema silvopastoril de *Leucaena leucocephala-Cynodon plectostachyus-Prosopis juliflora* en el Valle del Cauca, Colombia. Agroforestería para la producción animal en América Latina. 407 p.
- MARKERT, C.L. & MOLLER, F. 1959.** Multiple forms of enzymes: tissue ontogenetic and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 45:753-763
- MATÍAS, C. 2000.** Influencia del momento y la frecuencia de poda en la calidad de la semilla II. *Leucaena leucocephala* cv. Perú. En: Taller Internacional "La semilla en la ganadería". SEMIH 2000 celebrado del 15 al 17 de noviembre. EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. (CD-ROM).
- MENÉNDEZ, J. 1982.** Estudio regional y clasificación de las leguminosas forrajeras autóctonas y/o naturalizadas en Cuba. Tesis presentada en opción al grado de Candidato a Doctor en Ciencias. ICA. La Habana, Cuba. 89 p
- MENEZES, M.A.; DONIZETI, J. & MOTA, L.E. 1995.** Anaerobic metabolism of *Euterpe oleracea* II. Plant tolerance metabolism to anoxia. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 7(1): 47-51
- MERRILL, E.D. 1912.** Notes on the flora of Manila with special reference to the introduce element. Phillipine. Journal of Science. *Botany* 7: 145-208
- MOLINA, A.; VALDÉS, G. & CASTILLO, E. 2000.** Alternativas tecnológicas para la producción de leche y carne en las actuales condiciones de Cuba. *Rev. ACPA*. 19 (1):39
- MOLINA, C.H.; MOLINA, E.; MOLINA, J.P. & NAVAS, A. 2001.** Advances in the implementation of high tree density in sylvopastoral systems. International Symposium on Sylvopastoral Systems. 2nd Congress on Agroforestry and Livestock Production in Latin America. San José, Costa Rica. p 299.
- MOREJÓN, R.; DÍAZ, S. & PÉREZ, N. 2001.** Aplicación de técnicas multivariadas en la clasificación morfoagronómica de genotipos de arroz obtenidas en la Estación Experimental "Los Palacios". *Cultivos Tropicales*. 22:43-48

- 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
- MURGUEITO, E. & IBRAHIM, M. 2003.** Agroforestería pecuaria para la reconversión de la ganadería en Latinoamérica. Retos futuros. Curso Internacional Ganadería, Desarrollo y Medio Ambiente. La Habana. p 30
- NAVARRO, M. 2002.** Evaluación del vigor de las semillas de *Albizia lebbbeck* (L.) durante la emergencia de plántulas. Tesis de Maestría en Pastos y Forrajes. Ministerio de Educación Superior. Matanzas, Cuba. 100 p
- NORTON, B.W.; LOWRY, B. & MCSWEENEY, C. 1994.** The nutritive value of *Leucaena* species. In: *Leucaena*, opportunities and limitations. (Eds. H.M. Shelton, C.M. Piggin y J.L. Brewbaker). ACIAR Proceedings No. 57. Canberra, Australia. p. 103
- NTSYS-pc. 1997.** Numerical taxonomy and Multivariate analysis system, version 2.0. Setauket, New York: Exeter Software.
- NYGREN, P.; CRUZ, P.; DOMENACH, A.M.; VAILLANT, U. & SIERRA, J. 2000.** Influence of forage harvesting on dynamics of biological dinitrogen fixation of a tropical woody legume. *Tree Physiology*. 20:41
- OJEDA, F. 1996.** Los árboles forrajeros para la producción de leche. En: T. Clavero (Ed.). Leguminosas forrajeras arbóreas para la agricultura tropical. Ars. Gráfica. Maracaibo, Venezuela. P 81-90
- OLIVERA, Y. 2004.** Evaluación y selección inicial de accesiones de *Brachiaria* spp para suelos ácidos. Tesis en opción al título de Master en Pastos y Forrajes. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey".Cuba. 110 p.
- PADILLA, C. 2001.** Siembra y establecimiento de pastizales de gramíneas. I Foro Latinoamericano de Pastos y Forrajes. La Habana, Cuba. (CD-ROM).
- PALMA, J.M.; AGUIRRE, M.; CÁRDENAS, C. & MOYA, A. 1999.** Valor nutritivo de tres leguminosas arbóreas en el trópico seco de México. *Pastos y Forrajes*. 22:57
- PAN, F.G. 1988.** Comparison of diploid and tetraploid *Leucaena diversifolia*. *Quarterly Journal of Chinese Forestry*. 21: 89-98

- PAPANASTASIS, V.P.; PLATIS, P.D. & DINI-PAPANASTASIS, O. 1998.** Effects of age and frequency of cutting on productivity of Mediterranean deciduous fodder tree and shrub plantations. *Forest Ecology and Management*. 110:283
- PÉREZ-INFANTE, F. 1977.** Posibilidades de los pastos en el trópico. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 11:119
- PEZO, D. & IBRAHIM, M. 1999.** Sistemas silvopastoriles. Módulo de enseñanza Agroforestal No. 2. CATIE-GTZ. Turrialba, Costa Rica. 275 p
- PHILIPPEAU, G. 1986.** Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales. Services de Etudes Statistiques. ITCF. Lusignan, France. p.4
- PIGGIN, C.M.; MELLA, P.; JANING, M.; AKLIS, M.S.; KERRIDGE, D.C.; & ZAINGO, M. 1987.** Report 1985-87. Timur, Indonesia
- PIGGIN, C.M.; SHELTON, H.M.; & DART, P.J. 1995.** Establishment and early growth of *Leucaena*. En: *Leucaena: Opportunities and limitations*. Eds. H. M. Shelton, C. M. Pigginn and J. L. Brewbaker. Proceedings of a Workshop in Bogor Indonesia. ACIAR. Proceedings No. 57. p 241
- PINTO, R.; RAMÍREZ, I.; KÚ-VERA, J.C. & ORTEGA, L. 2002.** Especies arbóreas y herbáceas forrajeras del sureste de México. *Pastos y Forrajes*, 25:171-180.
- POLANCO, D. 1998.** Caracterización morfológica, isoenzimática, contenido de cianuro y almidón en el banco de germoplasma *in vivo* de yuca (*Manihot esculenta* C.) de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. 96p.
- POULSEN, K. & STUBSSGGARD, F. 2000.** Tres métodos de escarificación mecánica de semillas de testa dura. En: Técnicas para la escarificación de semillas forestales. Programa de Investigación. Serie Técnica. Manual Técnico No. 36. CATIE-PROFESOR-DFSC. Turrialba, Costa Rica. p. 35
- RAMÍREZ, H.; HUSSAIN, A.; ROCA, W, & BUSHUK, W. 1987.** Isozymes electrophoregrams of sixteen enzymes in five tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties. *Euphytica* 36: 39-48.
- REYES, F.; RODRÍGUEZ, R.; SIMÓN, L.; LAMELA, L. & SUÁREZ, L. 2000.** Nota técnica: Intercalamiento de *Phaseolus vulgaris* durante el establecimiento de *Leucaena leucocephala* en un sistema silvopastoril. *Pastos y Forrajes*. 23:135-139

- RODRÍGUEZ, M. & ARENCIBIA, A. 2002.** Principales tipos de marcadores del polimorfismo de los ácidos nucleicos. Técnicas analíticas. Capítulo 1. En: Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y selección de las plantas. (Ed. Cornide, M.T.; Arencibia, A.; Berovides, V.; Calvo, D.; Canales, E.; Coto, O; González, C.; Rodríguez, M.; Sánchez, J.; Sigarroa, A & Xiqués, X). Editorial Félix Varela, La Habana, Cuba. p. 13-35
- ROLO, R. 1999.** Relación nutrición-fertilidad en la hembra bovina. Memorias. II Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Colegio de Médicos Veterinarios de Honduras. Honduras. s/p
- ROMÁN, M.J.; RODRÍGUEZ, A.; XIQUÉS, X.; GONZÁLES, C.; RAYAS, A. & GONZÁLES, M.J. 1997.** Caracterización isoenzimática de 17 clones diploides de plátano fruta *Musa* spp. *Biología*. 11:61-70
- ROSALES, M. MURGUEITO, E., OSORIO, M. SPEEDY A. & SÁNCHEZ M. 1999.** Conclusiones y evaluaciones de la conferencia electrónica Agroforestería para la producción animal en América Latina. FAO. Roma. p. 492
- RUIZ, T.E. & FEBLES, G. 1987.** *Leucaena* una opción para la alimentación bovina en el trópico y el subtrópico. EDICA. La Habana, Cuba. 200 p.
- RUIZ, T.E. & FEBLES, G. 1999.** Sistemas silvopastoriles, conceptos y tecnologías desarrolladas en el Instituto de Ciencia Animal. (Eds. T.E. Ruiz y G. Febles). EDICA. La Habana, Cuba. 33 p.
- RUIZ, T.E. & FEBLES, G. 2001a.** Algunas valoraciones conceptuales sobre el establecimiento de las leguminosas en el trópico. Conferencia. I. Foro Latinoamericano de Pastos y Forrajes, Cuba. (CD-ROM)
- RUIZ, T.E. & FEBLES, G. 2001b.** Factores que influyen en la producción de biomasa durante el manejo del sistema silvopastoril. En: Memorias del curso "Sistemas silvopastoriles una opción sustentable". Tantakin, México. p 62.
- RUIZ, T. E. Y FEBLES. G. 2003.** Establecimiento de especies de árboles y arbustos tropicales: Siembra, manejo para el establecimiento y puesta en explotación. Curso: Sistemas silvopastoriles, una opción sostenible. Tantakin. México. p. 36
- RUIZ, T.E. & FEBLES, G. 2005.** Factores que influyen en la producción de biomasa durante el manejo del sistema silvopastoril. En: II Curso Intensivo de Silvopastoreo Colombo-Cubano. Bogotá, Colombia. s/p. [CD-ROM]

- RUIZ, T.E. & FEBLES, G. 2006.** Agrotecnia para el fomento de sistemas con leguminosas. Parte 2. En: Recursos Forrajeros Herbáceos y Arbóreos. (Ed. Milagros Milera). EEPF “Indio Hatuey” Matanzas, Cuba-Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. p. 103
- RUIZ, T.E.; FEBLES, G.; BERNAL, G. & DÍAZ, L.E. 1989.** Estudio de la fecha de siembra de *Leucaena leucocephala* en Cuba. **Revista Cubana de Ciencia Agrícola.** 23:203
- RUIZ, T.E; LAUZURICA, I. & BERNAL, G. 1985.** Estudio de la profundidad de siembra en *Leucaena leucocephala* en dos suelos. ISCAH, Boletín de Pastos No. 1. La Habana. p. 29
- SACANDÉ, M. 2000.** Stress, storage and survival of neems seed. PhD Thesis Wageningen University. Wageningen, The Netherlands. 124 p
- SÁNCHEZ, A.; MIQUILENA, O. & FLORES, R. 2000.** Efecto de corte en la arquitectura de la *L. leucocephala* regada por goteo artesanal. Memorias IV Taller Internacional Silvopastoril “Los árboles y arbustos en la ganadería tropical”. EEPF “Indio Hatuey”. Matanzas, Cuba. p. 235-239
- SÁNCHEZ, M.D. 1999.** Sistemas agroforestales para intensificar de manera sostenible la producción animal en América Latina tropical. En: Agroforestería para la producción animal en América Latina. FAO, Roma. p. 1
- SÁNCHEZ, S. 2007a.** Acumulación y descomposición de la hojarasca en un pastizal de *Panicum maximum* Jacq. Y en un sistema silvopastoril de *Panicum maximum* y *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba. 123 p
- SÁNCHEZ, T. 2007b.** Evaluación productiva de una asociación de gramíneas mejoradas y *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham con vacas Mambí de Cuba en condiciones comerciales. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. La Habana, Cuba. 103 p
- SÁNCHEZ-YELAMO, M.D. 1999.** Caracterización del germoplasma vegetal. Sección 2. Curso Práctico. Proteínas. Departamento de Biología vegetal, E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de Madrid, España. 60 p

- SANDOVAL, C.A.; LIZÁRRAGA, H.L. & SOLORIO, F.J. 2005.** Assessment of tree fodder preference by cattle using chemical composition, *in vitro* gas production and *in situ* degradability. ***Animal Feed Science and Technology***. 123–124:277
- SARMENTO, M.D & SCHIFINO-WITTMAN, M. 2000.** Utilizacao de diferentes tratamentos e seus efeitos na germinacao de sementes de *Leucaena*. ***Revista Científica Rural***. 5 (1):89-94
- SCAPINELLO, C.; FURLAN, A.C.; JOBIM, C. C.; FARIA, H. G-DE.; FIGUEIREDO, D.F & HERNÁNDEZ, A.B. 2000.** Nutritive value and use of *Leucaena* (*Leucaena leucocephala* cv. *Cunningham*) for growing rabbits. ***Acta-Scientiarum***. 22 (3):829
- SCHFING-WITTMANN M.T. & SCHLEGEL M. 1990.** Isozyme patterns of *Leucaena leucocephala*, *Leucaena diversifolia* and their hybrids selected for acid soils tolerance. ***Leucaena Research Reports*** 11: 47-49
- SCHMIDT, A.; FUENMAYOR, F. & FUCHS, M. 2003.** Caracterización de clones de yuca (*Manihot esculenta*) mediante marcadores proteicos e isoenzimáticos. ***Interciencia***. 28:690-698
- SEGUÍ, E.; TOMEU, A. & MACHADO, H. 1989.** Asociaciones entre caracteres individuales y su importancia en el mejoramiento genético de la especie *Panicum maximum* Jacq. ***Pastos y Forrajes***. 12:219
- SEGUÍ, E.; MACHADO, R. & WENCOMO, H.B. 2002.** Informe final de proyecto. 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. EEPF “Indio Hatuey”. 50 p. (Mimeo).
- SHARMA, N.K.; SINGH, P.N.; TYAGI, P.C. & MOHAN, S.C. 2001.** Effect of application of *Leucaena* mulch on soil moisture conservation and productivity of rainfed wheat. ***Indian Journal of Soil Conservation***. 9(2):143
- SHELTON, H.M. 2000.** Potential and limitation of *Leucaena* spp for Silvopastoril System. In: Simposio Internacional: Sistemas Agroforestais Pecuários na América de Sul. 18 – 20 de Setembro 2000. Brasil. (CD ROM)
- SHELTON, H.M. & BREWBAKER, J.L. 1994.** *Leucaena leucocephala*-the most widely used forage tree legume. (Eds. R. C. Gutteridge and H. M Shelton). CAB. International, UK. p 15-30

- SHELTON, H.M.; LOWRY, J.B.; GUTTERIDGE, R.C.; BRAY, R.A. & WILDIN, J.H. 1991.** Sustaining productive pastures in the tropics. 7. Tree and shrubs legumes in improved pastures. *Tropical Grasslands*. 25:119
- SIMÓN, L. 1998.** Del monocultivo de pastos al silvopastoreo: La experiencia de la EEPF "Indio Hatuey". En: Los árboles y arbustos en la ganadería. Tomo 1. Silvopastoreo. (Ed. L. Simón). EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 9
- SIMÓN, L. 2001.** Utilización de leguminosas arbóreas en mezclas y asociaciones en sistemas silvopastoriles. PNCT No. 008 "Producción de alimento animal por vías biotecnológicas y sostenibles". Informe final. EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. (Mimeo)
- SIMÓN, L. 2005.** Impacto bioeconómico y ambiental de la tecnología del silvopastoreo racional. En: El Silvopastoreo: Un nuevo concepto de pastizal (Ed. L. Simón). Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba-Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. p. 203
- SIMÓN, L.; HERNÁNDEZ, I. & OJEDA, F. 2005.** Protagonismo de los árboles en los sistemas silvopastoriles. En: El Silvopastoreo: Un nuevo concepto de pastizal (Ed. L. Simón). Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba-Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. p. 19
- SINGH, B.; SAHOO, A.; SHARMA, R. & BHAT, T.K. 2005.** Effect of polyethylene glycol on gas production parameters and nitrogen disappearance of some tree forages. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124:351
- SKERMAN, P.J.; CAMERON, D.G. & RIVEROS, F. 1991.** Catálogo de leguminosas pratenses tropicales. En: Leguminosas forrajeras tropicales. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal, N° 2. Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. p. 231
- SNEATH, P. & SOKAL, R. 1973.** *Numerical Taxonomy*. Freeman. San Francisco, EEUU. 73p.
- SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P. 1989.** Isozymes in plant biology. Department of Botany, Washington Sate University Pullman, Washington. 45 p
- SONG, P.L.; PENY, W.C. & ZHEN, J.C. 1990.** Research on isozymes in pollen from rice, cotton and rape on the two pathways of pollen development. *Acta Scientiarum-Naturalium-Universitatis-Normalis-Hunariensis*. 13(4): 342-348.

- SORENSSON, C.; SHELTON, H.M.; AUSTIN, M.T. & BREWBAKER, J.L. 1993.** Seedling growth of cultivars and hybrids within the genus *Leucaena*. *Trop. Grassl.* 27:45
- STÜR, W.W.; SHELTON, H.M. & GUTTERIDGE, R.C. 1994.** Desfoliation and management of forage tree legumes. In: Tree legumes in tropical agriculture. (Gutteridge R.C. and Shelton, H.M, eds). CAB International. Wallingford, U.K. p. 144-157.
- TANG, M. 1994.** Efecto de la nodulación con rhizobium en el rendimiento de MS, contenido de nitrógeno y nodulación de *Leucaena leucocephala* cv. CNIA-250. *Pastos y Forrajes.* 17: 143
- TAPIA L.; LÓPEZ, J.L.; BUENO, J.R. & RIVAS, R. 2000.** Empleo del follaje de leguminosas en la alimentación de patos en crecimiento. En: Memorias del IV Taller Internacional Silvopastoril “Los árboles y arbustos en la ganadería tropical”. 29-1 diciembre 2000. EEPF “Indio Hatuey”. Matanzas, Cuba. 381 p.
- TELES, M.N.; ALVES, A.A.; OLIVEIRA, J.C. & BEZERRA, A.M. 2000.** Procedure for dormancy breakage in *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. *Revista Brasileira de Zootecnia.* 29 (2):387-391
- TORAL, O. 2005.** La utilización del germoplasma arbóreo forrajero. En: El Silvopastoreo: Un nuevo concepto de pastizal (Ed. L. Simón). Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”. Matanzas, Cuba-Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. p. 34-47
- TORAL, O.; IGLESIAS, J.M. & REINO, J. 2006.** Comportamiento del germoplasma arbóreo forrajero en condiciones de Cuba. *Pastos y Forrajes.* 29: 337
- TORRES, A.; ALVARADO, A.; CHACÓN, E.; ZERPA, A & ROMERO, R. 2002.** Producción de 3 semillas de *Leucaena leucocephala*. (Lam.) de Wit en Venezuela. Conferencia para el III Cursillo: “El uso de recursos alimenticios para la producción de bovinos a pastoreo”. En: Memorias XI Congreso Venezolana de Producción e Industria Animal. Vallera. 22-26 de octubre. ULA-Trujillo. Venezuela. p 7.
- TORRES, V.; FIGUEREDO, J.; LIZAZO, D. & ÁLVAREZ, A. 2006.** Modelo estadístico para la medición del impacto de la innovación o transferencia tecnológica en la rama agropecuaria. Informe técnico. Instituto de Ciencia Animal. San José de las Lajas. La Habana, Cuba

- VALDÉS, G. & PLANAS, T. 1999.** Ganadería de cría y alimentación. *Rev. ACPA*. 18 (1):47
- VENTER VAN DE, A. 2000.** What is seed vigour? *ISTA New Bulletin*. 121:13
- VISUATA, B. 1998.** Análisis estadístico con SPSS para Windows. Vol. II. Estadística multivariante. Ed. C. Fernández. Madrid, España. p 24
- VOISIN, A. 1963.** Productividad de la hierba. Editorial Tecnos. S. A. Madrid. 499p
- WATSON, L. & DALWITZ, M.J. 1999.** *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. En: Ecology and Evolutionary Biology Conservatory.
- WENCOMO, H.B.; CEPERO, B. & IGLESIAS, J.M. 2003.** Comportamiento de 145 accesiones de *Leucaena* spp aviveradas en un sustrato con suelo ácido. *Pastos y Forrajes*. 26:21
- WENCOMO, H.B.; SEGUÍ, E. & HERNÁNDEZ, L. 2001.** Comportamiento de accesiones de *Leucaena* spp en la fase de establecimiento. *Pastos y Forrajes*. 24:115
- WHITEMAN, P.C. & LULHAM, A. 1970.** Seasonal changes in growth and nodulation of perennial tropical pasture legumes in the field.II. Effects of controlled defoliation levels on nodulation of *Desmodium intortum* and *Phaseolus atropurpureus*. *Aust. J. Agric. Res.* 21:207
- WILLIAMS, B.A. 2000.** Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. En: Forage evaluation in ruminant nutrition. (Eds. D.I. Givens, E. Owen; H.M. Omed y R.F.E. Axford). CAB International. Wallingford, UK. 475 p.
- ZAKAYO, G. KREBS, G.L. & MULLAN, B.P. 2000.** The use of *Leucaena leucocephala* leaf meal as a protein supplement for pigs. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. 13 (9):1309

Anexo 1

Afectaciones causadas por plagas

Grados	Por cientos de afectación (para cada enfermedad)
0	0% de la planta afectada
1	1% de la planta afectada
2	5% de la planta afectada
3	10% de la planta afectada
4	25% de la planta afectada
5	50% de la planta afectada
6	100% de la planta afectada

El cálculo del índice de infección por cada enfermedad se realizó a través de la función de Townsend y Heuberger.

$$II = \frac{\sum axb}{nxK} \times 100, \text{ donde:}$$

a = Número de plantas afectadas; b = Valor del grado de la escala en plantas afectadas; c = Numero total de plantas muestreadas; K = Máximo valor de la escala; II = Índice de infección (%)

De acuerdo a los grados de afectación señalados en la escala descrita anteriormente y los índices de infección que se calcularon, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones, también relacionadas con la metodología de referencia:

Las accesiones: con grado 0 se consideran “inmunes”

con grado 1 - 2 “resistentes”

con grado 3 - 4 tolerantes

con grado 5 - 6 susceptibles

Continuación del Anexo 1

Comportamiento de la incidencia de enfermedades en las accesiones por meses

Índice de infestación (%)/meses																		
No.	Período lluvioso									Período poco lluvioso								
	Mayo - Junio			Julio - Agosto			Sept - Octubre			Nov - Dic			Enero - Febrero			Marzo - Abril		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	0,69	0	1,16	3,47	0	5,55	5,55	4,16	6,25	2,78	2,78	1,39	2,78	4,16	1,39	3,53	4,28	3,24
2	3,47	3,7	3,01	3,47	0	5,55	2,08	2,77	4,68	4,92	4,92	3,70	2,78	4,16	1,39	3,53	4,28	3,24
3	3,93	0	1,16	3,47	0	5,55	5,55	4,16	7,81	3,99	3,99	2,77	4,16	4,16	4,16	3,06	4,05	3,01
4	2,78	0	0	2,78	0	5,55	5,55	4,16	7,46	3,99	3,99	2,77	4,86	5,55	1,39	3,06	4,05	3,01
5	3,47	0	1,16	2,78	0	5,55	5,55	4,16	7,46	3,99	3,99	2,77	2,78	4,16	1,39	3,06	4,05	3,01
6	3,93	0	1,16	2,78	0	5,55	4,16	2,77	5,55	2,60	2,60	1,39	4,86	5,55	1,39	1,21	3,12	2,08
7	1,16	0	4,62	0	0	2,77	5,55	4,16	7,46	3,99	3,99	2,77	4,86	5,55	1,39	3,06	3,35	2,31
8	3,93	0	6,71	0	0	2,77	5,55	4,16	7,46	4,45	4,45	3,24	3,47	2,78	1,39	4,51	4,51	2,08
9	0,69	0	2,54	0	0	2,77	5,55	4,16	6,25	2,31	2,31	3,70	3,47	2,78	1,39	5,15	5,43	3,01
10	3,47	0	1,16	2,78	0	5,55	5,55	4,16	7,81	2,60	2,60	2,77	2,77	1,39	1,39	2,60	3,12	2,08
11	3,47	0	1,16	2,78	0	5,55	5,55	4,16	7,81	2,60	2,60	2,77	2,77	1,39	1,39	1,21	3,12	0,69
12	2,78	0	0	2,78	0	5,55	4,16	2,77	5,55	2,60	2,60	0	1,39	3,01	0,23	1,21	3,64	0,81
13	0	0	0	2,78	0	5,55	5,55	4,16	6,25	4,92	4,92	2,31	2,78	4,16	1,39	3,06	4,05	1,62
14	3,47	0	1,16	0,00	0	0	2,77	4,16	4,68	3,99	3,99	1,39	4,16	4,16	4,16	2,60	3,12	4,86
15	2,78	0	0	2,78	0	5,55	5,55	4,16	6,25	2,60	2,60	1,39	4,86	4,86	3,82	1,39	0,00	2,78
16	2,78	0	0	0,00	0	0	5,55	4,16	7,46	2,78	2,78	1,39	4,16	4,16	1,39	2,60	3,12	2,08
17	3,93	0	1,16	0,00	0	00	5,55	4,16	6,25	2,60	2,60	1,39	2,78	4,16	1,39	1,21	3,12	0,69
18	2,78	0	0	2,78	0	5,55	4,16	2,77	5,55	2,60	2,60	0	2,78	2,78	2,78	2,6	3,12	3,47
19	0	0	0	0,00	0	2,77	4,16	2,77	5,55	2,60	2,60	0	2,78	2,78	0	2,6	3,12	0,69
20	1,16	0	1,16	0,00	0	2,77	2,77	4,16	3,47	3,99	3,99	0	0	0	0	1,21	2,43	0
21	3,93	0	1,16	2,78	0	5,55	5,55	4,16	6,25	2,60	2,60	0	2,78	4,16	1,39	1,21	3,12	2,08
22	2,78	0	0	2,78	0	5,55	5,55	4,16	7,81	2,60	2,60	1,39	2,78	4,16	1,39	1,21	3,12	0,69
23	1,16	0	1,16	2,78	0	5,55	3,47	2,77	3,47	2,60	2,60	1,39	4,16	4,16	1,39	3,81	5,55	3,47

Leyenda: Especies: 1-11 *L. leucocephala*, 12-14 *L. lanceolata*, 15-16 *L. diversifolia*, 17-21 *L. macrophylla*, 22-23 *L. esculenta*
 Enfermedades, a= *Meliola sp.*, b= *Camptomeris leucaenae*, c= *Colletotrichum capsici*

Anexo 2**ELECTROFORESIS PARA LA DETERMINACION DE ISOENZIMAS****Preparación de soluciones madres.****1. Solución madre Buffer Tris-Gly (20x)**

- 50 g de Gly
- 96.6 g de Tris

Disolver en volumétrico de 1 L con H₂O desionizada.

2. Solución madre Buffer Tris-HCl (2x)

- 46 g de Tris
- 900 ml H₂O desionizada

Disolver

- Añadir HCl hasta pH 8.9

Completar a 1 L

3. Solución madre Gel de Poliacrilamida 8.5 % pH 8.9 (2x)

- 163.1 g de Acrilamida
- 8.9 g de Bis-acrilamida
- Disolver en solución de Tris-HCl
- Añadir 2 ml de TEMED
- Llevar a 1 L con Tris-HCl

Nota: **Guardar en frasco ambar**

4. Preparación de geles en cubeta.**GEL SEPARADOR:**

- 25 ml de gel de poliacrilamida
- 25 ml de H₂O desionizada
- 0.7 ml de persulfato de amonio (AMPS) al 10 %

5. Buffer de corrida.

- 25 ml de la solución madre de Tris-Gly en volumétrico de 2 L
- Añadir H₂O desionizada
- Ajustar pH 8.3
- Enrasar.

6. Corrida

7. Polo negativo: Rg de cubeta de las muestras.

Corriente 40-50 nA y 120 V

T de corrida 4 h

8. Tinción de geles.

A) Verter en una probeta 14 ml de Hac glacial

Añadir 0.25 g de benzidina diHCl hasta disolver

Enrasar a 50 ml con H₂O desionizada

B) Se vierte 0.5 ml de H₂O₂ (28-32 %)

Se completa a 50 ml con H₂O desionizada

C) Unir A y B 10 min antes de usarlo.

Procedimiento de tinción:

1. Situar el gel durante 5-10 min hasta aparición de bandas.
2. Lavar 2 ó 3 veces con H₂O d
3. Cubrir el gel con HAc al 10 %.

Según Chamberlain, Hughes y Galvey, 1996

GEL BUFFER

5,4 g Tris-base	}	pH 8,3
1,28 g ácido cítrico		
1L de H ₂ O		

BUFFER DE EXTRACCIÓN

50 mL buffer

40 mg KCl

100 mg MgCl₂

18 mg EDTA (sal disódica)

0,5 mL Tritón X-100

2 mL 10% DTT

2 g PVP-40

ESTANDARIZADO

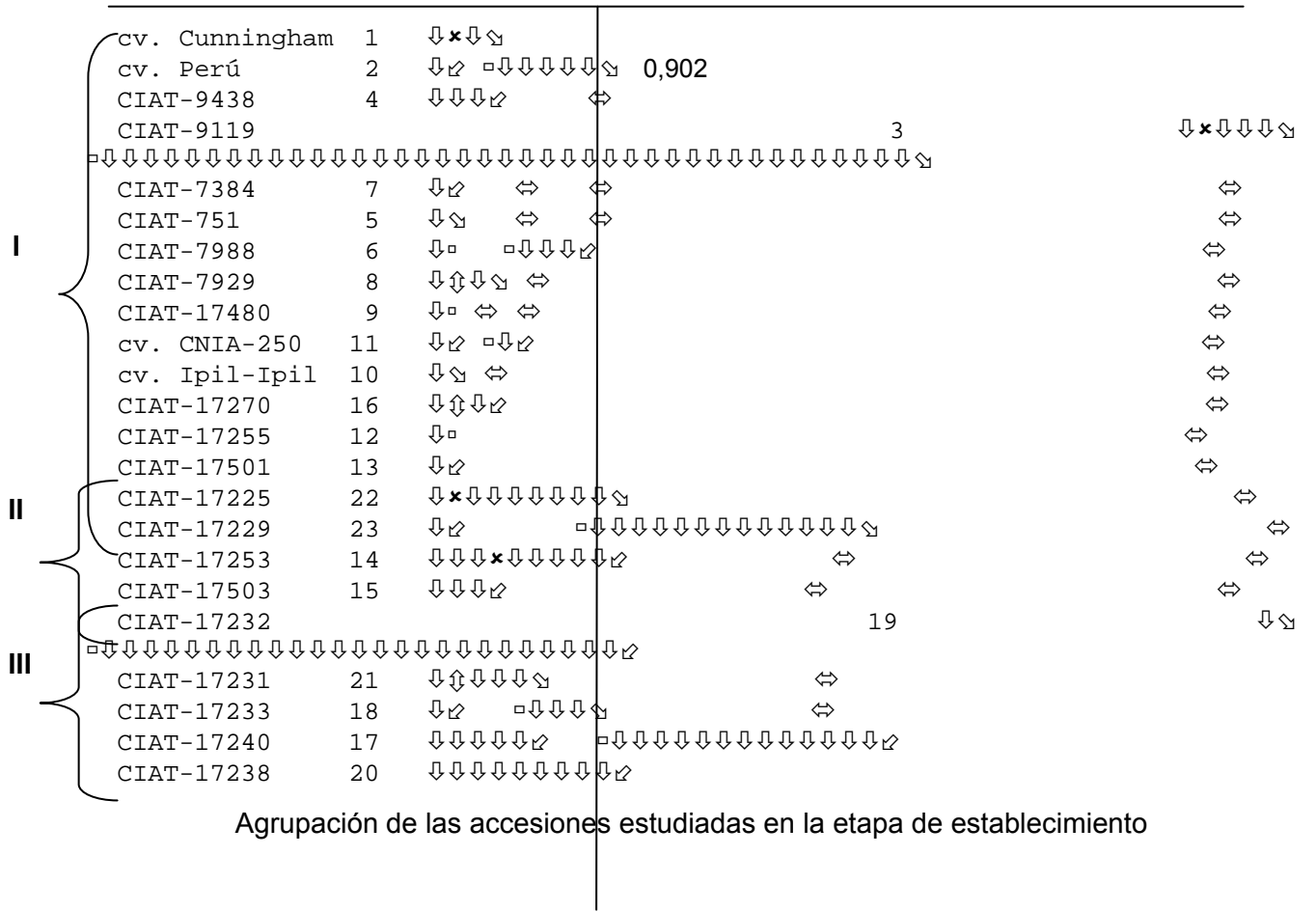
Se empleó un buffer Tris-Citrato pH 8.3 al que se añadió KCl 0.08%, MgCl₂ 0.2%, EDTA 0.04%, 0,5 mL de Tritón X100 1%, 2 mL 10% DTT y 25 mg PVP-40 4%.

Anexo 3

I	CIAT-9438	4	↓*↓☒	1,254	
	CIAT-7384	7	↓☒ ⇔		
	cv. CNIA-250	11	↓↓↓↓☒↓↓↓☒		
	CIAT-17270	16	↓↓↓☒ ☐↓☒		
	CIAT-17255	12	↓*↓↓↓↓↓☒ ⇔		
	CIAT-17501	13	↓☒ ☐↓↓↓↓↓↓↓☒		
	cv. Cunningham	1	↓↓↓*↓☒ ⇔		
	cv. Perú	2	↓↓↓☒ ☐↓↓↓☒		
	CIAT-7929	8	↓↓↓☒ ⇔		☐↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓☒
	CIAT-17480	9	↓↓↓☒↓☒		⇔
	CIAT-9119	3	↓↓↓☐		⇔
	cv. Ipil-Ipil	10	↓↓↓☒		⇔
	CIAT-751	5	↓↓↓*↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓☒		
	☐↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓☒				
	II	CIAT-7988	6		↓↓↓☒
CIAT-17240		17	↓↓↓*↓☒	⇔	
CIAT-17233		18	↓↓↓☒ ☐↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓☒	⇔	
CIAT-17253		14	↓↓↓↓↓☒	⇔	
CIAT-17232		19	↓☒	☐↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓☒	
CIAT-17238		20		↓↑↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓☒	
CIAT-17231		21	↓☒	☐↓↓↓↓↓☒	
CIAT-17503		15		↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓☒	
III		CIAT-17225			22
		↓↓↓↓↓*↓↓☒			
	CIAT-17229	23	↓↓↓↓↓☒		

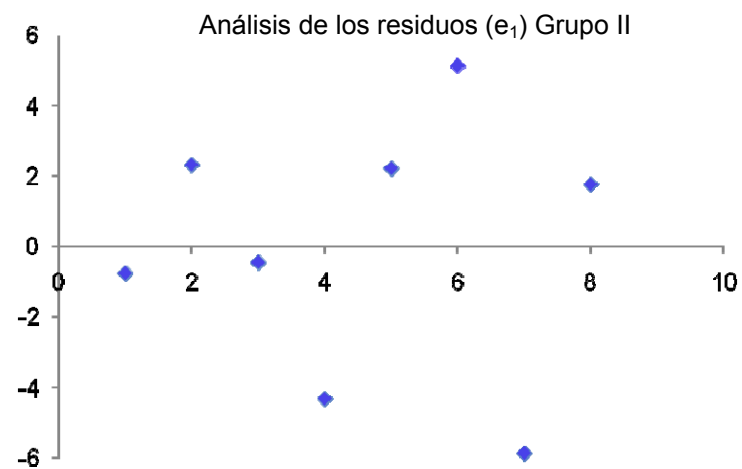
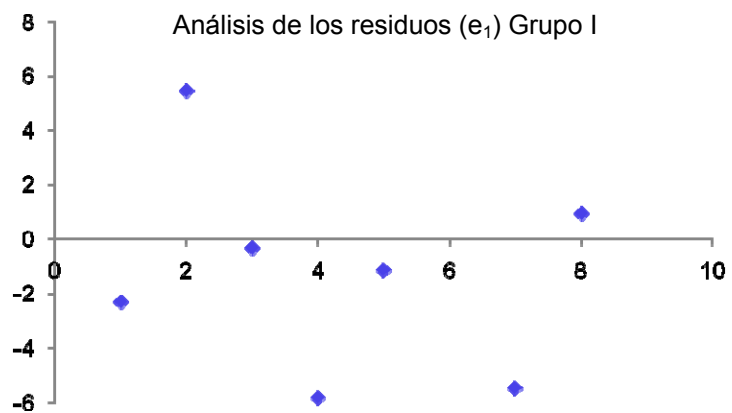
Agrupación de las accesiones estudiadas en las condiciones de vivero

Anexo 4



Agrupación de las accesiones estudiadas en la etapa de establecimiento

Anexo 5



Análisis de varianza

	GL	SC	CM	F	Signf.
Regresión	3	26008,9	8669,6	196,14	***
Residual	4	176,8	44,2		

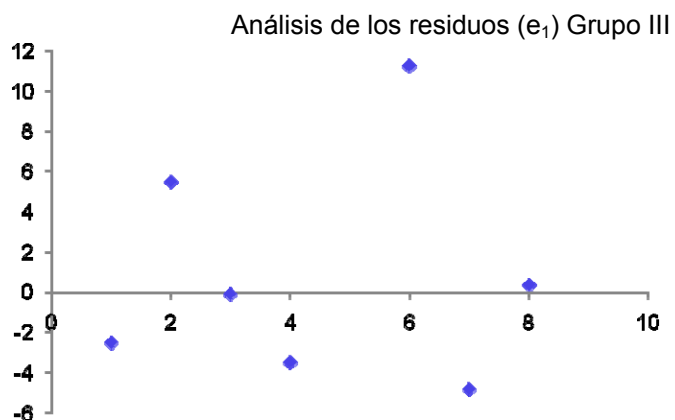
Múltiple R=0,995
 $R^2=0,993$
 R^2 ajustado=0,987
 $EE\pm=6,45$

Análisis de varianza

	GL	SC	CM	F	Signf.
Regresión	3	23307,6	7769,21	331,8	***
Residual	4	93,66	23,41		

Múltiple R=0,998
 $R^2=0,996$
 R^2 ajustado=0,993
 $EE\pm=4,83$

Continuación del Anexo 5



Análisis de varianza

	GL	SC	CM	F	Signf.
Regresión	3	19197,6	6399,2	108,51	***
Residual	4	235,8	58,9		

Múltiple R=0,993
 $R^2=0,987$
 R^2 ajustado=0,978
 $EE\pm=7,67$

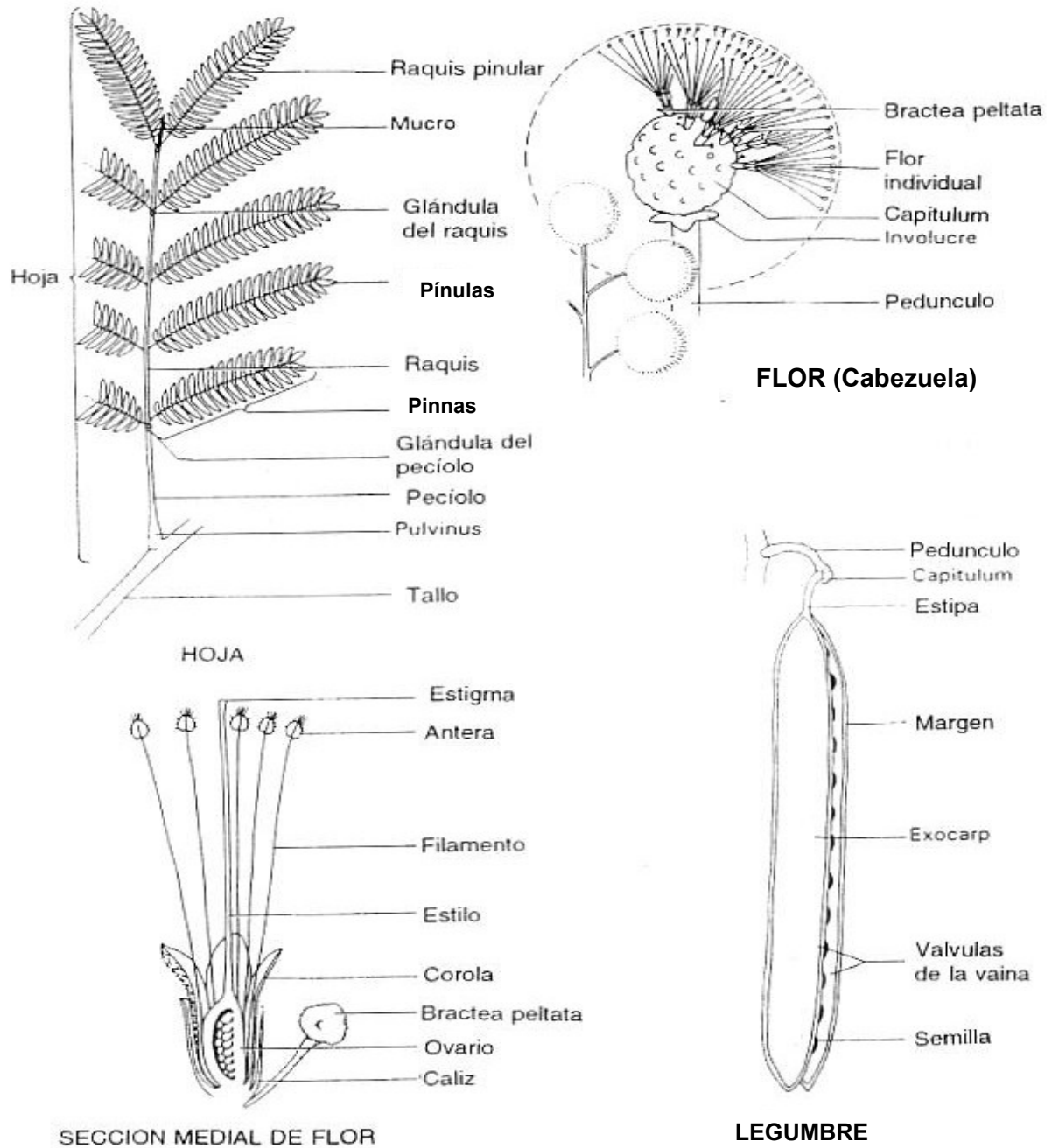
Diagrama de líneas con una curva de ajuste que aproxima la relación entre la altura (cm) y los días

Modelo de mejor ajuste entre la altura y los días

Altura	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Modelo	Cúbico	Cúbico	Cúbico
Probabilidad	$P<0,001$	$P<0,001$	$P<0,001$
R^2	0,993	0,996	0,987
$V(e)$	44,20	23,41	58,96
β_1	0,185 $\pm 0,279$	0,125 $\pm 0,20$	0,020 $\pm 0,32$
β_2	0,005 $\pm 0,003$	0,006 $\pm 0,002$	0,007 $\pm 0,003$
β_3	-1,08E-05 $\pm 1,01E-05$	- 1,62E-05 $\pm 7,35E-06$	- 2,14E-05 $\pm 1,16E-05$

Anexo 6

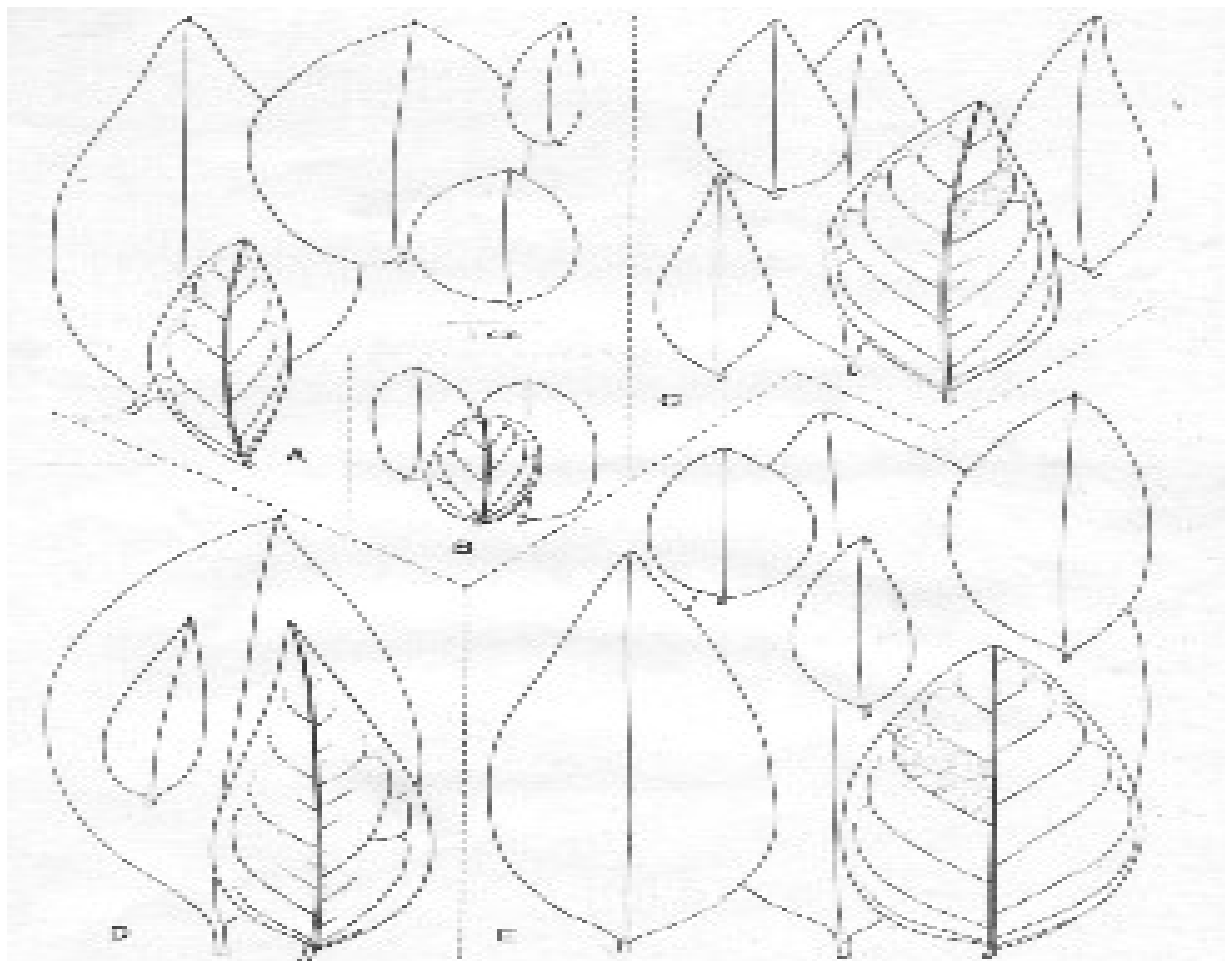
Morfología de *Leucaena* (hoja, flor y fruto)



Fuente: Tomado de Hughes, 1998

Anexo 7

Tamaño y forma de las pínulas: especies con pínulas ovaladas o elípticas y bases débilmente asimétricas.



Fuente: Tomado de Anon. 2002

Leyenda:

A *L. lanceolata*

B *L. retusa*

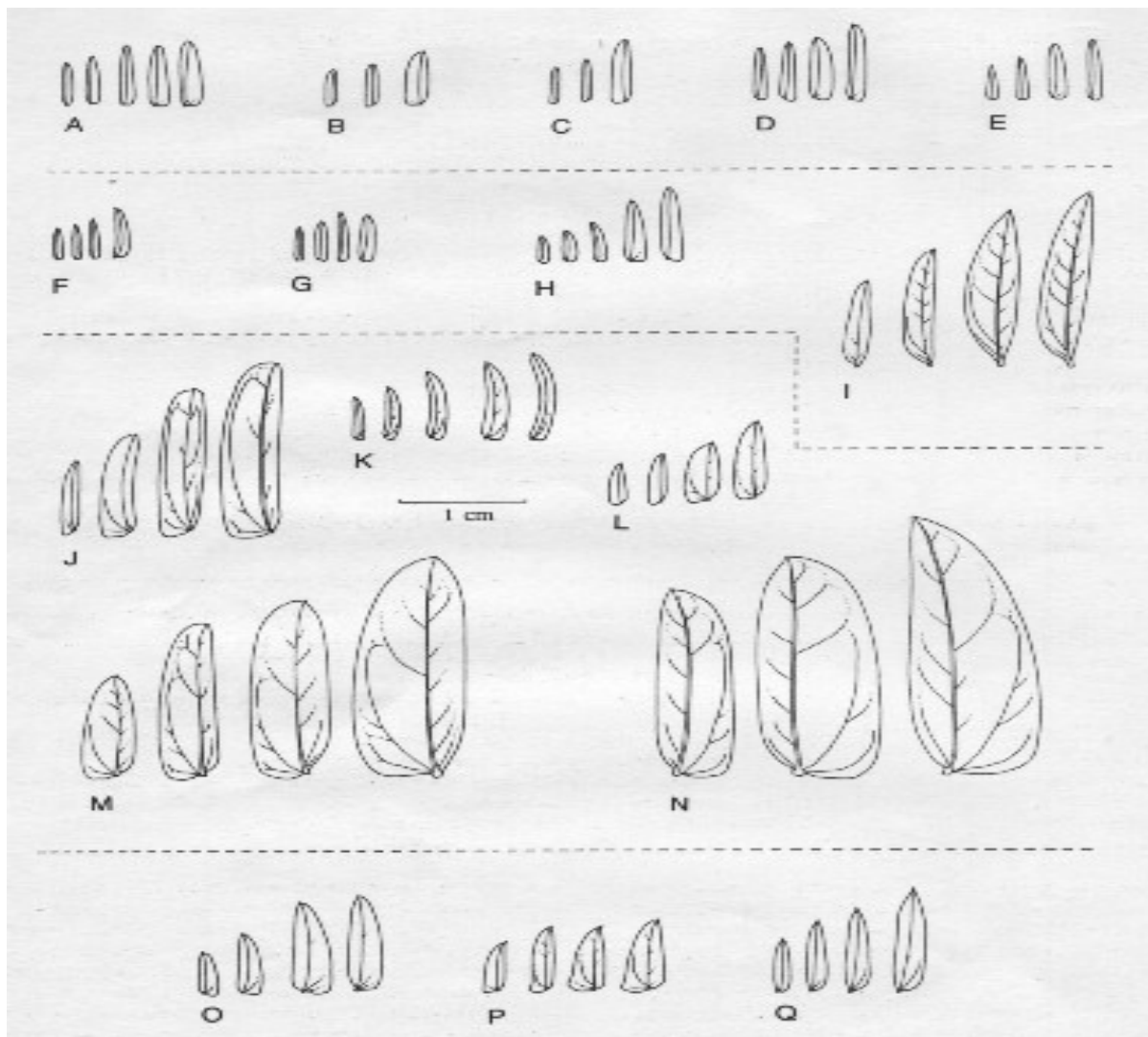
C *L. multicapitula*

D *L. macrophylla*

E *L. trichodes*

Continuación del Anexo 7

Tamaño y forma de las pínulas: especies con pínulas lineales o lineales – oblongas con bases fuertemente asimétricas.



Fuente: Tomado de Anon. 2002

Leyenda:

A *L. esculenta*

B *L. involucrata*

C *L. pueblana*

D *L. pallida*

E *L. matudae*

F *L. trichandra*

G *L. pulverulenta*

H *L. diversifolia*

I *L. leucocephala*

J *L. salvadorensis*

K *L. collinsii*

L *L. lempirana*

M *L. shannonii*

N *L. magnifica*

O *L. confertiflora*

P *L. cuspidata*

Q *L. greggii*

Continuación del Anexo 7

Características del tamaño y forma de las pínulas de las especies de *Leucaena*

1*.Pínulas elípticas, ovaladas o lanceoladas, débilmente asimétricas en la base, grandes				
Especies	No. pares de pinnas	No. pares de pínulas	Longitud de la pínulas (mm)	Ancho de las pínulas (mm)
<i>L. lanceolata</i>	2 – 5	2 – 5 (7)	16 - 70	8 - 35
<i>L. macrophylla</i>	(1) 2 - 3	2 – 4 (6)	(15) 23 – 55 (80)	(6) 7 - 39
2*.Pínulas lineales, estrechas – oblongas, fuertemente asimétrica en la base, pequeñas				
<i>L. diversifolia</i>	(14) 16 – 24 (24)	(43) 48 - 62	(2,9) 4 – 5,5 (7)	(0,6) 0,8 – 1,2
<i>L. esculenta</i>	(18) 30 – 40 (60)	(40) 60 – 75(85)	3,5 – 6,6	0,9 – 1
<i>L. leucocephala</i>	(4) 6 – 8 (9)	13 - 21	9 – 16 (21)	2 – 4,5

Fuente: Tomado de Anon, 2002

Leyenda: 1* grandes (>1 cm de ancho) 2* pequeños (< 1 cm de ancho) Rango normal en letra negra, en paréntesis rango extremo

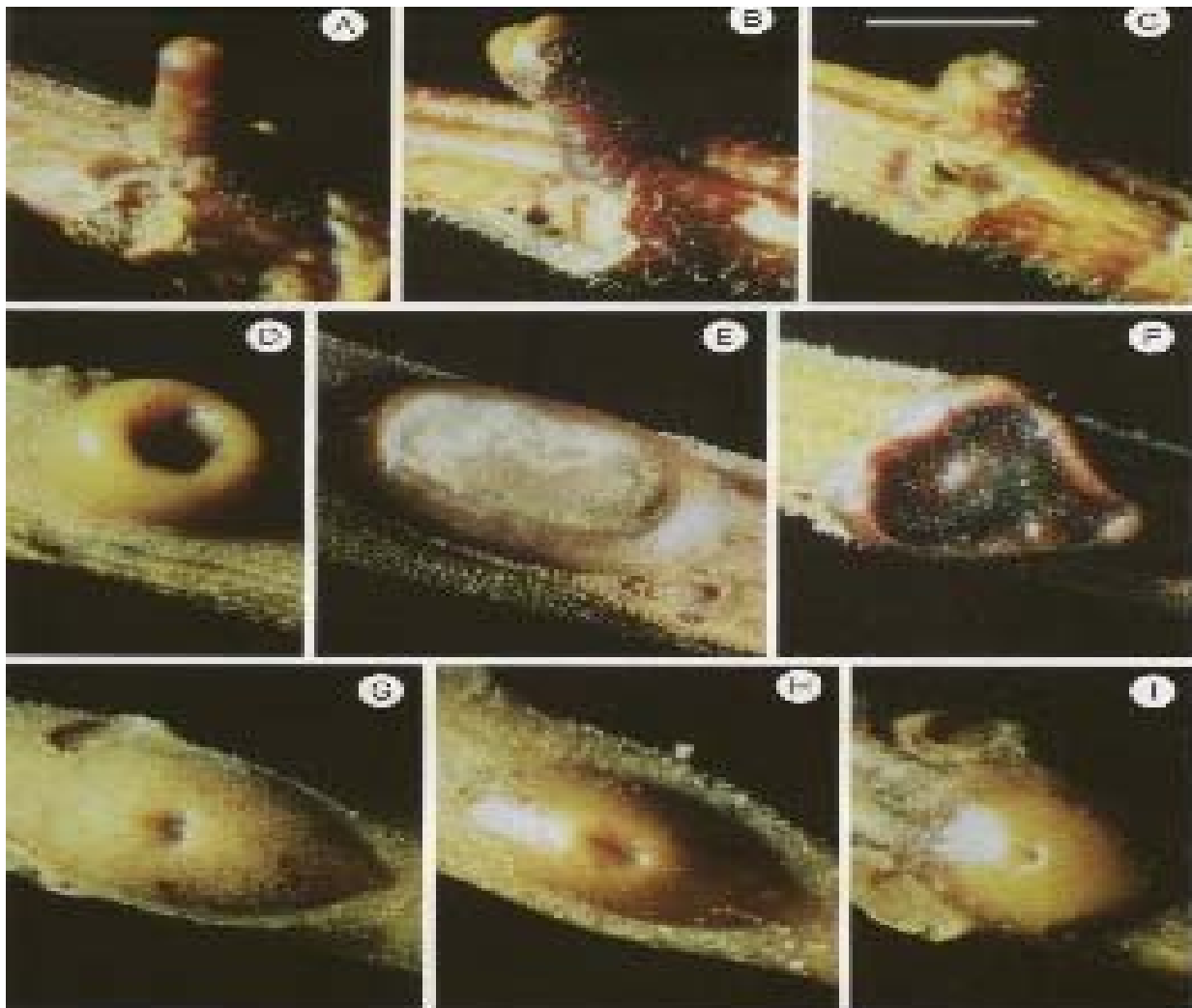
Principales características morfológicas de las accesiones evaluadas

No.	Especie	Accesiones	L N/CF	Longitud de las legumbres	Ancho de las legumbres	Color de las legumbres	Color de las semillas
1	<i>L. leucocephala</i>	cv. Cunningham	5	14,5	2	1	2
2		cv. Perú	4	17,3	2,2	2	2
3		CIAT 9119	2,4	14,6	1,8	2	2
4		CIAT 9438	1 - 3	12,5	1,8	2	2
5		CIAT 751	3 - 5	13,5	1,8	1	1
6		CIAT 7988	4	20	1,7	1	2
7		CIAT 7384	8	17,4	2,3	2	2
8		CIAT 7929	5	15,7	1,8	1	2
9		CIAT 17480	2	16,2	1,6	2	2
10		cv. Ipil Ipil	8	19	1,9	1	1
11		cv. CNIA 250	2	18	1,9	2	2
12	<i>L. lanceolata</i>	CIAT 17255	1 - 4	11,4	1,5	2	2
13		CIAT 17501	1 - 3	13,5	1,2	1	1
14		CIAT 17253	1,4	11,4	1,5	1	2
15	<i>L. diversifolia</i>	CIAT 17503		No floreció, ni fructificó		-	-
16		CIAT 17270	7	16	1,5	1	1
17	<i>L. macrophylla</i>	CIAT 17232	1,2	8	2	2	2
18		CIAT 17233		No floreció, ni fructificó		-	-
19		CIAT 17240	1,3	6	0,5	1	2
20		CIAT 17238	1,3	6	0,5	1	1
21		CIAT 17231	1,2	15,5	1,5	1	2
22	<i>L. esculenta</i>	CIAT 17225	2	12,5	2,2	1	2
23		CIAT 17229		No floreció, ni fructificó		-	-

Leyenda: L N/CF: Legumbres, número/cabezuela.

Color de las semillas y de las legumbres: 1. carmelita claro, 2. carmelita oscuro

Anexo 8

Tipos de glándulas de pecíolo de las especies de *Leucaena***Legenda:**

A-C Glándulas cortas estipitadas (tronchadas), cilíndricas.

D-F Glándulas sentadas (no tronchadas) en forma de taza o cráter con orificio ancho.

E *L. esculenta*

G-I Glándulas sentadas (no tronchadas), redondas, cónicas o en forma de cúpula con orificio angosto.

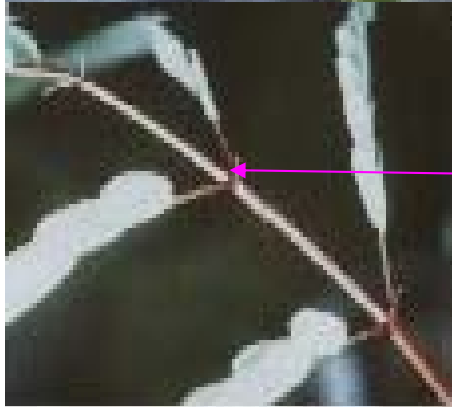
Continuación del Anexo 8

Tipos de glándulas de pecíolo de *Leucaena*



A

Gota de néctar en la glándula del pecíolo de la hoja joven de una planta de *L. esculenta*



B

Glándulas erguidas en forma de espiga de *L. retusa*



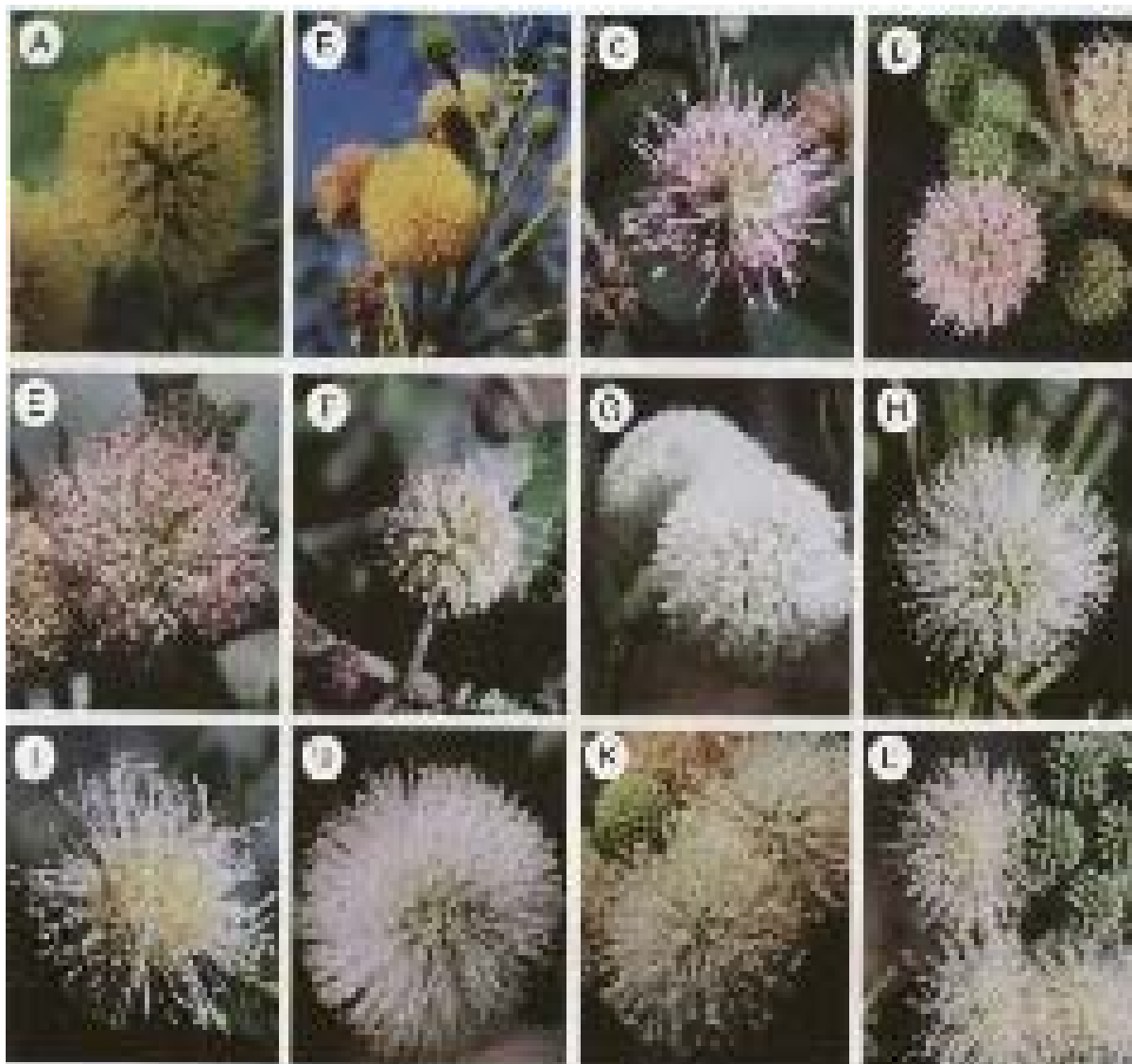
C

Glándulas múltiples en forma de taza o discoide a lo largo del raquis de la hoja de *L. trichandra*

Glándulas múltiples a lo largo del raquis de hoja en la base de cada par de pinnas.

Fuente: C tomada de Anon., 2002

Anexo 9
Flores de *Leucaena*



Fuente: Tomado de Anon (2002)

Leyenda:

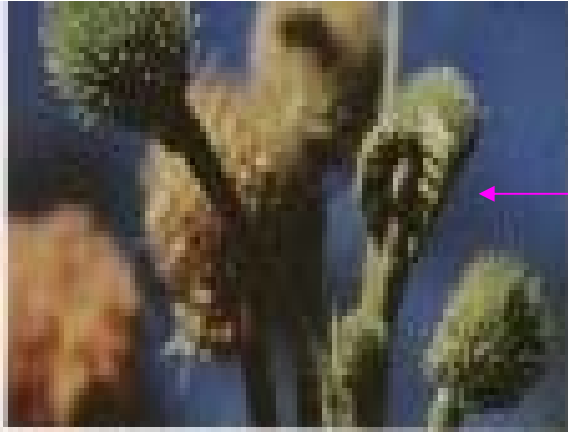
A-B Especies con flores amarillo brillantes y brácteas puntiagudas de flor que son fuertemente exertos en yema

C-F Especies con partes de flores matizadas de rosado o rojizo. **C** *L. diversifolia*

G-L Especies con flores blancas y brácteas redondas de flor que son exertadas en yema **G**
L. lanceolata **J** *L. esculenta*

Continuación del Anexo 9

Flores de *Leucaena* (forma de las brácteas)



Yema de flor de *L. retusa* mostrando la apariencia de cono, debido a las brácteas exertas de flor puntiagudas



Yemas de flor en forma de cereza, con brácteas redondas

Anexo 10
Forma de las legumbres de *Leucaena*



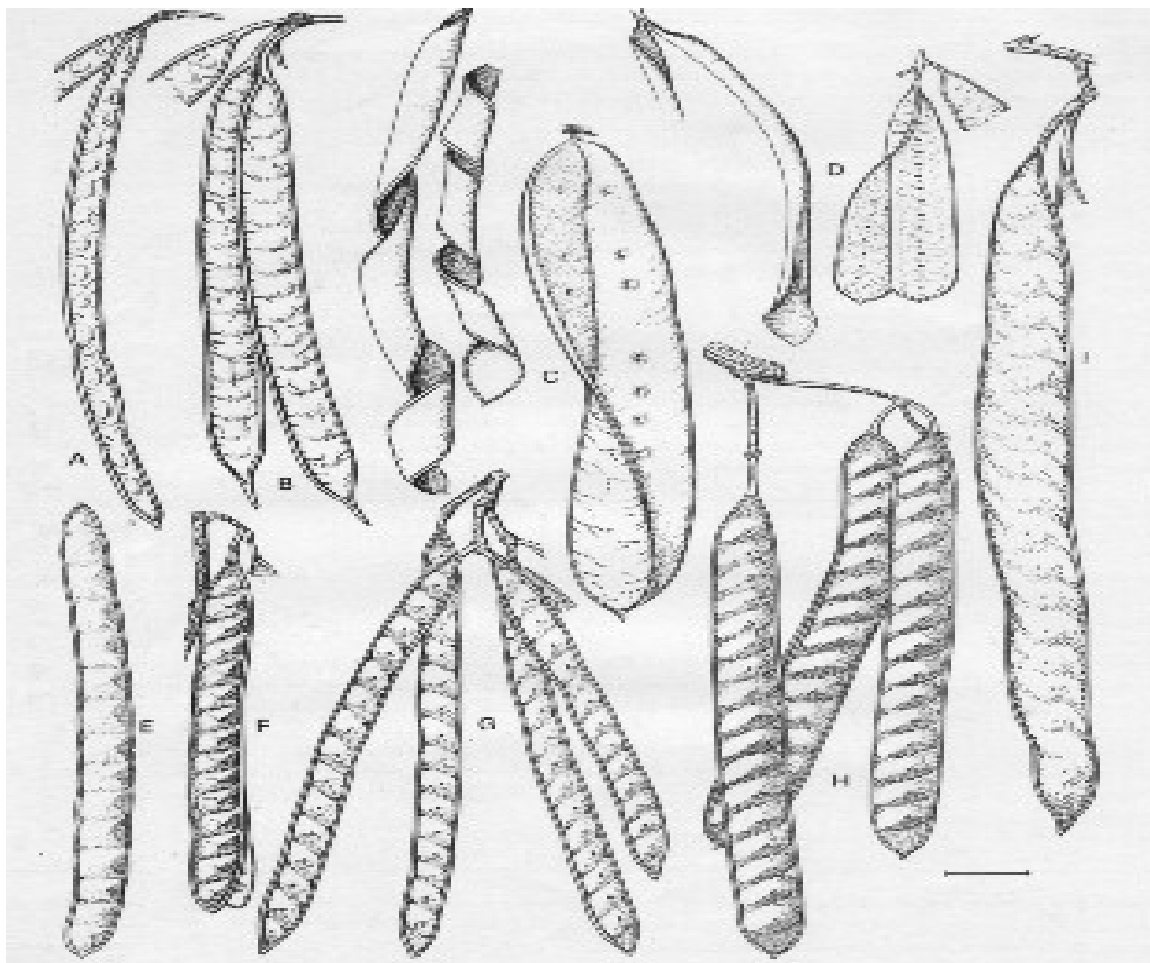
L. leucocephala



L. esculenta

Continuación del Anexo 10

Forma y tamaño de las legumbres de *Leucaena*



Fuente: Tomado de Anon. 2002

Leyenda:

A *L. retusa*

B *L. greggii*

C *L. cuspidata*

D *L. confertiflora*

E *L. matudae*

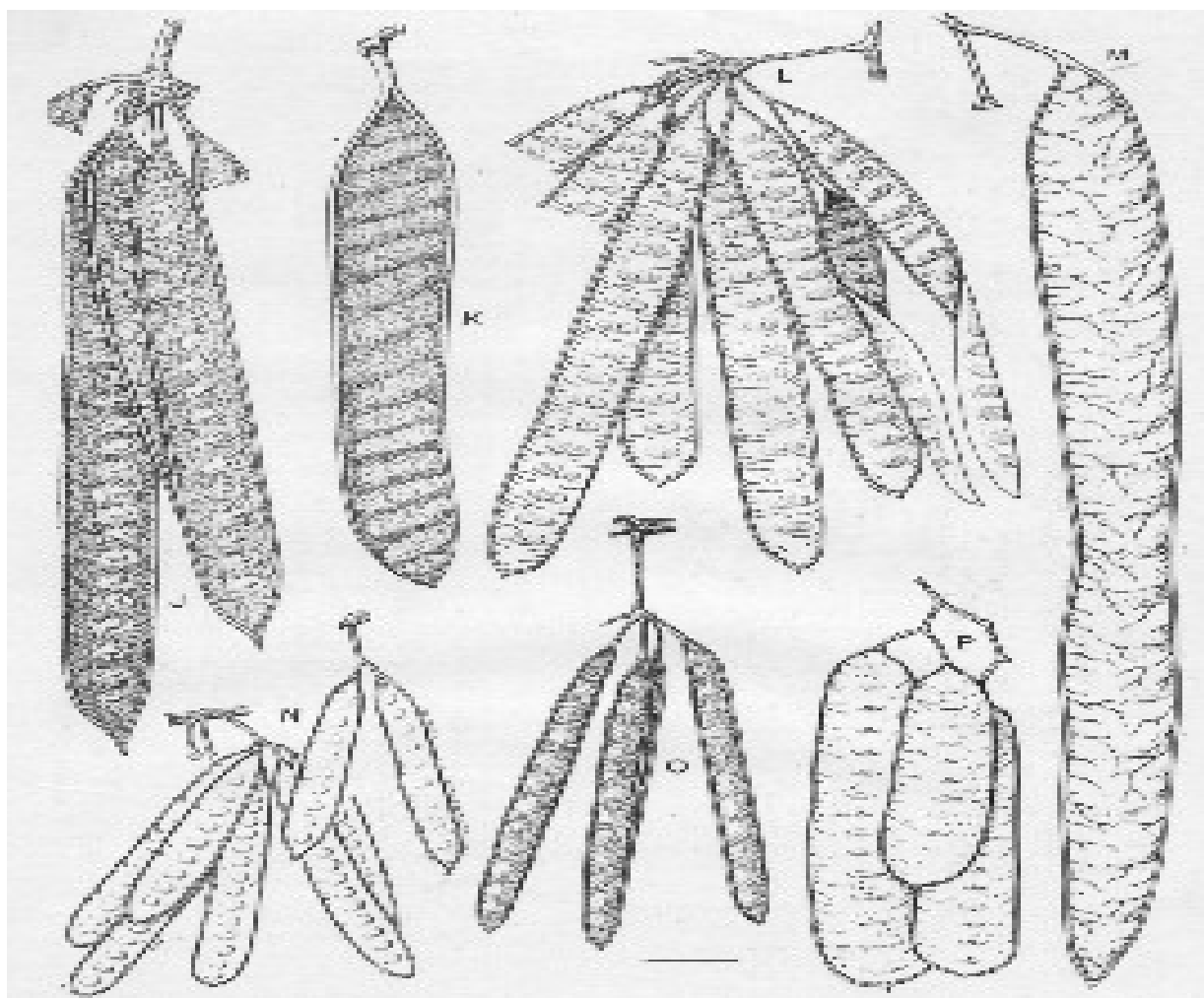
F *L. pueblana*

G *L. involucrata*

H *L. pallida*

I *L. esculenta*

Forma y tamaño de las legumbres de *Leucaena*



Fuente: Tomado de Anon. 2002

Leyenda:

J *L. magnifica*

K *L. salvadorensis*

L *L. leucocephala*

M *L. lanceolata*

N *L. trichandra*

O *L. shannonii*

P *L. multicapitula*

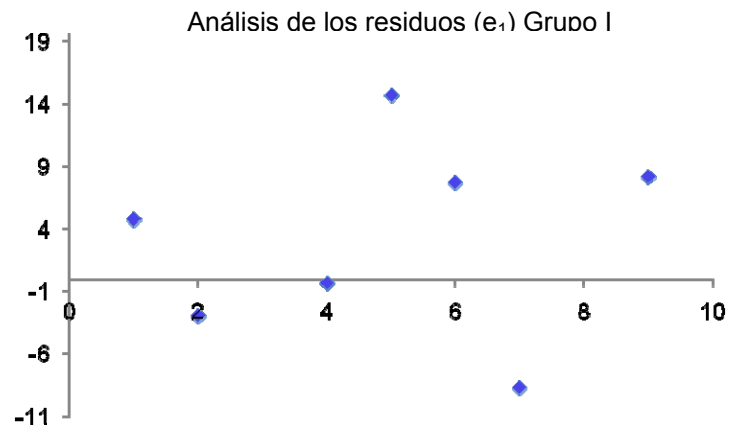
P *L. esculenta*

Anexo 11

I	CIAT 751	5	↓↘	0,309		
	CIAT 7929	8	↓□			
	CIAT 7384	7	↓□			
	CIAT 17501	13	↓⇄↓↘			
	cv. Perú	2	↓□ ⇄			
	CIAT 9119	3	↓↘ □↓↘			
	CIAT 7988	6	↓↘ ⇄ ⇄			
	cv. Ipil-Ipil	10	↓□ ⇄ ⇄			
	CIAT 9438	4	↓⇄↓↘ ⇄			
	cv. Cunningham	1	↓↘			
□↓↓						
II	CIAT 17480	9	↓↓↓↓↓□		⇄	
	cv. CNIA-250	11	↓*↓↘ ⇄		⇄	
	CIAT 17270	16	↓↘ □↓↘		⇄	
	CIAT 17255	12	↓↓↓↘		⇄	
	CIAT 17225	22	↓*↓↓↓ ↓↓↘		⇄	
	CIAT 17229	23	↓↘ ⇄		⇄	
III	CIAT 17240	17	↓↘ ⇄		⇄	
	CIAT 17231	21	↓⇄↓↘			
	□↓↓					
	CIAT 17232	19	↓↘ □↓↘ ⇄			
	CIAT 17253	14	↓↘ ⇄ ⇄ ⇄			
CIAT 17238	20	↓⇄↓↘ □↓↘				
CIAT 17233	18	↓↘ ⇄				
CIAT 17503	15	↓↓↓↓↓↓↘				

Agrupación de las accesiones estudiadas en la etapa de capacidad de recuperación a la poda

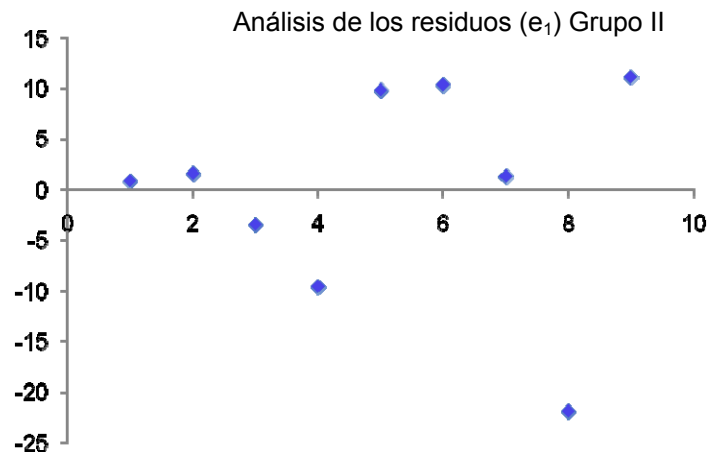
Anexo 12



Análisis de varianza

	GL	SC	CM	F	Signf.
Regresión	2	35994,6	17997,3	149,77	***
Residual	6	720,9	120,1		

Múltiple R=0,990
 $R^2=0,980$
 R^2 ajustado=0,973
 EE=10,96

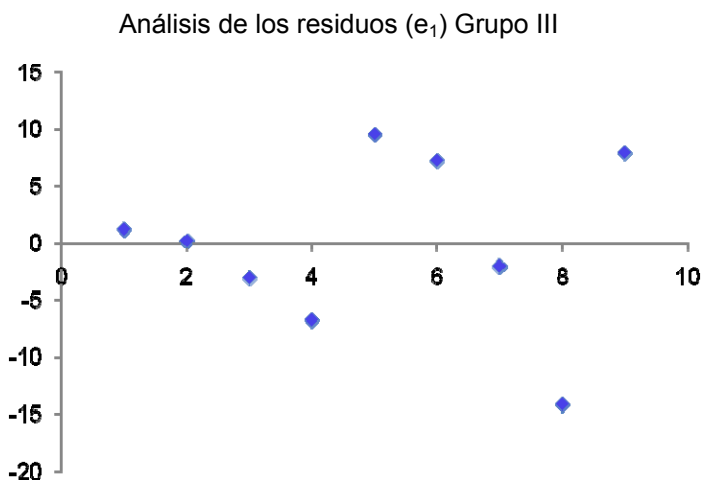


Análisis de varianza

	GL	SC	CM	F	Signf.
Regresión	2	28527,6	14263,8	93,47	***
Residual	6	915,6	152,6		

Múltiple R=0,984
 $R^2=0,968$
 R^2 ajustado=0,958
 EE=12,35

Continuación del Anexo 12



Análisis de varianza

	GL	SC	CM	F	Signf.
Regresión	2	17488,6	8744,3	112,7	***
Residual	6	465,4	77,5		

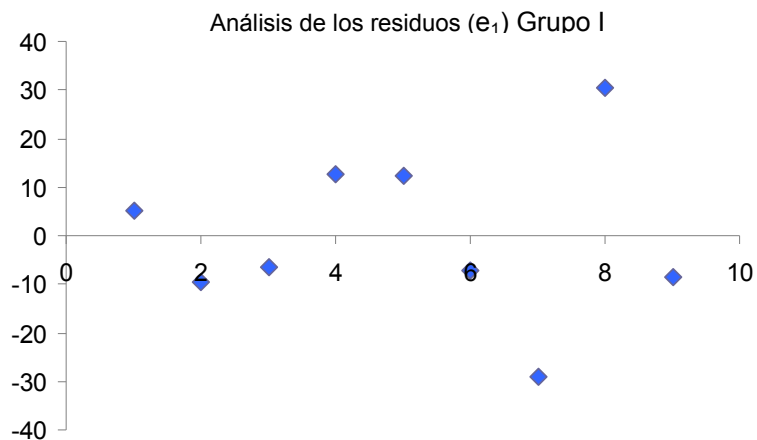
Múltiple R=0,986
 $R^2=0,974$
 R^2 ajustado=0,965
 EE=8,80

Diagrama de líneas con una curva de ajuste que aproxima la relación entre el número de rebrotes y los días por grupos.

Modelo de mejor ajuste entre el número de rebrotes y los días

Número de rebrotes	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Modelo	Cuadrático	Cuadrático	Cuadrático
Probabilidad	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
R^2	0,983	0,968	0,974
$V(e)$	120,16	152,60	77,57
β_1	1,110	0,358	0,059
	$\pm 0,914$	$\pm 1,03$	$\pm 0,73$
β_2	0,033	0,038	0,033
	$\pm 0,012$	$\pm 0,014$	$\pm 0,010$

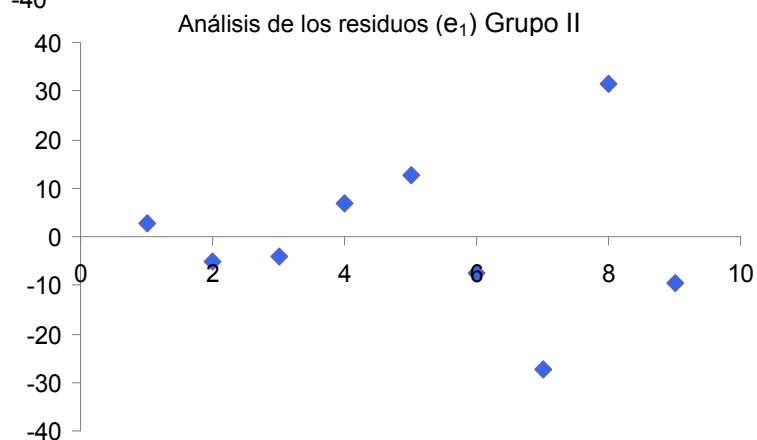
Anexo 13



Análisis de varianza

	GL	SC	CM	F	Signf.
Regresión	3	50941,5	16980,5	35,73	***
Residual	5	2375,6	475,1		

Múltiple R=0,977
 $R^2=0,955$
 R^2 ajustado=0,937
 $EE\pm=21,79$

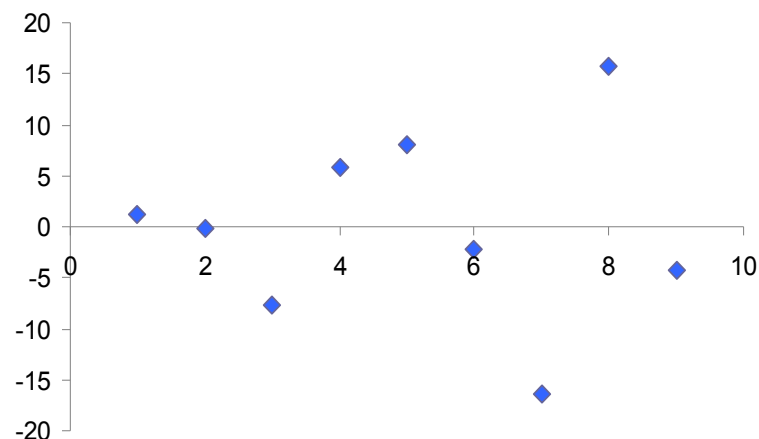


Análisis de varianza

	GL	SC	CM	F	Signf.
Regresión	3	38017,6	12672,5	29,31	***
Residual	5	2161,4	432,2		

Múltiple R=0,972
 $R^2=0,951$
 R^2 ajustado=0,913
 $EE\pm=20,79$

Continuación del Anexo 13

Análisis de los residuos (e_i) Grupo III

Análisis de varianza

	GL	SC	CM	F	Signf.
Regresión	3	16637,0	5545,6	39,77	***
Residual	5	697,0	139,4		

Múltiple R=0,979
 $R^2=0,967$
 R^2 ajustado=0,935
 $EE\pm=11,80$

Diagrama de líneas con una curva de ajuste que aproxima la relación entre la longitud de los rebrotes y los días por grupos.

Modelo de mejor ajuste entre la longitud de los rebrotes y los días

Longitud de los rebrotes	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Modelo	Cúbico	Cúbico	Cúbico
Probabilidad	$P<0,001$	$P<0,001$	$P<0,001$
R^2	0,955	0,946	0,959
$V(e)$	475,12	432,28	139,41
β_1	7,926 $\pm 5,52$	5,760 $\pm 5,26$	4,778 $\pm 2,99$
β_2	-0,197 $\pm 0,178$	-0,133 $\pm 0,170$	-0,131 $\pm 0,096$
β_3	0,002 $\pm 0,001$	- 30,77 $\pm 44,95$	- 27,72 $\pm 25,52$

Anexo 14

Tabla Producción media de biomasa de las accesiones evaluadas por años (kg MS/planta)

No.	Especies	Accesiones	Período lluvioso			Período poco lluvioso		
			BC kg/árbol	BL kg/árbol	BT kg/árbol	BC kg/árbol	BL kg/árbol	BT kg/árbol
1	<i>L. leucocephala</i>	cv. Cunningham	0,81	0,93	1,74	0,75	0,90	1,66
2		cv. Perú	0,72	0,80	1,53	0,74	0,78	1,53
3		CIAT-9119	0,78	0,85	1,63	0,69	0,77	1,46
4		CIAT-9438	0,65	0,86	1,51	0,71	0,77	1,48
5		CIAT-751	0,64	0,83	1,47	0,64	0,69	1,34
6		CIAT-7988	0,69	0,88	1,58	0,72	0,79	1,51
7		CIAT-7384	0,67	0,73	1,40	0,65	0,70	1,36
8		CIAT-7929	0,67	0,90	1,57	0,68	0,75	1,43
9		CIAT-17480	0,82	0,91	1,74	0,70	0,80	1,50
10		cv. Ipil-Ipil	0,77	0,87	1,64	0,79	0,83	1,63
11		cv. CNIA-250	0,68	0,89	1,57	0,69	0,76	1,45
12	<i>L. lanceolata</i>	CIAT-17255	0,64	0,74	1,38	0,68	0,80	1,48
13		CIAT-17501	0,66	0,85	1,52	0,63	0,73	1,36
14		CIAT-17253	0,63	0,81	1,44	0,71	0,81	1,52
15	<i>L. diversifolia</i>	CIAT-17503	0,82	0,87	1,69	0,69	0,79	1,49
16		CIAT-17270	0,67	0,84	1,51	0,73	0,82	1,56
17	<i>L. macrophylla</i>	CIAT-17240	0,69	0,83	1,53	0,67	0,80	1,47
18		CIAT-17233	0,63	0,78	1,41	0,79	0,83	1,62
19		CIAT-17232	0,65	0,78	1,43	0,71	0,81	1,52
20		CIAT-17238	0,63	0,74	1,38	0,69	0,80	1,49
21		CIAT-17231	0,66	0,73	1,39	0,81	0,85	1,67
22	<i>L. esculenta</i>	CIAT-17225	0,65	0,74	1,39	0,78	0,85	1,65
23		CIAT-17229	0,63	0,75	1,38	0,78	0,84	1,63
EE ±			0,024^{ns}	0,024^{ns}	0,044^{ns}	0,026^{ns}	0,026^{ns}	0,041^{ns}

EE ±: Error estándar

BC: biomasa comestible

BL: biomasa leñosa

BT: biomasa total

Anexo 15

Tabla Composición bromatológica de las accesiones evaluadas

No.	Especies	Accesiones	Período lluvioso				Período poco lluvioso			
			FB	PB	Ca	P	FB	PB	Ca	P
1		cv. Cunningham	22,37	28,21	1,83	0,21	24,03	27,61	1,81	0,19
2		cv. Perú	22,51	28,91	1,59	0,19	20,81	28,07	1,54	0,17
3		CIAT-9119	21,51	27,71	1,52	0,18	22,87	27,47	1,50	0,18
4		CIAT-9438	21,49	28,71	1,52	0,18	22,87	28,60	1,50	0,17
5	<i>L. leucocephala</i>	CIAT-751	20,78	27,30	1,58	0,21	23,30	27,26	1,18	0,16
6		CIAT-7988	21,71	26,20	1,79	0,12	21,20	25,52	1,74	0,17
7		CIAT-7384	21,16	26,09	1,56	0,19	20,03	25,73	1,54	0,17
8		CIAT-7929	23,35	25,66	1,89	0,18	20,13	25,05	1,86	0,15
9		CIAT-17480	20,66	27,27	1,79	0,18	22,27	26,18	1,75	0,18
10		cv. Ipil-Ipil	21,16	27,63	1,51	0,21	21,08	26,94	1,49	0,17
11		cv. CNIA-250	21,51	28,53	1,56	0,16	21,06	27,66	1,16	0,16
12		CIAT-17255	21,00	25,87	1,36	0,18	23,19	25,24	1,30	0,17
13	<i>L. lanceolata</i>	CIAT-17501	21,12	25,40	1,33	0,21	23,65	25,13	1,30	0,20
14		CIAT-17253	21,44	25,50	1,36	0,21	23,75	25,00	1,32	0,20
15	<i>L. diversifolia</i>	CIAT-17503	21,81	26,80	1,46	0,20	22,23	25,32	1,21	0,13
16		CIAT-17270	21,00	26,20	1,41	0,19	22,41	26,00	1,23	0,14
17		CIAT-17240	20,60	22,76	1,54	0,19	22,62	22,01	1,52	0,19
18		CIAT-17233	20,59	22,92	1,58	0,17	22,01	22,54	1,52	0,17
19	<i>L. macrophylla</i>	CIAT-17232	20,04	22,04	1,58	0,22	22,92	21,61	1,51	0,17
20		CIAT-17238	20,34	22,76	1,58	0,21	22,13	22,64	1,53	0,19
21		CIAT-17231	20,54	22,78	1,58	0,19	22,34	22,62	1,53	0,17
22	<i>L. esculenta</i>	CIAT-17225	18,74	25,94	1,08	0,17	25,49	25,00	1,03	0,13
23		CIAT-17229	18,57	25,64	1,09	0,19	25,03	25,00	1,06	0,13
EE±			1,55 ^{ns}	2,44 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,06 ^{ns}	1,55 ^{ns}	2,44 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,06 ^{ns}

FB: Fibra bruta (%); PB: Proteína bruta (%); Ca: Calcio; P: Fósforo; EE ±: Error estándar

Anexo 16

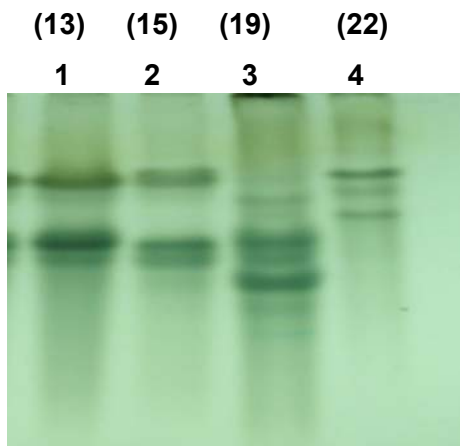
			0,319	
I	CIAT 751	5	↓	
	CIAT 7929	8	↓□	
	CIAT 7384	7	↓□	
	CIAT 17501	13	↓↓↓↓	
	cv. Perú	2	↓□ ↔	
	CIAT 9119	3	↓↓ ↓□	
	CIAT 7988	6	↓↓ ↔	
	cv. Ipil-Ipil	10	↓□ ↔	
	CIAT 9438	4	↓↓ ↓↓ ↔	
	cv. Cunningham	1	↓	
□↓↓				
II	CIAT 17480	9	↓↓↓ ↓□	↔
	cv. CNIA-250	11	↓* ↓↓ ↔	↔
	CIAT 17270	16	↓ ↓□	↔
	CIAT 17255	12	↓↓ ↓↓	↔
	CIAT 17225	22	↓* ↓↓ ↓↓ ↓↓	↔
	CIAT 17229	23	↓ ↓	↔
	CIAT 17240	17	↓ ↓	↔
	CIAT 17231	21	↓ ↓ ↓↓	↔
III	□↓↓			
	CIAT 17232	19	↓ ↓ ↓□	↔
	CIAT 17253	14	↓ ↓ ↔	↔
	CIAT 17238	20	↓ ↓ ↓ ↓ □ ↓	
	CIAT 17233	18	↓ ↓ ↔	
	CIAT 17503	15	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓	

Agrupación de las accesiones estudiadas para la selección de especies

Anexo 17

Detección del polimorfismo isoenzimático

Patrones electroforéticos representativos de la muestra estudiada (*Prx*)



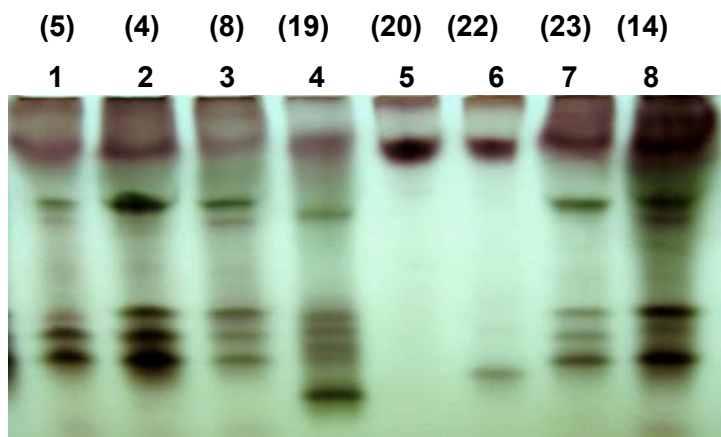
Patrón 1: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21

Patrón 2: 15

Patrón 3: 19

Patrón 4: 22, 23

Patrones electroforéticos representativos de la muestra estudiada (*Est*)



Patrón 1: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16

Patrón 2: 8

Patrón 3: 14

Patrón 4: 17, 18, 21

Patrón 5: 19

Patrón 6: 20

Patrón 7: 22

Patrón 8: 23

**Tabla Patrones electroforéticos obtenidos en los sistemas isoenzimáticos analizados
α y β esterasas**

Accesiones	1	2	2a	2b	3r	4	4b	5r	6	6a	6b	7	7b	7c
5	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
6	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
21	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
26	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
38	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
42	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
50	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
51	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
52	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
94	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
95	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
63	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
65	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
152	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
107	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
166	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
109	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
110	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
111	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1
113	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
139	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
124	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
130	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0

Nota: 1 presencia, 0 ausencia

Patrones	Accesiones
1	5,6,21,38,42,50,52,63,65,94,95,107,166
2	26
3	51
4	152
5	109,110,139
6	111
7	113
8	130
9	124

**Tabla Patrones electroforéticos obtenidos en los sistemas isoenzimáticos analizados
peroxidasas**

Accesiones	1	2	2b	3	4	4b	5	5b	6
5	1	0	0	0	1	1	0	0	0
6	1	0	0	0	1	1	0	0	0
21	1	0	0	0	1	1	0	0	0
26	1	0	0	0	1	1	0	0	0
38	1	0	0	0	1	1	0	0	0
42	1	0	0	0	1	1	0	0	0
50	1	0	0	0	1	1	0	0	0
51	1	0	0	0	1	1	0	0	0
52	1	0	0	0	1	1	0	0	0
94	1	0	0	0	1	1	0	0	0
95	1	0	0	0	1	1	0	0	0
63	1	0	0	0	1	1	0	0	0
65	1	0	0	0	1	1	0	0	0
152	1	0	0	0	1	1	0	0	0
107	1	0	0	0	1	1	0	0	0
166	1	0	0	0	0	0	1	1	0
109	1	0	0	0	1	1	0	0	0
110	1	0	0	0	1	1	0	0	0
111	0	0	1	0	1	1	0	0	1
113	1	1	0	1	0	0	0	0	0
139	1	0	0	0	1	1	0	0	0
124	1	1	0	1	0	0	0	0	0
130	1	0	0	0	1	1	0	0	0

Nota: 1 presencia, 0 ausencia

Patrones	Accesiones
1	5,6,21,26,38,42,50,51,52,63,65,94,95,107,109,110,130,139,152
2	166
3	111
4	113, 124