

## CAPÍTULO 21

# Biotecnología para la Yuca

*Martin Fregene\**, *Joe Tohme\*\**, *William Roca\*\*\**,  
*Paul Chavarriaga<sup>Ψ</sup>*, *Roosevelt Escobar<sup>ΨΨ</sup>* y *Hernán Ceballos<sup>ΨΨΨ</sup>*

### Introducción

La yuca es, probablemente, la especie vegetal más eficiente del trópico en la producción, por unidad de área, de carbohidratos para las necesidades del pequeño agricultor. Su alta productividad la convierte en una fuente atractiva de materia prima renovable para la industria; sin embargo, su cultivo presenta algunos problemas de producción que pueden reducir considerablemente su rendimiento, restarle interés y hacerlo menos rentable en el competitivo mercado de los carbohidratos de origen vegetal.

Entre los problemas más serios del cultivo se pueden mencionar el ataque de varios organismos patógenos (enfermedades), la falta de suficiente material sano y certificado para la 'siembra', y el deterioro acelerado de las raíces cosechadas. La biotecnología puede contribuir a

la solución de éstos y otros problemas para beneficiar tanto a los productores, particularmente a los pequeños, como a los consumidores.

Desde los años 80, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) ha investigado el potencial de la biotecnología aplicada a la yuca, para entenderlo mejor y orientarlo a la solución de los problemas de este cultivo que escapan a la acción de los métodos convencionales de mejoramiento. Tres grandes áreas se han estudiado en el CIAT:

- **Cultivo de tejidos** para la limpieza y multiplicación rápida de material sano (certificado) y para la conservación de germoplasma.
- **Transformación genética** para introducir características agronómicas de interés que no existen naturalmente en la yuca, por ejemplo, la resistencia a las enfermedades y el mejoramiento de la calidad del almidón.
- **Marcadores moleculares**, usados para hacer más eficiente el mejoramiento de la yuca y para entender la estructura de su diversidad genética.

El presente capítulo muestra el progreso alcanzado dentro y fuera del CIAT en estas tres áreas desde 1980. En él se describen en detalle las tecnologías de mayor aplicación o más promisorias (p. ej., propagación y transformación). Se exponen también, en términos comprensibles, las necesidades tecnológicas más apremiantes que, una vez resueltas, permitirían avanzar rápidamente mediante el empleo de la biotecnología a los problemas específicos del cultivo de la yuca.

\* Ph.D., Fitogenética Molecular, Líder del Proyecto Genética de Yuca, CIAT, Cali, Colombia.  
E-mail: m.fregene@cgiar.org

\*\* Ph.D., Fitogenética Molecular, Líder del Proyecto Uso de la Agrobiodiversidad mediante la Biotecnología, CIAT. E-mail: j.tohme@cgiar.org

\*\*\* Ph.D., Fisiología Vegetal, Líder del Proyecto Biodiversidad y Recursos Genéticos de Raíces y Tubérculos Andinos, CIP, Lima, Perú.  
E-mail: w.roca@cgiar.org

Ψ M.Sc., Biotecnología y Botánica, Asociado de Investigación, Unidad de Biotecnología, CIAT.  
E-mail: p.chavarriaga@cgiar.org

ΨΨ Bioquímico, Asistente de Investigación, Unidad de Biotecnología, CIAT. E-mail: r.escobar@cgiar.org

ΨΨΨ Ph.D., Mejoramiento, Líder del Proyecto Mejoramiento de Yuca, CIAT. E-mail: h.ceballos@cgiar.org

### Sistema de propagación in vitro

La producción de material de 'siembra' (estacas para plantar) mediante el cultivo de tejidos cobra especial importancia para la yuca, cultivo en que se emplea el sistema convencional de propagación por estacas. Este sistema no puede satisfacer la cuantiosa demanda de nuevos materiales y se puede convertir, además, en un foco de diseminación de plagas y enfermedades que disminuyen la producción en los clones de interés. La falta de una tecnología disponible para producir material de 'siembra' certificado en Colombia, en cantidad suficiente, constituye una limitante seria para el establecimiento de este cultivo a escala comercial.

Actualmente se conocen dos sistemas de propagación in vitro de la yuca:

- a partir de meristemas preexistentes, por ejemplo, en nudos y ápices (Roca, 1984; Konan et al., 1997) o mediante el cultivo de "roseta" (Roca, 1984);
- propiciando la formación de novo de embriones somáticos, por ejemplo, inducidos a partir de hojas inmaduras o de meristemas apicales (Szabados et al., 1987).

El primer sistema de propagación (cultivo de ápices y nudos) es el más común. Técnicamente, el segundo sistema (mediante embriones somáticos) sería el más eficiente, siempre y cuando se logre resolver el problema de la conversión de embrión a planta y comprobar la estabilidad genética del material recuperado. Sin embargo, este sistema se usa ampliamente por su eficiencia en la transformación genética y podría usarse en el futuro para la producción de semilla sintética de yuca.

El uso de cultivos meristemáticos proporciona, en primer lugar, materiales élite limpios, aptos para 'siembra', en cantidades razonables y con posibilidad de ser enviados a un solicitante local o internacional sin que sean sometidos a restricciones cuarentenarias. Según Roca (1984), el sistema consiste (Figura 21-1) en colocar yemas o ápices en un medio de cultivo sólido, en un ambiente estéril y bajo condiciones controladas de cuarto de crecimiento (28 a 30 °C, 12 horas de fotoperíodo y una intensidad de 1000 lux). Transcurridas 4 a 6 semanas, se

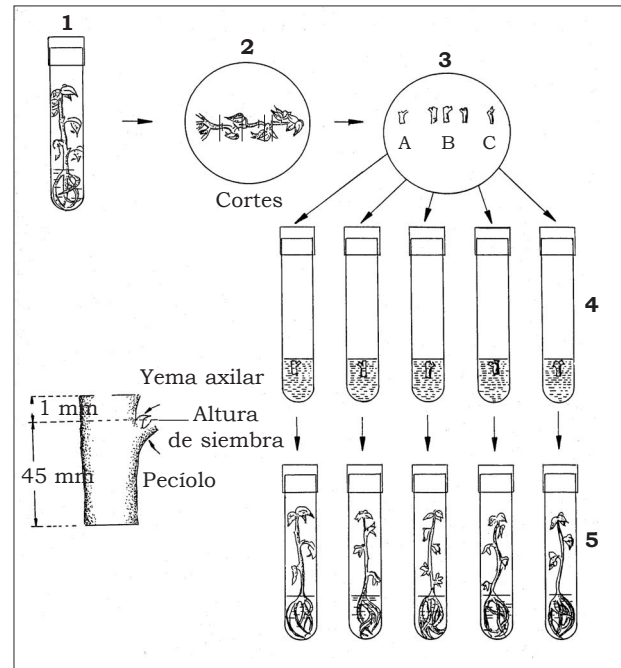


Figura 21-1. Esquema de propagación in vitro a partir de una planta certificada. 1 = plántula para propagar obtenida asépticamente; 2 = tallo de plántula dividido con cortes; 3 = segmentos de tallo obtenidos: A, B y C; 4 = segmentos en medio de propagación; 5 = plántulas micropropagadas in vitro. A = base de planta, B = segmentos de tallo con un nudo, C = punta del tallo.

FUENTE: CIAT (1982).

pueden obtener de tres a cuatro nuevos explantes aptos para iniciar un nuevo ciclo de propagación.

Considerando estas tasas de propagación (1:3 a 1:4) y el tiempo que toma producir el material (4 a 6 semanas por ciclo), este sistema no estaría en capacidad de producir grandes cantidades de material de 'siembra' para satisfacer una demanda masiva. Dentro del esquema actual, el sistema estaría en capacidad de producir de  $6 \times 10^3$  a  $6 \times 10^4$  plantas por año.

En el Centro Internacional de Investigación Agrícola para el Desarrollo (CIRAD, por su acrónimo en francés), Teisson y Alvard (1994) desarrollaron un sistema de multiplicación masiva empleando biorreactores, denominado RITA® (Recipiente para la Inmersión Transitoria Automatizada, en francés); el sistema ha sido probado con éxito en cultivos como café (Berthouly et al., 1995), banano (Alvard et al.,

1993), caucho (Etienne et al., 1997) y caña de azúcar (Lorenzo et al., 1998). Recientemente, otros grupos de investigadores lo han probado en los sistemas embriogénicos de *Brachiaria* sp., en cultivo de anteras de arroz (Escobar et al., 2000a) y en sistemas de propagación mediante nudos en yuca (Escobar et al., 2001) y en caoba (Orellana, 1997).

Este sistema de inmersión temporal permite aumentar notablemente la tasa de

Cuadro 21-1. Tasa de propagación de clones comerciales de yuca mediante el sistema RITA® (n = número inicial de explantes usados).

Clon	n	Tejido recuperado		Explantos, total	Tasa de propagación
		Apices	Nudos		
CM 3306-4	10	50	51	101	10.1
CM 4574-7	10	40	25	65	6.5
CM 523-7	10	46	60	106	10.6
MBRA 383	10	43	25	68	6.8
MBRA 507	10	43	35	78	7.8
MCOL 2215	10	58	30	88	8.8
MCOL 1505	10	28	25	53	5.3
MCUB 74	10	31	42	73	7.3
MECU 72	10	26	42	68	6.8
MTAI 8	10	26	35	61	6.1

multiplicación en yuca (Escobar et al., 2001), si se compara con el sistema convencional in vitro (Cuadro 21-1); además, reduce los costos unitarios de propagación. Consiste en lo siguiente: los tejidos reciben, en tiempos alternos, nutrientes y hormonas del medio de cultivo y un flujo de oxígeno durante la inmersión, con un período programado de espera entre ciclo y ciclo (Figura 21-2); se logra así un crecimiento acelerado de tallos y hojas en los que brota un gran número de yemas para el siguiente ciclo de propagación.

Este sistema presenta las siguientes ventajas: disminución de la mano de obra, reducción de los problemas de asfixia o vitrificación de los tejidos, mejor nutrición mineral de los tejidos, renovación completa del aire dentro del recipiente durante cada ciclo, mejor separación de los tejidos, y control de los procesos morfológicos (Teisson y Alvard, 1994).

Los trabajos desarrollados en la Unidad de Biotecnología del CIAT han determinado que la tasa de propagación en el sistema RITA® depende de la variedad y del manejo que se le da en medios líquidos. En el CIAT se estableció, con financiación del Programa de Biotecnología Agrícola (PBA) y del DGIS Holanda, el sistema RITA® para producir materiales destinados a la costa norte de Colombia, empleando los clones Venezolana (MCOL 2215) y Verdecita (MCOL 1505) como testigos (Escobar et al., 2000c; CIAT, 1999).

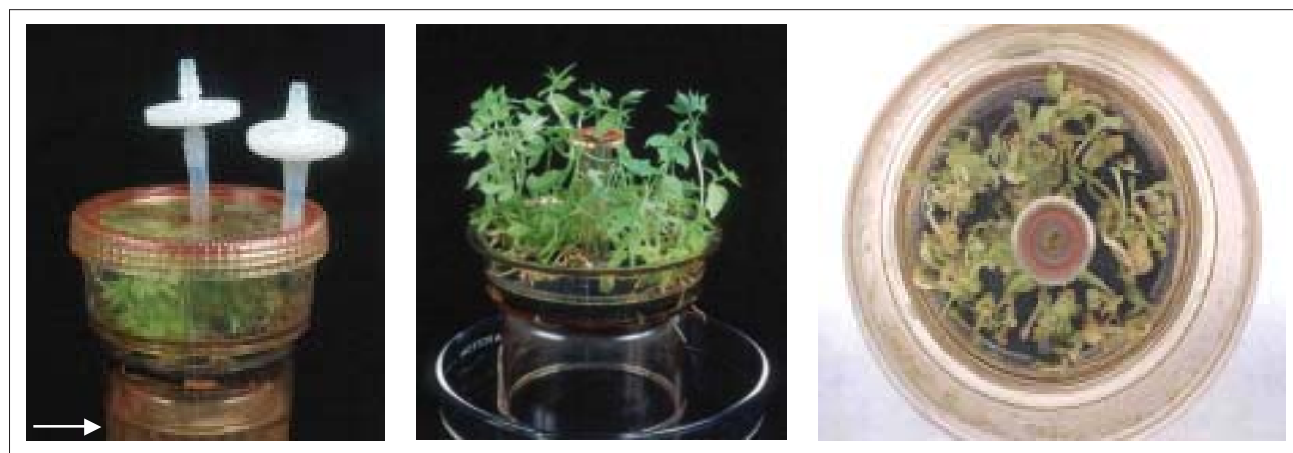


Figura 21-2. Detalle del funcionamiento del método RITA® (izquierda) y del material propagado masivamente con él (centro). El medio líquido asciende (flecha) por diferencia de presión, cíclicamente, a la cavidad superior, donde alimenta los explantes. A la derecha, germinación de embriones de yuca en RITA® para acelerar su crecimiento y aumentar la eficiencia de conversión embrión-planta.

En el Cuadro 21-1 se observa la tasa de propagación de algunos clones desarrollados para la costa norte y de otros de interés comercial para Colombia (Escobar et al., 2001). Los datos preliminares señalan un incremento en la eficiencia de propagación bajo condiciones de RITA® de 166% a 300%, respecto al sistema sólido (R. Escobar, información sin publicar).

Los costos de desarrollo de esta tecnología y de la propagación in vitro podrían limitar su aplicación en comunidades de agricultores de escasos recursos. Por esta razón, el CIAT lleva a cabo un segundo proyecto que, con recursos del Programa de los Centros GCIAT de Investigación Participativa y Análisis de Género para el Desarrollo de Tecnología y la Innovación Institucional (PRGA-CIAT), ha permitido la producción in vitro de material certificado (Figura 21-3), empleando insumos de bajo costo y de fácil consecución para los agricultores en los mercados locales (Escobar et al., 2000b; CIAT, 1999).

Actualmente, en la Unidad de Biotecnología del CIAT se está diseñando un sistema de biorreactores de bajo costo, que pueda desarrollar a gran escala el proceso y transferirlo a los campesinos de diferentes zonas.

Un sistema de propagación masiva de clones de yuca de importancia económica para Colombia, bien adaptado, que asegure la cantidad y la calidad sanitaria del material de 'siembra', y que garantice el flujo de material



Figura 21-3. Grupo de agricultores de Santa Ana, Cauca, recibiendo capacitación en cultivo de tejidos para establecer una pequeña instalación de producción de material de 'siembra' a bajo costo en la zona.

para futuras plantaciones, a bajo costo, constituye la mejor solución para desarrollar comercialmente este cultivo.

## Conservación de Germoplasma

El acceso a la variabilidad genética de un cultivo y de sus especies relacionadas es parte fundamental del proceso de fitomejoramiento. La yuca es un cultivo de alta heterocigocidad; por tanto, la conservación de su semilla sexual no es la más adecuada para mantener la fidelidad de un material a su fuente. La integridad genética del material se conserva, por tanto, mediante el cultivo de partes vegetativas.

Actualmente, el CIAT mantiene en custodia los recursos genéticos del género *Manihot* en dos formas: en el campo, mediante el cultivo in vitro con tasas de crecimiento mínimo; son aproximadamente 6000 accesiones que representan a 23 países diferentes (Bonierbale et al., 1997). El área de conservación en campo ocupa, aproximadamente, 3 ha, en las que deben hacerse periódicamente enmiendas al suelo, riego y mantenimiento preventivo para manejar plagas, patógenos e insectos; por tanto, los costos de conservación de esa área son relativamente altos (Epperson et al., 1999).

Se ha discutido, durante años, que la conservación in vitro logra, en algunos sistemas de propagación vegetativa, una reducción significativa en el costo de mantenimiento y de conservación del germoplasma; de este modo consigue mantenerlo a mediano o a largo plazo.

### Crecimiento a tasas mínimas

Withers y Williams (1986) propusieron dos tipos de banco genético in vitro:

- el Banco Genético in vitro Activo (IVAG, en inglés), a corto plazo, bajo condiciones de crecimiento mínimo, y con funciones específicas de propagación y distribución de material;
- el Banco Genético in vitro Básico (IVBG, en inglés), cuyo objetivo principal es el almacenamiento por seguridad (black box) del germoplasma a largo plazo.

Roca (1984) estableció las condiciones para la conservación in vitro a corto plazo en un

medio 8S sólido con una combinación específica de reguladores hormonales y a una temperatura de 22 a 24 °C. Actualmente, en un área de 40 m<sup>2</sup>, se manejan cinco tubos por clon, haciendo subcultivos cuya periodicidad va de 8 a 16 meses, según el clon (G. Mafla, comunicación personal).

Las colecciones del género *Manihot* más completas del mundo se conservan en el CIAT, en Colombia, y en la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CENARGEN, de Brasil); la colección de materiales africanos está en el International Institute of Tropical Agriculture (IITA), en Africa, y en el Institute of Scientific Research for Development and Cooperation (ORSTOM, de Francia).

Cerca de 4000 plántulas de más de 1600 accesiones diferentes, han sido distribuidas in vitro de la colección del CIAT a los solicitantes, desde el inicio de ésta en 1979 (G. Mafla, comunicación personal). Se ha integrado, por tanto, al manejo del banco, un sistema para el seguimiento (monitoria) al flujo de materiales, al estado sanitario, a los datos de pasaporte, a la estabilidad genética, y a la detección de duplicados en la colección, entre otras actividades. La colección que se mantiene en el CIAT ha sido designada por la FAO; por tanto, las instituciones receptoras deben firmar previamente un acuerdo de transferencia de germoplasma como requisito para el envío del material. En él acuerdan no establecer derechos de propiedad sobre el material vegetal, principalmente. El CIAT está implementando actualmente un sistema de código de barras para manejar este banco IVAG, que se halla en la Unidad de Recursos Genéticos del Centro.

### **Crioconservación de yuca**

Se explicaron anteriormente los conceptos de IVAG y de IVBG. Ambos bancos deben constituir un sistema complementario e integral para manejar el recurso genético de *Manihot*, en el cual:

- el IVAG provee continuamente material limpio, libre de plagas y enfermedades y con alto potencial de propagación;
- el IVBG provee una colección de largo plazo, libre de cambios genéticos y que reduce el costo y el espacio de la colección convencional.

Las técnicas de crioconservación se dividen en clásicas y nuevas. Las primeras se basan en la protección química y en la deshidratación parcial, que ocurren durante la congelación: en ellas son críticos el comportamiento del agua remanente en el tejido durante la congelación, la manera de remover el agua, y la descongelación. El segundo grupo de técnicas se basa en la vitrificación, que es el paso de un líquido hacia un estado amorfo (vítreo) durante la congelación, el cual evita la formación de estructuras cristalinas (Towill, 1996).

Varios autores han establecido protocolos clásicos para la crioconservación de yuca, usando diferentes explantes (semillas, ápices, meristemas, etc.), por ejemplo, Kartha (1982), Bajaj (1983), Marín et al. (1990), Benson (1992) y Escobar et al. (1997). Otros presentan protocolos nuevos, por ejemplo, Benson (1992), Choronsub et al. (1999) y Escobar et al. (2000a). En trabajos desarrollados en el CIAT se ha demostrado que la respuesta posterior a la congelación depende del genotipo empleado; por ello, no es posible extrapolar resultados partiendo de pocos genotipos, en el manejo de un banco (Escobar et al., 1997).

En los últimos años, el CIAT ha implementado la técnica de encapsulación-deshidratación que se basa, a su vez, en la técnica de la semilla sintética; en ésta, se coloca un ápice de modo que quede cubierto por una solución de alginato de sodio, y se polimeriza luego con cloruro de calcio. Esta metodología ha sido probada con éxito en 95 variedades tomadas al azar de la colección central in vitro de yuca; de ellos, 25% dieron una respuesta superior a 70% en la formación de brotes; 50% respondieron de 30% a 70% en brotación; y 25% dieron una respuesta menor que 30% en cuanto a brotes recuperados en la fase siguiente a la congelación (Manrique, 2000).

Esta técnica favorece la manipulación de los explantes sin dañarlos, permite tratarlos con niveles altos de azúcar, deshidratarlos luego en sílica gel y congelarlos rápidamente por inmersión directa en nitrógeno líquido. La recuperación se hace en un medio en que se controlen la presión osmótica, la concentración y el tipo de regulador hormonal que favorezcan el crecimiento de los ápices congelados.

Los resultados actuales plantean la posibilidad de aumentar el número de clones que se conservarán en nitrógeno líquido, para

determinar los siguientes aspectos logísticos: número de tubos por variedad, repeticiones, número de explantes por tubo, porcentaje de respuesta mínimo y seguro, reproducibilidad de la técnica a través del tiempo de conservación, base de datos, recuperación in vitro, en el invernadero y en el campo. Estos y otros aspectos permitirían ganar experiencia en el establecimiento y manejo de un banco básico (IVBG), tomando la yuca como modelo.

Asimismo, es necesario ajustar la técnica actual para aplicarla a los materiales que han dado una débil respuesta con el fin de lograr una respuesta mínima y segura después de la congelación.

### Transformación Genética

La ingeniería genética se emplea para manipular genes e introducirlos en las plantas obteniendo así una transformación genética (transgénesis); es ésta una herramienta poderosa que puede ampliar la base genética, en cuanto a caracteres útiles, más allá del límite impuesto por la compatibilidad entre especies.

A cultivos como la yuca, en que cada genotipo es un mosaico heterogéneo de genes, la ingeniería genética ofrece la ventaja de poder transferir uno o varios genes sin que se pierda el genotipo; esta pérdida irreversible ocurre en el mejoramiento convencional.

- El aspecto más promisorio para la transferencia de genes en la yuca es la resistencia a las enfermedades obtenida con genes del mismo género *Manihot* y de otras fuentes novedosas.
- Otras aplicaciones posibles de la transferencia de genes estarían en el mejoramiento de la calidad de la raíz en los siguientes aspectos: incrementar su nivel de proteína y su contenido de micronutrientes, eliminar o reducir los compuestos cianogénicos (azúcares cianogénicos), mejorar su capacidad como raíz fresca para ser almacenada, acumular nuevos compuestos (almidones cerosos) que incrementen el valor de los productos derivados de la yuca, y otros.

### Métodos de transformación y regeneración

Los métodos más comunes para introducir ADN en las células de yuca son la transferencia por medio de la bacteria *Agrobacterium* sp. y el disparo de micropartículas cubiertas con los genes de interés. Se demostró hace más de 10 años que la yuca era susceptible a la transformación con *Agrobacterium* sp. (Calderón-Urrea, 1988), pero la eficiencia de transformación de las diferentes cepas de la bacteria varía y depende del genotipo de ésta (Chavarría-Aguirre et al., 1993; Li et al., 1996; Puonti-Kaerlas et al., 1997). Ahora bien, el mayor problema de la transformación genética (TG) de la yuca es la eficiencia de regeneración in vitro de las células transformadas para obtener plantas completas.

### Embriogénesis somática

Es el método más común para regenerar plantas de yuca. Los embriones somáticos pueden ser inducidos, en un número limitado de explantes, como cotiledones y ejes embrionarios del embrión sexual (Stamp y Henshaw, 1982), como hojas inmaduras, meristemas apicales o meristemas axilares (Szabados et al., 1987; Mathews et al., 1993; Puonti-Kaerlas et al., 1997b; 1998; Frey, 1996), como anteras (Mukherjee, 1995), y como inflorescencias inmaduras en medios que contienen auxina (Woodward y Puonti-Kaerlas, 2000). El origen multicelular de los embriones somáticos de yuca los convierte en tejidos subóptimos para la transformación genética, porque es común obtener de ellos plantas quiméricas indeseables.

Un sistema de cultivo de tejidos adaptado a la transformación genética fue desarrollado por Taylor et al. (1996) y se denominó **callo embriogénico friable** (CEF). Los embriones somáticos mantenidos en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) o en el GD (Gresshoff y Doy, 1974) son suplementados con la auxina Picloram y producen CEF; éste es luego transferido al medio líquido SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) y produce suspensiones embriogénicas que proliferan rápidamente. Los embriones son transferidos después a medios sin hormonas o con otras auxinas para inducir su maduración y su conversión a plantas completas.

A diferencia de lo que sucede con la embriogénesis primaria y la secundaria de la yuca, las nuevas unidades embriogénicas del CEF se desarrollan sobre la superficie de unidades preexistentes, aparentemente como grupos de origen unicelular; esto las convierte en blancos excelentes para la transformación (Taylor et al., 1996). El bombardeo de CEF con micropartículas recubiertas con ADN ha permitido la regeneración de plantas transgénicas de yuca (Schopke et al., 1996; Raemakers et al., 1996; Munyikwa et al., 1998b).

Una desventaja del CEF es la poca disponibilidad de suspensiones embriogénicas para los genotipos comerciales de mayor interés. El desarrollo de este tipo de suspensión depende aún del genotipo y es laboriosa. Además, la conversión del CEF de yuca a planta es relativamente baja, comparada con otros sistemas de regeneración en cultivos como tabaco, arroz, soya y maíz. Más aún, la probabilidad de obtener plantas anormales se incrementa rápidamente con el tiempo que duren las células en el cultivo in vitro; por tanto, es necesario renovar continuamente las líneas celulares. Estas condiciones reducen, por tanto, todavía más la eficiencia de transformación (Taylor et al., 1996; Schopke et al., 1997a).

### **Producción de CEF y su transformación por *Agrobacterium* sp.**

Es importante profundizar un poco más en la transformación de yuca por mediación de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*. Esta metodología estaría más al alcance de los programas nacionales de investigación agrícola por su menor costo y, desde el punto de vista técnico, por la forma en que se insertan los genes (copias completas). El primer reporte de transformación del CEF por medio de *Agrobacterium* sp. fue realizado por González et al. (1998). Sin embargo, varios informes anteriores habían descrito la transformación de estos tejidos mediante la biolística, tal como se mencionó anteriormente (ver también Zhang et al., 2000; Zhang y Puonti-Kaerlas, 2000).

González et al. (1998) describieron un protocolo para transformar el cultivar de yuca TMS60444 (MNIG 11) empleando la cepa de *Agrobacterium* ABI-pILTAB188. Es importante

mencionar que la frecuencia de conversión de embrión a planta en este cultivar es relativamente alta (entre 18% y 27%), si se compara con la de otras variedades altamente embriogénicas como MCOL 2215 (Venezolana), cuya conversión oscila entre 8% y 20% (López, 2000).

### **Transformación del CEF**

La transformación del CEF mediante *Agrobacterium* puede tomar entre 30 y 34 semanas (8 a 9 meses) cuando se selecciona con Paramomicina (un antibiótico de la familia de la Kanamicina). Uno de los factores que probablemente retarda la recuperación de plantas transgénicas de yuca parece ser la sensibilidad del CEF al antibiótico y a la infección con *Agrobacterium per se* (Schopke et al., 1993; Li et al., 1996; González et al., 1998). La sensibilidad a la infección causada por la bacteria parece depender de la variedad; por ejemplo, MCOL 2215 es más sensible que TMS60444 (Chavarriaga y Ladino, resultados no publicados).

González et al. (1998) señalaron, como posibles limitantes en la transformación del CEF, la baja frecuencia de callos que producen los embriones somáticos diferenciados y la baja conversión de embriones transformados a plantas, aunque esta última parece ser la más alta reportada para transformación de yuca. La frecuencia de recuperación de plantas transgénicas osciló entre 1% y 10% (dos plantas de 180 ó 20 unidades embriogénicas seleccionadas en Paramomicina). Las quimeras disminuyeron por el probable origen unicelular de los embriones globulares en el CEF (González et al., 1998).

Según los autores antes citados, es posible producir cientos de líneas transgénicas del CEF con relativa facilidad a partir de 0.5 ml de SCV<sup>1</sup>. En otros aspectos de transformación y regeneración, el CEF es similar a otros sistemas de transformación que empleen embriones somáticos o partes de ellos. El número de inserciones puede variar

1. Una unidad (en ml) de SCV (Settled Cell Volume) se determina dejando en reposo el CEF (en suspensión) durante 30 minutos, en un tubo graduado de 15 ml.

(generalmente, entre 1 y 4) y la selección se hace con antibióticos o con azúcares (como la manosa) o las mismas construcciones genéticas, incluyendo los promotores.

El sistema CEF ha sido desarrollado para 14 variedades de yuca, de las cuales han sido regeneradas plantas sólo en siete de ellas. Plantas transgénicas, obtenidas mediante bombardeo, han sido regeneradas en tres variedades (TMS60444, Bonoua Rouge y MCOL1505), según Taylor et al. (2000). También se desarrolló CEF de las variedades Venezolana (MCOL2215), ICA Negrita (CM3306-4) y SM1219-9, que tienen importancia comercial en la costa norte de Colombia, y de ellas se regeneraron plantas (López, 2000; López et al., 2001a; 2001b).

La expresión transitoria del gen *gus*-intrón en el CEF y en cotiledones de embriones somáticos de la variedad Venezolana indica buenas posibilidades de transformación de esta variedad con las cepas de *Agrobacterium* C58C1 y LBA4404 (Chavarriaga et al., 2000a; 2000b).

Algunos investigadores de Holanda utilizaron *Agrobacterium* (y biolística) para transformar TMS60444, y emplearon como agentes de selección ciertos antibióticos o la actividad del gen de la luciferasa (Raemakers et al., 2000). En general, los sistemas de transformación con mediación de *Agrobacterium* sp., usando el CEF, podrían aplicarse a un estrecho rango de variedades de yuca de importancia local y comercial,

especialmente en los países en desarrollo donde el método de la biolística todavía es muy costoso.

### Regeneración

La clave para obtener un gran número de plantas transgénicas está, probablemente, en la optimización de los pasos de selección y de regeneración de plántulas. En el caso de TMS60444 es posible obtener entre 10 y 50 líneas embriogénicas, que son transgénicas por cada infección con *Agrobacterium* (Taylor et al., 2000). Este resultado, acoplado a la alta capacidad de TMS60444 para regenerar plantas (cerca de 100/g de CEF), representa un avance significativo en la transformación genética de la yuca (Figura 21-4). En MCOL2215, la regeneración de plantas no supera aún el 30%.

Actualmente se investigan en el CIAT tratamientos con varias combinaciones de medios, azúcares y hormonas, entre otros componentes, para optimizar las fases de maduración y germinación de los embriones derivados del CEF en cuatro variedades de yuca (TMS60444, MCOL2215, CM3306-4 y SM1219-9). Se estudia también el uso de RITA® para mejorar estos procesos (ver antes, Sistema in vitro...). Los resultados preliminares indican que la regeneración de plantas mejora sustancialmente cuando se emplea el sistema RITA® (López et al., 2001a; 2001b).

### Mejoramiento

El número de variedades adaptadas a las necesidades de los agricultores y a los



Figura 21-4. Planta transgénica de yuca (izquierda) de la variedad TMS60444, obtenida mediante transformación de callo embriogénico friable con *Agrobacterium*, y con expresión del gen marcador *gus* que da plantas azules (centro). El panel de la derecha confirma, mediante hibridación Southern, que el gen de resistencia a insectos (*cry1Ab*) ha sido insertado en el genoma de esta planta (flecha roja). La flecha oscura muestra el gen *cry1Ab* de la construcción genética utilizada en la transformación.



ecosistemas es, posiblemente, mayor que 1000. La tarea de transformar todas estas variedades con *Agrobacterium* sp. parece poco práctica, aunque se tendrá que enfrentar pronto. Usar variedades modelo, como la TMS60444, para transformar primero y luego transferir el gen de interés por mejoramiento clásico a otras variedades recalcitrantes a la transformación es una alternativa real, aunque poco adecuada por el tiempo que requeriría (entre 6 y 10 años). Es entonces necesario desarrollar el CEF para las variedades de mayor interés de las zonas productoras de yuca del mundo.

En el CIAT se trabaja, con el apoyo financiero del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), en el establecimiento del CEF para las variedades de importancia en Colombia. Hasta el momento se ha logrado inducir el CEF en las ocho variedades siguientes: MTA18 o Rayong 60, MCUB74 o Señorita, MNIG 11 o TMS60444, MCOL 2215 o Venezolana, MCOL 1505 o Verdecita, CM523-7 o Catumare, CM3306-4 o ICA Negrita y SM1219-9. Se han regenerado plantas de tres de esas variedades y el resto se mantiene en proliferación.

Por último, para la conservación a largo plazo del CEF de las distintas variedades de yuca, que garantice la estabilidad genética reduciendo así la posible variación somaclonal, se está trabajando en el CIAT en métodos de crio-conservación del CEF basados en los ya publicados para yuca (Escobar et al., 1997). Los resultados indican que es factible congelar CEF a temperaturas por debajo de  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$  y regenerar nuevamente células después del congelamiento (Santos et al., 2001).

### **Plantas transgénicas obtenidas por organogénesis**

Se reportó recientemente una alternativa de regeneración de plantas de yuca a través de la producción directa de brotes; los autores la denominan organogénesis (Li et al., 1995; 1998a). Sin embargo, la evidencia histológica del proceso de organogénesis es débil y no permite diferenciar entre la producción de brotes por proliferación de meristemas de embriones somáticos o por proliferación de meristemas producidos de novo en los cotiledones embrionarios. En el trabajo de Li et al. (1998a) se indujeron brotes en explantes cotiledonares

de embriones somáticos germinados. Estos brotes fueron inducidos utilizando BAP e IBA (1.0 y 0.5 mg/l, respectivamente). Los embriones somáticos provenían de embriogénesis cíclica, no de embriones primarios, y estos últimos no mostraron una buena capacidad organogénica. Los brotes se elongaron en un medio con 0.4 mg/l de BAP y luego se hicieron enraizar en un medio libre de hormonas.

La frecuencia de inducción de brotes varió entre 42% y 67%. La reproducibilidad del método desarrollado por Li et al. (1998a) parece confirmada por su aplicación en 10 variedades de yuca. Este método ha sido implementado en el IITA como alternativa para la TG en yuca, ha generado plantas transgénicas de yuca (Li et al., 1996) y ha sido utilizado para introducir nuevos genes de interés en esta especie (Li et al., 1996; 1998b).

### **Mejoras técnicas para la TG en yuca**

#### **Genes marcadores de selección**

La frecuencia de transformación genética de la yuca es, a menudo, baja; por ello, es necesario emplear diferentes marcadores para diferenciar las células transgénicas de las no transgénicas y poder seleccionarlas (Schrott, 1995). Algunos de los marcadores visuales más usados son los siguientes:

- el gen *uidA*, proveniente de *E. coli* (Jefferson, 1987; Jefferson et al., 1986);
- el gen de la luciferasa del "cocuyo" *Photinus pyralis* (Ow et al., 1986) o el del coral *Renilla reniformis* (Mayerhofer et al., 1995);
- la proteína verde fluorescente conocida como GFP (Chalfie et al., 1994).

Los genes marcadores de selección convierten a la célula que los incorpora en resistente a los antibióticos, a compuestos análogos o derivados de los metabolitos, o a los herbicidas, entre otros, y le permiten sobrevivir y proliferar en medios selectivos. De los genes más comunes, el CIAT posee los siguientes:

- el gen *npfII*, que confiere resistencia a antibióticos amino-glicosídicos como la Kanamicina y la Geneticina (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983; Herrera-Estrella et al., 1983);

- el gen *hpt* que da resistencia al antibiótico Higromicina (van den Elzen et al., 1985);
- los genes *pat* y *bar* que dan resistencia a los herbicidas que contienen fosfinotricina (Murakami et al., 1986; De Block et al., 1987; Thompson et al., 1987; Wohlleben et al., 1988);
- los genes *nptII*, el *hpt*, el *bar* y el gen de la luciferasa han sido utilizados para obtener plantas transgénicas de yuca, como se observa en la Figura 21-5 (Schopke et al., 1996; Zhang y Puonti-Kaerlas, 2000; Sarria et al., 2000; Raemakers et al., 1996).

La opinión pública es cada vez más reacia a la utilización de genes de resistencia a antibióticos en plantas transgénicas, actitud que ha obligado a pensar en alternativas de selección. Un ejemplo son los genes de resistencia a antibióticos, cuya expresión puede ser inhibida en algunas bacterias mediante la incorporación de un intrón en la secuencia codificadora (Wang et al., 1997).

Hay un marcador de selección, basado en el gen *ipt* del T-ADN de *Agrobacterium tumefaciens*, que está ligado a un transposón para removerlo de brotes transgénicos (Ebinuma et al., 1997) o está bajo el control de un promotor inducible (Kunkel et al., 1990), y tiene buenas perspectivas. Un derivado de la citoquinina BAP (Joersbo y Okkels, 1996), el azúcar xilosa (Haldrup et al., 1998a; 1998b) o el azúcar manosa (Joersbo et al., 1998) son compuestos

alternos que se usan para seleccionar material transformado de yuca. En realidad, la selección de plantas transgénicas de yuca mediante la técnica selectora de la manosa ha sido confirmada con éxito (Zhang y Puonti-Kaerlas, 2000). Sin embargo, el gen que ayuda a metabolizar la manosa aún no está disponible para la mayoría de los laboratorios que trabajan en transformación de yuca.

Aunque los genes marcadores de selección son necesarios para diferenciar las células transgénicas de las no-transgénicas, la tendencia actual es producir plantas transgénicas que contengan sólo el gen de interés, las llamadas “transgénicas limpias” que se obtienen mediante ingeniería genética de precisión. Hoy en día, las entidades que regulan el uso de plantas transgénicas empiezan a exigir que éstas contengan sólo una copia del gen de interés sin incluir genes de selección. Por tanto, será necesario aplicar tecnologías de recombinación específica y dirigida (*site-specific recombination*) para eliminar los genes marcadores de selección durante la regeneración de las plantas transgénicas o después de ellas. Algunos ejemplos de la utilidad de estas tecnologías ya han sido publicados (Qin et al., 1994; Bayley et al., 1992; Odell et al., 1990).

### Promotores específicos y propiedad intelectual

Otra técnica que se necesita para mejorar la transformación genética de yuca son los

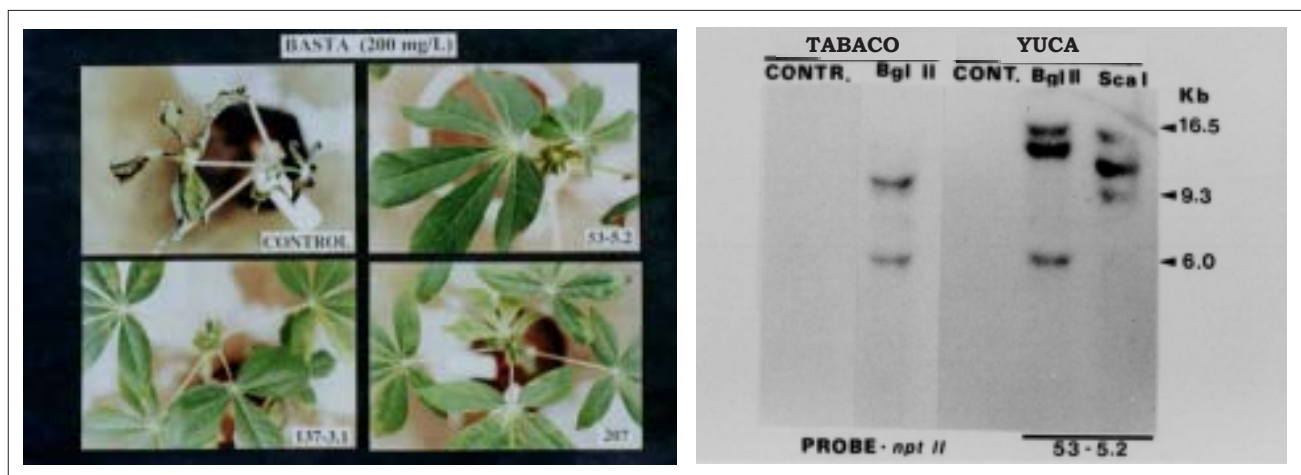


Figura 21-5. Plantas transgénicas de yuca (variedad MPER 183) que expresan resistencia al herbicida Basta (líneas 53-5.2, 137-3.1 y 207). Las pruebas moleculares confirman la presencia del transgen en la línea 53-5.2 (derecha).

promotores específicos de tejido o promotores inducibles, algunos de los cuales, específicos para raíz de yuca, ya han sido aislados (Liddle et al., 1997). Estos promotores se usarán para concentrar y activar la expresión de los genes introducidos en una parte de la planta (por ejemplo, raíces u hojas), cuando se requiera hacerlo. Por ejemplo, sería ideal limitar la expresión de un gen que expresa una proteína modificadora del almidón de la raíz o hacer expresar los genes de resistencia a los insectos dañinos sólo si éstos están presentes.

Hay promotores inducibles con iones de cobre o con esteroides (Mett et al., 1993; Schema et al., 1991) que ya han sido probados en plantas. La búsqueda de promotores inducibles o específicos de tejidos de yuca será necesaria si se quiere que la transformación genética de este cultivo se mantenga actualizada, sea aceptada por los consumidores, y sea una herramienta útil en el mejoramiento.

Los investigadores tienen que enfrentarse, a menudo, al derecho de propiedad intelectual (patentes), incluso aquellos que trabajan en transformación genética. Los que trabajan con yuca no son la excepción. Por el contrario, todas las construcciones, genes y promotores hasta ahora usados en la TG de la yuca están regulados por patentes; por tanto, el uso que se da finalmente a los productos derivados de estas investigaciones estaría restringido.

Los productos derivados de la yuca transgénica que entren en los mercados europeos o americanos (p. ej., harina de yuca) estarían sujetos a las limitaciones que imponen las patentes reconocidas en los respectivos países. Por otro lado, limitarse al uso de construcciones genéticas sólo para investigación y no para la aplicación comercial no es práctico, pues limitaría la liberación de plantas transgénicas a las que requieran los agricultores.

Por consiguiente, la búsqueda de genes y promotores propios de la yuca es necesaria para aliviar un poco la presión de la propiedad intelectual sobre las construcciones genéticas usadas actualmente en la TG de este cultivo.

## **TG para lograr resistencia a plagas y calidad de la raíz**

El ciclo de cultivo largo (8 a 14 meses) de la yuca expone a este cultivo a constantes ataques de insectos dañinos, bacterias, virus y otras plagas (Bellotti, 1979; Bellotti et al., 1999). En América Latina hay insectos lepidópteros, como el barrenador del tallo (*Chilomima clarkei*) y el gusano cachón (*Erinnyis ello*), dos de las plagas más comunes del cultivo. El gusano cachón, por ejemplo, causa pérdidas considerables de rendimiento en la costa norte de América del Sur y del Caribe. El barrenador del tallo no sólo reduce el rendimiento sino que deteriora el material de siembra (cangres o estacas).

### **Barrenador del tallo**

El barrenador pasa gran parte de su ciclo de vida dentro del tallo, donde no pueden llegar las aspersiones de los insecticidas. Durante los últimos 5 a 10 años, el barrenador ha causado daños considerables en más de 7000 ha de yuca en Colombia (Bellotti et al., 1999). Por otro lado, la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* (Bt) lleva un grupo de genes (*cry*) que codifican la síntesis de endotoxinas específicas (toxinas Bt), muy efectivas para controlar varios tipos de insectos. Pues bien, la aspersión con soluciones de Bt fue efectiva como control biológico del gusano cachón de la yuca (Bellotti y Arias, 1979).

El desarrollo de plantas transgénicas de yuca que expresen genes *cry* sería una manera de reforzar los métodos convencionales de control de plagas, y de beneficiar, probablemente, al medio ambiente porque las aplicaciones de plaguicidas podrían reducirse. Varios grupos científicos están trabajando en esta área; uno de ellos, en el CIAT, enfoca su trabajo hacia la transformación de las variedades adaptadas a las condiciones de la costa norte, de los valles interandinos y de los Llanos Orientales de Colombia; estas variedades son muy apetecidas por los agricultores, pero son susceptibles al barrenador del tallo, que ha causado pérdidas hasta de 100% en el material de plantación en la costa norte.

La resistencia al barrenador del tallo sería incorporada mediante *Agrobacterium* sp., o mediante el disparo de microparticulas, empleando un plásmido (pBIGCry) que lleva el

gen *cry1Ab* y genes de selección (*gus*-intrón y *nptII*) o el plásmido pSGManCry, que lleva el gen *manA* para selección con el azúcar manosa). Los resultados más recientes confirman que el gen *cry* ha sido efectivamente transferido a una variedad de yuca (TMS60444 o Mnig11), que se utiliza como variedad modelo para la transformación genética. Se espera igualmente la confirmación de la inserción del gen *cry* en otras dos variedades, de importancia comercial en Colombia, las cuales pasaron ya las primeras etapas de selección in vitro.

### **Raíces sin cianógenos**

La yuca produce dos **glucósidos cianogénicos**: linamarina y lutaustralina. Las variedades amargas se consumen especialmente en algunos países de África y en los grupos indígenas del Amazonas. Puesto que contienen concentraciones tóxicas de los compuestos cianogénicos, estos glucósidos deben ser removidos de las raíces mediante procesamientos laboriosos. Es necesario procesar cuidadosamente la yuca amarga (bitter cassava) para evitar el efecto tóxico, y en algunos casos, letal, del cianuro (Akintonwa et al., 1994; Mlingo et al., 1992; Banea-Mayambu et al., 1997; Rosling, 1988).

Las cianhidrinas residuales de la yuca procesada son la mayor fuente de cianuro de la dieta basada en yuca (Tylleskär et al., 1992). Por otro lado, las aguas residuales, producto del procesamiento de las raíces amargas de yuca, a menudo contienen concentraciones tóxicas de cianuro. Si no son tratadas apropiadamente, estas aguas son altamente contaminantes.

Ahora bien, si se bloquea la producción de la enzima oxidasa del citocromo P-450, en la síntesis de la linamarina, se podría reducir el nivel de los compuestos cianogénicos en la raíz de yuca. Por otro lado, si se expresa abundantemente en las raíces una enzima ( $\alpha$ -hidroxinitril-liasa) que cataliza la degradación de las moléculas cianogénicas, se podría lograr el mismo resultado (Arias-Garzón y Sayre 2000; Siritunga et al., 2001). En el primer caso, el bloqueo se haría mediante la tecnología del 'antisentido'. El gen que controla la oxidasa del citocromo P-450 en la yuca ha sido recientemente aislado y caracterizado (Andersen et al., 2000). Las construcciones antisentido que bloquean la expresión de este gen se han

insertado en la yuca y se han producido así plantas en las que se ha reducido hasta en un 80% el contenido de linamarina de las hojas (Siritunga y Sayre, 2001).

### **Raíces sin cianógenos y con carotenos**

Una forma novedosa de mejorar las raíces de yuca es la producción de **almidones cerosos**, o sea, que contengan 100% de amilopectina, mediante la inactivación de la enzima GBSS II (la sintetasa del almidón, unida a los gránulos de almidón); para hacerlo, se inserta el gen de la GBSS II en antisentido (Raemakers et al., 2001).

Las aplicaciones industriales de los almidones cerosos, como la producción de espesantes, pastas y pegantes, es un mercado con gran potencial de crecimiento. Un proyecto de transformación genética se ha iniciado en el CIAT, con el apoyo financiero del MADR, para introducir genes en la yuca que le permitan a esta especie producir almidón ceroso.

Finalmente, otro objetivo de la ingeniería genética de la yuca es el incremento de los  $\beta$ -carotenos o precursores de la vitamina A, la cual es vital para el desarrollo normal de los humanos. Las consecuencias de la deficiencia de vitamina A en el hombre van desde la ceguera parcial hasta la débil resistencia a varias enfermedades terminales (Sommer, 1998; West Jr. et al., 1989).

Las raíces de la yuca tienen la capacidad de sintetizar  $\beta$ -carotenos, como lo han demostrado las variedades de raíces amarillas que ya se identificaron y que contienen carotenoides en concentraciones hasta de 2 mg/10 g de peso fresco (Iglesias et al., 1997). Por tanto, los genes responsables de la síntesis de  $\beta$ -carotenos ya están presentes en la yuca; falta, entonces, transferir estos genes a las variedades de más aceptación entre cultivadores y consumidores, sin cambiarles las demás características.

### **Marcadores Moleculares**

#### **Desarrollo de un mapa de genes a escala molecular**

Se elaboró un mapa de genes de la yuca a escala molecular a partir de la segregación de

marcadores de RFLP, de los microsatélites (o SSR, repeticiones de secuencia simple, siglas en inglés), de RAPD y de varias isoenzimas, en un cruzamiento intraespecífico de 150 individuos de TMS30572 (una línea mejorada del IITA, Ibadán, Nigeria) y de CM2177-2 (una línea élite del CIAT, Cali, Colombia) (Fregene et al., 1997).

En total, 150 RFLP, 30 RAPD, 5 microsatélites y 3 loci de isoenzimas, que segregaban como fragmentos de restricción de dosis simple o SDRF (siglas en inglés) (Wu et al., 1992) en los gametos de la planta progenitora femenina, definen 20 grupos de ligamientos y abarcan 950 cM<sup>2</sup>, donde la densidad promedio de marcadores equivale a 1 marcador por cada 6 cM.

Con otros 120 marcadores de dosis simple de RFLP, 50 de RAPD, 4 de microsatélites y 1 de isoenzima de la planta progenitora masculina, se extrajeron 24 grupos de ligamientos que hacen una distancia total de 1220 cM y dan una densidad promedio de marcadores equivalente a 1 marcador por cada 8 cM.

Treinta marcadores de RFLP y 2 de microsatélites detectaron un fragmento segregante único en cada progenitor y un alelo común en ambos progenitores; el fragmento y el alelo se ubicaron en el mapa en posiciones similares en el grupo de ligamiento derivado del progenitor masculino y del femenino. Estos puentes alélicos (Ritter et al., 1991) son decisivos para identificar los grupos de ligamiento análogos en los mapas derivados de los progenitores masculino y femenino, puesto que detectan el mismo locus en ambos cromosomas paternos, salvo cuando representan secuencias duplicadas. La comparación de intervalos —en los mapas derivados del progenitor masculino y del femenino— que están limitados por marcadores heterocigóticos en ambos progenitores, de un lado, y los puentes alélicos, de otro (Ritter et al., 1991), reveló una recombinación meiótica significativamente

menor en los gametos de la progenitora femenina que en los del progenitor masculino.

En los mapas derivados tanto del progenitor femenino como del masculino hay más de 300 marcadores que (se ha calculado) abarcan 80% del genoma de la yuca. En consecuencia, el mapa de la yuca se acerca a la saturación. Ahora bien, la mayoría de los marcadores del mapa (o sea, los marcadores de RFLP) no se prestan fácilmente al análisis —a gran escala y de alto rendimiento— de poblaciones de plantas ayudado con marcadores moleculares, que es la principal aplicación del mapa.

En un esfuerzo por lograr que la tecnología de los marcadores pueda aplicarse más ampliamente en la yuca, se intentó hacer un mapa de segunda generación constituido por marcadores altamente polimórficos derivados de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como los microsatélites y los sitios marcados (tagged) para indicar secuencias (STS). Se construyeron dos genotecas de ADN genómico enriquecido con microsatélites y se seleccionaron cerca de 6000 clones para detectar la presencia de las siguientes secuencias de microsatélites: TC, GT, CAA, CAG, ACG, AAT y CAGA y GATA (Mba et al., 2000).

Se seleccionó también una genoteca de ADNc, construida a partir de ARNm proveniente de hojas y raíces aisladas del clon élite de yuca TMS30572, para detectar los microsatélites mencionados anteriormente; se seleccionaron aquí más de 87,000 clones. Se obtuvieron 330 marcadores de microsatélites de las genotecas enriquecidas, de los cuales 92 se han incorporado actualmente al mapa existente de la yuca (Mba et al., 2000; Fregene et al., información sin publicar).

Se obtuvieron otros 160 marcadores de microsatélites de las genotecas de ADNc, de los cuales 10 han sido incorporados al mapa (Mba et al., información sin publicar). El nivel de polimorfismo de los marcadores de microsatélite derivados de la genoteca de ADNc, en los progenitores de la población del mapa de la yuca, fue menor (40%) que el encontrado en las genotecas enriquecidas de ADN genómico (60%).

Otra iniciativa para saturar el mapa de la yuca es la generación de marcadores de secuencias expresadas o EST. Se ha propuesto el

2. La unidad con que se mide la proximidad o la lejanía de dos marcadores (p. ej., RFLP, RAPD, microsatélites, genes) en un cromosoma se denomina **cM** (= centi-Morgan) y equivale, cuantitativamente, a 1% de recombinación entre dos marcadores. Por ejemplo, si el marcador A está a 6 cM del marcador B, quiere decir que la frecuencia con que A se recombina (o sea, se mezcle o se separe si está cerca) con B es del 6%.

aislamiento de genes que se expresen diferencialmente en los progenitores de una población que dará origen al mapa, como una manera de desarrollar EST alrededor de caracteres específicos; de este modo se enfoca el locus candidato y se incrementa, al final, la exactitud del mapa que contiene los caracteres cuantitativos (Boventius y Weller, 1994; Suárez et al., 2000). Se aplicó la técnica ADNc/AFLP (Bachem et al., 1996) al ARNm de los progenitores de la población que originó el mapa de genes de la yuca, y se obtuvieron más de 500 fragmentos derivados de la transcripción (TDF), que fueron únicos en cualquiera de los progenitores (Suárez et al., 2000). Se clonó luego y se elaboró la secuencia de un subconjunto de 50 TDF.

La alineación de secuencias de los marcadores de secuencia expresadas (EST) reveló, principalmente, genes de función desconocida. Seis de los TDF han sido incluidos como marcadores de RFLP en el mapa existente de genes de la yuca a escala molecular; los TDF, así como los marcadores de RFLP, fueron más polimorfos que los ADNc aleatorios. Se incluyeron también varios genes clonados de función conocida en el mapa de genes de la yuca a escala molecular; entre ellos están los siguientes:

- dos genes del citocromo p450, que convierten los aminoácidos L-valina y L-isoleucina durante la biosíntesis de los glucósidos cianogénicos linamarina y lotaustralina en la yuca (Andersen et al., 2000);
- la fosforilasa AGPasa;
- el gen de la sintasa del almidón ligada a los gránulos (GBSSII), que participa en la biosíntesis del almidón (Munyikwa et al., 1997).

### **Desarrollo del mapa de genes que controlan caracteres agronómicos**

Los mapas de genes a escala molecular proveen un conjunto de puntos de referencia para obtener el genoma completo; es muy probable, por ello, que se pueda detectar el ligamiento con genes de interés en biología básica o con genes de interés en los trabajos de mejoramiento. Ya se han visto las aplicaciones prácticas de la "marcación" ('tagging') de genes de interés

agronómico en muchos cultivos; es, generalmente, un parámetro de selección más eficaz en el esquema de mejoramiento y permite analizar minuciosamente la variación genética cuantitativa de factores mendelianos más sencillos (Tanksley et al., 1989; Lee, 1995; Mohan et al., 1997).

Los cruzamientos de clones o de variedades seleccionados para lograr la construcción de un mapa de genes de la yuca están diseñados para que en dichos cruzamientos se separen, o segreguen, los caracteres considerados como prioritarios en el desarrollo de los programas de mejoramiento y selección con ayuda de marcadores (Fregene et al., 1997). Entre estos caracteres están la resistencia a la enfermedad del mosaico de la yuca (CMD), la resistencia a la bacteriosis común, el engrosamiento precoz de la raíz, los caracteres de calidad de la raíz (cianogénesis), el deterioro en poscosecha, la calidad culinaria y el contenido de almidón.

### **Resistencia al mosaico de la yuca**

La CMD es la enfermedad más importante de la yuca en África y una amenaza potencial para este cultivo en América Latina: no se conoce aún en este continente, pero su vector fue encontrado en él recientemente. La resistencia de la planta hospedante es el principal método de control; esta resistencia fue identificada por primera vez en los derivados del tercer retrocruzamiento de un cruzamiento interespecífico entre la yuca y *Manihot glaziovii*. Se cree que es poligénica con un componente recesivo. La planta progenitora femenina TMS30572 de la población que originó el mapa de la yuca posee esta fuente de resistencia.

Se identificaron hace poco varias razas nigerianas de yuca que expresan resistencia extrema a la CMD. Se desarrollaron entonces varias poblaciones para el mapa que segregan respecto a la antigua fuente de resistencia y a la nueva. Hay en ellas una población de retrocruzamiento de hermano medio, derivada del cruzamiento de cinco progenies F<sub>1</sub> de la población del mapa con el progenitor resistente a la CMD y del cruzamiento de la F<sub>1</sub> de las líneas nativas resistentes con variedades susceptibles. Los cruzamientos se evaluaron en dos sitios de Nigeria que tenían alta presión de la enfermedad, durante 2 años, y el análisis

genético clásico confirmó la naturaleza poligénica de la fuente de resistencia, *M. glaziovii*, y la presencia de un control del principal gen dominante de la nueva fuente de resistencia extrema (Akano et al., 2000).

Se eligió el análisis de segregación masal (BSA) para identificar rápidamente los marcadores vinculados a ambas fuentes de resistencia. Se encontró que un marcador microsatélite, SSRY40, del grupo de ligamiento D del mapa de genes de la yuca estaba asociado con la resistencia a la CMD; este marcador explica el 48% de la varianza fenotípica de la resistencia a la CMD (para  $P < 0.001$ ). El gen ha sido designado *CMD1*.

Dos marcadores de microsatélite, SSRY28 y NS158, ubicados en el grupo de ligamiento R, explican 70% y 80%, respectivamente, de la varianza fenotípica de la nueva fuente de resistencia (Akano et al., 2000). El gen dominante de resistencia a la CMD ha sido designado *CMD2* y está rodeado por SSRY28 y NS158, a 9 y 6 cM, respectivamente. El gen *CMD2* y los marcadores asociados con él son herramientas muy valiosas para el mejoramiento de la resistencia a la CMD en América Latina, ya que la ausencia de la enfermedad en este continente hace imposible el mejoramiento por resistencia a la CMD. En Africa, donde se requiere un despliegue rápido de la resistencia extrema en los acervos de genes de la yuca para proteger este cultivo de los estragos de la CMD, puede ser más eficiente la selección por resistencia extrema mediante un marcador eficiente que el mejoramiento convencional.

La selección con ayuda de marcadores moleculares permite al fitogenetista eliminar, en una etapa temprana y con ventaja, los genotipos susceptibles a la CMD que llegan al 50% en las líneas heterocigóticas nativas resistentes a esa enfermedad. Se reducen así a la mitad los costos de la evaluación de la enfermedad y se incrementa la eficiencia de la selección por la siguiente razón: el fitogenetista puede concentrarse en un menor número de genotipos en la etapa de plántula y en la etapa decisiva de ensayos de hileras sencillas, cuando las progenies se reducen hasta en 95%.

## **Resistencia a la bacteriosis**

La bacteriosis común de la yuca (o añublo bacteriano de la yuca, CBB), causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*), es una enfermedad importante de la yuca en Africa y en América del Sur. Se evaluó la resistencia al CBB en individuos  $F_1$  del cruzamiento, mediante inoculaciones controladas en el invernadero. Los síntomas se evaluaron visualmente a los 7, 15 y 30 días después de la inoculación, empleando una escala donde 0 = ausencia de enfermedad y 5 = máxima susceptibilidad (Jorge et al., 2000). Se usaron las siguientes cinco cepas de *Xam*: CIO-84, CIO-1, CIO-136, CIO-295 y ORST X-27.

La zona bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) se utilizó como una medida cuantitativa de resistencia en el análisis de los QTL (loci de caracteres cuantitativos), aplicando la regresión de marcadores únicos. Partiendo de los valores de AUDPC, se encontró que 12 QTL, ubicados en los grupos de ligamiento B, C, D, G, L, N y X del mapa de referencia derivado de la progenitora femenina, respondieron por 9% a 27% de la varianza fenotípica de la respuesta a las cinco cepas de *Xam*. Se propuso también un esquema para confirmar la utilidad de estos marcadores en la evaluación de poblaciones segregantes respecto a la resistencia a CBB (Jorge et al., 2000).

## **Engrosamiento precoz**

Otro carácter evaluado en la progenie  $F_1$  del mapa es el engrosamiento precoz. En 1998 se realizó una evaluación preliminar de este carácter mediante la cosecha de la población  $F_1$  del mapa, 7 meses después de la siembra en CIAT- Palmira (Fregene et al., 2000b). Se calculó el rendimiento de materia seca en tres plantas por genotipo. Partiendo de los resultados de esta evaluación, se seleccionaron 40 genotipos de engrosamiento precoz y 40 grupos de engrosamiento tardío. Los esquejes saludables, cuidadosamente recogidos, de los 80 genotipos seleccionados, se sembraron en un nuevo experimento en diciembre de 1998, en CIAT- Palmira. Se usó como testigo una línea nativa de yuca de engrosamiento precoz (Mandioca, de 3 meses de edad) introducida de Brasil. En el campo se estableció un diseño de bloques totalmente al azar, con dos repeticiones. Cada parcela contenía 60 plantas de cada genotipo en

un arreglo de 6 × 10 (columna por hilera). Las 32 plantas centrales, organizadas como 8 hileras de 4 plantas, sirvieron para la cosecha en secuencia, con un intervalo de 3 semanas; se comenzó a las 6 semanas después de plantar la yuca y se terminó a las 30 semanas de la plantación. Se hicieron, en total, nueve cosechas en un lapso de 7 meses, al cabo de los cuales el experimento se dio por terminado (julio de 1999).

En cada cosecha se evaluaron cuatro plantas de una hilera dentro de la parcela, por cada genotipo, respecto al rendimiento de raíces y a otros caracteres supuestamente relacionados con el engrosamiento. Estos últimos fueron los siguientes: altura de la planta, vigor de la planta, índice de área foliar, rendimiento de raíces frescas, follaje fresco, número de raíces por planta y diámetro de la raíz de las cinco raíces de almacenamiento más grandes. También se evaluaron el índice de cosecha (tomado como relación entre rendimiento de raíces y biomasa total cosechada), materia seca de la raíz, y follaje seco.

Los análisis de regresión múltiple de los caracteres evaluados (variable independiente) y el rendimiento de materia seca de la raíz (variable dependiente) revelaron que el engrosamiento precoz es influido, principalmente, por el índice de cosecha y por el follaje seco. Se hizo el análisis de QTL respecto a los caracteres vinculados de manera significativa con el engrosamiento precoz, empleando el programa QGENE (Nelson, 1997).

Se confirmó que los marcadores vinculados con los caracteres asociados con el engrosamiento precoz eran significativos a  $P < 0.005$ . Se encontraron tres QTL, cada uno para el peso del follaje seco, los cuales explican de 25% a 33% de la varianza fenotípica, en tanto que se encontraron cinco QTL para el índice de cosecha, los cuales explican de 18% a 27% de la varianza fenotípica (Okogbenin, en preparación).

Kawano et al. (1998) indicaron que la selección por índice de cosecha, en el esquema de mejoramiento, es un parámetro eficaz de selección indirecta respecto al rendimiento de la raíz. Partiendo del análisis de marcadores en el estudio del engrosamiento precoz, es evidente que el engrosamiento precoz —y, por extensión, el rendimiento— puede incrementarse más

eficazmente empleando criterios de selección basados en los marcadores para el follaje (o sea, la biomasa total de la planta) y para el índice de cosecha.

Los siguientes proyectos de marcación de genes se encuentran en curso en el CIAT:

- resistencia a la mosca blanca de la yuca (*A. socialis*) y a la bacteriosis común (CBB), utilizando diferentes cruzamientos;
- pudrición de las raíces (*Phytophthora* spp.) y calidad de la raíz; p. ej., deterioro en poscosecha (PHD), calidad del almidón y calidad culinaria.

### **Clonación de genes de interés agronómico**

La naturaleza heterocigótica de la yuca implica que cualquier intento de introducir en su genotipo un carácter vegetal, aun cuando esté controlado por un gen único, trae consigo la pérdida de una variedad favorita. Por tanto, un método más eficaz de introducir en la yuca caracteres controlados por un solo gen, como la resistencia a la CMD, es la transformación genética. Ahora bien, primero es necesario clonar los genes que controlan este carácter. Hay diversos enfoques para la clonación de un gen de interés, conocido solamente por su fenotipo o por su posición en un mapa de genes; el primer enfoque sería entonces la clonación por posición (Martin et al., 1993; Tanksley, 1995) y la clonación de genes mediante genes heterólogos (Bothwell et al., 1990).

### **Clonación por posición**

Tres elementos importantes se emplean en este tipo de clonación:

- un mapa detallado (desarrollado partiendo de una población grande) de la región apropiada del genoma;
- una genoteca de cromosomas bacterianos artificiales (CAS); y
- un protocolo eficaz de transformación para el análisis de complementación.

Se ha construido una CAS para yuca para la clonación por posición de los genes identificados a partir de los mapas de genes correspondientes



a los caracteres de interés agronómico (Fregene et al., 2000). Se aisló el ADN de la variedad de yuca TMS30001 y se incluyó en bloques de agarosa, tal como lo describen Zhang et al. (1995).

La variedad TMS30001, desarrollada en el IITA, presenta resistencia extrema a la CMD y resistencia a algunas cepas del CBB. Gran parte del ADN genómico, contenido en un tercio de un bloque de agarosa, fue parcialmente digerido con Hind III (1.5U) durante 20 minutos a 37 °C; los fragmentos de ADN obtenidos, cuyos tamaños estaban entre 100 y 300 kb, fueron seleccionados empleando electroforesis de geles en campo magnético pulsátil (CHEF MAPPER, Bio-Rad Corp.).

El ADN seleccionado por tamaño se ligó en el sitio de clonación Hind III de pBeloBAC11, en una relación vector:inserción de 10:1, utilizando 14U de ligasa, para un volumen final de 100 ml. Se transformaron luego 20 microlitros de células competentes DH10B (GIBCO BRL) con 2 ml de la reacción de ligación, por electroforación; las colonias blancas obtenidas se recogieron para la clasificación por tamaño de la inserción de ADN. Las colonias se cultivaron durante 14 horas en LB + 30 mg/ml de cloramfenicol y se aisló el ADN del plásmido mediante el robot de aislamiento automático de plásmidos Autogen (Kurabo Inc.).

El ADN del plásmido fue digerido con 10U de *Not I* para liberar las inserciones, y se separó en un gel de agarosa al 1%, mediante electroforesis de geles en campo magnético pulsátil. El resto de la 'ligación' se transformó, se colocó en placas y se recogieron 55,000 clones, cuyo tamaño promedio era de 80,000 pares de bases, con el robot Q-bot (Genetix PLC). La genoteca tiene una cobertura de cinco veces (5X) el tamaño del genoma de la yuca.

Descubiertos los marcadores genéticos vinculados al gen que controla la nueva fuente de resistencia a la CMD y construida una genoteca de CAS, se fija la etapa para la clonación por posición del gen de resistencia a la CMD. El marcador más cercano al gen dominante de la resistencia a la CMD está a 6 cM y no es apropiado para la construcción de contigs (segmentos contiguos de CAS alineados para representar la zona donde se encuentra el gen de interés) de CAS con los intervalos del

genoma; de hecho, no son factibles los contigs con menos de 1 cM. En consecuencia, son necesarios los mapas detallados, o mapas densos, de las regiones genómicas que fueron identificadas como portadoras del gen de resistencia.

La manera más eficaz de hacer un mapa detallado de la yuca es empleando una variante del análisis de segregación masal y los marcadores de AFLP (Giovanni et al., 1991). El método aprovecha la capacidad única de las técnicas RAPD y AFLP de muestrear muchos loci difundidos en todo el genoma y su capacidad para encontrar otros marcadores vinculados a aquellos en cualquier región, mediante la selección masal de clases genotípicas de marcadores contiguas a esa región.

Este método se aplica actualmente a una población grande empleada para desarrollar un mapa de 700 genotipos, para identificar otros marcadores en la región del genoma de la yuca que porta el gen de resistencia *CMD2*. Una vez que se hayan obtenido los mapas detallados, se calculará la relación que hay entre las distancias genéticas y las distancias físicas en las regiones pertinentes. Calculada la distancia física que se requiere para cubrir la región portadora de los genes de resistencia, se construirá un contig de CAS, mediante digestión de los clones de CAS y su dactiloscopia. Finalmente, los clones candidatos a CAS serán introducidos en genotipos de yuca susceptibles a la CMD mediante una transformación genética, utilizando el sistema BIBAC (Hamilton et al., 1996).

### ***Evaluación de la diversidad genética mediante marcadores moleculares***

Los recursos genéticos de la yuca y sus parientes silvestres representan un recurso decisivo para el futuro de este cultivo. Por tanto, es comprensible que se hayan hecho recolecciones y estudios sobre las relaciones genéticas entre las accesiones de yuca, utilizando prácticamente todos los marcadores moleculares disponibles.

### ***Accesiones y parientes silvestres***

Los marcadores de minisatélite, o sea, obtenidos por dactiloscopia de series repetidas en tándem altamente variables de ADN nuclear

(Jeffreys et al., 1985), fueron los primeros que se emplearon para estudiar las relaciones entre las accesiones de yuca y sus parientes silvestres (Bertram, 1993; Ocampo et al., 1994).

Las dactiloscopias fueron obtenidas mediante hibridación Southern de secuencias de ADN del fago M13 con ADN genómico de yuca digerido con un panel de enzimas de restricción (Rogstad et al., 1988). Con ellas se dedujo la relación existente entre las accesiones de yuca y las especies de *Manihot* de América Central, y se pudieron identificar 29 accesiones duplicadas posibles en un subconjunto de la colección internacional de yuca mantenida en el CIAT.

Se aplicaron también los análisis de RFLP del ADN cloroplástico y las secuencias ribosómicas nucleares (ADNr), empleando sondas heterólogas, para evaluar las relaciones filogenéticas entre las especies de *Manihot* de América del Sur y América Central y la yuca (Bertram, 1993; Fregene et al., 1994). El análisis molecular refutó la opinión, ampliamente sostenida y basada en caracteres morfológicos, de que la yuca puede haberse originado de una especie mesoamericana de *Manihot*, *M. aesculifolia* (Rogers y Appan, 1973; Rogers y Fleming, 1973); sugiere, en cambio, ese análisis una posible domesticación de algunos parientes silvestres cercanos de Brasil, entre los que se hallan *M. tristis* y *M. esculenta* subsp. *flabellifolia*.

Se emplearon también los marcadores de AFLP para obtener una evaluación cuantitativa de relaciones genéticas en una muestra representativa de la diversidad del cultivo y de seis taxa silvestres (Roa et al., 1997). Una vez más, este estudio demostró que la especie brasileña de *Manihot*, la subespecie *M. esculenta* subsp. *flabellifolia*, *M. tristis* y *M. peruviana* son más similares a la yuca que su pariente mexicano *M. aesculifolia*; señaló, además, que la yuca puede tener su origen en estos parientes cercanos (Roa et al., 1997).

La prueba concluyente de los orígenes de la yuca provino de un estudio filogeográfico basado en la elaboración de secuencias del gen nuclear de copia simple que codifica para la deshidrogenasa del gliceraldehido 3-fosfato (*G3pdh*) (Olsen y Schaal, 1999). Estos autores demuestran que la yuca se originó de poblaciones naturales de *M. esculenta* subsp.

*flabellifolia*, en la frontera sur de la cuenca amazónica de Brasil. Se emplearon también marcadores para obtener una evaluación cuantitativa de la semejanza genética de la yuca (Beeching et al., 1993; Bonierbale et al., 1995; Second et al., 1997; Elias et al., 1999) y para estudiar la estructura genética del germoplasma resistente a la enfermedad (Sánchez et al., 1999; Fregene et al., 2000a). Otros estudios han procurado determinar la estructura genética y la base de la diferenciación genética de las líneas nativas de la yuca en Africa (Mkumbira et al., 2000; Fregene et al., en preparación).

Bonierbale et al. (1995) informaron sobre una comparación del germoplasma élite de yuca mantenido en el CIAT, que está adaptado a cinco condiciones edafoclimáticas de producción. Encontraron los investigadores que el germoplasma de ciertas zonas edafoclimáticas (ECZ) tenía una base genética más amplia que el de otras; las accesiones, por su parte, no podían asignarse, en general, a un acervo específico de ECZ partiendo de modelos moleculares, puesto que había una considerable superposición de frecuencias de alelos.

### **Genotipos resistentes o susceptibles**

Hay otros enfoques para evaluar la diversidad genética que se basan en el análisis de la estructura de los genotipos resistentes a la enfermedad. Uno de ellos es el análisis de correspondencias múltiples (MCA) de los datos de AFLP (con dos combinaciones de iniciadores) de genotipos de yuca resistentes y susceptibles a dos cepas del estudio sobre *Xanthomonas axonopodis*, que permitió aclarar la estructura genética del germoplasma de yuca resistente a la bacteriosis común (CBB) (Sánchez et al., 1999).

Los resultados del análisis de diversidad entre genotipos resistentes y susceptibles al CBB revelan una distribución al azar de resistencia y susceptibilidad, lo que indica que la resistencia al CBB ha surgido, muchas veces, con independencia de otros aspectos del germoplasma de la yuca. Por otra parte, la evaluación de los análisis AFLP de líneas nativas y variedades mejoradas de Africa (en número de 29) que eran resistentes o susceptibles a la enfermedad devastadora del mosaico de la yuca (CMD), reveló una distribución de variedades resistente/susceptible que no es casual (Fregene et al., 2000a). Se encontró también que las

líneas nativas africanas resistentes a la CMD se diferenciaban genéticamente de las líneas élite resistentes y de las líneas nativas susceptibles, lo que indica dos cosas: la presencia de dos fuentes diferentes de resistencia a la CMD, y la posibilidad de que la fuente encontrada en la línea nativa haya surgido recientemente como un caso muy especial de mutación.

En otros estudios sobre líneas nativas de yuca se había evaluado, empleando marcadores de AFLP, la variabilidad genética de 31 variedades cultivadas tradicionalmente por los amerindios Makushi de Guyana y de una muestra representativa de 38 variedades de una colección mundial ex situ mantenida en el CIAT (Calí, Colombia) (Elias et al., 1999).

### ***Polimorfismo intravarietal***

El estudio dio los siguientes resultados: se halló polimorfismo intravarietal en 21 variedades, lo que indica que una variedad podría estar constituida por más de un genotipo. La diversidad encontrada en los cultivares de yuca de un sitio único en Guyana fue igual, en términos cuantitativos, a la encontrada en el grupo representativo de la colección del CIAT; además, no se encontró correspondencia entre la estructura de la diversidad molecular y la variación observada en los caracteres agronómicos que son objetivo de la selección que hacen los cultivadores. Por el contrario, se halló que la diversidad genética se estructuraba partiendo del sabor (variedades amargas versus variedades dulces) en un estudio sobre microsatélites de variedades de yuca del norte de Malawi (Mkumbira et al., 2000).

Se hizo otro estudio para evaluar las relaciones genéticas de 96 líneas nativas recolectadas en 10 poblaciones en el sur de Tanzania; en él se emplearon 68 marcadores de microsatélites en un análisis de componentes principales para conocer las diferencias genéticas entre las líneas nativas, sin basarse en el sabor o en la ubicación (Fregene et al., en preparación).

Aunque no está muy clara la base de la conglomeración, se cree que representa diferentes sucesos de introducción. Parece que la yuca, como ocurre con el maíz, tiene acervos de genes altamente diferenciados y un alto

porcentaje de loci de genes dominantes/recesivos activos; estas dos características son muy importantes en la heterosis. Una vez que se hayan analizado los numerosos datos y se hayan probado los cruzamientos entre conglomerados, es probable que se empleen marcadores moleculares para predecir la heterosis. Los marcadores de microsatélites se han empleado también para buscar duplicados en la colección central del CIAT (Chavarriaga et al., 1999) y para analizar el germoplasma de dos regiones: el litoral y la Amazonia de Brasil (Mueller et al., en preparación).

## **Conclusión**

La biotecnología de la yuca puede hacer contribuciones notables a la modernización del cultivo y crear opciones para que los pequeños agricultores obtengan ingresos adicionales. Integrada con el fitomejoramiento y la agronomía, principalmente, podrá realizar el potencial de este cultivo y hacer accesibles los resultados de ese trabajo.

## **Agradecimientos**

Los autores agradecen al Programa Colombiano de Biotecnología Agrícola (PBA), financiado por CEGA-DGIS, de Holanda; al Participatory Research and Gender Analysis Program (PRGA); al Department for International Development (DfID), del Reino Unido, y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia (MADR); estas entidades hicieron valiosos aportes a la financiación de los proyectos de investigación mencionados en este capítulo.

## **Referencias**

- Akano A; Barrera E; Dixon AG O; Fregene M. 2000. Molecular genetic mapping of resistance to the African cassava mosaic disease. Theoretical and Applied Genetics. (En impresión.)
- Akintonwa AO; Tunwashe N; Onifade A. 1994. Fatal and non-fatal acute poisoning attributed to cassava-based meal. Acta Horticulturae 375:285-288.

- Alvard D; Cote F; Teisson C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation: Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32:55-60.
- Andersen MD; Busk PK; Svendsen I; Moller BL. 2000. Cytochromes P-450 from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides Linamarin and Lotaustralin; I. Cloning, functional expression in *Pichia pastoris*, and substrate specificity of the isolated recombinant enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 275:1966-1975.
- Arias-Garzón DI; Sayre RT. 2000. Genetic engineering approaches to reducing the cyanide toxicity in cassava (*Manihot esculenta*, Crantz). En: Carvalho LJC; Thro AM; Vilarinhos AD (eds.). Proceedings of the IV International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, 1998. Brasilia, Brasil. p. 213-221.
- Bachem CWB; van der Hoeven RS; de Brujin SM; Vreugdenhill D; Zabeau M; Visser RGF. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal* 9(5):745-753.
- Bajaj TPS. 1983. Cassava plant from meristem cultures freeze-preserved from three years. *Field Crops Research* 7:161-167
- Banea-Mayambu JP; Tylleskär T; Gitebon N; Matadi N; Gebre-Medhin M; Rosling H. 1997. Geographical and seasonal association between linamarin and cyanide exposure from cassava and the upper motor neurone disease konzo in former Zaire. *Tropical Medicine & International Health* 2:1143-1151.
- Bayley CC; Morgan M; Dale EC; Ow DW. 1992. Exchange of gene activity in transgenic plants catalyzed by the Cre-lox site-specific recombination system. *Plant Molecular Biology* 18:353-361.
- Beeching JR; Marmey P; Gavaldà MC; Noirot M; Haysom HR; Hughes MA; Charrier A. 1993. An assessment of genetic diversity within a collection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm using molecular markers. *Annals of Botany (United Kingdom)* 72 (6):515-520.
- Bellotti AC. 1979. An overview on cassava entomology. En: Brekelbaum T; Bellotti A; Lozano J (eds.). Cassava Protection Workshop. Memorias. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 17-28.
- Bellotti AC; Arias B. 1979. Biology, ecology and biological control of cassava hornworm *Erinnyis ello*. En: Brekelbaum T; Bellotti A; Lozano J (eds.). Cassava Protection Workshop. Memorias. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 227-232.
- Bellotti AC; Smith L; Lapointe SL. 1999. Recent advances in cassava pest management. *Annual Review of Entomology (USA)* 44:343-370.
- Benson E; Chabrilange N; Engelmann F. 1992. Mise au point de méthodes de cryopreservation de meristems pour la conservation a long terme des ressources du manioc. ORSTOM (Montpellier).
- Berthouly M; Dufour M; Alvard D; Carrasco C; Alemanno L; Teisson C. 1995. Coffe micropropagation in liquid medium using temporary immersion technique. ASIC, Kyoto. 2:514-519C.
- Bertram RB. 1993. Application of molecular techniques resources of cassava (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae): Interspecific evolutionary relationships and intraspecific characterization. Cambridge University Press. p. 1-20.
- Bonierbale MW; Maya MM; Claros JL; Iglesias C. 1995. Application of molecular markers to describing the genetic structure of cassava gene pools. En: Proceedings of the Second International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Bogor, Indonesia, 1994. Working Document no. 150. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 106-122.

- Bonierbale MW; Guevara C; Dixon AGO; Ng NQ; Asiedu R; Ng SYC. 1997. Cassava. En: Fuccillo DA; Sears L; Stapleton P (eds.). Biodiversity in trust: Conservation and use of plant genetic resources in CGIAR centres. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. p. 1-20.
- Bothwell AL; Yancopoulos GD; Alt FW. 1990. Methods for cloning and analysis of eukaryotic genes. Jones and Bartlett, Boston, MA, E.U. p. 8-19.
- Boventius H; Weller JI. 1994. Mapping and analysis of dairy cattle quantitative trait loci by maximum likelihood methodology using milk protein genes as genetic markers. *Genetics* 137:267-280.
- Calderón-Urrea A. 1988. Transformation of *Manihot esculenta* (cassava) using *Agrobacterium tumefaciens* and expression of the introduced foreign genes in transformed cell lines. Tesis (M.Sc.). Vrije Univ. Bruselas, Bélgica.
- Chalfie M; Tu Y; Euskirchen G; Ward WW; Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.
- Charoensub R; Phansiri S; Sakai A; Yongmanitchai W. 1999. Cryopreservation of cassava in vitro-grown shoot tips cooled to -196 °C by vitrification. *Cryo-Letters* 20:89-94.
- Chavarriaga P; Schöpke C; Sangare A; Fauquet CM; Beachy RN. 1993. Transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) embryogenic tissues using *Agrobacterium tumefaciens*. En: Roca WM; Thro AM (eds.). Proceedings of the First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Cartagena, Colombia, 1992. Working Document no. 123. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 222-228.
- Chavarriaga P; Mancilla L; Ladino JJ; Ramírez C; López D; Herrera CJ; Roca WM. 2000a. Towards genetic transformation of cassava for insect resistance. En: Poster at the symposium "From germplasm bank to farmer fields, role of CIAT biotechnology in research and training in Latin America", Cali, Colombia, diciembre 2000. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
- Chavarriaga P; Mancilla LI; Ladino YJ; Segovia V; Roca WM. 2000b. Developing transgenic strategies against cassava stem borers. En: Carvalho LJCB; Thro AM; Vilarinhos AD (eds.). Proceedings of the IV International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, 1998. Brasilia, Brasil. p. 244-249.
- Chavarriaga P; Maya MM; Tohme J; Duque MC; Iglesias C; Bonierbale MW; Kresovich S; Kochert G. 1999. Using microsatellites, isozymes and AFLPs to evaluate genetic diversity and redundancy in the cassava core collection and to assess the usefulness of DNA-based markers to maintain germplasm collections. *Molecular Breeding* 5:263-273.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1999. Assessing and utilizing agrobiodiversity through biotechnology. En: CIAT Annual Report 1999; Project SB-02. Cali, Colombia. p. 34-36; 84-88.
- De Block M; Botterman J; Vandewiele M; Dockx J; Thoen C; Gossele V; Movva NR; Thompson C; van Montagu M; Leemans J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO Journal* 6:2513-2518.
- Ebinuma H; Sugita K; Matsunaga E; Yamakado. 1997. Selection of marker free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94:2117-2121.
- Elias M; Panaud O; Robert N. 1999. Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. *Heredity* 85(3):219-230.
- Epperson JE; Pachico D; Guevara C. 1997. Cost analysis of maintaining cassava plant genetic resources. *Crop Science* 37(5):1641-1649.

- Escobar RH; Mafla G; Roca WM. 1997. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Reports* 16:474-478.
- Escobar RH; Debouck D; Roca WM. 2000a. Development of cassava cryopreservation. En: Engelmann F; Takagi H (eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application*, Tsukuba, Japan/IPGRI, Rome. JIRCAS, Tokio. p. 222-226.
- Escobar R; Restrepo JM; Ospina GI; Hernández C; Tohme J; Roca WM. 2000b. Participatory research to develop low cost in vitro cassava propagation methods. En: Poster at the III International Seminar and Small Grants Workshop "Uniting science and participation in research", noviembre 2000, Nairobi, Kenya. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
- Escobar RH; Florez CP; Tabares E; Lentini Z; Roca WM. 2000c. Implementación del sistema RITA® en algunos cultivos del CIAT. En: Poster at the symposium "From germplasm bank to farmer fields: Role of CIAT biotechnology in research and training in Latin America", Cali, Colombia, diciembre 2000. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
- Escobar RH; Muñoz L; Roca WM. 2000d. Cassava micropropagation for rapid 'seed' production using temporary immersion bioreactors. En: Poster at the symposium "From germplasm bank to farmer fields: Role of CIAT biotechnology in research and training in Latin America", diciembre 2000. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
- Escobar RH; Muñoz L; Tohme J; Roca WM. 2001. Estado actual de la micropropagación de la yuca. Trabajo presentado en el Seminario Internacional, Programa Colombiano de Biotecnología Agrícola (PBA), Cartagena, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. (Multicopiado.)
- Etienne H; Lartaud M; Michaux-Ferrière N; Carron MP; Berthouly M; Teisson C. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cellular & Development Biology Plant* 33:81-87.
- Fraley RT; Rogers SG; Horsch RB; Sanders PR; Flick JS; Adams SP; Bittner ML; Brand LA; Fink CL; Fry JS; Galluppi GR; Goldberg SB; Hoffman NL; Woo SC. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:4803-4807.
- Fregene MA; Vargas J; Ikea J; Angel F; Tohme J; Asiedu RA; Akorada MO; Roca WM. 1994. Variability of chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its wild relatives. *Theoretical and Applied Genetics* 89(6):719-727.
- Fregene M; Angel F; Gómez R; Rodríguez F; Chavarriaga P; Roca W; Tohme J; Bonierbale M. 1997. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theoretical and Applied Genetics* 95:431-441.
- Fregene M; Bernal A; Duque M; Dixon A; Tohme J. 2000a. AFLP analysis of African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm resistant to the cassava mosaic disease (CMD). *Theoretical and Applied Genetics* 100(5): 678-685.
- Fregene M; Okogbenin E; Mba C; Angel F; Suárez MC; Gutiérrez J; Chavarriaga P; Roca W; Bonierbale M; Tohme J. 2000b. Genome mapping in cassava improvement: Challenges, achievements and opportunities. *Euphytica* (En impresión.)
- Frey P. 1996. Towards regeneration and transformation of cassava meristems. Tesis (M.Sc.). Swiss Federal Institut of Technology, Zurich, Suiza.
- Giovannoni JJ; Wing RA; Ganai MW; Tanksley SD. 1991. Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. *Nucleic Acids Research* 19(23):6553-6558.

- González AE; Schöpke C; Taylor NJ; Beachy RN; Fauquet CM. 1998. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) through *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Reports* 17:827-831.
- Gresshoff P; Doy C. 1974. Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of the anthers for haploid culture of this and other genera. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiol.* 73:132-141.
- Haldrup A; Petersen SG; Okkels FT. 1998a. Positive selection: A plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry. *Plant Cell Reports* 18:76-81.
- Haldrup A; Petersen SG; Okkels FT. 1998b. The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent. *Plant Molecular Biology* 37:287-296.
- Hamilton CM; Frary A; Lewis C; Tanksley SD. 1996. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:9975-9979.
- Herrera-Estrella L; De Block M; Messens E; Hernalsteens JP; Van Montagu M; Schell J. 1983. Chimeric genes as dominant selectable markers in plants. *EMBO Journal* 2:987-995.
- Iglesias C; Mayer J; Chávez L; Calle F. 1997. Genetic potential and stability of carotene content in cassava roots. *Euphytica* 94:367-373.
- Jefferson RA. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology* 5:387-405.
- Jefferson RA; Burgess SM; Hirsh D. 1986.  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:8447-8451.
- Jeffreys A; Wilson JV; Thein L. 1985. Hyper variable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314:67-73.
- Joersbo M; Okkels FT. 1996. A novel principle for selection of transgenic plant cells: Positive selection. *Plant Cell Reports* 16:219-221.
- Joersbo M; Donaldson I; Kreiberg K; Guldager P S; Brunstedt J; Okkels FT. 1998. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Molecular Breeding* 4:111-117.
- Jorge V; Fregene MA; Duque MC; Bonierbale MW; Tohme J; Verdier V. 2000. Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theoretical and Applied Genetics* 101(5/6):865-872.
- Kartha KK; Leung NL; Mroginski LA. 1982. *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiol.* 107(2):133-140.
- Kawano K; Narintaraporn K; Narintaraporn P; Sarakarn S; Limsila A; Limsila J; Suparhan D; Sarawat V; Watananonta W. 1998. Yield improvement in a multistage breeding program for cassava. *Crop Science* 38(2):325-332.
- Konan NK; Sangwan RS; Sangwan-Norreel BS. 1994a. Efficient *in vitro* shoot-regeneration systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Breeding* 113:227-236.
- Kunkel T; Niu Q W; Chan Y S; Chua N H. 1999. Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation. *Nature Biotechnology* 17:916-919.
- Lee M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy* 55:265-344.
- Lefèvre F; Charrier A. 1993a. Heredity of seventeen isozyme loci in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* 66:171-178.
- Li H-Q; Sautter C; Potrykus I; Puonti-Kaerlas J. 1996. Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology* 14:736-740.

- Li H-Q; Guo JY; Huang Y-W; Liang CY; Liu HX; Potrykus I; Puonti-Kaerlas J. 1998a. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. *Plant Cell Reports* 17:410-414.
- Li, H-Q; Potrykus I; Puonti-Kaerlas J. 1998b. Engineering leaf life length in cassava. En: Pires de Matos A; Vilarinhos A. (eds.). IV International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. Resúmenes. *Revista Brasileira de Mandioca (Suplemento)* 17:31.
- Li H-Q; Huang Y-W; Liang C-Y; Guo Y. 1995. Improvement of plant regeneration from secondary somatic embryos of cassava. En: Proceedings of the Second International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Bogor, Indonesia, 1994. Working Document no. 150. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. v. 1, p. 289-302.
- Liddle S; Hughes J; Hughes MA. 1997. Analysis of a cassava root  $\alpha$ -glycosidase promoter. *African Journal of Root and Tuber Crops* 2:158-162.
- Litt M; Luty JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44:397-401.
- López D. 2000. Inducción de callo embriogénico friable (CEF) y regeneración de plantas de la variedad de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) MCol 2215. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira, Colombia. 85 p.
- López D; Chavarriaga P; Tohme J; Roca WM. 2001a. Induction of friable embryogenic callus (FEC) in commercial cassava cultivars. En: CIAT Annual Report 2001; Project SB-02: Assessing and utilizing agrobiodiversity through biotechnology. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 224-229.
- López D; Montoya JE; Escobar R; Chavarriaga P; Tohme J; Roca WM. 2001b. Regeneration of cassava plants from friable embryogenic callus (FEC) by combining conventional solid media and temporary immersion using RITA®. En: CIAT Annual Report 2001; Project SB-02: Assessing and utilizing agrobiodiversity through biotechnology. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 224-227.
- Lorenzo JC; González BL; Escalona M; Teisson C; Espinosa P; Borroto C. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 52:197-200.
- Manrique NC. 2000. Respuesta varietal de 95 genotipos de la colección núcleo de yuca a la criopreservación usando la técnica de encapsulación-deshidratación. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira, Colombia. 88 p.
- Marín ML; Mafla G; Roca WM; Withers LA. 1990. Cryopreservation of cassava zygotic embryos and whole seeds in liquid nitrogen. *Cryo-Letters* 11:257-264.
- Martin GB; Brommonschenkel SH; Chunwongse J; Frary A; Ganai MW; Spivey R; Wu T; Earle ED; Tanksley SD. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262(5138): 1432-1436.
- Mathews H; Schöpke C; Carcamo R; Chavarriaga P; Fauquet C; Beachy RN. 1993. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. *Plant Cell Reports* 12:328-333.
- Mayerhofer R; Langridge WHR; Cormier MJ; Szalay AA. 1995. Expression of recombinant *Renilla* luciferase in transgenic plants results in high levels of light emission. *Plant Journal* 7:1031-1038.
- Mba REC; Stephenson P; Edwards K; Melzer S; Nkumbira J; Gullberg U; Apel K; Gale M; Tohme J; Fregene M. 2000. Simple Sequence Repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: Towards a SSR-based molecular genetic map of cassava. *Theoretical and Applied Genetics* 102:21-31.



- Mett VL; Lochhead LP; Reynolds PH. 1993. Copper-controllable gene expression system for whole plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90:4567-4571.
- Mkumbira J; Lagercrantz U; Mahungu N M; Chiwona-Karlton L; Saka J; Mhone A; Bokanga M; Brimer L; Gullberg U; Rosling H. 2000. Genetic variability within and between local cultivars in Northern Malawi. Euphytica. (En impresión.)
- Mlingi, N; Poulter NH; Rosling H. 1992. An outbreak of acute intoxications from consumption of insufficiently processed cassava in Tanzania. Nutrition Research 12:677-687.
- Mohan M; Nair S; Bhagwat A; Krishna T; Yano M; Bhatia C; Sasaki T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Molecular Breeding 3:87-103.
- Mukherjee A. 1995. Embryogenesis and regeneration from cassava calli of anther and leaf. En: Proceedings of the Second International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Bogor, Indonesia, 1994. Working Document no. 150. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. v. 1, p. 375-381.
- Munyikwa TRI; Chipangura B; Salehuzzaman SNIM; Jacobsen E; Visser RFG. 1995. Isolation and characterization of starch biosynthesis from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis (Ph.D.). University of Wageningen, Holanda. 119 p.
- Munyikwa TRI; Raemakers CJM; Schreuder R; Kok M; Schippers E; Jacobsen E; Visser RGF. 1998a. Pinpointing towards improved transformation and regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Plant Science 135:87-101.
- Munyikwa TRI; Raemakers CCJM; Schreuder M; Kreuze J; Suurs L; Kok R; Rozeboom M; Jacobsen E; Visser RGF. 1998b. Introduction and expression of antisense ADPG-pyrophosphorylase of cassava leads to decreased levels of starch and increased levels of sugars. En: Pires de Matos, A; Vilarinhos A (eds.). IV International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. Resúmenes. Revista Brasileira de Mandioca (Suplemento) 17:62.
- Munyikwa TRI; Langeveld S; Salehuzzaman SNIM; Jacobsen E; Visser RGF. 1997. Cassava starch biosynthesis: New avenues for modifying starch quantity and quality. Euphytica 96:65-75.
- Murakami T; Anzai H; Imai S; Satoh A; Nagaoka K; Thompson C. 1986. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygrosopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster. Molecular & General Genetics 205:42-50.
- Murashige T; Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- Nelson JC. 1997. QGENE: Software for marker based genome analysis and breeding. Molecular Breeding 3:229-235.
- Ocampo C; Angel F; Jiménez A; Jaramillo G; Hershey C; Granados E; Iglesias C. 1995. DNA fingerprinting to confirm possible genetic duplicates in cassava germplasm. En: Proceedings of the Second International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Bogor, Indonesia, 1994. Working Document no. 150. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. v. 1, p. 145-151.
- Odell JJ; Caimi PG; Sauer B; Russell SH. 1990. Site-directed recombination in the genome of transgenic tobacco. Molecular & General Genetics 223:369-378.
- Olsen KM; Schaal BA. 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(10):5586-5591.

- Orellana MA. 1997. Desarrollo de un sistema de cultivo in vitro para los explantes nodales de caoba (*Swietenia macrophylla* King). Tesis (Maestría). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica.
- Otim-Nape GW. 1993. Epidemiology of the African cassava mosaic geminivirus disease (ACMD) in Uganda. Tesis (Ph.D.). University of Reading, Reading, Reino Unido.
- Otim-Nape GW. 1995. The African cassava mosaic virus (ACMV): A threat to food security in Africa. En: Proceedings of the Second International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Bogor, Indonesia, 1994. Working Document no. 150. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. v. 2, p. 519-530.
- Ow DW; Wood KV; DeLuca M; de Wet JR; Helinski DR; Howell SH. 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234: 856-859.
- Perry BA. 1943. Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae. *American Journal of Botany* 30:527-543.
- Puonti-Kaerlas J; Frey P; Potrykus I. 1997a. Development of meristem gene transfer techniques for cassava. *African Journal of Root and Tuber Crops* 2:175-180.
- Puonti-Kaerlas J; Li H-Q; Sautter C; Potrykus I. 1997b. Production of transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz) via organogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation. *African Journal of Root and Tuber Crops* 2:181-186.
- Puonti-Kaerlas J; Li H-Q; Wohlwend H; Potrykus I. 1998. Competence for embryogenesis and organogenesis in cassava. En: Pires de Matos A; Vilarinhos A (eds.). IV International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. Resúmenes. *Revista Brasileira de Mandioca (Suplemento)* 17:32.
- Quin M; Bayley C; Stockton T; Ow DW. 1994. Recombinase-mediated site-specific recombination between plant chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:1706-1710.
- Raemakers CJJM; Sofiari E; Taylor NJ; Henshaw GG; Jacobsen E; Visser RGF. 1996. Production of transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants by particle bombardment using luciferase activity as selection marker. *Molecular Breeding* 2:339-349.
- Raemakers CJJM; Schreuder MM; Pereira I; Suurs L; Vincken JP; Jacobsen E; Visser RGF. 2001. Production of amylose-free cassava plants by genetic modification. Trabajo presentado en la Fifth Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, noviembre 2001. Resúmenes ejecutivos. St. Louis, MO, E.U. p. S3-13.
- Raemakers K; Schreuder M; Munyikwa T; Jacobsen E; Visser R. 2000. Towards a routine transformation procedure for cassava. En: Carvalho LJC; Thro AM; Vilarinhos AD (eds.). Proceedings of the IV International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, 1998. Brasilia, Brasil. p. 250-266.
- Ritter E; Debener T; Barone A; Salamini F; Gebhardt C. 1991. RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Molecular & General Genetics* 227:81-85.
- Roa AC; Maya MM; Duque M; Allem C; Tohme J; Bonierbale MW. 1997. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. *Theoretical and Applied Genetics* 95:741-750.
- Roca WM. 1984. Cassava. En: Sharp WR; Evans DA; Ammirato PV; Yamada Y. Handbook of plant cell culture. 2: Crop species. MacMillan Pub., Nueva York. p. 269-301.
- Rogers DJ; Appan SG. 1973a. *Manihot*; *Manihotoides* (Euphorbiaceae). *Flora Neotropica*. Monograph no. 13. Hafner Press, Nueva York, NY, E.U. 272 p.

- Rogers DJ; Fleming HS. 1973b. A monograph of *Manihot esculenta* with an explanation of the taximetric methods used. *Economic Botany* 27:1-113.
- Rogstad SH; Patton JC; Schaal BA. 1988. M13 repeat probe detects DNA minisatellite-like sequences in gymnosperms and angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:9176-9178.
- Rosling H. 1988. Cassava toxicity and food security. UNICEF African Household Security Programme. Tryck Kontakt, Uppsala, Suecia.
- Rosling H; Mlingi N; Tylleskär T; Banea M. 1993. Causal mechanisms behind human diseases induced by cyanide exposure from cassava. En: Roca WM; Thro AM (eds.). *Proceedings of the First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network*, Cartagena, Colombia, 1992. Working Document no. 123. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 366-375.
- Sánchez G; Restrepo S; Duque M; Fregene M; Bonierbale M; Verdier V. 1999. AFLP assessment of genetic variability in cassava accessions (*Manihot esculenta*) resistant and susceptible to the cassava bacterial blight (CBB). *Genome* 42:163-172.
- Santos LG; Escobar R; Chavarriaga P; Roca WM. 2001. Cryopreservation of friable embryogenic callus (FEC) lines. En: *CIAT Annual Report 2001; Project SB-02: Assessing and utilizing agrobiodiversity through biotechnology*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 256-257.
- Sarria R; Torres E; Angel F; Chavarriaga P; Roca WM. 2000. Transgenic plants of cassava (*Manihot esculenta*) with resistance to Basta obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports* 19:339-344.
- Schena M; Lloyd AM; Davis RW. 1991. A steroid-inducible gene expression system for plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:10421-10425.
- Schenk RU; Hildebrandt AC. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50:199-204.
- Schöpke C; Franche C; Bogusz D; Chavarriaga P; Fauquet CM; Beachy RN, 1993. Transformation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). En: Bajaj N (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry; Plant protoplasts and genetic engineering*. Springer-Verlag, Berlín. v. 23, p. 273-289.
- Schöpke C; Taylor N; Carcamo R; Konan N; Marmey P; Henshaw GG; Beachy RN; Fauquet C. 1996. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures. *Nature Biotechnology* 14:731-735.
- Schöpke C; Taylor N; Carcamo R; González de Schöpke AE; Konan N; Marmey P; Henshaw GG; Beachy RN; Fauquet C. 1997a. Stable transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by particle bombardment and by *Agrobacterium*. *African Journal of Root and Tuber Crops* 2:187-193.
- Schöpke C; Carcamo R; Beachy RN; Fauquet C. 1997b. Plant regeneration from transgenic and non-transgenic embryogenic suspension cultures of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *African Journal of Root and Tuber Crops* 2:194-195.
- Schrott M. 1995. Selectable marker and reporter genes. En: Potrykus I; Spangenberg G (eds.). *Gene transfer to plants*. Springer-Verlag, Berlín. p. 325-336.
- Second G; Allem A; Emperaire L; Ingram C; Colombo C; Mendes R; Carvalho L. 1997. AFLP based *Manihot* and cassava numerical taxonomy and genetic structure analysis in progress: implications for dynamic conservation and genetic mapping. *African Journal of Root and Tuber Crops* 2(1-2): 140-147.

- Siritunga D; Arias-Garzón D; Sayre R. 2001. Reduction in the cyanogenic potential of cassava roots; transgenic plants expressing hydroxynitrile lyase in the roots. En: Proceedings of the Fifth Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, noviembre 2001, St. Louis, MO, E.U. Resúmenes. p. S7-27.
- Siritunga D; Sayre R. 2001. Down-regulation of CYP79D1 and CYP79D2 to obtain acyanogenic cassava (*Manihot esculenta*). En: Proceedings of the Fifth Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, noviembre 2001, St. Louis, MO, E.U. Resúmenes. p. S7-28.
- Sommer A. 1988. New imperatives for an old vitamin A. *Journal of Nutrition* 119:96-100.
- Stamp JA; Henshaw GG. 1982. Somatic embryogenesis in cassava. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiol.* 105:183-187.
- Suárez MC; Bernal A; Gutiérrez J; Tohme J; Fregene M. 2000. Development of expressed sequence tags (ESTs) from polymorphic transcription derived fragments (TDFs) in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Genome* 43:62-67.
- Szabados L; Hoyos R; Roca W. 1987. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Reports* 6:248-251.
- Tanksley SD; Ganai MW; Martin GB. 1995. Chromosome landing: A paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends in Genetics* 11(2):63-68.
- Tanksley SD; Young ND; Paterson AH; Bonierbale MW. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Biotechnology* 7:257-263.
- Taylor NJ; Edwards M; Kiernan RJ; Davey CDM; Blakesley D; Henshaw GG. 1996. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology* 14:726-730.
- Taylor NJ; Mason MV; Schöpke C; Carcamo R; Ho T; González AE; Beachy RN; Fauquet C. 2000. Production of genetically transformed cassava plants containing various genes of interest. En: Carvalho LJC; Thro AM; Vilarinhos AD (eds.). Proceedings of the IV International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, 1998. Brasilia. Brasil. p. 267-276.
- Teisson C; Alvard D. 1994. A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. En: Terce M; Cella R; Falavigna A (eds.). Current issues in plant molecular and cell biology. Kluwer Academic Pub., Holanda. p. 105-110.
- Thompson GA; Hiatt WR; Facciotti D; Stalker DM; Comai L. 1987. Expression in plants of a bacterial gene coding for glyphosate resistance. *Weed Sci.* 35 (Suppl):19-23.
- Thro AM; Roca WM; Restrepo J; Caballero H; Poats S; Escobar R; Mafla G; Hernández C. 1999. Can in vitro biology have farm-level impact for small-scale cassava farmers in Latin America? *In Vitro Cellular & Development Biology Plant* 35:382-387.
- Towill LE. 1996. Germplasm preservation. En: Trigiano RN; Gray DJ (eds.). Plant tissue culture: Concepts and laboratory exercises. CRC Press. p. 291-196.
- Tylleskär T; Banea M; Bikangi N; Cooke RD; Poulter NH; Rosling H. 1992. Cassava cyanogens and konzo, an upper motoneuron disease found in Africa. *Lancet* 339:208-211.
- Umanah EE; Hartman RW. 1973. Chromosome numbers and karyotypes of some *Manihot* species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 98:272-274.
- Van den Elzen P; Townsend J; Lee KY; Bedbrook J. 1985. A chimeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Molecular Biology* 5:299-302.
- Wang MB; Upadhaya NM; Brettell RIS; Waterhouse PM. 1997. Intron-mediated improvement of a selectable marker gene for plant transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Genetics & Breeding* 51:325-334.

- West Jr. KP; Howard GR; Sommer A. 1989. Vitamin A and infection: Public health implications. *Annual Review of Nutrition* 9:63-86.
- Withers L; Williams JT. 1986. *In vitro* conservation. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) and FAO, Roma. 21 p.
- Wohllenben W; Arnold W; Broer I; Hillemann D; Strauch E; Puehler A. 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70:25-38.
- Woodward BR; Puonti-Kaerlas J. 2000. Somatic embryogenesis from floral tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). En: Carvalho LJC; Thro AM; Vilarinhos AD (eds.). Proceedings of the IV International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, 1998. Brasilia, Brasil. p. 431-438.
- Wu KK; Burnquist W; Sorrells ME; Tew TL; Moore PH; Tanksley SD. 1992. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theoretical and Applied Genetics* 83:294-300.
- Zhang H; Zhao X; Ding X; Paterson A; Wing R. 1995. Preparation of megabase-size DNA from plant nuclei. *Plant Journal* 7(1):175-184.
- Zhang P; Legris G; Coulin P; Puonti-Kaerlas J. 2000. Production of stably transformed cassava plants via particle bombardment. *Plant Cell Reports* 19:939-945.
- Zhang P; Puonti-Kaerlas J. 2000. PIG-mediated cassava transformation using positive and negative selection. *Plant Cell Reports* 19:1041-1048.