

**AVANCES EN LA INTROGRESION ASISTIDA POR MARCADORES
MOLECULARES DE LA RESISTENCIA AL DETERIORO FISIOLÓGICO POST-
COSECHA DESDE *Manihot walkerae* Croizat EN POBLACIONES DE YUCA *M.
esculenta* Crantz.**

ELVIA AMPARO ROSERO ALPALA

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRIA EN CIENCIAS AGRARIAS - FITOMEJORAMIENTO
PALMIRA
2008**

**AVANCES EN LA INTROGRESION ASISTIDA POR MARCADORES
MOLECULARES DE LA RESISTENCIA AL DETERIORO FISIOLÓGICO POST-
COSECHA (DFP) DESDE *Manihot walkerae* Croizat EN POBLACIONES DE
YUCA *M. esculenta* Crantz.**

ELVIA AMPARO ROSERO ALPALA

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Magíster
en Ciencias Agrarias con Énfasis en Mejoramiento Genético de Plantas**

DIRIGIDO POR:

MARTIN FREGENE Ph.D.

HERNAN CEBALLOS LASCANO Ph.D.

JUAN GONZALO MORALES OSORIO Ph.D.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRIA EN CIENCIAS AGRARIAS - FITOMEJORAMIENTO
PALMIRA**

2008

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Palmira, 17 de septiembre de 2008

DEDICATORIA

A mis padres SEGUNDO ROSERO y MARIA CELIDA ALPALA por su apoyo constante e irremplazables enseñanzas.

A mis hermanos JAIME, DEISY, LUCIA, GLADIS, ALICIA Y JENNIFER, con quienes he compartido inolvidables momentos en la vida.

A mi tierra con su gente, son mi inspiración para continuar

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus más sinceros agradecimientos a:

Hernán Ceballos Lascano. Por la dirección en el trabajo de tesis, por su amistad, apoyo personal, por sus consejos y por la confianza depositada en mí durante el desarrollo de este trabajo.

Martín Fregene. Por brindarme la oportunidad de continuar mis estudios de postgrado, sus valiosas enseñanzas y apoyo en la realización de este trabajo.

La Universidad Nacional de Colombia y su programa de becas para mejores estudiantes, por la formación profesional adquirida y el apoyo financiero ofrecido.

Dr. Chiedozie Egesi por su gran ayuda y enseñanzas.

Al personal del laboratorio de genética de yuca (CIAT), Janeth Gutierrez, Paula Hurtado y Cesar Ospina, por su gran apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Juan Carlos Pérez, Oriana Muriel y demás personal del programa de Mejoramiento de yuca por su amistad y gran disposición siempre

Al personal del laboratorio de calidad de raíces (CIAT), en especial a Teresa Sánchez por su apoyo, consejos y gran ayuda.

Al profesor Juan Gonzalo Morales, por su valiosa colaboración y comentarios en la preparación de este documento.

Al Personal de campo del programa de mejoramiento y genética de yuca, Jairo Valencia, Lopez, Armando y demás, por la gran disposición siempre.

CIAT. Por los recursos y facilidades otorgadas a través del tiempo de la investigación.

Anita Morillo, Yacenia Morillo y Constantino Cuambe, por su gran apoyo en el desarrollo del trabajo pero sobretodo por su especial amistad, por los gratos e inolvidables momentos compartidos.

Jaime Marin, Adriana Alzate, Adriana Nuñez y Diana Falla, por su compañía en las jornadas laborales, su gran ayuda y disposición en el desarrollo de este trabajo.

A los profesores Karina López y Mario Augusto García, por su apoyo y consejos durante mis estudios y en el desarrollo de este trabajo.

Al personal docente y administrativo de la universidad, por su apoyo y colaboración durante mis estudios.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron para la realización de este trabajo.....Mil gracias!!!.

La facultad y los jurados de tesis
no se harán responsables de las ideas
emitidas por el autor.

Articulo 24, resolución 04 de 1974

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN-----	1
1. OBJETIVOS-----	5
1.1. OBJETIVO GENERAL-----	5
1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS -----	5
2. MARCO TEORICO -----	6
2.1. EL CULTIVO DE LA YUCA-----	6
2.1.1. Taxonomía -----	6
2.1.2. Origen y dispersión -----	6
2.1.3. Citogenética -----	7
2.1.4. Descripción botánica -----	7
2.1.5. Sistema radical-----	9
2.2. IMPORTANCIA ECONOMICA DEL CULTIVO-----	10
2.3. DETERIORO POST COSECHA EN YUCA-----	11
2.3.1. Generalidades-----	11
2.3.2. Deterioro fisiológico o primario-----	12
2.3.3. Deterioro microbiano o secundario-----	17
2.4. MARCADORES MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO GENETICO -----	19
2.4.1. Mapas de ligamiento y detección de QTLs-----	21
2.4.2. Marcadores moleculares, construcción de mapas genéticos y detección de QTLs en yuca -----	25
2.4.3. Mejoramiento asistido por marcadores en la introgresión de características desde especies silvestres-----	27
3. MATERIALES Y METODOS -----	31
3.1. LOCALIZACIÓN-----	31
3.2. MATERIAL VEGETAL -----	31

3.3. EVALUACIÓN FENOTÍPICA DEL DETERIORO FISIOLÓGICO POST-COSECHA -----	33
3.4. EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS AL NIVEL DE INTROGRESIÓN Y/O AL DFP -----	34
3.4.1. Evaluación de materia seca-----	34
3.4.2. Contenido de humedad y estimación de la pérdida de humedad ----	35
3.4.3. Determinación cualitativa del nivel de escopoletina -----	35
3.4.4. Evaluación de tipo de planta-----	35
3.4.5. Evaluación forma, tamaño y características generales de la raíz ----	36
3.5. EVALUACIÓN GENOTÍPICA -----	37
3.5.1. Extracción ADN-----	37
3.5.2. Verificación de calidad y cantidad de ADN-----	37
3.5.3. Evaluación usando marcadores microsatélites -----	38
3.6. LECTURA Y ANÁLISIS DE DATOS-----	39
3.6.1. Datos genotípicos -----	39
3.6.2. Datos fenotípicos -----	39
3.6.3. Análisis de ligamiento y detección de QTLs -----	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	42
4.1. EVALUACION FENOTIPICA DEL DETERIORO FISIOLÓGICO POST-COSECHA (DFP)-----	42
4.1.1. Variabilidad fenotípica para DFP -----	42
4.1.2. Respuesta al DFP a través de la raíz-----	49
4.1.3. Relación del DFP con el contenido de materia seca y pérdida de humedad-----	52
4.1.4. Relación del DFP con el contenido de escopoletina -----	56
4.1.5. Relación del DFP y características de interés agronómico -----	57
4.2. MAPEO GENÉTICO Y ANÁLISIS DE QTLs PARA RESISTENCIA AL DETERIORO FISIOLÓGICO POST-COSECHA (DFP) -----	63
4.2.1. Estimación del polimorfismo -----	63
4.2.2. Evaluación en la población completa B1PD280-----	64
4.2.3. Construcción del mapa genético para la población B1PD280 -----	66

4.2.4. Identificación de QTLs asociados al DFP y MS -----	69
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES -----	75
BIBLIOGRAFIA -----	77
ANEXOS -----	88

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Correlación entre porcentaje de DFP en la evaluación a 14 ddc y otras características relevantes en yuca. ----- 53
- Cuadro 2. Promedios de porcentaje de DFP (14ddc), MS (0 y 14ddc) y DIFAGU. 54
- Cuadro 3. Correlación entre porcentaje de DFP en la evaluación a 14 ddc y características de interés agronómico. ----- 58
- Cuadro 4. Promedios de las características agronómicas evaluadas según niveles de DFP establecidos, parentales recurrentes (SM909-25 y MTA18) y parental donante (CW429-1). ----- 59
- Cuadro 5. Frecuencia de la segregación de los marcadores microsatélites evaluados en la población B1PD280 ----- 65
- Cuadro 6. Correspondencia entre los grupos de ligamiento del mapa de la población B1PD280 y los grupos previamente identificados, número de marcadores que los conforman y tamaño (cM). ----- 67
- Cuadro 7. Regiones QTLs asociadas con la respuesta al DFP en la población B1PD280, marcadores microsatélites y varianza fenotípica explicada ----- 71
- Cuadro 8. Regiones QTLs asociadas con el contenido de materia seca inicial --- 71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas de deterioro fisiológico primario (DFP) en yuca.-----	13
Figura 2. Síntomas típicos de deterioro secundario en yuca. -----	18
Figura 3. Esquema modificado de la estrategia “AB-QTLs” en la introgresión de características deseables desde especies silvestres en yuca-----	32
Figura 4. Cortes transversales de raíces de yuca que muestran la escala de evaluación de DFP. -----	33
Figura 5. Cortes transversales de raíces de yuca que muestran la escala de evaluación del nivel cualitativo de escopoletina-----	35
Figura 6. Respuesta de las raíces de la población B1PD280 al DFP en la evaluación a 14 ddc-----	43
Figura 7. Porcentaje promedio de DFP de la familia B1PD280, el parental resistente CW429-1, y los parentales susceptibles MTA18 y SM909-25 en las evaluaciones a 7 y 14 ddc-----	45
Figura 8. Histograma para el porcentaje promedio de DFP x genotipo de la población B1PD280-----	46
Figura 9. Frecuencia de genotipos de la población B1PD280 usando niveles de DFP establecidos en yuca en las evaluaciones a 7 y 14 ddc -----	47

Figura 10. Frecuencia de genotipos de la población B1PD280 evaluados a 7 o 14 ddc según niveles de DFP establecidos -----	48
Figura 11. Comportamiento del porcentaje promedio de DFP a través de las secciones evaluadas (Sec1-Sec7). -----	50
Figura 12. Comportamiento del porcentaje promedio de DFP a través de las secciones evaluadas de la población B1PD280 según niveles de DFP establecidos.-----	51
Figura 13. Relación del porcentaje de DFP en la evaluación a 14 ddc, DIFAGU y MS a 0 ddc. -----	56
Figura 14. Nivel promedio de escopoletina según niveles de DFP establecidos en la evaluación a 14 ddc.-----	57
Figura 15. Frecuencia obtenida en la población B1PD280 para C.GEN, FORM, TIPP y TAM según categorías establecidas para cada característica. -----	60
Figura 16. Frecuencia obtenida en la población B1PD280 para PUD según categorías establecidas y PROD (histograma). -----	62
Figura 17. Segregación alélica obtenida en la primera evaluación usando marcadores microsatélites -----	63
Figura 18. Segregación del alelo proveniente del parental resistente en parte de la población B1PD280 usando el marcador NS1045 -----	64
Figura 19. Distribución del porcentaje de homocigosidad (A) y heterocigosidad (H) de la población B1PD280-----	66

Figura 20. Mapa genético molecular basado en microsatélites en la familia B1PD280, se detalla el tamaño del grupo de ligamiento, las distancias entre marcadores (cM) y los marcadores ligados ----- 68

Figura 21. Posibles QTLs asociados con la respuesta al DFP y MS en la población B1PD280-----70

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Condiciones de amplificación de microsatélites por PCR -----	89
Anexo B. Correlación Pearson entre deterioro fisiológico post-cosecha (DFP), escopoletina (ESC), características generales (CARGEN), pudrición (PUD), materia seca (MS0 y MS14) y pérdida de humedad (DIFAGU) -----	90
Anexo C. Detalles de los marcadores microsatélites usados -----	91
Anexo D. Resultados de la prueba Chi_cuadrado-----	93
Anexo E. Detalles del mapa de ligamiento de la población B1PD280 -----	96
Anexo F. Genotipos con alto potencial genético para generar el segundo ciclo de retrocruzamiento-----	99

LISTA DE ABREVIATURAS

Termino	Abreviatura
Características generales	C.GEN
Deterioro fisiológico post-cosecha	DFP
Días después de la cosecha	ddc
Escopoletina	ESC
Forma de la raíz	FORM
Frecuencia de recombinación	<i>r</i>
Loci que controlan características cuantitativas	QTLs
Materia seca	MS
Materia seca 0 ddc	MS0
Materia seca 14 ddc	MS14
Pérdida del contenido de humedad	DIFAGU
Primer ciclo de retrocruzamiento	F ₁ RC ₁
Promedio de raíces por planta	PROD
Pudrición	PUD
Retrocruzamiento avanzado –QTLs	AB-QTLs
Selección asistida por marcadores	MAS
Tamaño de la raíz	TAM
Tipo de planta	TIPP

RESUMEN

El rápido Deterioro Fisiológico Post-cosecha (DFP) limita el potencial del cultivo de la yuca, disminuyendo su palatabilidad y valor comercial dentro de 24-72 horas después de la cosecha. Una fuente de genes que disminuyen el DFP fue identificada en un híbrido interespecífico (CW429-1) entre *Manihot esculenta* y *Manihot walkerae*. Se aplicó la estrategia de análisis de QTLs en retrocruzamientos “AB-QTL” con el fin de identificar QTLs asociados a la resistencia al DFP. Una población de medios hermanos (BIPD280) proveniente del parental resistente CW429-1 y 8 genotipos elite usados como padres recurrentes susceptibles fue desarrollada y evaluada. La cuantificación del DFP fue realizada usando el método propuesto por Wheatley *et al.* (1985), con algunas modificaciones. Cinco raíces por genotipo fueron evaluadas a los 7 y 14 días después de la cosecha (ddc), siguiendo una escala (0–100%), otras características relevantes fueron también evaluadas. Cuatrocientos treinta y cuatro marcadores microsatelites fueron evaluados. Los resultados mostraron una reducción significativa de DFP (entre 10-46% de reducción con respecto a los parentales recurrentes). Alrededor de un 51% de genotipos fueron establecidos con un alto y medio nivel de resistencia (0-35% de DFP) de los cuales 22 y 20% de genotipos corresponden a individuos sin síntomas de DFP después de 7 y 14 ddc, respectivamente. Una posible correlación fue establecida entre DFP (14 ddc) y escopoletina (0.523, $p < 0.001$), y con materia seca (0.288, $p < 0.001$). Los marcadores polimórficos (82 SSR) fueron usados para construir el mapa de ligamiento y de QTLs. Diecisiete grupos de ligamiento fueron obtenidos usando un LOD de 4.0 y una fracción de recombinación de 0.3. 3 regiones QTLs fueron establecidas en los grupos de ligamiento O y C, las cuales explicaron entre el 3.87-7.66% de la variación fenotípica. Cinco QTLs desde el parental donante con efectos negativos sobre materia seca fueron identificados. Estos resultados preliminares mostraron que el esquema de introgresión de la resistencia al DFP fue exitoso y los QTLs asociados a la característica contribuirán a mejorar la eficiencia en los procesos de mejoramiento de yuca mediante el esquema de AB-QTL y selección asistida por marcadores (MAS).

Palabras clave: introgresión, *Manihot walkerae*, deterioro fisiológico post-cosecha DFP, Mapeo genético, QTLs.

ABSTRACT

The rapid Physiological Postharvest Deterioration (PPD) process limits the potential of cassava crop, diminishing its palatability and commercial value within 24-72 hours after harvest. A source of genes for drastic delay of PPD was identified in an inter-specific hybrid (CW429-1) between *Manihot esculenta* (cultivated cassava) and *Manihot walkerae*. We applied an advanced backcross breeding strategy to identify quantitative trait loci (QTLs) for resistance to PPD from the donor parent CW429-1. A half-sib (BIPD280) population from resistant parental CW429-1 and 8 elite CIAT genotypes, used as susceptible recurrent parents, was developed and evaluated. The method proposed by Wheatley *et al.* (1985), with some modifications was used to quantify PPD. Five roots per genotype were evaluated 7 and 14 days after harvest (DAH), following a scale (0 - 100%). Other relevant traits were evaluated. Four hundred and thirty four microsatellites markers covering the whole cassava genome were evaluated. Results showed significant reduction of PPD (between 10–46% of PPD in relation to the recurrent parents). About 51% of genotypes were found to have high to medium level of resistance (0-35% PPD) of which 22 and 20% genotypes correspond to individuals without PPD after 7 and 14 DAH, respectively. A positive correlation was found between PPD (14 DAH) and scopoletin (0.523, $p < 0.001$), and with dry matter (0.288, $p < 0.001$). The polymorphic markers (82 SSR) were evaluated in the entire population for genetic and QTLs mapping. Seventeen linkage groups were obtained using a LOD score of 4 and a recombination fraction of 0.3 and three QTLs regions were found in the O and C linkage group that explain 3.87-7.66% of the phenotypic variance. Five QTLs with negative effects over dry matter were identified from donor parent. These preliminary results indicated that the scheme for introgressing PPD resistance was successful and QTLs found with significant effects associated with this trait have been identified as good targets for future work in cassava improving by AB-QTL scheme and Marker Assisted Selection (MAS).

Key words: Introgression, *M. walkerae*, physiological postharvest deterioration PPD, genetic mapping, Quantitative Trait Loci QTLs, advanced backcross QTL AB-QTL.

INTRODUCCIÓN

La yuca *Manihot esculenta* Crantz es un cultivo importante en las regiones tropicales y subtropicales. En estas regiones la yuca es la tercera fuente de calorías para humanos y animales después del arroz y el maíz, y es el sexto cultivo a nivel mundial de acuerdo a la producción global; principalmente por su extraordinaria capacidad para almacenar carbohidratos, y su tolerancia o adaptación a sequía y a suelos infértiles y ácidos (Best y Henry, 1992; Cock, 1985; Mann, 1997; Ingram y Humphries, 1972; Taylor *et al.*, 2002).

Uno de los mayores problemas que limita las posibilidades de producción, transporte y almacenamiento de la yuca es el rápido deterioro después de su cosecha, lo cual resulta en una corta capacidad de almacenamiento de las raíces. El deterioro post-cosecha es un problema inherente desde las heridas y daño mecánico de las raíces que no pueden ser prevenidos durante la cosecha (Huang *et al.*, 2001).

El deterioro fisiológico se muestra como coloración de los tejidos vasculares y del parénquima de almacenamiento, acompañado por cambios típicos de respuesta de la planta a heridas. Los mecanismos por los cuales las plantas responden a heridas y ataques de patógenos incluyen varias respuestas bioquímicas, las cuales incrementan la síntesis de ciertas proteínas, cambios en la membrana lipídica y la producción de etileno (Beeching *et al.*, 1994, 1998; Rickard, 1985).

Las raíces de yuca son altamente perecederas comparadas a las de otros cultivos templados o tropicales. Esto puede estar asociado al hecho que a diferencia de otros órganos de almacenamiento de las plantas, las raíces de yuca no exhiben ninguna inactividad endógena o latencia, no tienen ninguna función en la

propagación y no poseen ningún primordio de yema del cual un nuevo crecimiento pueda ocurrir. Los principales eventos ocurren uno o dos días después de la cosecha, tiempo en el cual se presenta una rápida iniciación del deterioro fisiológico post cosecha (DFP). La solución de este problema es una de las metas más importantes para la investigación y mejoramiento en yuca (Coursey y Booth, 1977; Passam y Noon, 1977; Ceballos *et al.*, 2004).

La variabilidad genética para esta característica es limitada en *M. esculenta*; sin embargo, Rogers y Appan (1973) reportaron una especie silvestre, *M. Walkerae*, cuyas raíces presentan yemas adventicias, las cuales pueden ser usadas para propagación. La disminución dramática del deterioro fisiológico postcosecha fue establecido en esta especie silvestre, sugiriendo el desarrollo de cruzamientos interéspecíficos como mecanismo de introgresión de alelos útiles (Fregene y Mba, 2004; Ceballos *et al.*, 2004).

Las metas del mejoramiento genético son considerablemente limitadas por las características biológicas del cultivo, lo cual incluye un largo periodo de crecimiento, una carga genética alta y una escasa producción de semilla sexual. Estos factores afectan severamente la rapidez y facilidad para detectar y usar genes de interés en yuca comercial. La biotecnología podría contribuir a superar estas limitantes biológicas aportando grandes beneficios para los agricultores (Fregene *et al.*, 2001).

La tecnología de marcadores moleculares es un sistema de herramientas que pueden realzar la eficacia de análisis genéticos y la selección de genes de interés en diferentes genotipos. Los marcadores moleculares son fenotípicamente neutrales y pueden ser usados para mapear caracteres dominantes o recesivos controlados por la segregación de un solo locus (rasgos cualitativos) y los caracteres que son controlados por múltiples loci, también llamados caracteres cuantitativos heredados (Nelson, 1996; Yencho *et al.*, 2000).

Mediante el uso de marcadores moleculares, el proceso de mejoramiento no solamente es realizado basándose en el fenotipo de la planta, sino también en el genotipo utilizando diferencias en el ADN que están altamente correlacionadas a las diferencias fenotípicas, este proceso incrementa altamente la eficiencia de selección (Yencho *et al*, 2000).

Las evaluaciones fenotípicas en conjunto con las técnicas moleculares podrían contribuir a la comprensión y conocimiento de los genes más importantes implicados en el proceso de DFP, y de esta forma incrementar la eficiencia en la obtención de variedades resistentes dentro de un programa de mejoramiento mediante el uso de selección asistida por marcadores (MAS) o transformación genética.

La introgresión genética de características de interés desde especies silvestres en conjunto con la selección asistida por marcadores asociados, podría ser una herramienta eficiente para el desarrollo de materiales comerciales resistentes a deterioro fisiológico. Por cuanto a pesar de que las especies silvestres son una importante fuente de genes de interés, el proceso de introgresión también requiere la reducción o eliminación del genoma indeseable del donador y el rompimiento de los eventos de ligamiento presentes, situación que podría ser parcialmente resuelta mediante el uso de marcadores moleculares, que por otra parte contribuirían a la reducción de generaciones requeridas en el esquema de retrocruzamiento, como se sugiere en el método de análisis de QTLs en retrocruzamiento avanzado “AB-QTL: *advanced backcross -QTL*” (Tanskley y Nelson, 1996; Blair *et al.*, 2007).

En yuca, un esquema modificado de la estrategia AB-QTLs esta siendo usado en la introgresión de características de interés desde genotipos silvestres relacionados. En este sentido, una accesión de *M. Walkerae* (MWal 001) fue usada para realizar cruzamientos extensivos con variedades elites de yuca. Después de este proceso, solamente un híbrido (CW429-1) fue obtenido, cuyas

raíces permanecieron intactas después de un mes de su cosecha, a partir de este genotipo se obtuvieron familias mediante polinización abierta. El objetivo de este estudio fue la evaluación de la introgresión de la resistencia al deterioro fisiológico post-cosecha (DFP) desde *M. Walkerae* en una población de hermanos medios en yuca.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la introgresión de la resistencia al deterioro fisiológico post-cosecha desde *M. Walkerae* Croizat en una población de hermanos medios en yuca *Manihot esculenta* Crantz.

1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar la variabilidad fenotípica de una población de yuca con respecto a la resistencia al deterioro fisiológico post-cosecha (DFP).

Identificar marcadores moleculares de tipo microsatélites asociados a la resistencia al DFP en yuca, usando la metodología de mapeo genético de loci que controlan características cuantitativas (QTLs).

Identificar regiones QTLs asociadas con efectos positivos (resistencia al DFP) y/o efectos negativos (disminución materia seca) en la población de hermanos medios en yuca.

Identificar genotipos potenciales con resistencia al DFP a partir de marcadores asociados a QTLs (selección positiva) y al mismo tiempo seleccionar en contra de alelos indeseables de *M. walkerae* (selección negativa), para avanzar en el proceso de Selección Asistida por Marcadores (MAS).

2. MARCO TEORICO

2.1. EL CULTIVO DE LA YUCA

2.1.1. Taxonomía. Estudios sobre las jerarquías sistemáticas indican que la yuca pertenece a la clase dicotiledónea, caracterizada por la producción de semilla con dos cotiledones, y a la subclase Archichlamydeae, que se diferencia por el perianto poco evolucionado; al orden Euphorbiales, familia Euphorbiaceae, tribu Manihoteae, género *Manihot* y especie *Manihot esculenta* Crantz. Las Euphorbiaceas se caracterizan por el notable desarrollo de los vasos laticíferos, compuestos por células secretoras que reciben el nombre de galactocitos. La yuca es una planta monoica, de ramificación simpodial y porte arbustivo (Perry, 1943; Judd et al., 1999).

2.1.2. Origen y dispersión. El género *Manihot* es originario de las Américas, ubicándose entre 30°N y 30°S de latitud. Estudios moleculares basados en genes nucleares de copia única han contribuido en el conocimiento de la filogeografía y origen evolutivo de la yuca, sugiriendo que: I) la yuca fue domesticada desde poblaciones de *M. esculenta* silvestres a lo largo de la región sur del Amazonas (oeste central del Brasil y este del Perú); II) el cultivo no parece ser derivado de varias especies progenitoras, como previamente se había propuesto; III) la yuca no comparte haplotipos con *Manihot pruinosa*, una especie estrechamente relacionada y con alto potencial para recombinación. América Central podría ser un centro secundario de diversidad genética, pues en México se han encontrado restos de hojas que datan de cerca de 2.500 años (Allem, 1994; Olsen y Shaal, 1999).

2.1.3. Citogenética. En la familia Euforbiácea, usualmente, el número cromosómico básico es 8, aunque el rango de variación oscila entre 6 a 11. Aproximadamente, 50% de las especies son poliploides (Martin, 1976).

Todas las especies de la tribu *Manihoteae* (incluyendo *M. esculenta*) estudiadas hasta ahora contienen 36 cromosomas y en la mayoría de los casos el apareamiento de los cromosomas en forma bivalente, sugiriendo que esta especie sería diploide. Entre las evidencias que apoyan esta hipótesis se encuentran: I) la presencia de dos diferentes grupos de regiones organizadoras del nucléolo (NOR), II) la repetición de tipos cromosómicos y III) el número cromosómico básico observado en otros géneros dentro de la familia Euphorbiaceae, cuyo rango va de 6 a 11. Para algunos autores, se trata de una especie diploide ($2n=36$ cromosomas), mientras que otros la consideran un poliploide, posiblemente un alopoliploide (ya sea tetra o hexaploide) (Perry, 1943; Magoon *et al.*, 1969; Umannah y Hartman, 1973).

2.1.4. Descripción botánica. La gran cantidad de genotipos de yuca cultivados comercialmente y la diversidad de ambientes ecológicos en los cuales se encuentra sembrada, dificultan una descripción precisa de los caracteres morfológicos, respecto a las cuales se debe tener siempre presente la interacción del genotipo (variedad) y de las condiciones ambientales, sin embargo, descriptores morfológicos han sido identificados para la caracterización de variedades de yuca (Domínguez, 1983).

La yuca cultivada, *Manihot esculenta* Crantz, es un arbusto leñoso perenne de 3 a 5 m de altura. Durante los primeros meses, después de la plantación, las raíces fibrosas comienzan a desarrollarse, ensancharse y a almacenar grandes cantidades de almidón en el parénquima (Ceballos y de la Cruz, 2002).

Los tallos son el medio para la multiplicación asexual y comercial de la especie. El tallo maduro es cilíndrico y su diámetro varía de 2 a 6 cm. Tanto el grosor del tallo como el color varían con la edad de la planta y la variedad (Domínguez, 1983).

Las hojas son simples y están compuestas por la lámina foliar y el pecíolo. La lámina foliar es palmeada y lobulada. Las hojas maduras son glabras y de diferentes colores. El color de las nervaduras y pecíolos son características varietales (Domínguez, 1983; Ceballos y de la Cruz, 2002).

No todas las variedades de yuca florecen, y entre las que lo hacen hay marcadas diferencias en cuanto a tiempo de floración y a la cantidad de flores que producen. La yuca es una planta monoica con polinización cruzada, de ahí que sea una planta altamente heterocigota. La polinización se realiza básicamente por la acción de insectos (Domínguez, 1983).

Después de la polinización y la subsiguiente fertilización, el ovario se desarrolla para formar el fruto, el cual toma entre 2 a 3 meses para completar su maduración. El fruto es una cápsula dehiscente y trilobular de forma ovoide o globular, de 1 a 1.5 cm de diámetro, con 6 aristas longitudinales, estrechas y prominentes. Al hacer un corte transversal se observa el epicarpio, mesocarpio y endocarpio. El endocarpio es de consistencia leñosa, se abre bruscamente cuando el fruto está maduro y seco para liberar y dispersar las semillas. Al madurar la semilla, el epicarpio y el mesocarpio se secan. La dehiscencia del fruto de la yuca es biccida, o sea, es una combinación de dos tipos de dehiscencia: septicida y loculicida (Domínguez, 1983).

La semilla es el medio de reproducción sexual de la planta y por consiguiente es de incalculable valor en el mejoramiento genético del cultivo. La semilla es de forma ovoide-elipsoidal y mide aproximadamente 10 mm de largo, 6 mm de ancho y 4 mm de espesor. La testa es lisa, de color café con moteado gris. En la parte superior se encuentra, la carúncula, estructura que se pierde una vez que la

semilla ha caído al suelo. El extremo opuesto a la carúncula termina en una pequeña cavidad. De la carúncula sale una sutura que termina en la actividad basal (Domínguez, 1983).

2.1.5. Sistema radical. Las raíces de la planta de yuca tienen como característica principal la capacidad de almacenamiento de almidones, razón por la cual es el órgano de la planta que hasta el momento tiene el mayor valor económico (Domínguez, 1983).

El sistema radical de la planta de yuca tiene una baja densidad de raíces pero una penetración profunda, lo cual le brinda a la planta la capacidad para resistir periodos largos de sequía. La planta absorbe agua y los nutrimentos por medio de las raíces fibrosas y aparentemente todas estas raíces tienen esa capacidad, la cual disminuye cuando se vuelven tuberosas. Solamente unas pocas raíces se vuelven tuberosas de manera que la mayoría de raíces fibrosas permanecen y continúan con su función alimentadora. Las raíces tuberosas son anatómica y morfológicamente similares a las fibrosas, pero la diferencia esencial radica en que la polaridad de crecimiento de la raíz cambia de longitudinal a radial cuando se inicia la acumulación de almidones. Sin embargo, esto no implica que la raíz no siga creciendo longitudinalmente (Domínguez, 1983).

Las raíces tuberosas de yuca provienen del engrosamiento secundario de las raíces fibrosas. Esto significa que la penetración al suelo del sistema radical la efectúan las raíces delgadas y solamente después de esa penetración se inicia el engrosamiento. Las partes que se distinguen en el sistema radical de una planta adulta de yuca son las raíces tuberosas, las cuales terminan en unas raíces fibrosas; en la parte proximal nace del cuello o pedúnculo, mediante el cual las raíces se unen al tallo. La raíz tuberosa está compuesta por la cáscara, la pulpa y las fibras centrales (Domínguez, 1983).

2.2. IMPORTANCIA ECONOMICA DEL CULTIVO

Alrededor de diecisiete millones de hectáreas de yuca son cultivadas en todo el mundo, 10.27 millones de hectáreas en África, 2.637 en Sur América y 3.535 en Asia. La producción de yuca en el mundo oscila entre 170 millones de toneladas por año; 50% es producido en África, 30% en Asia y aproximadamente el 20% en Sur América (Rodríguez, 2001).

La yuca es utilizada principalmente para la alimentación humana en África. En gran parte de África tropical, la yuca es la fuente más importante de calorías llegando a ser el alimento base de más de 200 millones de africanos. Cerca de 70% de la yuca es procesada antes del consumo de diferentes maneras para producir varios tipos de harinas, pastas fermentadas, tapioca, chips y almidón. En Latinoamérica la yuca es importante en ciertas áreas para alimentación humana, sin embargo, el uso como fuente para alimentación animal está incrementando. El uso de la yuca varía grandemente a través de Asia; en el sur de la India es importante en la dieta humana como yuca fresca, mientras en el estado de Tamil Nadu es una importante fuente de almidón, en Tailandia la mayoría de la yuca es procesada para producir almidón y píldoras de yuca seca para exportación como alimento animal; recientemente, se han creado fabricas de etanol que operan fermentando raíces de yuca (Cock, 1985; Rodríguez, 2001).

Hay industrias de almidón en pequeña escala en países tropicales, las cuales tienen una real importancia socioeconómica para la economía local. En diversos países, el almidón naturalmente fermentado es obtenido para preparar productos de panificación tradicionales. Ejemplo de esta actividad tradicional son, kupruk en Indonesia, Sago en India, pan de bono y pan de yuca en Colombia, biscoicho y pao de queijo en Brasil y chipa en Paraguay (Best *et al.*, 1992; Wenham, 1995).

El almidón de yuca puede ser usado de diferentes formas, directamente o como materia prima. Hay principalmente tres formas de uso: 1) almidón no modificado o

nativo; 2) almidones modificados física, química y biológicamente para aplicaciones industriales (alimento para personas hospitalizadas y bebés, productos no alergénicos y farmacéuticos, papel y textiles, adhesivos, alcoholes y acetonas); 3) endulzantes (fructosa, dextrina, glutamato monosódico, etc.) (FAO y IFAD, 2001; Grace, 1977).

La importancia de la yuca en el mundo es principalmente un reflejo de las ventajas agronómicas del cultivo. La contribución del cultivo sobre la subsistencia de poblaciones pobres está incrementando; no obstante, existe la necesidad de considerar el estudio de su manejo post-cosecha, procesamiento y mercadeo (Westby, 2002).

Hay tres mayores limitaciones para el incremento de la utilización de raíces de yuca: su corto periodo de vida, bajo contenido de proteína y su natural contenido de cianógenos. El deterioro fisiológico sugiere que la rapidez entre la cosecha y posterior procesamiento es más importante que en otro cultivo con raíces de almacenamiento. En adición a la obtención de productos almacenables, el procesamiento puede también adicionar valor al cultivo y proveer mejores oportunidades (Westby, 2002).

2.3. DETERIORO POST COSECHA EN YUCA

2.3.1. Generalidades. En general el deterioro post-cosecha está dividido en deterioro primario y deterioro secundario. Resultados preliminares indicaron que el deterioro primario es un complejo de procesos fisiológicos y ambientales, los cuales inician entre 24 a 48 horas después de realizada la cosecha dependiendo del genotipo de yuca (Plumbey y Rickard, 1991; Wenham, 1995). El deterioro secundario es el resultado del proceso anterior mas el deterioro debido a la presencia de microorganismos como bacterias y hongos (Huang et al., 2001).

2.3.2. Deterioro fisiológico o primario. El deterioro fisiológico post cosecha DFP o deterioro primario, es abiótico y en muchos aspectos semejantes a la respuesta a lesiones de tejidos observada en otros sistemas de plantas mejor estudiados. Los cambios en la coloración vascular asociados con cambios fisiológicos y bioquímicos del DFP causan cambios en la calidad comercial de las raíces de yuca. Aunque el deterioro microbiano y la pudrición aparecen después, no se ha demostrado que los cambios observados durante el DFP sean resultado de un ataque microbiano (Beeching et al., 1995).

Al desprender la raíz de la planta se produce un daño físico que desencadena reacciones de defensa, produciendo cambios visibles durante el deterioro fisiológico post-cosecha debido a la acumulación de numerosas proteínas y compuestos (Plumbley y Rickard, 1991).

Reportado por primera vez en 1928 en Argentina, y descrito por una coloración azul oscura de los vasos vasculares, el deterioro fisiológico post cosecha se inicia por lesiones en la superficie de la raíz y avanza cubriéndola por completo. El DFP se distingue por el color oscuro de las venas, resquebrajamiento radial y oclusiones en el xilema, causado por la acción de enzimas endógenas, como han reportado varios autores (Plumbley y Rickard, 1991; Beeching *et al.*, 1994).

Observaciones realizadas confirman que el deterioro fisiológico no está relacionado con la invasión de patógenos, pero las lesiones en los tejidos pueden hacer posible el fácil acceso de una amplia variedad de microorganismos involucrados en deterioro secundario (Beeching *et al.*, 1994, Clowes *et al.*, 1995, Beeching *et al.*, 1998).

Normalmente la respuesta de defensa es inhibida con la reparación de la lesión. Sin embargo, estos procesos de reparación no ocurren en las raíces de la yuca almacenadas después de la cosecha. Aunque todos los elementos metabólicos para una respuesta normal a lesiones están presentes en las raíces de yuca

cosechadas no hay una adecuada regeneración de los tejidos lesionados. La hipótesis principal es que una incontenible cascada de respuestas a la lesión resulta finalmente en el deterioro. La no cicatrización de los tejidos lesionados podría desencadenar una continua producción de señales, las cuales inician continuamente la cascada de reacción de defensa por todas las partes de la raíz (Beeching *et al.*, 1999).

Durante la cosecha, las raíces se parten para separarlas del tallo, a menudo las puntas son dañadas y las raíces sufren múltiples lesiones. Durante la manipulación y el transporte las lesiones de las raíces pueden aumentar. Es a partir de las áreas lesionadas de la raíz que se inicia el deterioro fisiológico. El DFP es inicialmente observado como una coloración negro-azul de los tejidos vasculares al interior de la raíz, el cual es conocido como “*vascular streaking*”. Previo al aumento de color azul se observa una fluorescencia intensa cuando el tejido vascular de las raíces es expuesto a la luz ultravioleta, como se observa en la Figura 1 (Wheatley, 1982, Wenham, 1995).

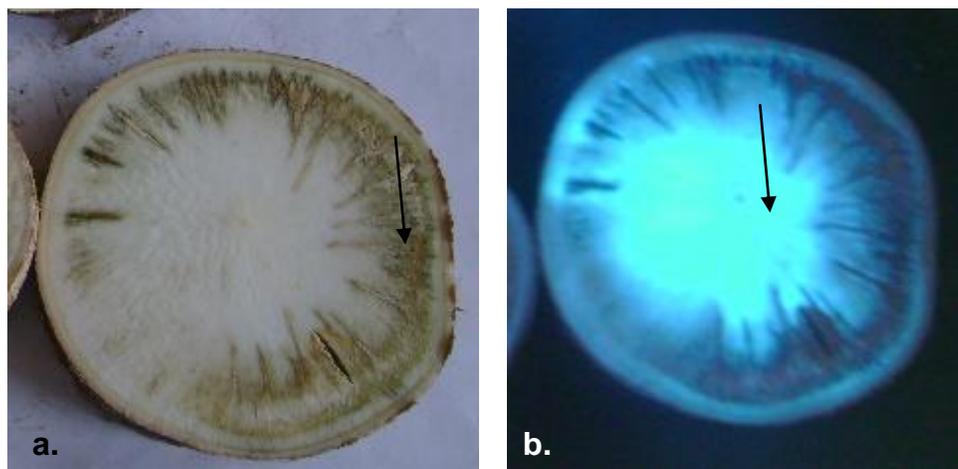


Figura 1. Síntomas de deterioro fisiológico primario (DFP) en yuca. a) corte transversal de raíz observado bajo condiciones normales de evaluación muestra resquebrajamiento radial con coloración oscura. b) corte transversal de raíz observado bajo exposición a luz ultravioleta muestra alto nivel de fluorescencia.

El DFP en yuca es un proceso activo que involucra cambios en la expresión de genes y aspectos comunes con la respuesta a lesiones. Los mecanismos de respuesta fisiológica a lesiones incluyen: incremento en la actividad de enzimas como la fenilalanina amonioliasa (PAL), una proteína asociada con la síntesis del fenol, incremento en la actividad de peroxidasas, catalasas y fenoloxidasas (Rickard *et al.*, 1985, Beeching *et al.*, 1999). Durante el desarrollo del DFP, compuestos de bajo peso molecular inician o aumenta su producción, compuestos fenólicos y polifenólicos incrementan su síntesis después de la cosecha; también se observan cambios en la composición de las membranas lipídicas y producción del etileno (Hirose *et al.*, 1984).

Varias líneas de evidencia sugieren que la respuesta a DFP en raíces de yuca es un proceso oxidativo mediado enzimáticamente, por lo tanto, el oxígeno molecular es requerido; tratamientos para reducir el acceso al oxígeno y/o inhibir la actividad enzimática pueden afectar esta respuesta. Adicionalmente, la disminución en los antioxidantes no enzimáticos, β -caroteno y ascorbato, ha sido reportada durante DFP, y un contenido alto de carotenos está asociado con la reducción de la susceptibilidad al DFP. De igual manera, se ha encontrado que la poda antes de cosecha afecta la respuesta al DFP, en la medida en que afecta inversamente la proporción en el contenido de almidón y azúcares, y causando a su vez una reducción en la susceptibilidad al DFP, disminución de materia seca y aumento en el contenido de azúcares (Averre, 1967; Noon y Booth, 1977; Beeching *et al.*, 1998; Oirschot *et al.*, 2000; Chavez *et al.*, 2005).

El efecto inmediato de una lesión en los tejidos de una planta es la ruptura de la barrera de protección física, produciendo en los tejidos cercanos deshidratación, disminución de los niveles de CO₂, aumento en los niveles de oxígeno e incremento en la exposición a microorganismos patógenos. Estas presiones de selección han dado lugar a un mecanismo impresionante de defensa en las plantas, con una estructura genética compleja (Beeching *et al.*, 1994; Wenhan, 1995).

- Producción de Especies Reactivas de Oxígeno. Se ha reportado la presencia de especies reactivas de oxígeno, tanto superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) que son inducidas por las heridas generadas durante la cosecha y el posterior desencadenamiento del estrés oxidativo en raíces de yuca almacenadas. La producción de superóxido fue detectada dentro de los 15 minutos después de la herida, bajando sus niveles 8-10 horas más tarde. El peróxido de hidrogeno fue detectado 3 horas después de causar las lesiones en las raíces. En estudios histoquímicos se ha encontrado que la formación de superóxido se presenta en el parénquima, las células del cambium presentaron coloración mas intensa; por su parte el peróxido estuvo inicialmente localizado en el parénquima cortical y en el parénquima de almacenamiento fundamentalmente el cambium, donde estaba especialmente asociado con los vasos xilemáticos (Reilly et al., 2003)

- Producción de metabolitos secundarios. Los análisis bioquímicos y químicos muestran que la producción de peróxido de hidrogeno y la hidroxycumarina, escopoletina y su glucósido escopolina están estrechamente relacionados al proceso de deterioro fisiológico, más que otros compuestos; sin embargo, también se ha observado el incremento de la actividad de ciertas enzimas, como peroxidasas. La síntesis de catequinas y sus posibles metabolitos condensados en taninos, ocurre después de 5 a 6 días y por esta razón puede ser el resultado de una reacción de defensa durante la pudrición por deterioro secundario o microbial pero no para DFP (Buschmann et al., 2000b).

La acumulación de escopoletina y peróxido se presenta en los mismos compartimentos, y se postula la existencia de una peroxidasa escopoletina específica en el apoplasto que produce el precipitado azul oscuro en los haces vasculares durante el DFP. Las diferencias en la respuesta al DFP entre los cultivares no son debidas al tiempo de acumulación sino a las cantidades de escopoletina sintetizadas (Buschmann *et al.*, 2000a,b).

La escopoletina es encontrada en muy bajas concentraciones en las raíces frescas, pero aumenta considerablemente 24 horas después de la cosecha (de <1,0 a > 250 µg/g de materia seca). Este drástico incremento permite visualizar la escopoletina en los mismos tejidos bajo luz ultravioleta debido a su fluorescencia. La aplicación de escopoletina en tejidos frescos induce rápidamente los síntomas de DFP. Las raíces resistentes al DFP acumulan menos escopoletina que las raíces susceptibles (Rickard, 1982; Wheatley, 1982).

- Genes expresados y actividad enzimática detectada durante el proceso de deterioro fisiológico post-cosecha. Los genes inducidos como parte de la respuesta general de defensa pueden ser divididos en varios grupos de acuerdo a su función. En un primer grupo los genes que codifican enzimas de la ruta metabólica del fenilpropanoide, tales como fenilalanina amonio liasa (PAL), chalcona sintasa (CHS) y chalcona isomerasa (CHI), los cuales son marcadores clásicos en la respuesta de defensa de las plantas. Muchos productos finales de la ruta metabólica del fenilpropanoide, tienen efecto antimicrobiano directo, tal como las fitoalexinas, mientras otros productos como la lignina, son útiles para fortalecer la pared celular. En un segundo grupo están los genes que determinan la síntesis de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs Hydroxyproline Rich Glycoproteins) y peroxidasas. El producto de estos genes de defensa también puede contribuir a la formación de una barrera estructural contra la invasión de patógenos. Un tercer grupo es formado por los genes de chitinasas, pectinasas y β-1,3-glucanasa. Estas enzimas pueden promover la degradación de la pared celular de hongos, o liberar señales endógenas que estimulan la reacción de defensa (Clowes et al., 1995).

Estudios iniciales sobre los genes inducidos por el ataque de patógenos, han demostrado que la expresión de genes relacionados con la defensa de la planta, que codifican para enzimas como fenilalanina amonoliase, chalcone sintasa, chalcone, isomerasa, quitinasas y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina también

son inducidos por la ruptura de la barrera de protección física, cuando se presentan lesiones en los tejidos (Rickard, 1985). Además, la respuesta de la planta a lesiones incluye la inducción de otros genes relacionados con la defensa, como peroxidasas, lipoxigenasas y proteínas de la pared celular. Aparentemente varias de las enzimas inducidas en lesiones participan en la síntesis de lignina y en otras reacciones que contribuyen a la reparación de la pared celular dañada. Adicionalmente a la función de reparación, algunas de las proteínas producidas participan en la producción de fitoalexinas, isoflavonoides, y compuestos fenólicos que contribuyen a la defensa contra organismos patógenos y larvas de insectos (Ross *et al.*, 1995).

De esta forma las plantas reaccionan a las diferentes fuentes de estrés, cambiando los patrones de expresión de su genoma. Diferentes factores como: infección por virus, irradiación ultravioleta, ataque de herbívoros o lesiones en los tejidos, disparan la expresión de genes inactivos y estimula el aumento en la tasa de transcripción de otros (Baladin *et al.*, 1995).

Muchas de las secuencias sobrerreguladas y expresadas específicamente en el proceso de DFP juegan un rol importante en el proceso celular incluyendo la interconversión de especies reactivas de oxígeno, reparación de la pared celular, muerte celular programada, transporte de metabolitos, iones y agua, percepción y traducción de señales, respuesta a estrés, metabolismo y biosíntesis, y activación de síntesis de proteínas (Reilly *et al.*, 2007).

2.3.3. Deterioro microbiano o secundario. El deterioro secundario es regularmente debido a la invasión y proliferación de hongos y bacterias dentro de la raíz, este tipo de deterioro es menos importante que el primario o fisiológico, debido a que depende de condiciones externas a la planta, las cuales pueden ser controladas. En la Figura 2 se observan raíces con síntomas típicos del deterioro secundario (Plumbley y Rickard, 1991; Cortes, 1999).



Figura 2. Síntomas típicos de deterioro secundario en yuca. La pudrición causada por microorganismos es la característica distintiva de este tipo de deterioro.

Diferentes especies de hongos y bacterias han sido aisladas de raíces de yuca almacenadas en diferentes condiciones. Dos tipos de pudrición debida a microorganismos ha sido descrita por Majunder (1955), una pudrición seca que ocurre en condiciones aeróbicas, causadas por una especie aun no identificada de *Rhizopus* sp. y una pudrición blanda que ocurre en condiciones anaerobias causadas por una especie de *Bacillus* sp. Ocasionalmente, la pudrición de las raíces puede estar acompañada de un cambio en la coloración de los haces vasculares, pero se ha establecido que es típico del deterioro primario (Plumbley y Rickard, 1991).

La investigación detallada realizada por Ekundayo y Daniel (1973), sugiere que la pudrición blanda de las raíces es el resultado de un conjunto de hongos: *Lasiodiplodia theobromae* (Pat) Grift. Et Maubl. (*Botrydiplochia theobromae* Pat.), *Aspergillus niger* Van Tieghem, *Aspergillus flavus* Link, *Cylindrocarpon candidum* (Link) Wollenw, y *Thricoderma harzianum* Rifia, aunque Noon y Booth (1977), indican que *Diplodia Manihoti* es el más serio marcador de esta enfermedad.

2.4. MARCADORES MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO GENETICO

Desde la pasada década, mapas moleculares están disponibles para muchos cultivos; tales como: maíz, tomate, papa, arroz y trigo; los cuales han facilitado la selección basada en marcadores moleculares para características de interés. Los marcadores moleculares se basan en diferencias de la secuencia de nucleótidos en el ADN de los cromosomas de diferentes individuos. Estas diferencias son referidas como polimorfismos de ADN, y son el resultado de inserciones, deleciones, duplicados y substituciones de nucleótidos (Brar y Khush, 1993; Liu, 1997).

La tecnología basada en marcadores moleculares tiene gran potencial para incrementar la precisión y la eficiencia en los procesos de mejoramiento genético de plantas, adicionalmente para facilitar la transferencia de variabilidad útil desde especies silvestres a clones elites, así como también en selección asistida por marcadores para características que se expresan más tarde en la fase del ciclo de crecimiento del cultivo y/o características difíciles de ser evaluadas debido a sus altos costos (recuperar los mejores genotipos en poblaciones segregantes, identificar fuentes de genes de resistencia a plagas y enfermedades); es así como, una ganancia substancial en el mejoramiento para características cuantitativas se ha visto cuando la genética molecular se integra con el mejoramiento convencional (Lawson *et al.*, 1997; Fregene *et al.*, 2001).

La biotecnología de marcadores moleculares, con su habilidad para explotar la información a nivel génico, basada en el mapeo de genomas y, mejoramiento y análisis genéticos asistidos por marcadores, ofrece una opción práctica en el progreso para la solución de problemas en el mejoramiento de los cultivos. Los mapas genéticos y análisis de marcadores para características complejas pueden ser empleados para entender la base genética del rendimiento potencial, y la identificación de factores involucrados. Éstos, pueden también ser usados para

elucidar el control genético de la calidad de raíz, incluyendo el contenido de almidón y calidad, y deterioro fisiológico, y localizar genes de resistencia a enfermedades y plagas, uso eficiente de nutrientes y floración. La información obtenida puede ser usada en la selección de parentales con alto valor como progenitores, puede ser considerada como una guía para las decisiones en el mejoramiento de múltiples características y en la combinación de genes complementarios, aprovechando adicionalmente la alta diversidad en yuca y sus silvestres relacionados (Fregene *et al.*, 2001).

Los marcadores moleculares proveen estimaciones confiables de la diversidad genética, pueden mejorar la eficiencia de selección para muchas características a través de su ligamiento con alelos con efectos menores (características cuantitativas) y mayores (características cualitativas), y así contribuir al mayor entendimiento de la genética de las características a nivel de ADN; al mismo tiempo que se contribuye a incrementar la eficiencia del proceso de mejoramiento, y reduce los costos para la producción de nuevas variedades (Lamkey y Lee, 1993; Fregene *et al.*, 2001).

Los marcadores asociados con características de interés agronómico también proveen una imagen del valor como progenitor de los genotipos, mediante la eliminación de la influencia sobre el fenotipo de otros loci deletéreos y el ambiente. Los marcadores pueden ser usados para mapear genes de resistencia, para realizar selección negativa asistida por marcadores de la resistencia a enfermedades en ausencia del patógeno (eliminación de genotipos susceptibles) y adicionalmente son la base en el proceso de clonación de genes de resistencia (Fregene *et al.*, 2001).

2.4.1. Mapas de ligamiento y detección de QTLs

- Mapas de ligamiento. El análisis de ligamiento es uno de los métodos básicos e indispensables en los estudios de genética, la distancia entre genes sobre el genoma es asignada con base a la frecuencia de recombinación de los genes, estimada desde los individuos que conforman la población segregante. Por lo tanto, la probabilidad de recombinación entre dos loci es mayor, cuanto más separados se encuentren y, por lo tanto, mayor es la probabilidad de segregación independiente o sin ligamiento, siendo ésta la premisa básica en la construcción de mapas genéticos o de ligamiento. El ligamiento en términos prácticos, puede definir la distancia genética entre características polimórficas las cuales pueden ser reconocidas como diferencias en la actividad enzimática, longitud en los fragmentos de restricción o en la secuencia de nucleótidos en locus alélicos. Los polimorfismos en la secuencia de nucleótidos son detectados mediante el uso de técnicas moleculares, y su aplicación en una población segregante permite la construcción de mapas genéticos (Yin et al., 2003, Mohan et al., 1997).

La construcción del mapa genético requiere: a) la selección de la población de mapeo más apropiada; b) el cálculo de la frecuencia de recombinación más adecuado para esa población; c) establecimiento de los grupos de ligamiento y estimación de las distancias del mapa; y d) determinación del mejor orden del mapa (Staub *et al.*, 1996).

Los análisis realizados para la construcción de mapas de ligamiento usan los datos obtenidos desde una población segregante para estimar las frecuencias de recombinación que posteriormente son usadas para determinar el arreglo lineal de los marcadores genéticos, minimizando los eventos de recombinación. El porcentaje de recombinación esta dado por los eventos de entrecruzamiento que se puedan presentar después del proceso meiótico cuando se forman quiasmas entre dos loci; los eventos de cruzamiento sencillo no son independientes por cuanto siempre existe interferencia asociada al organismo en cuestión, la

localización del cruzamiento, factores ambientales y otros numerosos factores que son considerados por la función de mapeo desarrollada por Kosambi (1944).

La frecuencia de recombinación es usada como un índice de la distancia entre dos loci sobre un cromosoma, la aditividad de las distancias esta basada en la proporcionalidad entre el numero promedio de cruzamientos por cromátida entre dos loci y la distancia entre ellos, por lo tanto valores altos de distancia entre loci en una misma cromátida sugieren la independencia de éstos (Staub *et al.*, 1996).

La construcción de mapas de ligamiento molecular requiere el uso de procedimientos estadísticos diseñados para elegir valores de variables que maximizan una función definida y permiten incluir clases ambiguas (dobles heterocigotos -AaBb- en una población F_2 contienen tipos recombinantes y no recombinantes), por esa razón se estima la máxima verosimilitud (maximum likelihood), procedimiento que permite obtener la máxima posibilidad de que los marcadores estén ligados, se basa en el orden de los marcadores que producen la distancia mas corta y a su vez que tengan la probabilidad más baja de que se realicen múltiples recombinaciones, y cuya expresión es maximizada mediante el uso de la frecuencia de recombinación (r), valor que se encuentra limitado entre 0-0.5 (Staub *et al.*, 1996, Young, 1994).

El valor de LOD (Logarithm of Odd Distance) explica el logaritmo (10) de la razón entre dos hipótesis, un valor de $LOD > 4,0$ es equivalente a decir que la hipótesis alternativa (ligamiento) es 10.000 veces mas probable que la hipótesis nula (no ligamiento). El LOD disminuye cuando el valor r incrementa e incrementa con el incremento en el tamaño de muestra (Staub *et al.*, 1996, Young, 1994).

- Detección de QTLs. En contraste a las características monogénicas, tales como la resistencia a enfermedades e insectos, muchas características agronómicas importantes incluyendo rendimiento, características relacionadas con

la calidad y otras, muestran expresión fenotípica continua. La mayoría de estas características son controladas por varios genes, el número de genes y sus efectos de interacción controlando la expresión de características cuantitativas son escasamente comprendidos. El mapeo de características cuantitativas, por lo tanto, es difícil por cuanto el genotipo no puede ser inferido a partir del fenotipo, y éste es altamente afectado por el ambiente (Yin et al., 2003; Mohan et al., 1997).

Los genes que afectan las características cuantitativas son frecuentemente llamados "QTLs: Quantitative Trait Loci", loci que controlan características cuantitativas. Muchos genes importantes en el mejoramiento son QTLs, y por lo tanto el mapeo de QTLs es una de las más importantes actividades en la integración de la investigación en la genómica y el mejoramiento de plantas. La base de la detección de QTLs es el análisis estadístico de asociaciones entre marcadores y valores cuantitativos de las características, y las técnicas estadísticas usadas presentan diferentes niveles de sofisticación y todas han sido desarrolladas para detectar QTLs múltiples ligados. Sin embargo, un QTL detectado mediante cualquier técnica no es un gen verdadero, solamente representa la región del genoma que contiene la mayoría de genes relacionados con la característica bajo estudio (Liu, 1997; Mohan *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 2003).

Las primeras investigaciones fueron realizadas por Osborn *et al.* (1987), Tanksley y Hewitt (1988) y Paterson *et al.* (1991) en tomate, quienes establecieron la utilidad de los marcadores de tipo RFLPs en el mejoramiento de características cuantitativas.

El mapeo de QTL permite obtener información sobre el número, posición cromosómica, magnitud del efecto e interacciones de los loci que controlan la expresión de dichos caracteres. El procedimiento incluye la construcción de mapas genéticos y la búsqueda de asociación entre características cuantitativas y marcadores polimórficos. Una asociación significativa entre caracteres y los marcadores, puede ser evidencia de la presencia de un QTL en una región

cercana a la localización de los marcadores. Cuando un QTL es detectado, el valor de r^2 indica la proporción de la varianza explicada por ese QTL, el valor de LOD tiene relación con el cociente de verosimilitud (LR) calculado en el mapeo de QTLs y equivale a dos veces el logaritmo en base 10 de la máxima posibilidad de validar una hipótesis nula de que no hay un QTL ligado a un marcador contra la hipótesis alterna de que existe un QTL ligado a un marcador en una región particular del genoma (Staub *et al.*, 1996; Ortiz, 2002). Esta definida mediante esta fórmula matemática:

$$LR = -2 \ln L_0 / L_1 = -2 \ln 10^{-LOD}$$

Los análisis permiten determinar diferentes efectos de los loci como aditividad y dominancia, el efecto de aditividad se expresa en el efecto al cambiar el loci de un parental por el otro parental, el signo + indica el aumento numérico de la característica que es aportado por el alelo del parental 1, y el signo – expresa la disminución numérica del parental 2. Dependiendo de la característica se selecciona la mejor línea. El efecto de dominancia ocurre cuando para un loci el valor promedio de los heterocigotos de la población es menor que el de alguno de los parentales (Ortiz, 2002).

Las metodologías más comunes para el mapeo de QTL son: análisis simple, análisis de intervalo y análisis de intervalo compuesto; el análisis simple utiliza un solo marcador a la vez y no requiere un mapa molecular completo, la distribución de los valores del carácter es examinada separadamente para cada marcador. El análisis de intervalo usa los datos de los mapas moleculares, por lo tanto en lugar de analizar la población con un marcador a la vez, el análisis se realiza usando un par de marcadores adyacentes simultáneamente, este análisis se basa en la estimación de la máxima verosimilitud y permite una mejor apreciación de la posición y el efecto de los QTLs. El análisis de intervalo compuesto considera el intervalo entre dos marcadores y además unos pocos marcadores bien seleccionados en cada análisis para controlar la varianza causada por otros QTL.

La probabilidad de falsos positivos se reduce desde el análisis simple al del intervalo compuesto (Staub *et al.*, 1996; Moncada, 2003).

2.4.2. Marcadores moleculares, construcción de mapas genéticos y detección de QTLs en yuca. Las técnicas usadas para selección asistida para características deseables en poblaciones segregantes involucran el uso de marcadores moleculares tales como ADN polimórfico amplificado al azar (RAPDs), polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs), microsatélites y marcadores de ADN basados en PCR, tales como fragmentos amplificados de secuencias caracterizadas (SCARs), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs), entre otros. Grandes progresos han sido obtenidos mediante el mapeo de muchos genes de importancia agrícola usando marcadores moleculares; estableciendo así, procesos de selección asistida por marcadores (MAS) (Mohan *et al.*, 1997).

En yuca, el primer mapa molecular fue construido a partir de la segregación de 132 RFLPs, 30 RAPDs, 3 SSRs, y 3 marcadores isoenzimáticos, utilizando una población F_1 obtenida mediante el cruce de dos parentales elite “TMS 30572 y CM2177-2” procedentes de Nigeria y Colombia, respectivamente. El mapa obtenido consta de 20 grupos de ligamiento que cubren 931.6 cM del genoma de la yuca o un estimado de 60% del genoma (Fregene *et al.*, 1997). Este estudio adicionalmente permitió el diseño de marcadores, análisis de ligamiento y comprensión de la organización del genoma.

El constante desarrollo de marcadores moleculares ha permitido la saturación del mapa, los estudios realizados por Chavarriaga *et al.* (1998) lograron el aislamiento y caracterización de 14 microsatélites que amplifican secuencias repetitivas de tipo GA; posteriormente, desarrollaron 172 marcadores de tipo SSR a partir de librerías genómicas (Mba *et al.*, 2001).

Constantes investigaciones dirigidas hacia la saturación del mapa han sido desarrolladas. El mapa saturado por Mba *et al.* (2001), consiste de 239 RFLPs, 80 RAPDs, 7 SSR, 6 ESTs, 3 isoenzimas y 5 genes desconocidos, y según estimaciones parece estar saturado en un 80%. Posteriores trabajos han contribuido hacia una mayor saturación del mapa, la búsqueda de QTLs y la construcción de nuevos mapas usando familias F₂ (Zárate, 2002; Marín, 2002).

Los marcadores microsatélites o secuencias simples repetitivas (SSR) son los marcadores elegidos para el mapeo genético y selección asistida por marcadores en muchas especies. Un mapa de ligamiento basado en microsatélites fue construido en la población F₂ obtenida desde la autopolinización de K150 (genotipo obtenido del cruzamiento TMS 30572 x CM2177-2) usando 100 marcadores que cubren 1236.7 cM, distribuidos sobre 22 grupos de ligamiento con una distancia promedio entre marcadores de 17.92 cM (Okogbenin *et al.*, 2006).

En CIAT se han desarrollado diferentes investigaciones relacionadas con la construcción de mapas y búsqueda de QTLs asociados a características de interés usando la población originada desde el cruzamiento TMS 30572 y CM 2177-2. Para el caso de la resistencia cuantitativa a la pudrición bacteriana CBB, estos parentales presentan características de resistencia y susceptibilidad, respectivamente; siendo la población segregante una excelente población para el mapeo de QTLs que ejercen control sobre la resistencia a la enfermedad. Este fue el primer reporte de análisis de QTLs en yuca, donde se encontraron 8 QTLs localizados sobre los grupos de ligamiento B, D, L, N y X de la estructura del mapa derivada desde el parental femenino, y 4 QTLs sobre los grupos de ligamiento G y C desde el parental masculino (Jorge *et al.*, 2000).

Otras investigaciones fueron desarrolladas para identificar las regiones QTLs relacionadas con la productividad, mediante datos de producción y arquitectura de la planta, QTLs primarios usando modelo simple, y QTLs secundarios mediante un modelo de interacción de QTL primario, fueron detectados mediante mapeo por

intervalo. Un total de 30 QTLs primarios y 84 QTLs secundarios fueron detectados, y los resultados en las correlaciones sugieren que los QTLs encontrados para arquitectura de la planta pueden ser usados para mejorar la productividad. Así mismo, se realizó un análisis genético para encontrar características y regiones QTLs asociadas al rendimiento temprano, encontrándose un total de 27 QTLs controlando el rendimiento temprano, 2 para peso seco del follaje, 8 para índice de cosecha y 17 para diámetro de raíz (Okogbenin y Fregene, 2002; 2003).

2.4.3. Mejoramiento asistido por marcadores en la introgresión de características desde especies silvestres. El uso eficiente de la variabilidad genética disponible en los genotipos silvestres depende de la habilidad para introgresar solamente los segmentos de ADN deseables desde el germoplasma silvestre a las variedades cultivadas. Los abundantes eventos de recombinación pueden estar disponibles para permitir la reducción del ligamiento entre regiones del genoma con efectos positivos y negativos para determinada característica (Fulton et al., 1997).

Varias investigaciones han sido dirigidas hacia la cuantificación de los niveles de recombinación que ocurren entre los genomas de las especies cultivadas y sus silvestres relacionados a través de diferentes generaciones de retrocruzamiento avanzado usando como principal herramienta los marcadores moleculares, en el caso de tomate, la introgresión desde *L. peruvianum* al tomate cultivado mostró niveles altos con respecto a los esperados, por cuanto las distancias genéticas entre los dos parentales son muy amplias. Usando *L. hirsutum* como padre donador y marcadores RFLPs se determinó QTLs para características de importancia económica encontrándose que en un 20% de QTLs asociados a 12 características, los alelos de *L. hirsutum* estaban asociados a características positivas desde el punto de vista del mejoramiento hortícola (Fulton et al., 1997; Bernacchi et al., 1998).

El método de análisis de características cuantitativas en poblaciones de retrocruzamiento “AB-QTLs: Advanced Backcross QTLs”, recientemente propuesto por Tanksley y Nelson (1996) combina los análisis de QTL con el desarrollo de nuevas variedades, mediante la identificación y transferencia de alelos QTLs con efectos positivos desde una línea inadaptada donante, como especies silvestres, dentro de genotipos élite establecidos, este método permite la reducción de ciclos de retrocruzamiento por cuanto durante el RC₂ y RC₃ se realiza un proceso de selección positiva dirigida hacia la introgresión de la característica de interés, al mismo tiempo que se realiza una selección negativa con el fin de reducir la frecuencia de alelos deletéreos del donador. Es una importante estrategia que puede ser usada para QTLs con acción aditiva, dominante, parcialmente dominante y sobredominante.

La estrategia de análisis de QTLs en poblaciones de retrocruzamiento avanzado permite detectar el verdadero valor y potencial genético del germoplasma silvestre, puesto que usa la información fenotípica asociada con los métodos basados en marcadores moleculares, por lo tanto, podría ser aplicado para explotar eficientemente su variabilidad genética, así lo han demostrado los estudios realizados en tomate, en los cuales, la estrategia AB-QTL fue usada para identificar loci para características de rendimiento y otras características relacionadas con calidad del fruto en poblaciones derivadas de cruzamientos interespecíficos, logrando estimar en cada uno de los QTLs, los alelos del parental donador y estimando adicionalmente sus efectos para las diferentes características (Fulton *et al.*, 1997; Bernacchi *et al.*, 1998, Monforte y Tanksley, 2000, Fulton *et al.*, 2002; Frary *et al.*, 2004).

En arroz, los estudios desarrollados han aportado similares resultados en la introgresión de genes de interés a partir de *Oryza rufipogon*; las características fenotípicas evaluadas fueron rendimiento, componentes del rendimiento y características morfológicas, encontrándose alelos del parental donador con efectos positivos para QTLs asociados con el rendimiento y en algunos casos su

ubicación es similar a la encontrada en el arroz cultivado, lo cual sugiere que se trata de regiones conservadas a través del género *Oryza*; en cuanto a las características morfológicas los alelos del parental silvestre mostraron gran estabilidad, adicionalmente se encontró que para la mayoría de QTLs asociados con la calidad de grano (especialmente contenido de amilosa y consistencia del gel) el parental donador presentó alelos con efectos negativos, de acuerdo a los objetivos del programa de mejoramiento. Por lo tanto, el conocimiento de las regiones asociadas a efectos negativos sobre la calidad de grano serán requeridas durante el desarrollo de variedades para rendimiento y componentes de rendimiento en el proceso de introgresión, para mejorar la calidad de granos podría ser usado el silvestre *O. glaberrima*, el cual contiene alelos con efectos positivos para QTLs asociados a estas características (Xiao *et al.*, 1998, Septiningsih *et al.*, 2003, Thomson *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004).

En soya, la utilización de este método para el incremento del contenido de proteína usando alelos de *Glycine soja* ha sido muy importante. En berenjena, estudios similares han permitido introgresar alelos útiles desde *Solanum linnaeanum* (tiempo de floración, número de flores y frutos, tamaño del cáliz y fruto satinado), al mismo tiempo que se contribuía al conocimiento de la conservación de la función de los genes durante la evolución (Sebolt *et al.*, 2000, Frary *et al.*, 2003).

Algunos avances de esta estrategia han sido mostrados en el desarrollo de líneas isogénicas cercanas “NILs: Near Isogenic Line” para ser usadas en procesos de mapeo fino con el fin de determinar el tipo de acción génica de los QTLs, aditividad, dominancia y/o posibles interacciones epistáticas, especialmente para los fragmentos introgresados ya sean de acción positiva o negativa, usando los resultados en este último caso, como estrategia para romper el ligamiento existente, adicionalmente representan líneas mejoradas con alto valor comercial (Tanksley y Nelson, 1996; Fulton *et al.*, 1997; Bernacchi *et al.*, 1998; Monforte y Tanksley, 2000). Estos resultados demuestran la aplicabilidad de la estrategia AB-

QTL en la selección positiva y negativa durante el desarrollo de variedades mejoradas usando procesos de introgresión desde especies silvestres y selección asistida por marcadores.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. LOCALIZACIÓN

La población de la primera generación de retrocruzamiento fue establecida *in vitro*, mediante técnicas de rescate de embriones y de propagación, se multiplicaron los genotipos para finalmente establecer de 5 a 10 repeticiones. Posteriormente, la población vegetal fue establecida en una parcela experimental de CORPOICA-Palmira en abril del año 2006. La evaluación fenotípica fue realizada en el Laboratorio de calidad de raíces de yuca y los análisis moleculares fueron realizados en el Laboratorio de genética de yuca, ubicados dentro de las instalaciones del Centro Internacional de Agricultura Tropical, localizado en Palmira, Valle del Cauca, a 1000 m.s.n.m., 3°31' latitud norte, 76°20' longitud oeste.

3.2. MATERIAL VEGETAL

El parental resistente a deterioro fisiológico post-cosecha (CW429-1) proviene del cruzamiento interespecífico de *M. esculenta* (SM1521-10) y *M. walkerae* (MWal 001). La población de hermanos medios (BIPD280: 252 individuos) usada en este estudio fue generada mediante el policruzamiento del parental resistente CW429-1 y 8 genotipos élite usados como padres recurrentes susceptibles (MTA18, CM523-7, HMC-1, MCOL1505, MBRA337, MPER183, CM2772-3 y SM909-25). Se siguió el procedimiento de introgresión de características deseables desde especies silvestres mediante mejoramiento asistido por marcadores, estrategia conocida como: "AB-QTLs, Advanced Backcross QTLs" (Figura 3).

La familia B1PD280 podría ser considerada como el primer ciclo de retrocruzamiento (F_1RC_1) debido a la presencia de genotipos élite de yuca cultivada en el mismo lote de cruzamiento y el alto porcentaje de polinización cruzada del cultivo. En las diferentes evaluaciones se utilizaron la población B1PD280, el parental resistente CW429-1 y dos parentales susceptibles recurrentes (MTAI 8 y SM909-25).

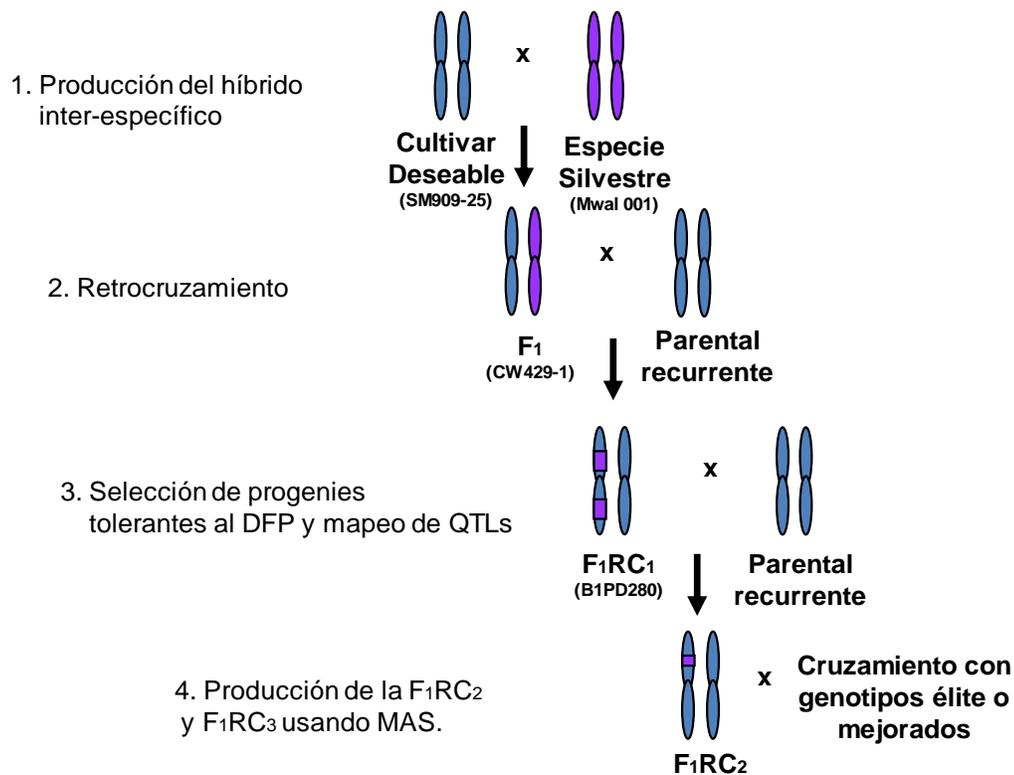


Figura 3. Esquema modificado de la estrategia “AB-QTLs” en la introgresión de características deseables desde especies silvestres en yuca. El esquema muestra la transferencia de regiones genómicas desde el parental silvestre donante y el proceso de selección dirigido a la obtención de materiales mejorados (Tomado de Blair et al., 2007).

3.3. EVALUACIÓN FENOTÍPICA DEL DETERIORO FISIOLÓGICO POST-COSECHA

La evaluación fenotípica fue realizada usando la metodología desarrollada por Wheatley *et al.* (1985) basado en trabajos previos en el CIAT. El detalle de ésta metodología se describe a continuación:

1. Se tomaron raíces comerciales de tamaño medio, sin daños mecánicos, ni pudrición precosecha.
2. Se descartaron los extremos distal y proximal de las raíces.
3. Se cubrió el lado distal de la raíz con una película plástica para mantener la humedad y evitar el inicio del DFP por esta superficie, dejando destapado el extremo proximal.
4. Las raíces fueron almacenadas en un lugar protegido del sol y la lluvia, pero expuesto al aire libre a una temperatura media de 24°C.
5. Se hicieron cortes transversales a los 2, 4, 6, 8, 10, 12, y 14 cm a partir del extremo proximal, para obtener un total de 7 secciones a evaluar.
6. Se asignaron valores numéricos de acuerdo a una escala de 0 a 10 a la superficie proximal de cada corte, la escala usada se muestra en la Figura 4.

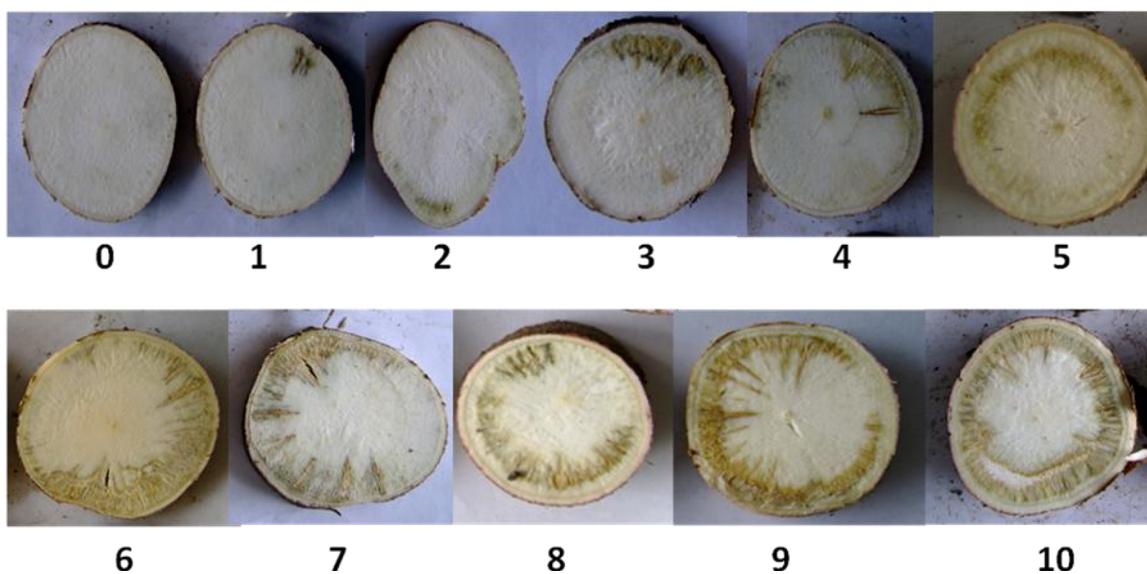


Figura 4. Cortes transversales de raíces de yuca que muestran la escala de evaluación de DFP.

La evaluación fue realizada a 7 y 14 días después de la cosecha. Los valores de la escala de medición corresponden a: 0 a 0% de la superficie deteriorada; 1 a 10% de la superficie deteriorada; 2 a 20% y así sucesivamente hasta 10 que corresponde al 100% de la superficie deteriorada. Se consideró el área periférica de los cortes transversales, ya que el centro de la raíz raramente se deteriora. Se utilizaron 5 raíces por genotipo en cada evaluación.

3.4. EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS AL NIVEL DE INTROGRESIÓN Y/O AL DFP

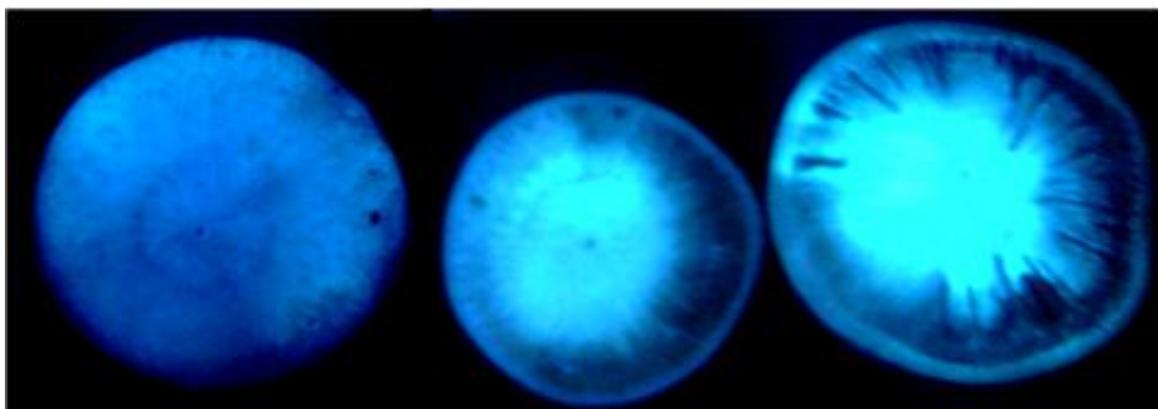
3.4.1. Evaluación de materia seca. Para determinar el porcentaje de materia seca (MS) en las raíces se usaron muestras a 0 y 14 días después de la cosecha; se tomó una muestra de una sección seleccionada al azar de cada raíz evaluada para DFP por cada genotipo. Las secciones de raíz seleccionadas fueron lavadas y posteriormente se les quitó la cáscara (cáscara externa y corteza), el parénquima fue fragmentado en pequeños trozos, se pesó la muestra fresca en una balanza de precisión, posteriormente fue secada en un horno a 60° C durante dos días y finalmente se registró el peso de la muestra en seco.

El porcentaje de materia seca fue calculada usando la fórmula sugerida por Brainbrid *et al.* (1996):

$$MS (\%) = \frac{\text{Peso muestra seca (gr.)}}{\text{Peso muestra fresca (gr.)}} * 100$$

3.4.2. Contenido de humedad y estimación de la pérdida de humedad. El porcentaje de humedad de las raíces fue estimado a partir de los datos de materia seca, por lo tanto se usaron los datos del peso de la muestra inmediatamente después de fragmentar el tejido e inmediatamente después de sacarlas del horno. La pérdida de humedad (DIFAGU) fue estimada mediante la diferencia del contenido de humedad entre 0 y 14 ddc.

3.4.3. Determinación cualitativa del nivel de escopoletina. La fluorescencia en las secciones de cada raíz fue evaluada mediante una escala cualitativa de 1 a 3, se realizó a 7 y 14 ddc. Las secciones se colocaron en una cabina oscura con luz ultra violeta (365 nm) y se asignaron valores de la escala (Figura 5) de acuerdo a la intensidad.



1=Bajo

2=Medio

3=Alto

Figura 5. Cortes transversales de raíces de yuca que muestran la escala de evaluación del nivel cualitativo de escopoletina

3.4.4. Evaluación de tipo de planta. Para la evaluación del tipo de planta, se usó una escala de 1 a 5 que fue establecida de acuerdo a la integración de varios aspectos importantes, como: la arquitectura de la planta, el vigor, el nivel de ramificación, la adecuada capacidad de producir estacas, la cantidad de follaje, la

ausencia de enfermedades y la presencia de características silvestres (CIAT, 2002). La escala usada fue:

- 1 = Plantas con buena arquitectura y vigor
- 2 = Plantas con arquitectura y vigor intermedio
- 3 = Plantas con buen vigor pero no buena arquitectura
- 4 = Plantas con vigor intermedio pero características silvestres
- 5 = Plantas con bajo vigor y/o características silvestres

3.4.5. Evaluación forma, tamaño y características generales de la raíz. Se realizó una descripción morfológica de las raíces siguiendo la metodología propuesta por Gonçalves y Guevara (1998) para forma de raíz, igualmente se determinó el tamaño de las raíces, características generales y presencia de pudrición al momento de la evaluación (7 y 14 ddc), usando parámetros establecidos en este estudio. Los parámetros usados fueron los siguientes:

Forma de raíz

- 1= Cónica
- 2= Cónica cilíndrica
- 3= Cilíndrica
- 4= Irregular

Tamaño de raíz

- 1= Pequeña (diámetro < 5 cm.)
- 2= Mediana (diámetro 5–8 cm.)
- 3= Grande (diámetro > 8 cm.)

Características generales

- 1= Raíces con características de yuca cultivada
- 2= Raíces con características silvestres

Pudrición

- 0= Ausencia de pudrición
- 1= Susceptible a pudrición

3.5. EVALUACIÓN GENOTÍPICA

3.5.1. Extracción ADN. El ADN de los 252 genotipos de la progenie y de los parentales fue extraído usando el protocolo de Gilbertson–Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983) con algunas modificaciones para yuca en microextracción. El tejido vegetal fue cosechado en sobres de papel y posteriormente secado a 60°C durante 48 horas en un horno Blue MStabil. Una cantidad de tejido finamente macerado (1-1.5 mg) fue depositado en tubos eppendorf de 1.5 ml. Se adicionaron 800µl de solución amortiguadora de extracción (100 mM de Tris HCl pH 8.0, 50 mM de EDTA pH 8.0, 500 mM de NaCl, 1% de PVP y 0.07% de β-Mercaptoetanol) más 50µl de SDS (20%). Después de homogenizar la suspensión e incubar a 65°C por 15 min, mezclando por inversión cada 5 minutos, se adicionó 250µl de acetato de potasio 5M frío (-20°C, pH 5.2), para precipitar las proteínas y restos de tejido celular, por centrifugación a 12000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, y el ADN fue precipitado con 600µl de isopropanol frío, mezclando por inversión e incubando a -20°C por 1 hora y centrifugando a 12000 rpm por 10 min. Finalmente se descartó el sobrenadante y se secaron los tubos sobre toallas de papel. Para eliminar el ARN, se adicionó RNAsa disuelta en T₁₀E₁ en una proporción de 2/100 (2 µl RNAsa: 100 µl T₁₀E₁). El ADN se resuspendió por calentamiento en baño maría (65°C) por 10min.

3.5.2. Verificación de calidad y cantidad de ADN. La evaluación de la calidad del ADN extraído fue realizada en geles de agarosa al 0.8% en TBE 0.5X, teñidos con bromuro de etidio (0.5µg/ml). El volumen de la muestra fue 10 µl (2µl de ADN, 5µl de agua HPLC y 3µl de buffer de carga Blue Juice [0.25% de azul de bromofenol y 30% de glicerol en agua]). Las muestras se corrieron a 100 voltios durante 45 minutos. Los geles fueron observados bajo luz ultravioleta (UV) y fotografiados usando una cámara Polaroid/ UV 21-USA.

El ADN, se cuantificó utilizando un fluorómetro DyNA Quant™ 200, el cual estima la cantidad de ADN mediante la coloración con el reactivo Hoescht® y buffer TNE 10X pH 7.4 (Tris Base 1M, EDTA-Na₂ 0.5M, NaCl 5M), y un estándar de calibración de ADN de timo de ternero, cuya concentración es de 100 ng/μl.

3.5.3. Evaluación usando marcadores microsatélites. Los datos genotípicos fueron obtenidos mediante dos evaluaciones:

- Primera evaluación: Con el objetivo de identificar loci SSR polimórficos se utilizaron 6 individuos de la población B1PD280, el parental resistente CW429-1 y dos parentales susceptibles, TAI 8 y SM909-25. Se evaluaron 434 marcadores microsatélites diseñados en previos estudios a partir de cDNA y ADN genómico (170 EST-SSRY, 159 SSRY y 105 NS) (Mba *et al.*, 2001; Fregene *et al.*, 1997).

La reacción de PCR fue establecida para un volumen final de 25 μL. El volumen de MgCl₂ y agua HPLC fueron estimadas de acuerdo a la estandarización de cada primer. La información detallada se muestra en el anexo A.

La amplificación fue realizada usando el programa YUCADIV, con variaciones en la temperatura de alineamiento. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc-USA) (anexo A).

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de acrilamida al 4% (Acrilamida 40%, TBE 10X buffer, Urea 5M) en cámaras verticales de electroforesis OWL (OWL Separation System. INC), el tiempo de corrida de acuerdo al tamaño del producto de amplificación, y posteriormente tinción con nitrato de plata.

- Segunda evaluación: Para esta evaluación se empleó toda la población BIPD280 y los marcadores microsatélites polimórficos que se identificaron en la primera evaluación.

3.6. LECTURA Y ANÁLISIS DE DATOS

3.6.1. Datos genotípicos. La lectura de las bandas se realizó considerando el tipo de la población, por lo tanto en una población del primer ciclo de retrocruzamiento la proporción fenotípica y genotípica esperada es 1: 1; así, la lectura fue realizada de acuerdo a la presencia del alelo segregado por parte del parental resistente (H) y la ausencia del mismo (A), siguiendo el método propuesto por Wu et al. (1992) para mapeo de genomas poliploides basado en la segregación de SDRF (Single-Dose Restriction Fragments); para la ausencia de algunas de estas bandas o nula amplificación se representó con el símbolo (-) que significa dato perdido, los datos se ingresaron en una matriz en un archivo Microsoft Excel texto y posteriormente se realizó el análisis de ligamiento y mapeo de QTLs, cuyo proceso es descrito mas adelante.

3.6.2. Datos fenotípicos. Los resultados fenotípicos obtenidos fueron analizados mediante estadísticos de tendencia central y varianza usando las funciones estadísticas del programa Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA) y el software minitab (Minitab, State College, PA). Se realizaron análisis de frecuencia con número de intervalos de amplitud constante. Adicionalmente se clasificaron con respecto a los niveles ya establecidos para deterioro fisiológico, así:

0-5% Altamente resistente

5-35% Medianamente resistente

35-65% Intermedio

65-95% Susceptible

95-100% Altamente susceptible

Adicionalmente fueron desarrollados análisis de correlación entre el DFP y algunas características que fueron evaluadas, como: nivel cualitativo de escopoletina, tamaño de raíz, materia seca y otras características de interés agronómico.

3.6.3. Análisis de ligamiento y detección de QTLs. Para la construcción del mapa genético se desarrolló el análisis de ligamiento mediante el uso del software MapDísto Versión 1.7 Beta 132 para MS Windows (disponible en <http://www.mpl.ird.fr/~lorieux>). El ligamiento es comprobado de acuerdo a las diferencias estadísticas respecto a una segregación esperada, en este caso, la de una progenie de un retrocruzamiento, por lo tanto se realizó una prueba de chi-cuadrado con el fin de verificar la segregación de los marcadores usando el comando Segregation X2S. Para la construcción del mapa de ligamiento se utilizó un valor LOD (LOD score: Logarithm of Odd Distance) de 4.0, que significa que es 10.000 veces más probable que los datos observados hayan sido obtenidos por un ligamiento que por eventos aleatorios y una frecuencia de recombinación (r) de 0.3, el valor r es usado como un índice de la distancia entre dos loci sobre un cromosoma, por lo tanto valores altos (r : 0.5) sugieren la independencia de éstos (Staub et al., 1996).

Posterior a la estimación de las distancias, se determinó el mejor orden de los loci usando un LOD de 4.0 y un $r < 0.25$; para la verificación final del orden de los marcadores se realizó usando los comandos *Bootstrap order* y *Three point*, este último comando permite verificar que el orden obtenido por el método de seriación es conforme al método de máximo de verosimilitud. Finalmente, la visualización del mapa se realizó usando el comando *Draw all sequences*.

Las distancias obtenidas son aditivas y permiten construir mapas mediante la adición de puntos, las unidades de distancia en el mapa de ligamiento se calculan en centimorgan (cMs) con la función de Kosambi que asume presencia de interferencia en los eventos de recombinación (Kosambi, 1944; Liu, 1997).

El análisis de regresión es un método de mapeo de QTLs, se basa en la comparación de las medias fenotípicas entre clases genotípicas de un solo marcador, verificando la existencia de diferencias significativas entre la media fenotípica de genotipos AA y Aa de un cruce, donde A y a son alelos de un locus marcador. Este es un método de correlación lineal solo permite la detección del QTL, pero no proporciona información sobre la frecuencia de recombinación entre el marcador y el QTL, es decir, su ubicación en el genoma (Liu, 1997).

Para detectar la asociación entre polimorfismos exhibidos por los marcadores microsatélites con QTLs que controlan la respuesta al DFP, se realizó un análisis de marcador simple utilizando el software Windows QTL Cartographer (WinQTLCart) versión 2.5 (Statistical Genetics, North Carolina State University, USA).

El archivo de datos fue preparado en MapDisto con formato para WinQTLCart, al final de la matriz de datos genotípicos se colocaron los datos fenotípicos promedios de DFP (14 ddc) y MS (0ddc). Se realizaron análisis de marcador simple usando la opción *Single Marker Analysis*.

El análisis de marcador simple emplea regresión simple donde la variable dependiente es el carácter cuantitativo y la variable independiente es el número de alelos en el locus marcador, dependiendo de la segregación del individuo (Liu, 1997; Marín, 2002). Un QTL se declaró significativo cuando la $p < 0.05$ y el resultado del coeficiente de determinación (R^2) obtenido expresó la variación fenotípica explicada por la diferencia alélica del marcador.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EVALUACION FENOTIPICA DEL DETERIORO FISIOLÓGICO POST-COSECHA (DFP)

4.1.1. Variabilidad fenotípica para DFP. Diferentes niveles de resistencia y susceptibilidad al DFP fueron encontrados en la población B1PD280. En la Figura 6a se muestra un caso de resistencia al DFP después de 14 días de realizada la cosecha (Genotipo B1PD280-29), en estas secciones no se observa ninguna coloración vascular, las raíces permanecieron intactas. Visualizando las mismas secciones en la cámara de luz ultravioleta (360 nm) se observa un nivel normal de escopoletina, metabolito secundario que se encuentra en mayores cantidades en raíces con DFP (Figura 6b). Los genotipos con diferentes niveles de susceptibilidad al DFP mostraron la presencia de coloración oscura en la región periférica de la raíz (Figura 6c) y alta acumulación de escopoletina en las regiones adyacentes a las zonas con DFP (Figura 6d), se muestra el caso del genotipo B1PD280-69.

En estudios previos se han identificado los compuestos que están involucrados tanto en la presencia de la coloración oscura de los vasos xilemáticos como en la fluorescencia bajo luz ultravioleta. Los factores evidentemente más importantes para el proceso de DFP son la presencia de oxígeno y la hidroxycumarina, escopoletina; al parecer la coloración oscura resulta de la oxidación de la escopoletina por una peróxidasa específica generando un compuesto del cual aún se desconoce su estructura; adicionalmente se presenta un incremento en la cantidad de escopoletina lo que permite su visualización bajo luz ultravioleta debido a su fluorescencia (Wheatley y Schwabe, 1985; Reilly *et al.*, 2003)

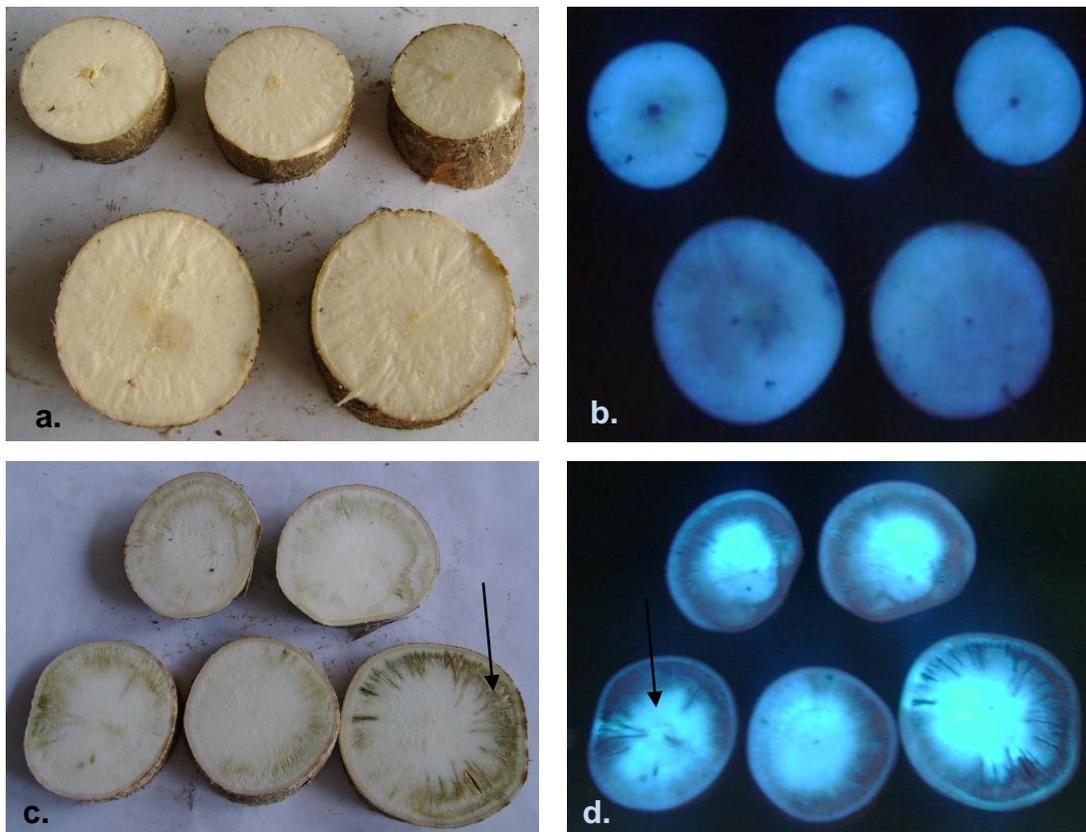


Figura 6. Respuesta de las raíces de la población B1PD280 al DFP en la evaluación a 14 ddc. a) resistencia del genotipo B1PD280-29 al DFP; b) raíces del genotipo B1PD280-29 bajo luz ultravioleta; c) susceptibilidad del genotipo B1PD280-69 al DFP, se observa el resquebrajamiento y coloración oscura de la raíz; d) raíces del genotipo B1PD280-69 bajo luz ultravioleta, se observa el alto nivel de fluorescencia.

Todos los compuestos fluorescentes que han sido identificados asociados al DFP son hidroxycumarinas como escopolina, esculina, escopoletina y esculetina, siendo la cantidad de escopoletina la más alta durante el proceso de DFP (Tanaka *et al.*, 1983, Buschmann *et al.*, 2000a). Aun no se conoce por completo la función de estos compuestos, sin embargo Rodríguez *et al.*, (2000) sugirieron que la escopoletina presenta actividad antimicrobial, por cuanto su producción se presenta en respuesta a las heridas causadas en las raíces como método de

prevención del deterioro microbiano, sin embargo su posterior oxidación genera los síntomas del DFP.

Las Figuras 6c y 6d muestran claramente los síntomas mas comunes del DFP. En etapas iniciales del DFP hay una acumulación de escopoletina en los haces xilemáticos, posteriormente se presenta el proceso oxidativo generando los síntomas visibles de DFP (Figura 6c) y las cantidades de escopoletina que se están produciendo son acumuladas en regiones adyacentes, particularmente en las células parenquimáticas (Figura 6d). Por esta razón dentro de los métodos de prevención que proponen Wheatley y Schwabe (1985) están la reducción interna de escopoletina, mediante la disminución y/o inhibición completa del precursor de la escopoletina o inactivación del sistema enzimático, o ausencia de uno de los factores involucrados en la oxidación primaria (O_2).

El comportamiento de los genotipos resistentes encontrado sugiere que algunos procesos fisiológicos y/o bioquímicos que normalmente se presentan después de la cosecha en presencia de oxígeno están siendo inhibidos. Los diferentes niveles de DFP entre genotipos se debe a las cantidades de escopoletina que son sintetizadas como lo sugieren Buschmann *et al.* (2000a,b).

En la evaluación de los parentales, el parental resistente CW429-1 y el parental susceptible SM909-25 mostraron valores de DFP similares en las evaluaciones a 7 y 14 ddc, 0 (*ds*: 0) y 76.7% de DFP (*ds*: 2.5), respectivamente. Sin embargo el parental susceptible MTA18 mostró un incremento de DFP pasando de 41.7 (*ds*: 2.16) a 77.5% de DFP a 14ddc (*ds*: 1.5).

En la progenie B1PD280, se observó una gran variabilidad en los niveles de DFP, el porcentaje de deterioro fisiológico que presentó en promedio la población fue 30.5 y 39.1% de DFP, en la evaluación a 7 y 14 ddc, respectivamente; valores considerablemente menores con respecto a los parentales recurrentes evaluados. La alta variabilidad se refleja en los altos valores de desviación estándar

encontrados, propios de una población segregante (*ds*: 25.44 y 30.64, para las evaluaciones a 7 y 14 ddc, respectivamente).

En la Figura 7, se muestran los valores promedio de DFP en las evaluaciones de 7 y 14 ddc de los parentales y la población B1PD280. En la evaluación a 7 ddc se observa que el porcentaje promedio de DFP de la población B1PD280 fue un 11 y 45% menor con respecto a los parentales susceptibles, MTAI8 y SM909-25, respectivamente. En cuanto a la evaluación a 14 ddc, la población B1PD280 presentó valores promedios de DFP con una reducción del 38% con respecto a lo obtenido en los parentales recurrentes evaluados (MTAI8 y SM909-25).

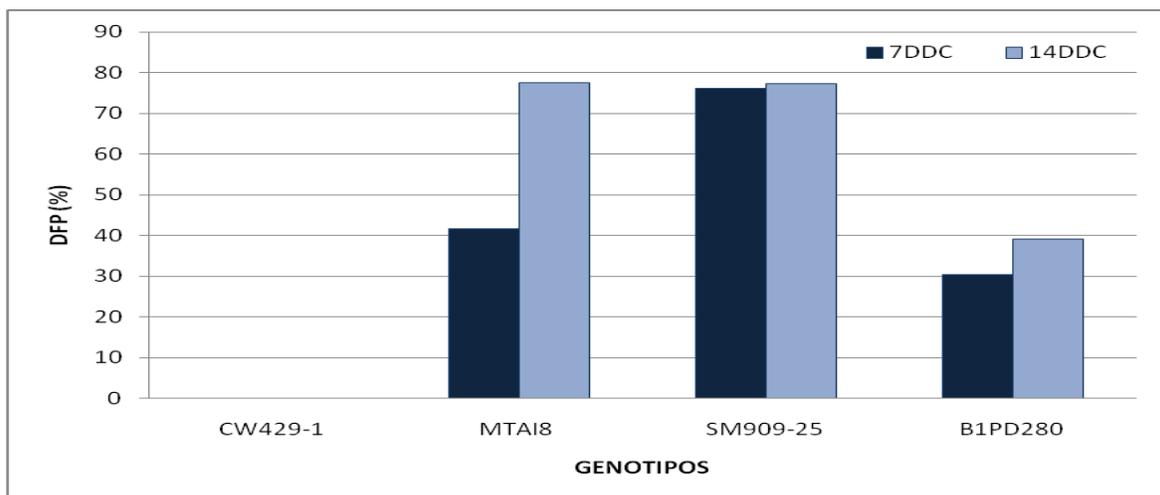


Figura 7. Porcentaje promedio de DFP de la familia B1PD280, el parental resistente CW429-1, y los parentales susceptibles MTAI8 y SM909-25 en las evaluaciones a 7 y 14 ddc. Menor promedio de DFP fue establecido en la familia B1PD280 con respecto a los parentales susceptibles en las dos evaluaciones.

Según el análisis de frecuencia, se observó una amplia variabilidad en el porcentaje de DFP con una distribución continua propio de caracteres cuantitativos, la población B1PD280 en la evaluación a 7 ddc mostró una mayor frecuencia de genotipos con presencia de porcentaje DFP por debajo de 40% (Figura 8a). En la evaluación a 14 ddc, se observó una reducción de 16% de

genotipos con niveles intermedios de resistencia al DFP (5-35%) con respecto a lo encontrado en la evaluación a los 7ddc; sin embargo, la cantidad de genotipos altamente resistentes se mantiene constante (alrededor del 20% de los genotipos), siendo éstos los posibles parentales para formar el siguiente ciclo de retrocruzamiento F_2RC_2 (Figura 8b).

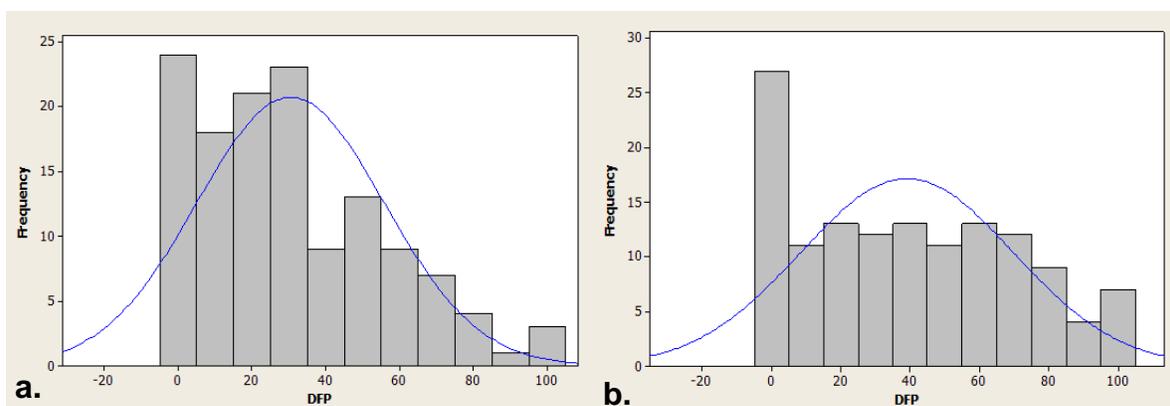


Figura 8. Histograma para el porcentaje promedio de DFP x genotipo de la población B1PD280. a) distribución asimétrica de la población B1PD280 hacia menor porcentaje de DFP en la evaluación a 7 ddc. b) frecuencia de genotipos altamente resistentes (0% de DFP) se conserva en la evaluación a 14 ddc.

La distribución asimétrica observada en las dos evaluaciones podría ser explicada por la estructura genética de la población, por cuanto se trata del primer ciclo de retrocruzamiento con presencia de un alto porcentaje de genoma del parental donante (CW429-1). El incremento de genotipos con niveles superiores de DFP en la evaluación a 14ddc, aumentó también el promedio general de DFP de la población desde 30.5% en la evaluación a 7ddc a 39.1% de DFP en la evaluación a 14ddc. Esta variación a través del tiempo ha sido también reportada por Reilly *et al.* (2003) y Cuambe (2007).

De acuerdo a la escala del nivel de DFP establecido en yuca, se encontró que un 20% de genotipos son altamente resistentes (0-5% de DFP), este porcentaje se mantiene casi constante en la evaluación a 7 y 14 ddc (Figura 9).

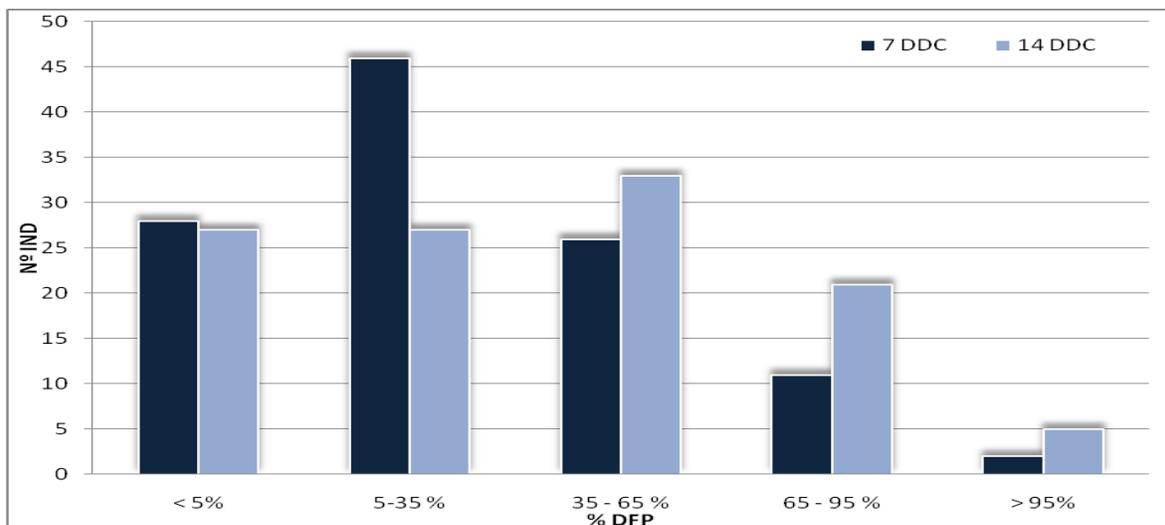


Figura 9. Frecuencia de genotipos de la población B1PD280 usando niveles de DFP establecidos en yuca en las evaluaciones a 7 y 14 ddc. 0-5%: Altamente resistente, 5-35%: Medianamente resistente, 35-65%: Intermedio, 65-95%: Susceptible, 95-100%: Altamente susceptible.

En la evaluación a 7 ddc se encontró un 43% de genotipos medianamente resistentes (5-35% de DFP), un 23% con una respuesta intermedia (35-65% de DFP), y un 9 y 2% susceptibles (65-95% de DFP) y altamente susceptibles (95-100% de DFP), respectivamente. En cuanto a la evaluación a 14 ddc se encontraron 27% de genotipos medianamente resistentes, un 29% de genotipos con un nivel intermedio, y un 18 y 5% de genotipos entre mediana y altamente susceptibles, respectivamente.

La cantidad de genotipos con alto grado de resistencia se mantuvo incluso después de 14 ddc. Los genotipos con un nivel medio de resistencia exhibieron un mayor porcentaje de DFP a 14 ddc, esto significa que un nivel medio de resistencia retrasa parcialmente el progreso del DFP, sin embargo el proceso no puede ser inhibido por completo como ocurre en los genotipos altamente resistentes, los cuales en ninguna de las evaluaciones presentaron síntomas.

Los resultados muestran la evidente transferencia y/o permanencia de los genes que confieren resistencia al DFP, puesto que además de encontrar en la población B1PD280 un porcentaje promedio de DFP inferior con respecto a los parentales recurrentes, se observó asimetría con un desplazamiento hacia los menores valores de DFP tanto en la evaluación a 7 como a 14 ddc. El porcentaje de genotipos resistentes (20% de genotipos) encontrado en este estudio es significativamente alto considerando las dificultades del cultivo asociadas especialmente con su alta carga genética y heterocigosidad (Fregene *et al.*, 2001).

Características como el menor tamaño de raíz y/o bajo número de raíces por planta también fueron encontradas en la población B1PD280, por lo cual algunos genotipos se evaluaron solamente una vez ya sea a 7 (16 genotipos) o 14 ddc (68 genotipos). La Figura 10 muestra las frecuencias obtenidas para estos genotipos.

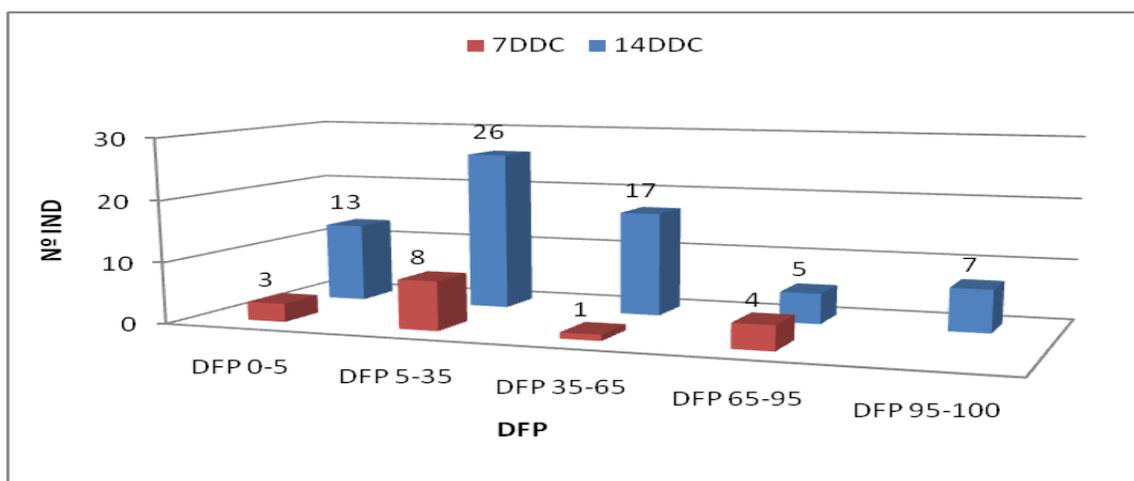


Figura 10. Frecuencia de genotipos de la población B1PD280 evaluados a 7 o 14 ddc según niveles de DFP establecidos. 0-5%: Altamente resistente, 5-35%: Medianamente resistente, 35-65%: Intermedio, 65-95%: Susceptible, 95-100%: Altamente susceptible.

En la evaluación a 7 ddc se observa un 50% de genotipos medianamente resistentes, porcentaje menor al 25% de genotipos se encontró para el resto de

niveles y ausencia de genotipos altamente susceptibles. En la evaluación a 14 ddc se observa un rango porcentual entre 25-38% de genotipos con niveles intermedios de DFP (5-35, 35-65% de DFP), los niveles entre 65-100% de DFP presentaron un porcentaje menor al 20% de genotipos. En las dos evaluaciones se encontró alrededor de un 19% de genotipos altamente resistentes, sin embargo este valor solamente corresponde a una evaluación, por lo tanto se hace necesario una nueva evaluación que permita su verificación.

4.1.2. Respuesta al DFP a través de la raíz. Usando promedios generales a través de las siete secciones evaluadas enumeradas desde sec1 (sección ubicada en el extremo proximal) hasta llegar al extremo distal, sec7; se observó que la población B1PD280 presentó una reducción alrededor de 27% de DFP con respecto al parental susceptible MTA18 a través de las secciones 1 a 5, las posteriores secciones (sec6-7) presentaron un 10% de reducción de DFP. Con respecto al parental SM909-25 se observó una reducción alrededor del 45% de DFP a lo largo de las secciones 1 a 6, la última sección (sec7) mostró una reducción de tan solo 5% de DFP.

En la Figura 11, se observa claramente como el parental resistente aunque exhibió síntomas en el área expuesta al aire, no presentó síntomas en las secciones posteriores. Por su parte, los parentales recurrentes al igual que el promedio de la población B1PD280 mostraron que el proceso de deterioro inició en el extremo proximal o sección que tiene contacto con el oxígeno y posteriormente sufrió una reducción a medida que se desplazó hacia el extremo distal, el cual se encontraba cubierto.

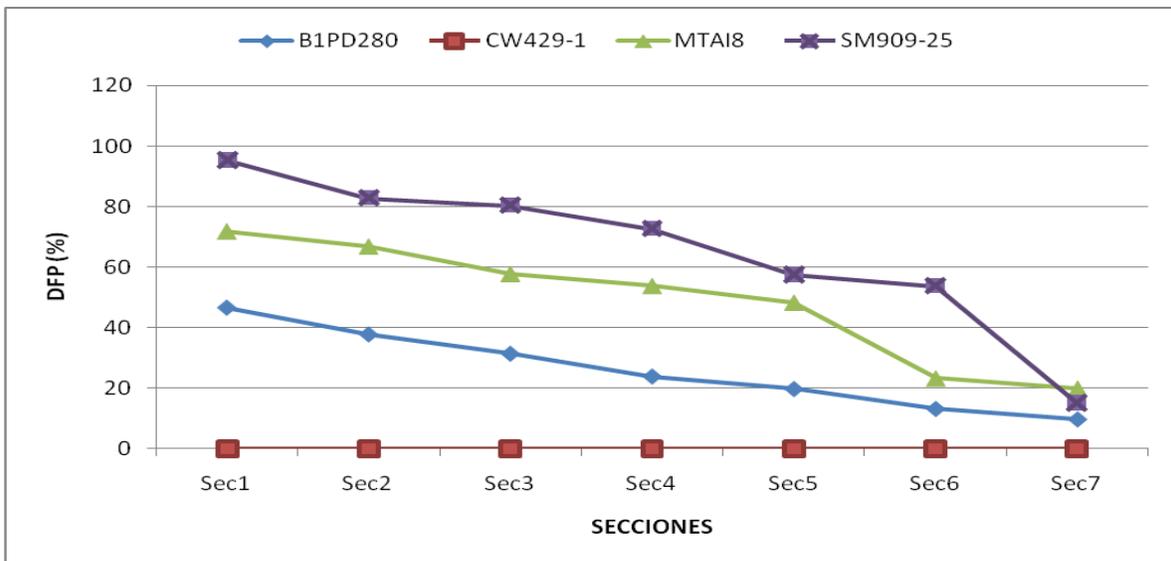


Figura 11. Comportamiento del porcentaje promedio de DFP a través de las secciones evaluadas (Sec1-Sec7). Una evidente reducción de DFP a través de la raíz estuvo presente en la población B1PD280 con respecto a los parentales susceptibles.

Se realizaron análisis similares utilizando la escala de niveles de DFP. En la Figura 12a se muestran los resultados de la evaluación a 7 ddc, se observa que los genotipos altamente resistentes (<5% de DFP) aunque mostraron un bajo porcentaje de deterioro en las primeras dos secciones (3% de DFP), no presentaron síntomas de DFP en las secciones subsiguientes (sec3-sec7). Por su parte las raíces de genotipos con nivel intermedio de DFP presentaron síntomas típicos en el extremo expuesto al aire (sec1), observándose una reducción progresiva de síntomas a medida que se desplaza hacia el extremo distal, el cual se encuentra cubierto. Los genotipos altamente susceptibles presentaron valores de DFP homogéneos (100% de DFP) a través de la raíz. Una posible explicación de estos resultados sería la existencia de un mecanismo de reparación de tejidos rápida como respuesta a la lesión en genotipos con resistencia al DFP. La rápida cicatrización de tejidos expuestos al oxígeno evita que el proceso continúe a través de toda la raíz, al tiempo que puede iniciar un estado de latencia que probablemente estaría controlado por los genes presentes en *M. walkerae*.

Aunque la información con respecto a los genes involucrados es aun desconocida, el fenomeno de resistencia presente en esta especie silvestre fue previamente descrito por Rogers y Appan (1973).

Beeching *et al.* (1999), afirmaron que en los genotipos susceptibles no ocurren procesos de reparación, aunque todos los elementos metabólicos para una respuesta normal a lesiones están presentes en las raíces no hay una adecuada regeneración de los tejidos lesionados. Por lo tanto, una cascada de respuestas bioquímicas a la lesión resulta finalmente en el deterioro fisiológico postcosecha.

En la evaluación a los 14 ddc, se encontraron resultados similares aunque los genotipos mediana y altamente susceptibles presentaron adicionalmente susceptibilidad al deterioro microbiano, siendo posible evaluar de 4 a 6 secciones solamente (Figura 12b). Sin embargo, se observó claramente el mismo comportamiento de reducción gradual a través de la raíz de los genotipos con resistencia al DFP (<5%) y tolerantes (5-35, 35-65% de DFP), fenomeno que no se presentó en los genotipos altamente susceptibles, los cuales presentaron niveles similares de síntomas de DFP a través de todas las secciones de la raíz (100% de DFP).

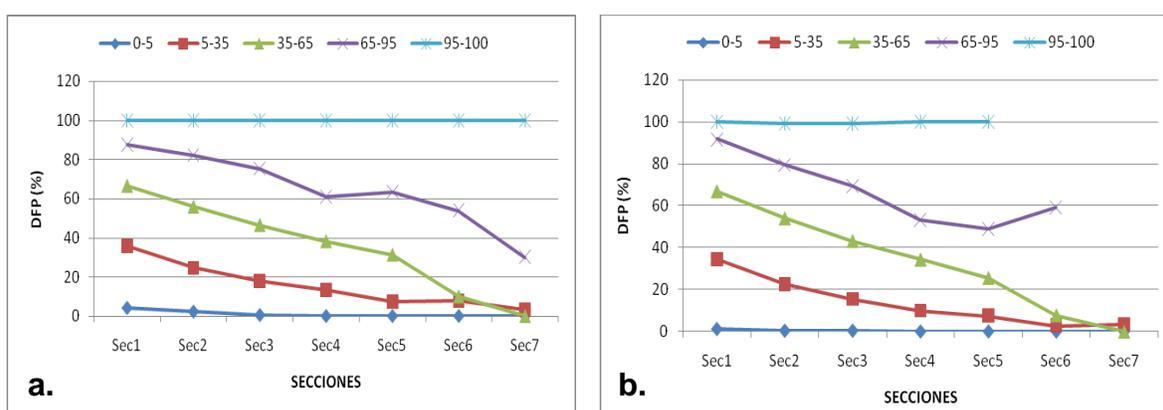


Figura 12. Comportamiento del porcentaje promedio de DFP a través de las secciones evaluadas de la población B1PD280 según niveles de DFP establecidos. a) muestra el comportamiento en la evaluación a 7 ddc. b) muestra el comportamiento en la evaluación a 14 ddc.

En el análisis de varianza dentro de los niveles de DFP establecidos se observó un rango de desviación estandar relativamente bajo (0-8.5 en la evaluación a 7ddc y 1-9.2 para la evaluación a 14ddc). Por su parte los valores de desviación estandar obtenidos entre niveles de DFP establecidos fueron considerablemente altos (39.5 y 40.2, en las evaluaciones a 7 y 14 ddc, respectivamente). Estos valores muestran la confiabilidad que se puede obtener al establecer niveles de resistencia al DFP como estrategia de selección.

4.1.3. Relación del DFP con el contenido de materia seca y pérdida de humedad. En el cuadro 1, se muestran los coeficientes de correlación obtenidos entre la respuesta al DFP (14 ddc) y otras características de interés. Respecto a la relación del porcentaje DFP con el contenido de MS se encontraron coeficientes de correlación de 0.288 y 0.521 con MS a 0 y 14 ddc, respectivamente ($p < 0.001$). Resultados similares fueron reportados previamente por Ojulong et al. (2007), en su estudio sobre características relacionadas con el rendimiento y algunas respuestas a estres biótico sobre 627 genotipos de yuca evaluados en CIAT-Palmira. Ellos encontraron una correlación positiva entre el contenido de materia seca y la respuesta al DFP (0.19, $p < 0.001$), aunque su reporte presenta un menor valor de correlación comparado con este estudio su nivel de significancia es considerablemente alto. En el trabajo realizado por Chavez et al. (2005) sobre una población de 2457 genotipos de yuca, encontraron igualmente una correlación positiva (0.348, $p < 0.01$); los estudios realizados por Jennings y Hershey (1985); Van Oirschot et al. (2000) también reportaron correlación positiva entre estas dos características.

Esta es una desafortunada situación por cuanto los procesos de mejoramiento no solamente están enfocados a la búsqueda de genotipos con una característica deseable sino con varias características que puedan satisfacer las necesidades de los productores, la industria y/o los consumidores. La correlación positiva encontrada entre DFP y contenido de MS, es por lo tanto un gran limitante debido

a que uno de los objetivos de un proyecto de mejoramiento es la obtención de variedades con alto contenido de materia seca, pero a la vez resistentes al DFP.

Análisis similares fueron realizados con los datos de la evaluación a 7 ddc. Los resultados fueron semejantes y se muestran en el anexo B.

Cuadro 1. Correlación entre porcentaje de DFP en la evaluación a 14 ddc y otras características relevantes en yuca.

	DFP	ESC	MS0	MS14
ESC	0,523**			
MS0	0,288**	0,114		
MS14	0,521**	0,262*	0,446**	
DIFAGU	-0,264*	-0,149	0,366**	-0,673**

** indica correlación entre las características a $p < 0.001$, * indica correlación entre las características $p < 0.01$. DFP: deterioro fisiológico post-cosecha, ESC: escopoletina, MS0: materia seca 0 ddc, MS14: materia seca 14 ddc, DIFAGU: pérdida del contenido de humedad.

Se encontraron correlaciones positivas entre MS0 y, MS14 y DIFAGU con valores de p significativos (0.446 y 0.366, respectivamente. $p < 0.001$), por cuanto son características estrechamente asociadas. Un valor negativo y altamente significativo fue encontrado entre MS14 y DIFAGU (-0,673), una posible explicación es que las raíces que presentan acelerada deshidratación muestran normalmente mayor contenido de materia seca a 14 ddc. Aunque con menor valor de significancia, también se encontró una correlación negativa entre DFP y DIFAGU (-0,264, $p < 0.01$).

El valor de DIFAGU fue obtenido mediante la diferencia de la MS a 0 y 14 ddc, la correlación negativa encontrada entre el DFP y DIFAGU sugiere que los genotipos que presentan mayor pérdida de humedad (expresada en valores negativos) presentan mayor susceptibilidad al DFP, lo que está de acuerdo con la correlación encontrada entre MS y DFP.

Utilizando los niveles de DFP establecidos y los datos de DFP, MS y DIFAGU, se observó diferencias significativas ($p < 0.001$) en el contenido de materia seca (MS0 y MS14) entre los diferentes niveles de DFP, igualmente, aunque con menor significancia ($p < 0.05$) entre valores de DIFAGU entre los niveles establecidos de DFP, los resultados se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Promedios de porcentaje de DFP (14ddc), MS (0 y 14ddc) y DIFAGU. Se muestran los datos según niveles de DFP establecidos, parentales recurrentes (SM909-25 y MTA18) y parental donante (CW429-1).

Nivel DFP	DFP (%)	MS0 (%)	MS14 (%)	DIFAGU (%)
< 5	0,4**	35,9**	37,2**	-1,2*
5 – 35	20,0**	38,8**	42,1**	-3,3*
35 – 65	50,5**	40,9**	45,9**	-4,3*
65 – 95	75,6**	42,8**	48,5**	-5,7*
> 95	99,5**	38,1**	52,9**	-12,9*
TA18	77,5	39,8	-	-
SM909-25	77,3	41,0	46,0	-5,0
CW429-1	0	35,3	39,3	-4,0

** $p < 0.001$, * $p < 0.05$. DFP: deterioro fisiológico post-cosecha, MS0: materia seca 0 ddc, MS14: materia seca 14 ddc, DIFAGU: pérdida del contenido de humedad.

En todos los niveles de DFP se observó un incremento en el porcentaje de MS desde 0 a 14 ddc, desde 1.4% de MS en genotipos altamente resistentes (<5% de DFP), alrededor de 5% de MS en genotipos con respuesta intermedia al DFP y un considerable incremento (14.8% de MS) en genotipos altamente susceptibles (>95% de DFP), fenómeno que se traduce en mayor pérdida de humedad en estos genotipos.

El promedio de MS14 fue menor en genotipos resistentes (37.2% de MS) comparado con los genotipos altamente susceptibles (52.9%). En cuanto a los valores de MS0 hay incremento desde 35.9% de MS en genotipos resistentes a 42.8% en genotipos susceptibles (65-95% de DFP), sin embargo los genotipos altamente susceptibles presentaron un menor valor promedio (38.1% de MS). Los

valores de DIFAGU también mostraron un incremento pasando de -1.2% en genotipos resistentes hasta -12.9% en genotipos altamente susceptibles.

Con respecto a los promedios de los parentales se observó que los genotipos susceptibles presentaron un contenido de MS a 0 ddc similar (por encima de 38% de MS) a los parentales susceptibles (MTAI8 y SM909-25), los genotipos con resistencia al DFP presentaron 35% de MS al igual que el parental resistente (CW429-1). En cuanto a MS14 los genotipos susceptibles presentaron mayor contenido que el parental SM909-25 (46% de MS), por su parte los genotipos y parentales resistentes presentaron porcentajes similares de MS (menor a 40% de MS), mostrando un incremento de MS desde 0 a 14 ddc entre 1 y 4% de MS. Los genotipos altamente susceptibles presentaron mayor valor de MS (14.8% de MS comparado con 4% en SM909-25) y mayor pérdida de humedad (-12.9% de DIFAGU) incluso mayor al parental susceptible SM909-25 (-4%).

La Figura 13 muestra la dispersión tridimensional obtenida usando los datos de DFP, DIFAGU y MS0. Se observa que los genotipos con menor contenido de materia seca y menor pérdida de humedad presentaron mayor grado de resistencia al DFP; por el contrario, los genotipos que presentaron niveles desde intermedios a susceptibles al DFP mostraron mayor contenido de materia seca y una pérdida elevada de humedad.

La respuesta que presentaron los genotipos resistentes al DFP podría ser explicada por una posible cicatrización de tejidos expuestos al ambiente, evitando así la pérdida de humedad durante el periodo de almacenamiento y progreso del proceso de DFP a través de la raíz, esta hipótesis está apoyada en lo reportado por Beeching *et al.* (1999), quienes afirman que el DFP responde a una cascada de respuestas a la lesión, las cuales normalmente son inhibidas con procesos de reparación o cicatrización de la lesión; generalmente las respuestas de DFP relacionadas con procesos oxidativos (Reilly *et al.*,2003). De igual forma una posible iniciación del proceso de latencia puede presentarse en los genotipos

resistentes, característica ha sido descrita por Rogers y Appan (1973) en el parental silvestre (*M. walkerae*).

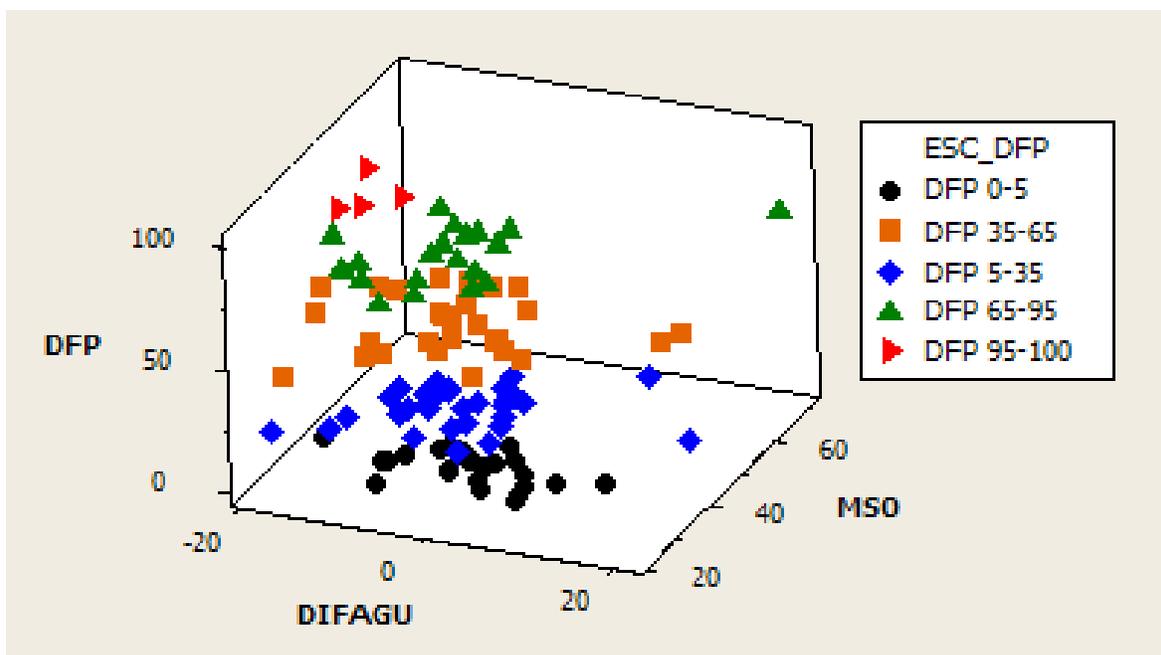


Figura 13. Relación del porcentaje de DFP en la evaluación a 14 ddc, DIFAGU y MS a 0 ddc. La dispersión tridimensional muestra que los genotipos con menor contenido de materia seca y menor pérdida de humedad presentaron mayor grado de resistencia al DFP.

4.1.4. Relación del DFP con el contenido de escopoletina. Se determinó un coeficiente de correlación de 0.389 y 0.523 ($p > 0.001$) correspondiente a una correlación positiva entre la respuesta al DFP y el contenido de escopoletina promedio para la evaluación a 7 y 14 ddc, respectivamente. Estudios previos han establecido que la presencia de escopoletina así como el oxígeno son factores indispensables para que el proceso de DFP se presente (Wheatley y Schwabe, 1985). A pesar de que este compuesto se encuentra normalmente en raíces frescas de yuca, el DFP induce un drástico incremento a cantidades elevadas que hacen posible su visualización bajo luz ultravioleta. Las raíces resistentes al DFP acumulan menos escopoletina que las raíces susceptibles (Buschmann et al.,

2000a,b; Rickard, 1982; Wheatley, 1982). En la Figura 14 se ilustra que el mayor contenido de escopoletina se encuentra en los genotipos moderada y altamente susceptibles.

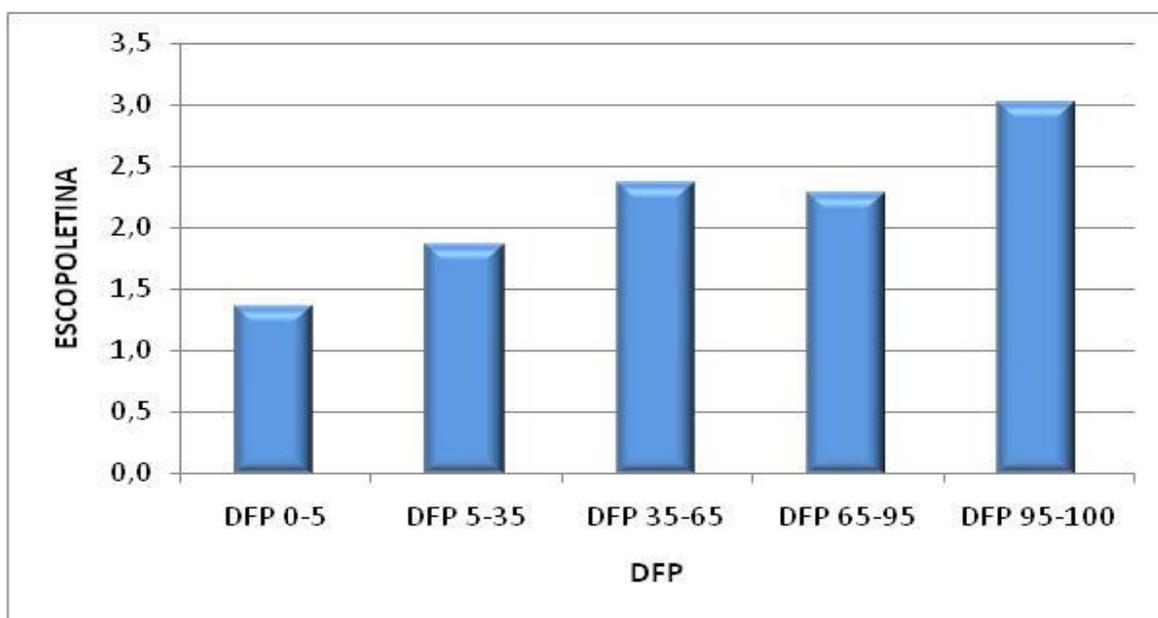


Figura 14. Nivel promedio de escopoletina según niveles de DFP establecidos en la evaluación a 14 ddc.

4.1.5. Relación del DFP y características de interés agronómico. Las características de interés agronómico evaluadas fueron: tamaño de la raíz (TAM), características generales de la raíz (C.GEN), forma de la raíz (FORM), presencia o ausencia de pudrición (PUD), promedio de raíces por planta (PROD) y tipo de planta (TIPP). En todas estas características la población B1PD280 presentó valores intermedios entre los parentales susceptibles cultivados (MTA18 y SM909-25) y el híbrido interespecífico (CW429-1) (esta información se encuentra posteriormente detallada). No se encontró ninguna correlación con el DFP. Los resultados se observan en el cuadro 5.

Cuadro 3. Correlación entre porcentaje de DFP en la evaluación a 14 ddc y características de interés agronómico.

	DFP	TAM	C.GEN	MS0
TAM	-0,163			
C.GEN	0,010	-0,114		
PUD	-0,070	0,314**	-0,069	-0,309**

** $p < 0.001$, * $p < 0.01$. DFP: deterioro fisiológico post-cosecha, TAM: tamaño de la raíz, C.GEN: características generales de las raíces, PUD: pudrición.

Se determinó correlaciones entre PUD encontrada en el momento de evaluación y TAM, encontrándose un valor positivo altamente significativo (0,314, $p < 0.001$), lo cual indica que las raíces con mayor diámetro son más susceptibles a la pudrición microbiana, ya que presentan mayor superficie de contacto. Igualmente se encontró correlación negativa altamente significativa entre PUD y MS0 (-0,309, $p < 0.001$), lo cual sugiere que alto contenido de humedad en las raíces crea un ambiente propicio para el crecimiento de microorganismos entre otros probables factores genéticos que podrían estar asociados a este evento.

Ninguna de las características mostró diferencias significativas entre los promedios para los niveles de DFP establecidos, tampoco se observó un comportamiento especial asociado al DFP, indicando que no existe ninguna correlación entre estas características y el DFP. En el cuadro 4 se muestran los valores promedio de las características agronómicas según los niveles de DFP establecidos y los valores en los parentales, claramente se observa que TAM, y C.GEN presentan valores intermedios y en su mayoría tendientes al promedio de los parentales recurrentes, así la población B1PD280 presentó raíces de tamaño mediano (categoría 2) y con características generales de la raíz similares a la yuca cultivada (categoría 1). En cuanto a FORM se observaron datos muy variables (entre 2-3 según categorías establecidas) y con bajo nivel de pudrición (en todos los niveles tendiendo a 0).

Cuadro 4. Promedios de las características agronómicas evaluadas según niveles de DFP establecidos, parentales recurrentes (SM909-25 y MTAI8) y parental donante (CW429-1).

Nivel DFP	DFP (%)	TAM	C.GEN	FORM	PUD	PROD	TIPP
< 5	0,4**	1,8	1,0	2,3	0,2	4,8	3,3
5 – 35	20,0**	1,9	1,1	2,5	0,3	4,0	3,4
35 – 65	50,5**	1,5	1,1	3,1	0,2	4,2	3,2
65 – 95	75,6**	1,5	1,1	2,6	0,2	4,8	2,6
> 95	99,5**	1,5	1,0	3,4	0,2	4,6	3,7
TAI8	77,5	2	1	2	1	4,5	1
SM909-25	77,3	2	1	2	1	12,5	1
CW429-1	0	1	2	4	0	3,5	4

** $p < 0.001$, DFP: deterioro fisiológico post-cosecha, TAM: tamaño de la raíz, C.GEN: características generales, FORM: forma de la raíz, PUD: pudrición, PROD: promedio de raíces por planta, TIPP: tipo de planta.

La característica TIPP se vio profundamente afectada, se observaron valores alrededor de 3 según escala de categorías indicando que la población B1PD280 presentó vigor entre intermedio y bajo, y presencia de características silvestres. Estos resultados sugieren la posible presencia de genes con efectos negativos sobre esta característica, por cuanto es una característica ausente en los parentales recurrentes y mejorados (SM909-25 y MTAI8), y evidentemente provienen desde el parental silvestre. Este tipo de resultados son comunes en procesos de introgresión desde especies silvestres. La mayoría de la población B1PD280 exhibió vigor entre intermedio y bajo, y presencia de características silvestres tales como: baja altura de la primera ramificación, ramificaciones escasas, largas y débiles, características de *Manihot walkerae* reportadas por Rogers y Appan (1973).

En PROD se observó un promedio de 4 raíces/planta similar a lo producido por el parental resistente (CW429-1) y considerablemente menor con respecto a SM909-25 (12 raíces/planta), sin embargo la producción del parental susceptible MTAI8 es también baja (4.5 raíces/planta); por lo tanto no solamente efectos genéticos

desde el parental silvestre pudieron haber influido sobre esta característica cuantitativa.

Los análisis de frecuencia realizados utilizando las características agronómicas evaluadas se muestran en la Figura 15. En la característica C.GEN se observó que 93% de los genotipos de la población B1PD280 presentaron la categoría numérica 1 indicando que las raíces presentan características de yuca cultivada, una pequeña cantidad de genotipos presentan raíces con características silvestres similares a las encontradas en el parental donante (categoría 2).

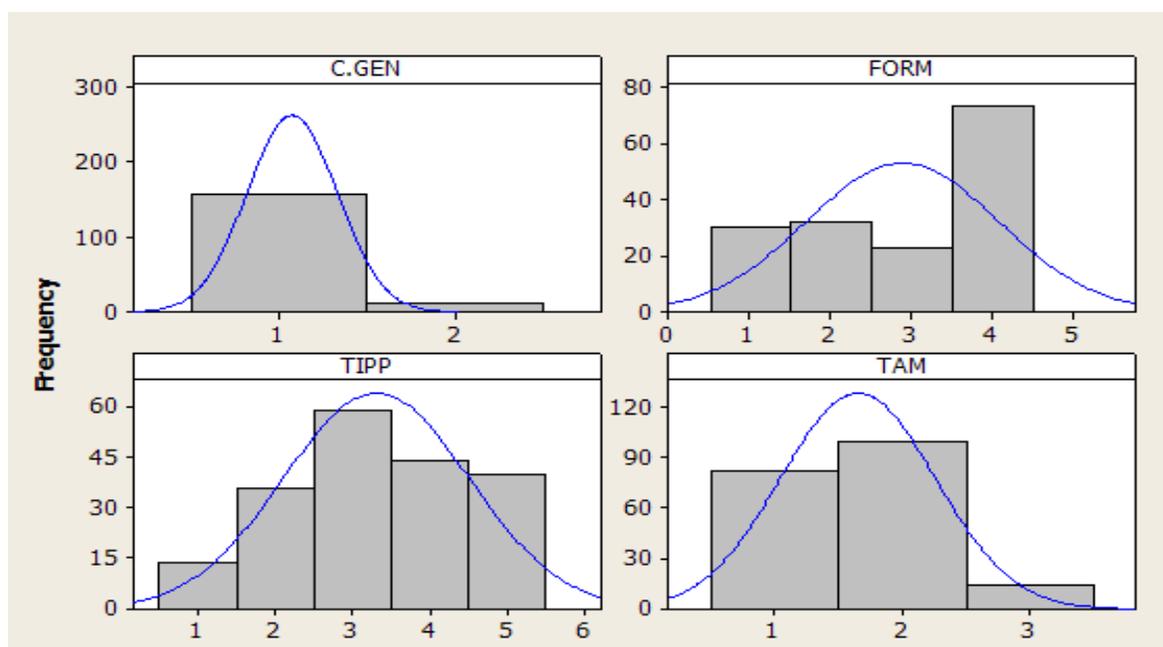


Figura 15. Frecuencia obtenida en la población B1PD280 para C.GEN, FORM, TIPP y TAM según categorías establecidas para cada característica.

En cuanto FORM, la mayor frecuencia se encuentra en la categoría 4 (47% de los genotipos), por lo tanto la mayoría de genotipos presentaron raíces con forma irregular, característica presente en el parental donante, un 19% de la población presentó raíces con forma cónica-cilíndrica (categoría 2) como los parentales recurrentes, 13 y 19% de genotipos presentaron categorías asociadas como forma cilíndrica (categoría 3) y forma cónica (categoría 1), respectivamente.

Con respecto a TIPP también se observó que las categorías que presentan características asociadas al parental donante presentaron mayor frecuencia, el 31% fueron genotipos con buen vigor pero no buena arquitectura (categoría 3), el 21% de la población correspondió a plantas con vigor intermedio pero características silvestres (categoría 4), el 21% de genotipos presentaron bajo vigor y/o características silvestres (categoría 5) similares al parental donante (CW429-1), tan solo el 7% de genotipos presentaron buena arquitectura y vigor (categoría 1) y 18% presentaron arquitectura y vigor intermedio (categoría 2).

Para la variable TAM, se encontraron frecuencias similares entre las categorías de raíces pequeñas (categoría 1, diámetro < 5 cm.) y medianas (categoría 2, diámetro 5–8 cm.), presentando valores alrededor del 45% de la población, una segregación cercana al 1:1 entre la categoría del parental donante y la de los parentales recurrentes; encontrándose además una baja frecuencia de genotipos (6.7% de la población) con raíces de gran tamaño (categoría 3, diámetro > 8 cm.). Esta característica no fue afectada por la presencia de genes con efectos negativos provenientes del parental donante. No se observó relación del TAM con el DFP, lo cual favorece los procesos de mejoramiento.

En la Figura 16 se muestra la frecuencia obtenida para las características PUD y PROD. En la característica PUD, un 79% de la población no presentó pudrición (categoría 0) y se encontró una menor cantidad de genotipos con susceptibilidad a pudrición microbiana (21% de genotipos), que como se discutió anteriormente estuvo asociada al porcentaje de humedad y al tamaño de la raíz. Por su parte, el promedio de PROD en general fue bajo (4 raíces/planta), el histograma muestra una curva normal continua, propia de una característica cuantitativa con una variación entre 1- 9 raíces/planta.

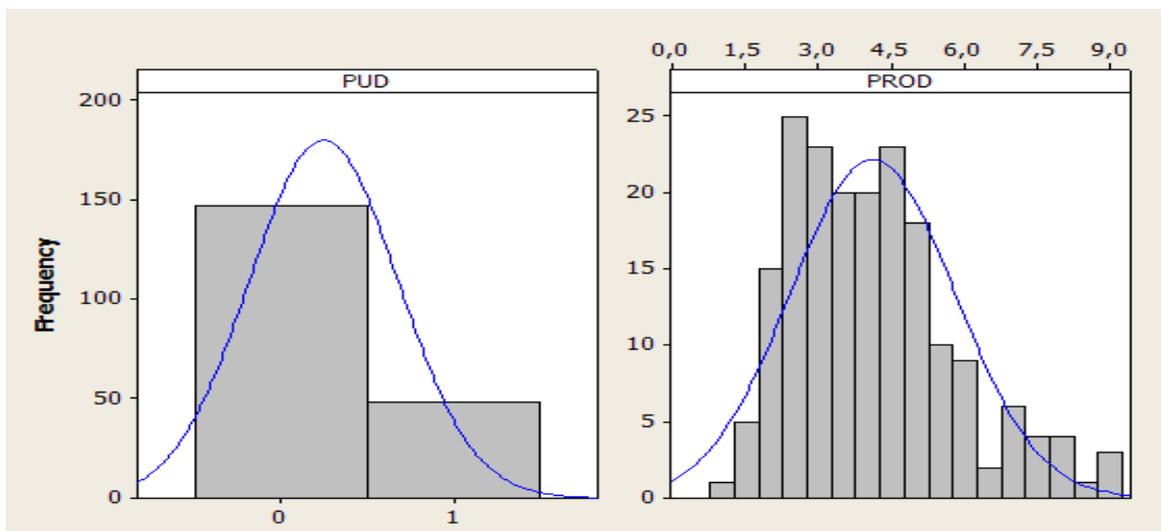


Figura 16. Frecuencia obtenida en la población B1PD280 para PUD según categorías establecidas y PROD (histograma).

Los resultados encontrados se ajustan a lo reportado en la introgresión desde especies silvestres en otros cultivos (Fulton *et al.*, 1997; Bernacchi *et al.*, 1998, Monforte y Tanksley, 2000, Fulton *et al.*, 2002; Frary *et al.*, 2004, Xiao *et al.*, 1998, Septiningsih *et al.*, 2003, Thomson *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004), debido a la presencia de ligamiento entre regiones del genoma que se refleja en efectos positivos y/o negativos para determinadas características. Adicionalmente a la investigación que se desarrolla entorno a los genes asociados a la característica de interés, es importante el conocimiento de las regiones del genoma asociadas con efectos negativos durante el proceso de obtención de variedades mejoradas, esto contribuye a mejorar la eficiencia del proceso. Es así como el esquema de AB-QTLs propuesto por Tanksley y Nelson (1996) constituye una estrategia en el mejoramiento genético de yuca, debido a que es posible realizar selección positiva dirigida hacia la introgresión de la característica de interés, al mismo tiempo que se realiza una selección negativa con el fin de reducir la frecuencia de alelos deletéreos del donador.

4.2. MAPEO GENÉTICO Y ANÁLISIS DE QTLs PARA RESISTENCIA AL DETERIORO FISIOLÓGICO POST-COSECHA (DFP)

4.2.1. Estimación del polimorfismo. Se encontraron 151 marcadores microsatélites polimórficos de 434 marcadores evaluados en los parentales (CW429-1, SM909-25 y MTA18) y 6 genotipos de la familia B1PD280 seleccionados al azar. En la Figura 17 se muestra patrones de amplificación y el polimorfismo seleccionado (a y b) con base en la presencia del alelo segregado por parte del parental resistente y la ausencia del mismo, siguiendo el método propuesto por Wu et al. (1992) para mapeo de genomas poliploides basado en la segregación de SDRF (Single-Dose Restriction Fragments).

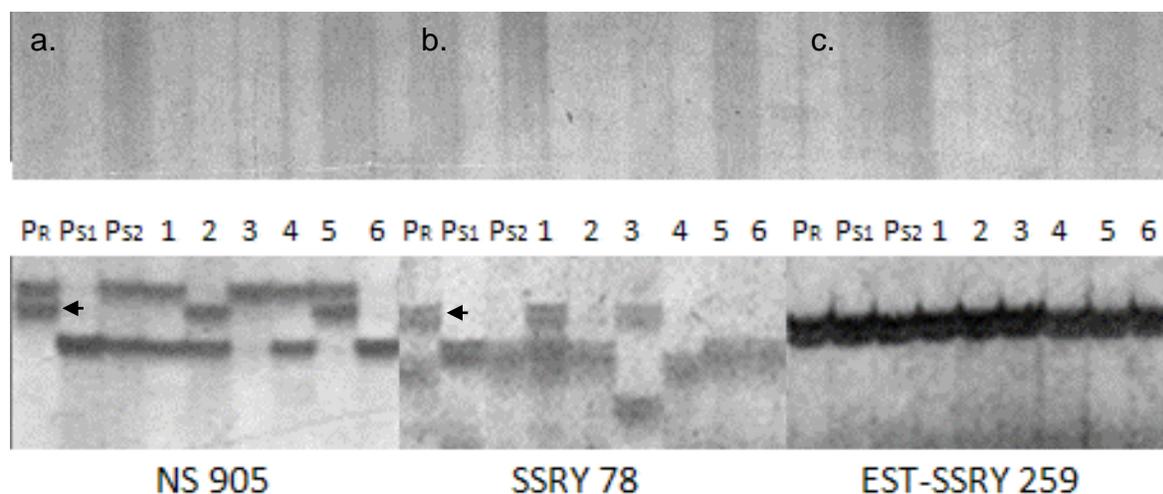


Figura 17. Segregación alélica obtenida en la primera evaluación usando marcadores microsatélites. Amplificación en el parental resistente (P_R: CW429-1), los parentales susceptibles (P_{S1}: SM909-25 y P_{S2}: MTA18) y seis genotipos de la población B1PD280 (carriles 1-6). a y b) marcadores polimórficos con la presencia de alelismo en el padre resistente (indicado por la flecha); c: marcador monomórfico.

4.2.2. Evaluación en la población completa B1PD280. Usando los marcadores polimórficos obtenidos en la primera evaluación, se evaluó la población completa B1PD280 donde fue posible observar la segregación del alelo presente en el parental resistente. En la Figura 18 se muestra un ejemplo de la segregación del alelo del parental resistente en la población B1PD280 y su respectiva lectura. Las matrices de datos genotípicos fueron construidas mediante la lectura de bandas según el método propuesto por Wu et al. (1992) y usando una codificación específica (H: presencia, A: ausencia y (-): ausencia total de las bandas o nula amplificación).

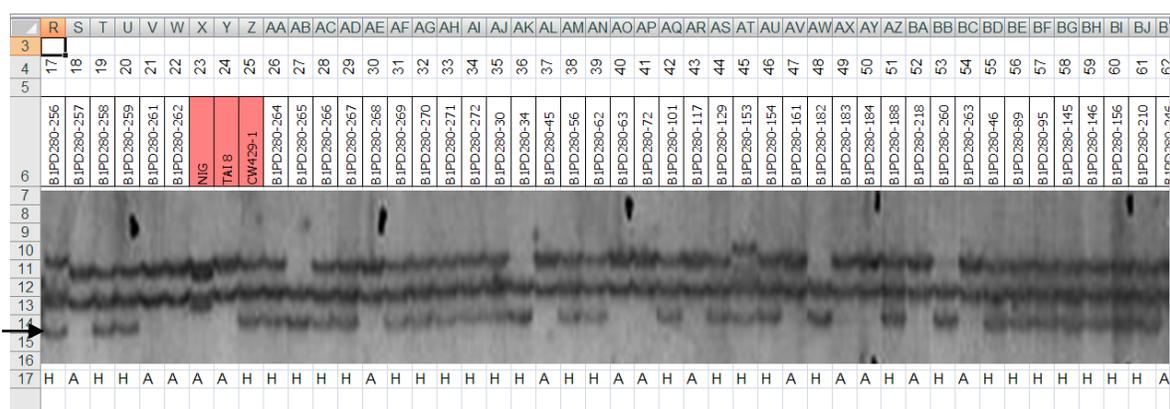


Figura 18. Segregación del alelo proveniente del parental resistente en parte de la población B1PD280 usando el marcador NS1045. La flecha indica el alelo proveniente del parental resistente (CW429-1). La parte superior muestra la identificación de cada genotipo; en la parte inferior se encuentra la lectura de la segregación así: presencia (H), ausencia (A) y ausencia total de las bandas o nula amplificación (-).

Durante esta evaluación se detectaron algunos marcadores, en los cuales el alelo seleccionado fue polimórfico solamente en los parentales (sin segregación en la población B1PD280), razón por la cual no fueron usados en el análisis de ligamiento. Finalmente se establecieron 82 marcadores que fueron usados para construir el mapa de ligamiento de la población B1PD280 (ver detalles de los marcadores usados en el anexo C).

En el cuadro 5 se muestra la segregación obtenida en la población B1PD280 con los marcadores usados para construir el mapa, la segregación se ajusta a lo esperado en un primer ciclo de retrocruzamiento (1:1).

Cuadro 5. Frecuencia de la segregación de los marcadores microsatélites evaluados en la población B1PD280

Marcador-Genotipo	Símbolo	Número	Porcentaje
AA	A	4976	0,4535
Aa	H	5557	0,5065
aa	B	0	0,0000
--	-	439	0,0400
Total			1,0000

Los resultados de la prueba de $\chi^2_{1:1}$ sobre los datos de segregación de cada marcador evaluado mostraron que el 52% de los marcadores que conforman los grupos de ligamiento presentan una segregación que se ajusta a la proporción esperada 1:1. Un 45% de los marcadores presentaron una segregación distorsionada (cercana 3:1), aunque con menor probabilidad. Estos datos se muestran en el anexo D.

En cuanto a la composición del genoma de la población B1PD280, se observó que el rango de homocigosidad (A= AA) fue entre 29.3 y 57.3% con una media de 41.72%. La heterocigosidad (H=Aa) estuvo en un rango entre 34.1 y 69.5% con una media de 54.19%. La población presentó un porcentaje mayor de heterocigosidad, sin embargo, se ajusta a la segregación esperada para una población F_1RC_1 (1:1). En la Figura 19 se muestra la distribución de estas variables, el término densidad se refiere a la frecuencia de homocigosidad y heterocigosidad observada en la población B1PD280, según ajustes del programa Minitab.

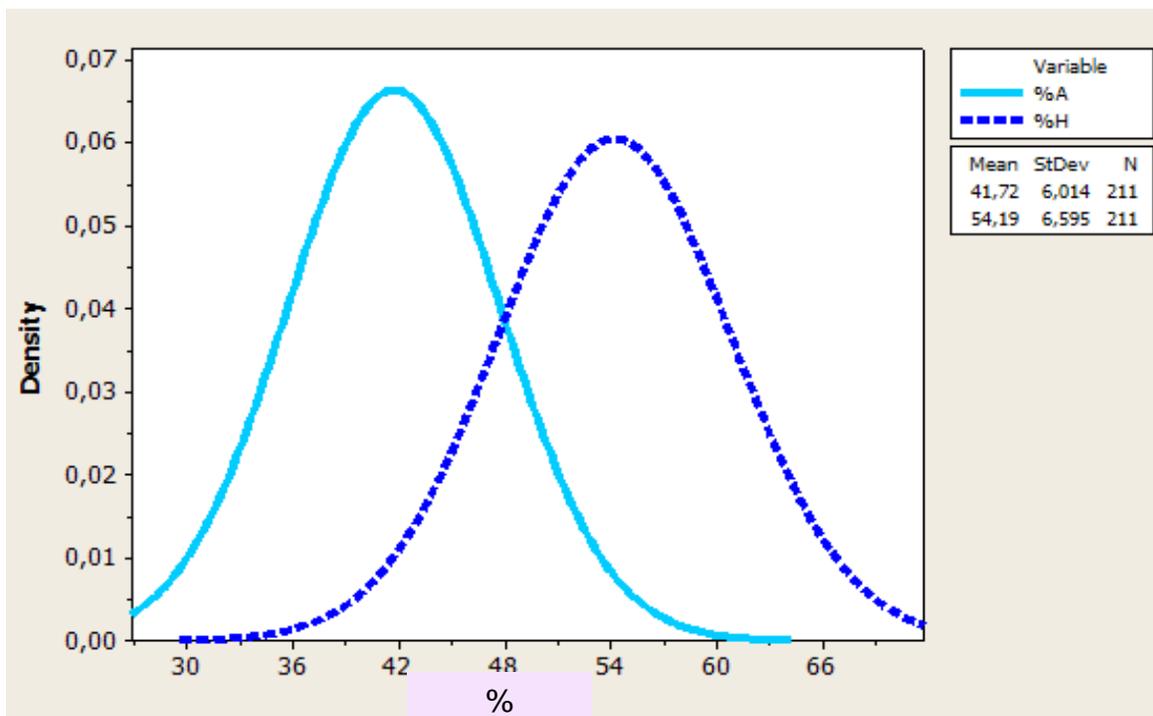


Figura 19. Distribución del porcentaje de homocigosidad (A) y heterocigosidad (H) de la población B1PD280

4.2.3. Construcción del mapa genético para la población B1PD280. En la construcción del mapa de ligamiento de la familia B1PD280 se usaron 82 marcadores microsatélites con los cuales se obtuvieron 17 grupos de ligamiento usando un LOD mínimo de 4,0. Se seleccionó este valor para que la probabilidad de que los datos observados hayan sido por azar y no por ligamiento fuera mínima.

Los grupos de ligamiento cubren 696,01 cM con un promedio entre marcadores de 19,8 cM; los grupos presentaron en su mayoría bajos niveles de saturación, el rango de las distancias entre marcadores fue 1-34,4 cM. Se presentó un alto número de marcadores desligados (30 marcadores), situación que está asociada a la compleja estructura genética que presenta la población evaluada, por lo cual se

hace necesario continuar con la saturación de este mapa. Los detalles de los grupos de ligamiento formados se muestran en el anexo E.

Los grupos de ligamiento obtenidos en este estudio son similares a lo reportado por Mba *et al.*, (2001); Zárate, (2002); Marín, (2002) y Okogbenin *et al.* (2006), quienes desarrollaron mapas genéticos de yuca basados en marcadores microsatélites; aunque la densidad del mapa de la población B1PD280 es menor. Los grupos de ligamiento obtenidos fueron reorganizados de acuerdo al mapa genético establecido para yuca, así se reestablecieron 11 grupos de ligamiento. De éstos 3 no habían sido identificados previamente como se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Correspondencia entre los grupos de ligamiento del mapa de la población B1PD280 y los grupos previamente identificados, número de marcadores que los conforman y tamaño (cM).

Grupo de ligamiento (B1PD280)	Número marcadores	Tamaño (cM)	G. Ligamiento previamente establecido en el mapa de yuca
1 + 11	3+3	29,55 + 18,81	K + K*
2	2	33,57	1**
3	7	141,96	O
4 + 13	2+6	10,50 + 105,73	E* + E
5 + 9	3+2	24,01 + 15,99	F + F*
6	3	39,51	L
7	4	54,84	C
8	2	30,59	2**
10	3	6,22	M
12	3	49,73	D
14	2	29,58	H
15	3	50,76	G
16	2	23,01	B
17	2	31,61	3**

* indica grupos de ligamiento previamente identificados pero con bajo número de marcadores ligados que complementan a un grupo con mayor número de marcadores.

**Grupos de ligamiento que no han sido previamente identificados

En la Figura 20 se observa el mapa genético obtenido para la población B1PD280.

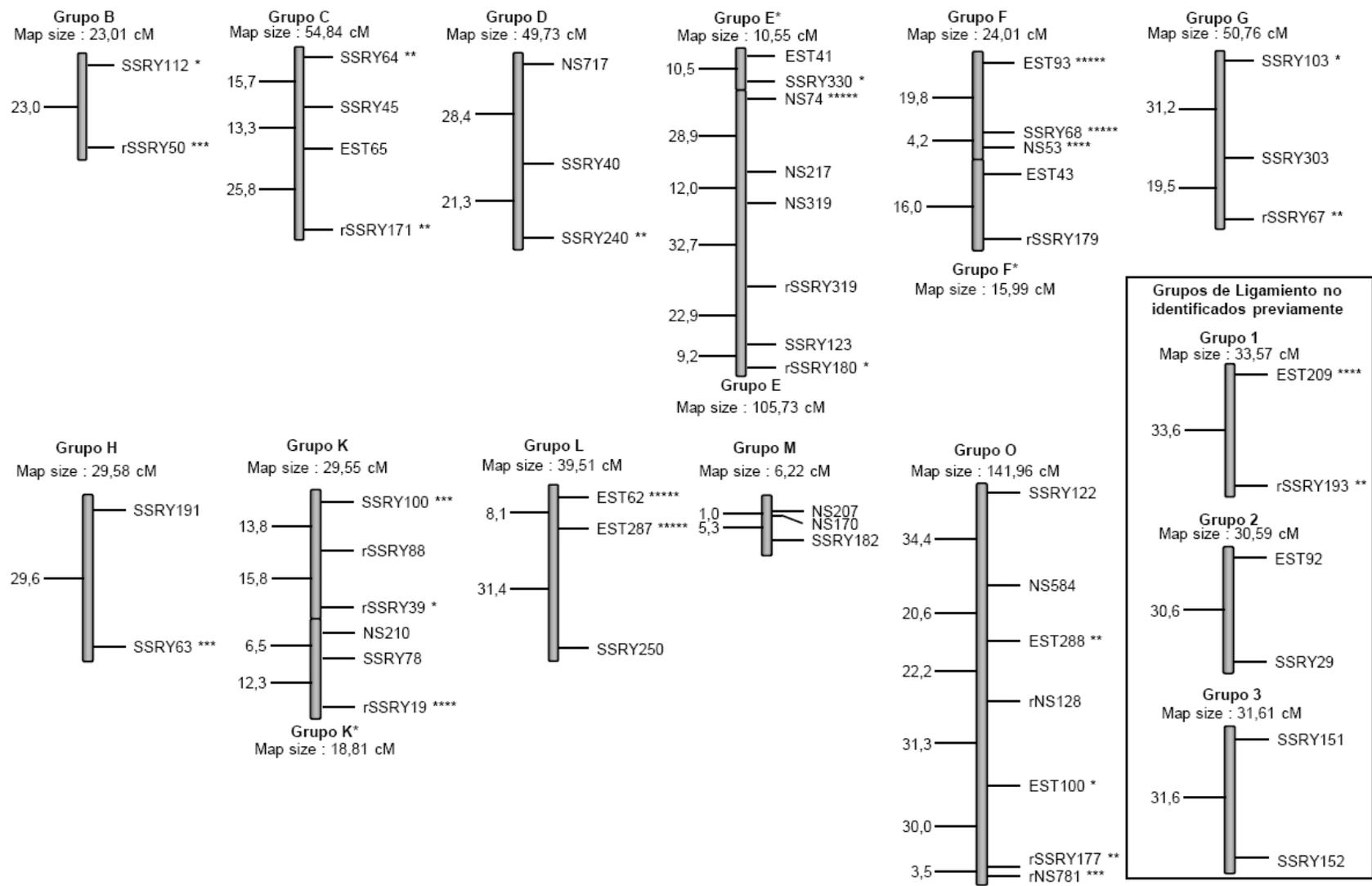


Figura 20. Mapa genético molecular basado en microsatélites en la familia B1PD280, se detalla el tamaño del grupo de ligamiento, las distancias entre marcadores (cM) y los marcadores ligados.

Los marcadores que conforman los grupos de ligamiento al igual que el promedio de distancia entre marcadores es similar a lo reportado en mapas previos desarrollados en yuca, sin embargo, existe la necesidad de saturar el mapa por cuanto hay un bajo número de grupos de ligamiento y un alto número de marcadores desligados. El cubrimiento del genoma obtenido en el mapa de la familia B1PD280 es menor con respecto al primer mapa de ligamiento construido por Fregene *et al.* (1997), quienes obtuvieron un mapa que consta de 20 grupos de ligamiento que cubren 931.6 cM del genoma de la yuca o un estimado de 60% del genoma. En el primer mapa de yuca usando marcadores microsatélites desarrollado por Ekogbenin, *et al.* (2006), se usaron 100 marcadores, los cuales mostraron una cobertura de 1236.7 cM (22 grupos), con una distancia entre marcadores de 17,92 cM. Comparando estos resultados previos con lo obtenido en este estudio, se observa que existe similitud en cuanto a las distancias entre marcadores; sin embargo, la cantidad de marcadores que conforman el mapa de la población B1PD280 es relativamente baja con respecto a lo usado en estos estudios.

4.2.4. Identificación de QTLs asociados al DFP y MS. Usando el mapa de ligamiento construido para la población B1PD280 fue posible localizar QTLs asociados al DFP y MS. Para efectuar su detección se usó el análisis de marcador simple, el cual está basado en una regresión simple entre la segregación de un marcador y la variación fenotípica de DFP y MS. Además de la resistencia al DFP se analizó el contenido de materia seca inicial (MS₀), característica cuantitativa que en los análisis fenotípicos mostró alta correlación con el DFP.

Para obtener una idea rápida de las posibles regiones QTLs dentro del genoma de yuca (todos los grupos de ligamiento), se realizó un análisis de marcador simple utilizando el software Windows QTL Cartographer (WinQTLCart) versión 2.5 (Statistical Genetics, North Carolina State University, USA), mediante el cual se obtuvieron diferentes asociaciones entre los marcadores y las características

fenotípicas evaluadas con diferentes niveles de significancia, se consideró como mínimo valor de probabilidad 0.05. En la Figura 21 se muestran los QTLs detectados mediante este análisis.

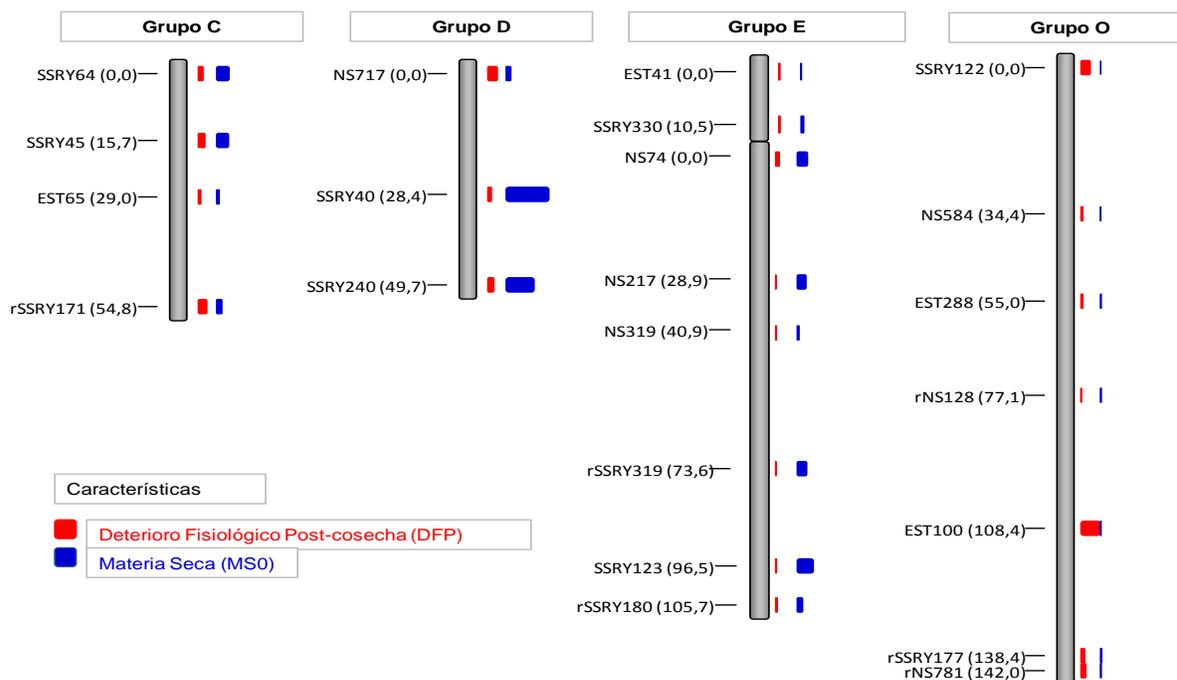


Figura 21. Posibles QTLs asociados con la respuesta al DFP y MS en la población B1PD280. Los grupos de ligamiento C y O presentan QTLs asociados a la resistencia al DFP. Los grupos C, D y E presentan QTLs asociados a bajo contenido de MS.

Para resistencia al DFP se encontraron 3 posibles QTLs asociados. Los marcadores EST100 y SSRY122 se encuentran en el grupo O con niveles de significancia de $p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente. Por su parte, el marcador SSRY171 se encuentra en el grupo C y su nivel de significancia es de $p < 0.05$. El marcador EST100 además de presentar una asociación altamente significativa con la resistencia al DFP explicó el 7.66% de la variación fenotípica, seguido en orden de importancia por los marcadores SSRY171 y SSRY122 los cuales explicaron el 3.87 y 3.70%, respectivamente.

En el cuadro 7 se muestran los valores de varianza fenotípica que explican estos marcadores y su significancia. Los cocientes de verosimilitud (LR) estimados son altos por lo tanto la probabilidad de que exista asociación entre la segregación del marcador y la variación fenotípica es alta.

Cuadro 7. Regiones QTLs asociadas con la respuesta al DFP en la población B1PD280, marcadores microsatélites y varianza fenotípica explicada.

GL	Marcador	Varianza explicada (%)	LR	pr(F)
O	EST100	7.66	6,723	0,010*
O	SSRY122	3.70	3,917	0,049*
C	rSSRY171	3.87	3,889	0,050*

Para el contenido de materia seca (MS0) se encontró una relación altamente significativa con los marcadores SSRY40 y SSRY240 del grupo de ligamiento D, los cuales explican una variación de 17.38 y 11.32%, respectivamente; seguido por el grupo E cuyo marcador SSRY123 explica el 5.87% con una significancia de $p < 0.05$. Finalmente los marcadores SSRY64 y SSRY45 ubicados en el grupo C explican alrededor del 5% de la variación fenotípica de MS0. Estos resultados se muestran en el cuadro 8.

Cuadro 8. Regiones QTLs asociadas con el contenido de materia seca inicial

GL.	Marcador	Varianza explicada (%)	LR	pr(F)
D	SSRY40	17.38	16,549	0,000 **
D	SSRY240	11.32	11,940	0,001 **
E	SSRY123	5.87	6,315	0,012 *
C	SSRY64	5.00	5,657	0,018 *
C	SSRY45	4.76	5,410	0,021 *

Los QTLs encontrados para MS provienen del parental donante, el cual presenta bajo contenido de MS. Un evento indeseable de ligamiento se presentó en el

grupo C, el cual contiene tanto QTLs asociados con la resistencia al DFP como para MS. Una alta correlación positiva entre DFP y MS fue descrita previamente en el análisis de datos fenotípicos confirmando este hallazgo.

Los bajos valores de varianza fenotípica explicada por cada marcador pueden presentarse por la presencia de muchos genes con efectos menores que podrían estar involucrados en la respuesta al DFP. Sin embargo la saturación del mapa podría proveer mejor información sobre los QTLs asociados al DFP. De acuerdo a los resultados obtenidos por Cortes *et al*, (1999, 2002) en el mapeo de QTLs asociados al DFP usando 144 genotipos de la población usada por Fregene *et al*, (1997); el grupo C (grupo que fue obtenido en este estudio), presentó regiones QTLs asociadas que explicaron el 13% de la variación fenotípica, adicionalmente se detectaron QTLs en los grupos G, P, L, U y X del mapa derivado del parental femenino que explicaron entre 5-12% de la variación, y en el grupo L del parental masculino, QTLs que explicaron el 11% de variación.

En el estudio realizado por Jorge *et al*. (2000), se encontraron valores superiores de varianza fenotípica explicada en características cuantitativas de interés, para el mejoramiento de la resistencia cuantitativa a la pudrición bacteriana (CBB). En este estudio se encontraron 8 QTLs, localizados sobre los grupos de ligamiento B, D, L, N, y X de la estructura del mapa derivada desde el parental femenino, los cuales explicaron entre el 9-20% de la variación en la respuesta a esta enfermedad, y 4 QTLs sobre los grupos de ligamiento G y C desde el parental masculino que explicaron entre el 10.7-27.1% de la variación. Similar a lo obtenido en este estudio el grupo C parece contener regiones QTL asociadas a la respuesta de estrés biótico. Sin embargo, en este estudio los resultados sugieren que aunque varios genes podrían estar involucrados en la expresión de esta característica, el efecto de algunos de ellos es mayor y primordial.

El proceso de mejoramiento genético sobre la resistencia al DFP usando mapeo genético y de QTLs permitió detectar el verdadero valor y potencial genético desde

Manihot walkerae, puesto que mediante el uso de la información fenotípica de respuesta al DFP, contenido de MS y la información arrojada por los marcadores moleculares fue posible identificar efectos positivos y negativos desde el parental donante. Esta información permitirá explotar eficientemente la variabilidad genética de la yuca, en especial en la obtención de genotipos con resistencia al DFP.

La utilización de la estrategia AB-QTL permitió establecer que la desafortunada correlación fenotípica entre DFP y MS es explicada por la presencia de ligamiento entre las regiones del genoma involucradas en la expresión de estas características, puesto que el grupo C contiene QTLs asociados tanto a DFP como a MS. En concordancia con estudios realizados en otros cultivos de interés (Fulton *et al.*, 1997; Bernacchi *et al.*, 1998, Monforte y Tanksley, 2000, Fulton *et al.*, 2002; Frary *et al.*, 2004, Xiao *et al.*, 1998, Septiningsih *et al.*, 2003, Thomson *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004); la estrategia usada en este estudio permitió identificar regiones QTLs que provienen del parental donante y que han sido transferidas a la población B1PD280 con efectos positivos (resistencia al DFP) y con desafortunados efectos negativos o presencia de genes deletéreos (bajo contenido de MS).

La información obtenida en cuanto a los marcadores que se encuentran asociados a los QTLs tanto para la resistencia a DFP como para MS constituyen un avance en la aplicación del esquema AB-QTLs en yuca, su posterior investigación y utilización en los procesos de selección podrán contribuir en la eficiencia del mejoramiento genético de la yuca mediante selección positiva (DFP) y negativa (MS) en el proceso de selección asistida por marcadores (MAS).

Los genotipos con alto potencial para ser usados como parentales en el siguiente ciclo de retrocruzamiento se muestran en el anexo F. Los resultados obtenidos aquí confirman el potencial del germoplasma silvestre, ya que proveen una gran cantidad de genes útiles que pueden ser transferidos hacia los materiales

comerciales. Los estudios de mapeo y detección de QTLs usando marcadores moleculares aportan al conocimiento acerca de la característica y su genética, y al mismo tiempo son una herramienta para aumentar la eficiencia en el proceso de introgresión, puesto que permiten detectar la presencia de genes con efectos indeseables. En yuca, este avance ha sido obtenido para la resistencia al virus del mosaico africano (CMD), según lo reportado por Okogbenin *et al.* (2007). Actualmente es posible realizar genotipificación y preselección de las poblaciones en el proceso de mejoramiento, lo que ha permitido la obtención de nuevas variedades mediante la introgresión de características útiles desde donantes silvestres.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados fenotípicos confirman el éxito en la introgresión de la resistencia al deterioro fisiológico desde el pariente silvestre *M. walkerae*, encontrándose un 20% de genotipos con alta resistencia al DFP, que posiblemente serán usados como parentales para el siguiente ciclo de retrocruzamiento.

Se estableció una correlación positiva entre el DFP y contenido de materia seca (0.288, $p < 0.001$), constituyéndose en un desafío en la obtención de materiales mejorados.

Se estableció una correlación entre DFP y pérdida del contenido de humedad (-0.264, $p < 0.01$), correlación que no ha sido descrita anteriormente y que requiere de mayor investigación a fin de comprender el proceso de DFP y los mecanismos de la resistencia al DFP desde *M. walkerae*.

Se construyó un mapa genético para la población B1PD280 usando 52 marcadores microsátélites, los cuales formaron 17 grupos de ligamiento que cubren 696.01 cM (promedio entre marcadores de 19.8 cM), sin embargo se encontró un bajo nivel de saturación y una gran cantidad de marcadores desligados lo que sugiere la necesidad de continuar con la saturación de este mapa.

El análisis de marcador simple permitió identificar 3 regiones QTLs (EST100, SSRY122 y SSRY171) con efectos favorables asociados a la resistencia al DFP ubicadas en los grupos de ligamiento O y C, las cuales fueron donadas por el parental CW429-1. Sin embargo la mayor saturación del mapa podría proporcionar mayor información sobre QTLs asociados con mayor probabilidad y varianza explicada que los obtenidos en este estudio.

Se identificaron 5 QTLs asociados con bajo contenido de materia seca (SSRY40, SSRY240, SSRY123, SSRY64 y SSRY45) ubicados en los grupos de ligamiento D, E y C provenientes desde el parental CW429-1. Lo cual corresponde a alelos indeseables que inevitablemente están presentes en los procesos de introgresión y que se requiere continuar su estudio para minimizar su efecto en las variedades comerciales

Se observó que la desafortunada correlación entre DFP y MS podría presentarse por eventos de ligamiento entre las regiones del genoma asociadas con estas características, por cuanto los QTLs asociados a DFP (SSRY171) y a MS (SSRY64 y SSRY45) están ubicados en el grupo de ligamiento C.

La utilización de la estrategia AB-QTL permitió identificar regiones QTLs que provienen del parental donante (CW429-1) y que han sido transferidas a la población B1PD280 con efectos positivos para la resistencia al DFP y con desafortunados efectos negativos sobre MS.

Los resultados obtenidos en este estudio constituyen un avance y un ejemplo de la utilidad de la aplicación de la estrategia de análisis de QTL en retrocruzamientos para la selección positiva y negativa durante el desarrollo de variedades mejoradas de yuca usando procesos de introgresión desde especies silvestres y selección asistida por marcadores.

BIBLIOGRAFIA

ALLEM, A.C. 1994. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). Genetic Resources and Crop Evolution 41: 133-150.

AVERRE, C. 1967. Vascular streaking of stored cassava roots. Proceedings of 1st International Symposium on Tropical Root Crops, Trinidad.

BALADIN, T., VAN DER DOES, C., AIBERT, J.M.B., BOL, J.F. and LINTHORST, H.J.M. 1995. Structure and induction pattern of novel proteinase inhibitor class-II gene of tobacco. Plant mol Biol. 27: 1197-1204.

BEECHING, J.R., DODGE, A.D., PHILLIPS, H.M. and WENHAM, J.E. 1994. Physiological deterioration in cassava: possibilities for control. Tropical Science. 34: 335-343.

BEECHING, J.R., HAN, Y., GÓMEZ-VÁSQUEZ, R., DAY, R.C. and COOPER, R.M. 1998. Wound and defense responses in cassava as related to post-harvest physiological deterioration. Recent Adv. Phytochem. 32: 231–248.

BEECHING, J.R., HAN, Y., LI, H., REILLY, K., BUSCHMANN, H., GOMEZ-VASQUEZ, R., RODRIGUEZ, M.X., CORTES, D.F., TZIMAS, G., COOPER, R.M. and THOME, J. 1999. Improving a tropical crop: cassava. Poster presentado en: "Molecular Biology's Role in Enhancing Agricultural Productivity". Amsterdam, Marzo 14-16.

BEECHING, J., DODGE, A., MOORE, K., WENHAM, J. 1995. Physiological deterioration in cassava: An incomplete wound response?. Págs 729-736. En: Thro A-M and Roca W. (ed.). The Cassava Biotechnology Network: Proceedings of the Second International Scientific Meeting. Aug 22-26, 1994, Bogor- Indonesia.

BERNACCHI, D., BECK-BUNN, T., ESHED, Y., LOPEZ, J., PETIARD, V., UHLIG, J., ZAMIR, D. and TANKSLEY, S. 1998. Advanced backcross QTL analysis in tomato. Identification of QTLs for traits of agronomic importance from *Lycopersicon hirsutum*. Theor Appl Genet 97: 381-397

BEST, R. and HENRY, G. 1992. *Report of the First Meeting of the International Network for Cassava Genetic Resources*, eds. Roca, W. M. and Thro, A. M. (Cent. Int. Agric. Trop., Cali, Colombia), pp. 3–11.

BEST, R., WHEATLEY, C., CHUZEL, G. 1992. Cassava processes and product development at CIAT. En: Howeler, R H. Cassava Breeding, Agronomy and Utilization research in Asia. Proc. Third Regional Workshop held in Malang, Indonesia. Bangkok, Thailand, CIAT.

BRAINBRID G.E.; TOMLINS, K. and WELLINGS, K. (1996). Methods for assessing quality characteristics of non-grain starch samples. Natural Resources Institute.

BLAIR, M., FREGENE, M., BEEBE, S. and CEBALLOS, H. 2007. Marker-assisted selection in common beans and cassava. Pags. 81-115. In: Guimarães, E.; Ruane, J.; Scherf, B.; Sonnino, A. and Dargie, J. (ed). Marker-assisted selection: current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. FAO- Roma.

BRAR D.S. and KHUSH, G.S. 1993. Application of biotechnology in integrated pest management. *Journal Insect of Science* 6: 7-14.

BUSCHMANN, H., RODRIGUEZ, M.X., TOHME, J., BEECHING, J.R. 2000a. Accumulation of hydroxycoumarins during post-harvest deterioration of tuberous roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Annals of Botany* 86: 1153±1160.

BUSCHMANN, H., REILLY, K., RODRIGUEZ, M.X., TOHME, J., BEECHING, J.R. 2000b. Hydrogen Peroxide and Flavan-3-ols in Storage Roots of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) during Postharvest Deterioration. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 5522-5529.

CEBALLOS, H. and DE LA CRUZ, G. 2002. Taxonomía y morfología de la yuca. En: Ceballos, H. and Ospina, B. (Eds), La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT. Pp 15-32-

CEBALLOS, H., IGLESIAS, C.A., PEREZ, J.C. and DIXON, A.G.O. 2004. Cassava breeding: opportunities and challenges. *Plant Molecular Biology* 56: 503–516.

CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P., MAYA, M., BONIERBALE, M., KRESOVICH, S., FREGENE, M., TOHME, J. and KOCHERT, G. 1998. Microsatellites in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. *Theor Appl Genet.* 97: 493-501.

CHAVEZ, A.L., SANCHEZ, T., JARAMILLO, G., BEDOYA, J.M., ECHEVERRY, J. BOLAÑOS, E.A., CEBALLOS, H. and IGLESIAS, C.A. 2005. Variation of quality traits in cassava roots evaluated in landraces and improved clones. *Euphytica* 143: 125-133

CIAT, 2002. Annual report from IP3 project: improved cassava for the developing world. Cali, Colombia: CIAT, Apdo. Aéreo 6713.

CLAROS, J.L., ALVAREZ, E. and FREGENE, M. 2005. Evaluations of wild relatives of cassava for resistance to the cassava bacterial blight (CBB) in the screen house and association of resistance with Resistance Gene Analogs (RGAs). Annual Report Project IP3-CIAT. Output 12: 38-39.

CLOWES, A.E.E., TATHAM, A.S., BEECHING, J.R. and SHREWRY, P.R. 1995. Characterization of cassava roots proteins. En: A.M Thro, W. Roca (ed). *The Cassava Biotechnology Network: Proceedings of the second international scientific meeting.* Cali, Colombia: CIAT, 716-728.

COCK, J. H. (1985) *Cassava: New Potential for a Neglected Crop*, 191. Boulder, Colorado: Westview Press.

CORTÉS, D.F. 1999. Identificación de marcadores moleculares de genes implicados en el proceso de deterioro fisiológico post-cosecha de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis de pregrado. Universidad del Valle.

CORTÉS, D.F., REILLY, K. OKOGBENIN, E., BEECHING, J. IGLESIAS, C. and TOHME, J. 2002. Mapping wound-response genes involved in post-harvest physiological deterioration (PPD) of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* 128: 47-53.

COURSEY, D.G. and BOOTH, R.H. 1977. Post-harvest problems of non-grain staples. *Acta Horticulturae*, 53: 23-33.

CUAMBE, C.E. 2007. Evaluación del deterioro fisiológico poscosecha y mapeo preliminar de QTLs en el primer retrocruzamiento derivado del híbrido inter-específico (CW429-1) entre *Manihot esculenta* Crantz y la especie silvestre *Manihot walkerae* Croizat. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 86 p.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.R. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1:19.

DOMÍNGUEZ, C.E. 1983. Morphology of the cassava plant. CIAT, Cali, Colombia

EKUNDAYO, J.A. and DANIEL, T.M. 1973. Cassava rot and its control. Transactions of the British Mycological Society, 61: 27-32.

FAO and IFAD. 2001. The global cassava development strategy and implementation plan Volume 1. Proceedings of the validation forum on the global cassava development strategy. FAO, Rome.

FRARY, A., DOGANLAR, S., DAUNAY, M.C. and TANKSLEY, S.D. 2003. QTL analysis of morphological traits in eggplant and implications for conservation of gene function during evolution of solanaceous species. Theor Appl Genet 107:359–370

FRARY, A., FULTON, T.M., ZAMIR, D. and TANKSLEY, S. D. 2004. Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* _ *L. pennellii* cross and identification of possible orthologs in the Solanaceae. Theor Appl Genet 108:485–496.

FREGENE, M. and MBA, C. 2004. Marker-Assisted Selection (MAS) In: Hershey C. (ed) Cassava Breeding. FAO, Rome Italy.

FREGENE, M., ANGEL, F., GOMEZ, R., RODRIGUEZ, 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., OKOGBENIN, E., MBA, C., ANGEL, F., SUAREZ, M., GUTIERREZ, J., CHAVARRIAGA, P., ROCA, W., BONIERBALE, M. and TOHME, J. 2001. Genome mapping in cassava improvement: Challenges, achievements and opportunities *Euphytica* 120: 159–165.

FULTON, T. M., NELSON, J. C. and TANKSLEY, S. D. 1997. Introgression and DNA marker analysis of *Lycopersicon peruvianum*, a wild relative of the cultivated tomato, into *Lycopersicon esculentum*, followed through three successive backcross generations. *Theor Appl Genet* 95 : 895-902.

FULTON, T.M., BUCHELI, P., VOIROL, E., LOPEZ, J., PETIARD, V. and TANKSLEY, S.D. 2002. Quantitative trait loci (QTL) affecting sugars, organic acids and other biochemical properties possibly contributing to flavor, identified in four advanced backcross populations of tomato. *Euphytica* 127: 163–177.

GONÇALVES, W.M. and GUEVARA, C. 1998. Descriptores morfológicos e agronomicos para a caracterizaÇao de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Memorias do workshop latinoamericano sobre recursos geneticos de madioca. Brasil. 1995. EMBRAPA. Documentos CNPMF Nº 78. 38 p.

GRACE, M.R. 1977. Cassava processing. FAO, Rome.

HIROSE, S., DATA, E.S., QUEVEDO, M.A., URITANI, I. 1984. Relation between respiration and post-harvest deterioration in cassava roots. *Japanesse Journal of Crop Science* 53: 187- 196

HUANG, J; BACHEM, C; JACOBSEN, E and VISSER, R. 2001. Molecular analysis of differentially expressed genes during posharvest deterioration in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) tuberous roots. *Euphytica* 120: 85-93.

INGRAM, J.S., HUMPHRIES, J.R.O. 1972. Cassava Storage: A review. *Tropical Science* 14: 131-148

JENNINGS, D.L. and HERSHEY, C.H. 1985. Cassava breeding: A decade of progress from international programs. In: G.E. Russell (Ed.), *Progress in Plant Breeding*, pp 89–116. Butterworths. London, Boston.

JORGE, V., FREGENE, M.A., DUQUE, M.C., BONIERBALE, M.W., TOHME, J. and VERDIER, V. 2000. Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet* 101:865–872.

JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A. and STEVENS, P.F. 1999. *Plant systematic: A phylogenic Approach*. USA. Sinauer. 464 p.

KOSAMBI, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172 – 175.

LAMKEY, K. R. and LEE, M. 1993. Quantitative genetics, molecular markers, and plant improvement. p. 104-115. In: B. C. Imrie and J. B. Hacker (ed.) *Focused plant improvement: Towards responsible and sustainable agriculture*. Proc. 10th Australian Plant Breeding Conf., Gold Coast, 18-23 April 1993. Organising committee, Australian Convention and Travel Service: Canberra

LAWSON, D.M., LUNDE, C. and MUTSCHLER, M.A. 1997. Marker assisted transfer of acylsugar mediated pest resistance from wild tomato, *Lycopersicon pennellii*, to the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Molecular Breeding* 3: 307-317.

LI, J., XIAO, J., GRANDILLO, S., JIANG, L., WAN, Y., DENG, Q., YUAN, L. and McCOUCH, S. 2004. QTL detection for rice grain quality traits using an interspecific backcross population derived from cultivated Asian (*O. sativa* L.) and African (*O. glaberrima* S.) rice. *Genome* 47: 697–704.

LIU, B.H. 1997. *Statistical genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis*. CRC press, Boca Raton, FL, USA.

MAGOON, M.L., KRISHNAN, R. and BAI, K.V. 1969. Morphology of the pachytene chromosomes and meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. *Cytol Tokyo* 34:616-626.

MAJUMDER, S.K. 1955. Some studies on the microbial rot of tapioca. *Bull. Cent. Food, Technology, Res. Inst. (Mysore)*: 4:164

MANN, C. 1997. Reseeding the Green Revolution. *Science* 277, 1038–1043.

MARIN, J.A. 2002. Mapeo genético y análisis asistido por marcadores "microsatélites" de la genética del rendimiento en una población F₂ de yuca (*Manihot esculenta* crantz). Tesis de Grado. Universidad del Tolima. Ibagué. 111 p.

MARTIN, F.W. 1976. Cytogenetics and plant breeding of cassava. *Commonwealth Bureau of Plant Breeding and Genetics* 46: 909-916.

MBA, R., STEPHENSON, P., EDWARDS, K., MELZER, S., NKUMBIRA, J., GULLBERG, U., APEL, K., GALE, M., TOHME, J., and FREGENE, M. 2001. Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. *Theor Appl Genet* 102:21–31.

MOHAN, M.; NAIR, S., BHAGWAT, A., KRISHNA, T.G., YANO, M., BHATIA, C.T. and SASAKI, T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3: 87–103.

MONCADA, M.P. 2003. Mapeo de QTL: métodos de análisis. En: Memorias cursos y simposios del Congreso de la Sociedad Colombiana de Fitomejoramiento y Producción de Cultivos, Bogotá (Colombia), Julio 2-5.

MONFORTE, A.J. and TANKSLEY, S.D. 2000. Fine mapping of a quantitative trait locus (QTL) from *Lycopersicon hirsutum* chromosome 1 affecting fruit characteristics and agronomic traits: breaking linkage among QTLs affecting different traits and dissection of heterosis for yield. *Theor Appl Genet* 100:471–479

NELSON, R.J. 1996. Marker-assisted plant breeding. In: G.J. Perley (ed.) *Biotechnology and integrated pest management*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 186-204.

NOON, R.A., BOOTH, R.H. 1977. Nature of post-harvest deterioration of cassava roots. *Transactions of the British Mycological Society* 69: 287-290

OIRSCHOT, Q., O'BRIEN, G., DUFOUR, D., EL-SHARKAWY, M. and MESA, E. 2000. The effect of pre-harvest pruning of cassava upon root deterioration and quality characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (13): 1866-1873.

OJULONG, H., LABUSCHANGNE, M. T., FREGENE, M. and HERSELMAN, L. 2007. A cassava clonal evaluation trial based on a new cassava breeding scheme. *Euphytica*. Published online: 16 October.

OKOGBENIN, E. and FREGENE, M. 2002. Genetic analysis and QTL mapping of early root bulking in an F1 population of non-inbred parents in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet* 106:58–66.

OKOGBENIN, E. and FREGENE, M. 2003. Genetic mapping of QTLs affecting productivity and plant architecture in a full-sib cross from non-inbred parents in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet* 107:1452–1462

OKOGBENIN, E., MARIN, J. and FREGENE, M. 2006. An SSR-based molecular genetic map of cassava. *Euphytica* 147: 433–440.

OKOGBENIN, E., PORTO, M.C.M., EGESI, C., MBA, C., ESPINOSA, E., SANTOS, L.G., OSPINA, C., MARÍN, J., BARRERA, E., GUTIÉRREZ, J., EKANAYAKE, I., IGLESIAS, C. and FREGENE, M.A. 2007. Marker-assisted introgression of resistance to cassava mosaic disease into Latin American germplasm for the genetic improvement of cassava in Africa. *Crop science* 47: 1-10.

OLSEN, K. and SCHAAL, B. 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 96, pp. 5586–5591.

ORTIZ, A. 2002. Detección de nuevos QTLs relacionados con la eficiencia en la toma de fósforo en una población segregante de maíz F_{2:3} (*Zea mays* L) tolerante a suelos ácidos en la altillanura colombiana. Tesis de grado. Universidad Pontificia Javeriana. 125 p.

OSBORN, T.C., ALEXANDER, D.C., FOBES, J.F. 1987. Identification of restriction fragment length polymorphisms linked to genes controlling soluble solids content in tomato fruit. *Theor Appl Genet* 73: 350–356.

OSPINA, C., MACEA, E., BARRERA, E., MORANTE, N., GUTIERREZ, J. and FREGENE, M. 2005. Resistance to the cassava green mites in first backcross derivatives of *M. esculenta* sub spp *flabellifolia*. Annual Report Project IP3-CIAT. Output 12: 35-37.

PASSAM, H.C. and NOON, R.A. 1977. Deterioration of yams and cassava during storage. *Ann. App. Biol.*, 85: 436-440.

PATERSON, A.H., TANKSLEY, S.D., SORRELLS, M.E. 1991. DNA markers in plant improvement. *Adv Agron* 46: 39–90.

PERRY, A.B. 1943. Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae. *American Journal of Botany* 30: 527-543.

PLUMBLEY, R.A., RICKARD, J.E. 1991. Post-harvest deterioration in cassava. *Tropical science*. 31: 295-303.

REILLY, K., BERNAL, D.,CORTES, D., GOMEZ-VASQUEZ, R., TOHME, J. and BEECHING, J. 2007. Towards identifying the full set of genes expressed during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Mol Biol* 64:187–203.

REILLY, K., GOMEZ-VASQUEZ,R., BUSCHMANN,H.,TOHME, J. and BEECHING, J., 2003. Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Molecular Biology* 53: 669–685.

RICKARD, J.E. 1985. Physiological deterioration of cassava roots. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36: 167-176.

RODRÍGUEZ, M.X. 2001. Towards identifying markers for postharvest Physiological deterioration in Cassava (*Manihot esculenta* crantz). Thesis of Doctor of Philosophy of the University of Bath.

RODRIGUEZ, M.X., BUSCHMANN, H., IGLESIAS, C. and BEECHING, J.R. 2000. Production of antimicrobial compounds in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots during post-harvest physiological deterioration. In: Carvalho LJCB, Thro AM, Vilarinhos AD, eds. *Cassava Biotechnology. IVth International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network*. Embrapa, Brasilia. 320±328.

ROGERS, D.J. and APPAN, S.G. 1973. *Manihot, Manihotoides, Euphorbiaceae, Flora Neotropica*. Hafner Press, York, NY. 272 p.

ROSS, A.H., MANNERS, J.M. and BIRCH, R.G. 1995. Molecular cloning and characterization of peroxidases from buffel grass *Cenchrus ciliaris*. *Plant Science* 110: 95-103.

SEBOLT, A.M., SHOEMAKER, R.C. and DIERS, B.W. 2000. Analysis of a Quantitative Trait Locus Allele from Wild Soybean That Increases Seed Protein Concentration in Soybean. *Crop Sci*. 40:1438–1444.

SEPTININGSIH, E. M., TRIJATMIKO, K. R., MOELJOPAWIRO, S. and McCOUCH S. R. 2003. Identification of quantitative trait loci for grain quality in an advanced backcross population derived from the *Oryza sativa* variety IR64 and the wild relative *O. rufipogon*. *Theor Appl Genet* 107:1433–1441.

STAUB, J.E., SERQUEN, F.C. and GUPTA, M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. HortScience. 31(5): 729-741.

TANAKA, Y., DATA, E.S., HIROSE, S., TANIGUCHI, T. and URITANI, I. 1983. Biochemical changes in secondary metabolites in wounded and deteriorated cassava roots. Agricultural and Biological Chemistry 47: 693±700.

TANKSLEY, S.D. and HEWITT, J. 1988. Use of molecular markers in breeding for soluble solids content in tomato a re-examination. Theor Appl Genet 75: 811–823.

TANKSLEY, S.D. and NELSON, J.C. 1996. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. Theor Appl Genet 92 (2): 191-203.

TAYLOR, N.J., MASONA, M.V., SCHOPKE, C. and FAUQUET, C.M. 2002. Transgenic cassava for food security and economic development. In: G.G. Khachatourians, A. McHughen, R. Scorza, W.K. Nip and Y.H. Hui (Eds.) Transgenic Plants and Crops, Marcel-Dekker, New York, pp. 523–546.

THOMSON, M.J., TAI, T.H., MCCLUNG, A.M., LAI, X-H., HINGA, M. E., LOBOS, K. B., XU, Y., MARTINEZ, C.P. and McCOUCH, S.R. 2003. Mapping quantitative trait loci for yield, yield components and morphological traits in an advanced backcross population between *Oryza rufipogon* and the *Oryza sativa* cultivar Jefferson. Theor Appl Genet 107:479–493

UMANNAH, E.E. and HARTMAN, W. 1973. Chromosome numbers and karyotypes of some Manihot species. Am. Soc. Hortic. Sci. 98: 272-274.

VAN OIRSCHOT, Q.E.A., O'BRIEN, G.M., DUFOUR, D.D., EL-SHARKAWY, M.A. and MESA, E. 2000. The effect of pre-harvest pruning of cassava upon root deterioration and quality characteristics. J Sci Food Agric 80: 1866–1873.

WENHAM, J.E. 1995. Post-harvest Deterioration of Cassava. A Biotechnological perspective. FAO.

WESTBY, A. 2002. Cassava utilization, storage and small scale processing. In: R.J. Hillocks, J.M. Thresh and A.C. Bellotti (Eds.), Cassava: Biology, Production and Utilization. CABI Publishing, pp. 179–207.

WHEATLEY, C. 1982. Studies on Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Root Post-Harvest Deterioration. PhD Thesis. University of London.

WHEATLEY, C. and SCHWABE, W. 1985. Scopoletina Involvement in Post-Harvest Physiological deterioration of Cassava Root (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Experimental Botany* 36 (5): 783-791.

WHEATLEY, C.; LOZANO, C. and GOMEZ, G. 1985. Post-harvest deterioration of cassava roots, In: J.H. Cock and J.A. Reyes (Eds.), *Cassava: Research, Production and Utilization*. pp. 655-671. UNDP-CIAT, Cali.

WU, K.K., BURNQUIST, W., SORRELS, M.E. TEW, T.L., MOORE, P.H. and TANKSLEY, S.D. 1992. The detection and estimation of linkage in polyploids using single dose restriction fragments. *Theor. Appl. Genet.* 81: 471-476.

XIAO, J., LI, J., GRANDILLO, S., AHN, S., YUAN, L., TANKSLEY, S.D. and MCCOUCH, S. 1998. Identification of Trait-Improving Quantitative Trait Loci Alleles From a Wild Rice Relative, *Oryza rufipogon*. *Genetics* 150: 899-909.

YENCHO, G.C., COHEN, M.B. and GEPTS, P. 2000. Applications of tagging and mapping insect resistance loci in plants. *Annual Review* 5: 393-422.

YIN, X., STAM, P., KROPFF, M. and SCHAPENDONK, C.M. 2003. Crop Modeling, QTL Mapping, and Their Complementary Role in Plant Breeding. *Agron. J.* 95:90-98.

YOUNG, N.D. 1994. Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers. *DNA-Based Markers in Plant.* 1:39-57.

ZARATE, A. 2002. Mapeo genético de una población F₁ de yuca cultivada (*Manihot esculenta* crantz) utilizando microsátélites. Tesis de Grado. Universidad del Tolima. Ibagué. 76 p.

ANEXOS

Anexo A. Condiciones de amplificación de microsatélites por PCR

Reactivos y concentraciones usadas para PCR.

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final
Solución Tampón 10X (buffer)	10X	1X
MgCl ₂	25 mM	*
dNTPs	2.5	0.1
Primer Reverse	10 µM	0.2
Primer Forward	10 µM	0.2
Taq ADN polimerasa	1U	0.2
ADN molde	10 ng/ul	2
HPLC H ₂ O	-	-

Pasos, condiciones de temperatura y tiempo para amplificación de SSRs por PCR.

Etapa	Temperatura en °C	Tiempo en minutos
Desnaturalización Inicial	95	2
Desnaturalización	94	1
Alineamiento	45-55	1
Extensión	72	2
Extensión Final	72	5
Finalización PCR	14	Indefinido

Anexo B. Correlación Pearson entre deterioro fisiológico post-cosecha (DFP), escopoletina (ESC), características generales (CARGEN), pudrición (PUD), materia seca (MS0 y MS14) y pérdida de humedad (DIFAGU)

Correlación Pearson entre DFP evaluación a los 14 ddc y ESC, TAM, CARGEN, PUD, MS0, MS14 y DIFAGU.

	DFP	ESC	TAM	CARGEN	PUD	MS0	MS14
ESC	0,523 0,000						
TAM	-0,163 0,064	-0,075 0,406					
CARGEN	0,010 0,916	0,120 0,213	-0,114 0,225				
PUD	-0,070 0,430	-0,027 0,766	0,314 0,000	-0,069 0,464			
MS0	0,288 0,001	0,114 0,200	-0,158 0,073	-0,031 0,745	-0,309 0,000		
MS14	0,521 0,000	0,262 0,005	-0,200 0,033	-0,001 0,992	-0,195 0,040	0,446 0,000	
DIFAGU	-0,264 0,005	-0,149 0,118	0,052 0,586	-0,036 0,717	-0,009 0,924	0,366 0,000	-0,673 0,000

Correlación Pearson entre DFP evaluación a los 7 ddc y ESC, TAM, CARGEN, PUD, MS0, MS14 y DIFAGU

	DFP	ESC	TAM	CARGEN	PUD	MS0	MS14
ESC	0,389 0,000						
TAM	-0,076 0,384	-0,189 0,031					
CARGEN	0,048 0,613	0,079 0,407	-0,186 0,049				
PUD	-0,014 0,874	-0,086 0,347	0,235 0,009	-0,056 0,553			
MS0	0,103 0,239	0,068 0,439	-0,206 0,018	0,011 0,905	-0,259 0,004		
MS14	0,273 0,003	0,146 0,123	-0,247 0,008	0,040 0,693	-0,171 0,078	0,446 0,000	
DIFAGU	-0,195 0,039	-0,094 0,321	0,068 0,472	-0,043 0,670	-0,041 0,676	0,360 0,000	-0,674 0,000

Anexo C. Detalles de los marcadores microsatélites usados

Nº	MARCADOR	TIPO DE REPETICION	Left primer	Right primer	TAM.	TEM.
1	SSRY1	GCC(6)	GCAGCTGCCGCTAATAGTTT	CCAAGAGATTGCACTAGCGA	197	45
2	SSRY19	CT(8)CA(18)	TGTAAGGCATTCCAAGAATTATCA	TCTCCTGTGAAAAGTGCATGA	214	55
3	SSRY25	GA(27)	TGGCTACATGATAGCAACATCAA	CGCATGGTTTGTCTCGTTTA	296	55
4	SSRY29	CT(18)	TGGTAGCTTTTGAATATCTGATGG	TGCCAACCAACCATTATAGAC	281	55
5	SSRY39	CT(24)AT CT(3)AT(3)	TCAATGCATAGGATTTTAAAAGTA	AATGAAATGTCAGCTCATGCT	293	55
6	SSRY40	GA(16)	TGCATCATGGTCCACTCACT	CATTCTTTTCGGCATTCCAT	231	55
		CACACG(3)CACGCGCACACG(3) CACGCG CA(4)CG(2)CA(12) GA(3)G(12)GA(9)				
7	SSRY42		TTCTCCAAAGTTATCTAGAACCA	CAATCCTGTAGTAGCCAGTCTCA	221	55
8	SSRY45	CT(27)	TGAAACTGTTTGCAAAATTACGA	TCCAGTTCACATGTAGTTGGCT	228	55
9	SSRY50	CA(6)N(6)GA(31)	CCGCTTAACTCCTTGCTGTC	CAAGTGGATGAGCTACGCAA	271	55
10	SSRY52	GT(19)	GCCAGCAAGGTTTGCTACAT	AACTGTCAAACCATTCTACTTGC	266	55
11	SSRY57	GA(21)	TGTCATTGTCTGTTGACCATTT	TAACCTGCCAAGAACAAGGC	293	55
12	SSRY63	GA(16)	TCAGAATCATCTACCTTGCGA	AAGACAATCATTTTGTCTCCA	290	55
13	SSRY64	CT(13)CG CT(6)	CGACAAGTCGTATATGTAGTATTCACG	GCAGAGGTGGCTAACGAGAC	194	55
14	SSRY66	GA(19)AAGA	ATCTCAGCTTCCAACCTTTTCAGT	CGAAATGCTTGAGACAGGTATAG	261	55
15	SSRY67	GA(20)TGA	AGTTTGACCACCTTTTTCC	TGTCAAGTGATGAGCTGCTG	278	55
16	SSRY68	CT(12)CC CT(17)	GCTGCAGAATTTGAAAGATGG	CAGCTGGAGGACCAAAAATG	287	55
17	SSRY74	CT(21)	TTGCTCGAATTCACACAAT	GGTCAGGTGAGTAATAAAGAACAGTG	114	55
18	SSRY78	CT(22)	TGCACAGCTTCTGTTCCAT	ATGCCTCCAGTCCAGATAC	248	55
19	SSRY82	GA(24)	TGTGACAAATTTTCAGATAGCTTCA	CACCATCGGCATTAACCTTTG	211	55
20	SSRY88	CA(7)TACATA GA(22)	CCAAGTCTCACCTCCAAAG	CCTTGATGTGGCCAAAGTG	243	55
21	SSRY96	GT(12)	CTTTACCTGCATGCCATTGA	CTCCATGTTATCCAAGGTTGC	149	55
22	SSRY100	CT(17)TT CT(7) CCT	ATCCTTGCCTGACATTTTGC	TTCGCAGAGTCCAATTGTTG	210	55
23	SSRY103	GA(22)	TGAGAAGGAAACTGCTTGAC	CAGCAAGACCATCACCAGTTT	272	55
24	SSRY108	CT(24)CCT	ACGCTATGATGTCCAAAGGC	CATGCCACATAGTTCGTGCT	203	55
25	SSRY112	CT(15)C CT(3) GA(12)GT GA(3)GT GA(3)GT GA(6)N(41)GA(14)	CGCAAGGTAATCGGAGCTA	ACAATCAAAGGAGTCGTGTAATC	117	55
26	SSRY122		AAGCCAATTGTTGTGAGTTGC	GGTGCTTGGTTTATGCCTGT	273	45
27	SSRY123	CT(14)	AGCAGATCCAATCACTGAAA	TTCACAATAAAGCTCAGAAAAGG	136	55
28	SSRY150		CAATGCAGGTGAAGTGAATACC	AGGGTGCTTTCAGAGAAAAGG	175	45
29	SSRY151		AGTGAAATAAGCCATGTGATG	CCCATAATTGATGCCAGTTT	182	45
30	SSRY152		CTCTAGCTATGGATTAGATCT	GTAGCTTCGAGTCGTGGGAGA	233	55
		TA(5)CATA GATA(8) GC GA(23)GTGA(2)				
31	SSRY171		ACTGTGCCAAAATAGCCAAATAGT	TCATGAGTGTGGGATGTTTTATG	291	55
32	SSRY177	CCT(6)CTN(65)CT(4)AT CT(18)	ACCACAACATAGGCACGAG	CACCCAATTCACCAATTACCA	268	45
33	SSRY179	GA(28)	CAGGCTCAGGTGAAGTAAAGG	GCGAAAGTAAGTCTACAACCTTTCTAA	226	55
34	SSRY180	GA(16)G(4) GA(5)	CCTTGGCAGAGATGAATTAGAG	GGGGCATTCTACATGATCAATAA	163	55
35	SSRY182	CA(17)N(31)GAGG GA(8)	GGAATTCTTTGCTTATGATGCC	TTCTTTACAATTCTGGACGC	253	55
36	SSRY 191	(GA)8GTGA(GGGA)2GGA	TTTCATGAACAACCTTTTCTGGGTA (24)	TGTTGGCTGAGAAAGCAAGA (20)	186	60
37	SSRY 193	(CT)10TT(CT)3	CGAAGCTCCGCTCAGTAT (19)	TGGAATCGTTACCAGAAGTG (21)	218	60
38	SSRY 205	(CT)11	CTGTCTTGATTCCGGCAACT (20)	GCAAGTCGTTGCCTACCTTG (20)	201	60
39	SSRY 240	(GA)22	TCGGCTTTTAAACATCCTTCG	AGCTAGGAGCAACGCAGTTC	181	60
40	SSRY 250	(CT)18(ATCT)2CTAT(CT)2	GATCGGATGTCTGAGGAGGA	AATTGGAAGGGAAAGCCAAA	197	60
41	SSRY 303	(CA)34(N)7(GT)6	GCATCATCACCATTTTCTTTG	TGGAAGGTGTTAGCAACTGTG	195	60

Nº	MARCADOR	TIPO DE REPETICION	Left primer	Right primer	TAM.	TEM.
42	SSRY 319	(CT)9	CCAATCCATCCTTCCTCTCA	AGGAAGCAAAGACGACCTGA	170	60
43	SSRY 330	(CT)2TCTC(CT)8	CCACCATCATCATCGTCATC	TTCTTCTTCTCCCAATTGC	193	60
44	NS37		TGAGTGCATGAGAACGTAA	GTGCATCCTTACCAATCCTG	229	55
45	NS40		GCTGTTACGGCCAGAGTAGA	GATGTCTGAAATCCCTCTCTTT	175	55
46	NS53		CCAACGTATGGAATGTGCTG	CCTAAGTTGTTAGCCAGTGATTAGA	242	55
47	NS74		TCGCTGTATGCAATACTTCGTT	TAGTGTTGGGACTCTTTTCG	229	55
48	NS128		AAAGGACAGCGCTACCAGAA	GATCGCTTACCTTCCTCAG	283	55
49	NS158		GTGCGAAATGGAATCAATG	TGAAATAGTGATACATGCAAAAGGA	166	55
50	NS159		TATGGAGCAAAGTCAGCCCT	GTCCATGCACATGCCACTAC	264	55
51	NS170		TTCCTTTACAATTCTGGACGC	AGTCGGGAGTTGGAACCTCT	285	55
52	NS207		AGTCGGGAGTTGGAACCTCT	TTCTTTACAATTCTGGACGC	287	55
53	NS210		AAAGGGAGATTTGCAGAGCA	TGGCTTTGTTGTATGTGGA	251	55
54	NS217		TCAGCTGTATGTTGAGTGAGCA	AGGGAAGGAACACCTCTCCTA	226	55
55	NS319		TTCTAAAGTTGATTAAGCTCTGTG	AGGGAAGGAACACCTCTCCTA	164	55
56	NS584		TTTTATATGCGAGCGTATACGTG	CAGATAGGCGTTCCCAATA	188	50
57	NS717		GCCAAATCGCCAAGGTAATA	GGTGAGTGATAAGGTTACGGC		55
58	NS781		CACCCAATTCACCAATTACCA	GAAGACGACGATGGATAGCTG	205	50
59	NS905		CAAACCTAAACTCCGTCGCGC	TTGGCCTGTAAGGTTCCATC	283	55
60	NS1045	(CT)3(TTCTCT)2N(TC)3(TG)4	GTGTTGTGCCCTTGCTTAG	AAAAGGGTGGCGGATAATG	375	55
61	(ESTs)SSRY41	TCA(7)	CAGCGTCTCTGCGTCAATAA	AGTCGACGATGAGGAAGACG		55
62	(ESTs)SSRY43	CTT(7)	CAGCAGAGCTTTGCCTAACC	AACAAGCACCAACCAATA		55
63	(ESTs)SSRY44	TTC(7)	CATAAACGCGGTCCAAAAAT	ACGAAAATGCGGATTACAGC		55
64	(ESTs)SSRY62	TG(8)	CCATGGCACAATAACATTGG	TGGGCGTAGGACAGTAAGAGA		55
65	(ESTs)SSRY64	TG(9)	CCAACATGCTTCACCAATCA	CATTAGACAACGCAATGTG		55
66	(ESTs)SSRY65	ATG(9)	GCACCAGTCAACATTCTGTA	CATCATTACAACCCCATGA		55
67	(ESTs)SSRY81	CT(11)	CCCACATGTACTTGGGAAGAGA	GTTGGTGGACTCGTGATCT		55
68	(ESTs)SSRY82	TAA(11)	GAAGGCCAGACCAACAATA	TCGAAGGGCTATGGTGCTAT		55
69	(ESTs)SSRY90	AG(13)	GAGCCGAAAAGTTCAAAA	GAGTTTCTGGGGAGGAAAG		55
70	(ESTs)SSRY92	ATA(13)	GGAATTTCAATTCAGACAGG	ACGGCGGCACACTAAATATC		55
71	(ESTs)SSRY93	AG(13)	CAGGAAACCGTGACTTCAT	GCAATGCACATGATTTTGCT		55
72	(ESTs)SSRY94	CT(13)	TCTGCTTTGGCTGGAATTT	TTCCACAAGCATTCCAACA		55
73	(ESTs)SSRY100	AG(17)	GCGCTTTACAGCGTTTTTA	GGTCTTTGCTCCGTGTTAC		55
74	(ESTs)SSRY111	CT(5)	GCAGAAGCAATCTACTCTGG	GCCTCAAAACATGGTAATA		55
75	(ESTs)SSRY209	TTTTT(5)	GCAATGGAAGAAGTTGAGAG	GAGTCAAGTCTCTTTCATGATTAGG		55
76	(ESTs)SSRY266	GAA(6)	CACGATCATCTAACCAACC	GTCATCAGAATCCTCCTCTG		55
77	(ESTs)SSRY271	CTTTT(7)	GTGGTCTTGTACTGCCATT	CCGTATCAAAATCACTCGTT		55
78	(ESTs)SSRY275	GAAAG(7)	GCATAGCAGAGAGAAGAAGG	CGAAGTGGATTTATGGGTAA		55
79	(ESTs)SSRY280	TC(7)	GGTGAATTTGGGGTTAGAT	AGAAGCGGATTGTAAGATCA		55
80	(ESTs)SSRY287	TG(8)	GAGAACTTGGCAACACACTT	AGAAACCCCTAGAGTGAAGG		55
81	(ESTs)SSRY288	TG(10)	TGTAAGTGAATCTCCTGGAC	aCGATTGTCCATTCTTTGTG		55
82	(ESTs)SSRY292	TC(15)	TCTCTTCTCCTTGAACCTCTCC	CATCATAAACTGGTGAGACG		55

	DESCRIPCIÓN	FUENTE
	SSRs	GENOMICOS
	SSRs	cDNA
	SSRs NS	GENOMICOS
	SSRs NS	GENOMICOS
	EST-SSRs	ESTs

Anexo D. Resultados de la prueba Chi_cuadrado

Marcadores ligados en el mapa genético de la población B1PD280

GL	Grupo según mapa de yuca	Marker	$c^2_{1:1}$	p		hmz	htz	n
1	K	SSRY88	0,04	0,83404	ns	101	104	205
1	K	SSRY39	4,02	0,04486	*	119	90	209
1	K	SSRY100	11,60	0,00066	***	79	128	207
2	1	SSRY193	7,15	0,00750	**	120	82	202
2	1	EST209	15,70	0,00007	****	75	132	207
3	O	NS584	0,08	0,77397	ns	99	95	194
3	O	SSRY122	0,48	0,48807	ns	99	109	208
3	O	NS128	1,80	0,18019	ns	91	110	201
3	O	EST100	4,92	0,02650	*	88	120	208
3	O	EST288	7,01	0,00811	**	84	122	206
3	O	SSRY177	8,48	0,00359	**	125	83	208
3	O	NS781	12,50	0,00041	***	125	75	200
4	E`	EST41	0,02	0,89023	ns	106	104	210
4	E`	SSRY330	4,14	0,04181	*	87	116	203
5	F`	SSRY179	0,08	0,78151	ns	106	102	208
5	F`	EST43	0,13	0,72166	ns	101	96	197
6	L	SSRY250	0,84	0,35917	ns	107	94	201
6	L	EST62	21,35	0,00000	*****	69	135	204
6	L	EST287	24,02	0,00000	*****	67	137	204
7	C	SSRY45	0,31	0,57910	ns	100	108	208
7	C	EST65	1,98	0,15937	ns	91	111	202
7	C	SSRY64	8,00	0,00468	**	80	120	200
7	C	SSRY171	8,12	0,00438	**	124	83	207
8	2	SSRY29	0,25	0,61797	ns	95	102	197
8	2	EST92	2,00	0,15730	ns	90	110	200
9	F	NS53	15,70	0,00007	****	75	132	207
9	F	SSRY68	23,84	0,00000	*****	63	131	194
9	F	EST93	24,26	0,00000	*****	66	136	202
10	M	NS207	0,69	0,40763	ns	111	99	210
10	M	SSRY182	1,32	0,25067	ns	105	89	194
10	M	NS170	1,56	0,21200	ns	113	95	208
11	K`	NS210	0,69	0,40538	ns	110	98	208
11	K`	SSRY78	0,96	0,32699	ns	109	95	204
11	K`	SSRY19	17,15	0,00003	****	131	72	203

GL	Grupo según mapa de yuca	Marker	$\chi^2_{1:1}$	p		hmz	htz	n
12	D	NS717	0,02	0,89023	ns	106	104	210
12	D	SSRY40	0,38	0,53553	ns	101	110	211
12	D	SSRY240	7,64	0,00570	**	80	119	199
13	E	SSRY319	0,02	0,88697	ns	98	100	198
13	E	NS217	1,74	0,18664	ns	94	113	207
13	E	SSRY123	2,53	0,11162	ns	93	116	209
13	E	NS319	3,77	0,05220	ns	90	118	208
13	E	SSRY180	3,92	0,04771	*	86	114	200
13	E	NS74	30,72	0,00000	*****	56	132	188
14	H	SSRY191	1,69	0,19393	ns	87	105	192
14	H	SSRY63	11,33	0,00076	***	74	121	195
15	G	SSRY303	1,44	0,23049	ns	109	92	201
15	G	SSRY103	4,64	0,03125	*	82	112	194
15	G	SSRY67	8,04	0,00457	**	125	84	209
16	B	SSRY112	5,36	0,02055	*	85	118	203
16	B	SSRY50	14,53	0,00014	***	115	64	179
17	3	SSRY151	1,57	0,20980	ns	94	112	206
17	3	SSRY152	1,64	0,20083	ns	90	108	198

Marcadores desligados

Nº	Marker	$\chi^2_{1:1}$	p		hmz	htz	n
21	NS1045	6,23	0,01255	*	86	122	208
22	NS159	4,06	0,04384	*	89	118	207
36	SSRY205	5,16	0,02310	*	89	122	211
17	EST90	8,65	0,00328	**	81	123	204
26	NS37	9,78	0,00176	**	81	126	207
43	SSRY108	9,69	0,00185	**	82	127	209
47	SSRY150	9,22	0,00240	**	83	127	210
71	SSRY82	10,17	0,00143	**	81	127	208
73	SSRY96	8,56	0,00343	**	82	124	206
6	EST275	13,34	0,00026	***	72	123	195
32	NS905	11,83	0,00058	***	77	126	203
62	SSRY52	12,07	0,00051	***	75	124	199
5	EST271	17,31	0,00003	****	74	134	208
9	EST292	16,00	0,00006	****	130	73	203
59	SSRY42	18,02	0,00002	****	59	115	174

N°	Marker	$\chi^2_{1:1}$	p		hmz	htz	n
69	SSRY74	16,66	0,00004	****	75	134	209
80	EST81	40,79	0,00000	*****	56	147	203
76	NS158	32,96	0,00000	*****	63	146	209
27	NS40	43,90	0,00000	*****	145	52	197
81	SSRY1	24,02	0,00000	*****	67	137	204
63	SSRY57	35,02	0,00000	*****	55	137	192
66	SSRY66	23,33	0,00000	*****	70	140	210
2	EST111	2,24	0,13429	ns	90	71	161
4	EST266	0,08	0,78048	ns	105	101	206
7	EST280	0,58	0,44673	ns	110	99	209
13	EST44	3,17	0,07488	ns	86	111	197
79	EST64	0,69	0,40538	ns	98	110	208
16	EST82	0,04	0,83242	ns	99	102	201
20	EST94	1,65	0,19854	ns	89	107	196
55	SSRY25	0,82	0,36623	ns	97	110	207

Anexo E. Detalles del mapa de ligamiento de la población B1PD280

Grupo 1												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi</i> ² <i>L</i>	<i>chi</i> ² <i>ind</i>	<i>LOD</i>
SSRY100												
	0,134	13,771	201	0,024	2,59	74	3	24	100	107,51	111,99	26,07
rSSRY88												
	0,153	15,774	203	0,025	2,78	92	7	24	80	97,94	101,05	23,43
rSSRY39												
Grupo 2												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi</i> ² <i>L</i>	<i>chi</i> ² <i>ind</i>	<i>LOD</i>
EST209												
	0,293	33,567	198	0,032	4,92	67	7	51	73	33,96	46,99	7,60
rSSRY193												
Grupo 3												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi</i> ² <i>L</i>	<i>chi</i> ² <i>ind</i>	<i>LOD</i>
SSRY122												
	0,298	34,413	191	0,033	5,14	67	26	31	67	31,04	31,19	6,94
NS584												
	0,195	20,559	190	0,029	3,39	67	29	8	86	70,82	74,65	16,51
EST288												
	0,208	22,157	197	0,029	3,50	63	16	25	93	67,13	65,66	15,54
rNS128												
	0,278	31,319	198	0,032	4,60	59	31	24	84	39,11	37,86	8,80
EST100												
	0,268	29,967	205	0,031	4,35	78	8	47	72	44,02	55,00	9,94
rSSRY177												
	0,035	3,541	198	0,013	1,32	116	0	7	75	170,99	170,79	46,46
rNS781												
Grupo 4												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi</i> ² <i>L</i>	<i>chi</i> ² <i>ind</i>	<i>LOD</i>
EST41												
	0,104	10,550	202	0,021	2,24	84	18	3	97	126,73	129,68	31,53
SSRY330												
Grupo 5												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi</i> ² <i>L</i>	<i>chi</i> ² <i>ind</i>	<i>LOD</i>
EST43												
	0,155	15,987	194	0,026	2,87	85	14	16	79	92,56	92,53	22,11
rSSRY179												
Grupo 6												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi</i> ² <i>L</i>	<i>chi</i> ² <i>ind</i>	<i>LOD</i>
EST62												
	0,080	8,111	199	0,019	1,98	58	9	7	125	140,15	133,44	35,73
EST287												
	0,278	31,402	194	0,032	4,66	57	8	46	83	38,12	46,99	8,57
SSRY250												
Grupo 7												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi</i> ² <i>L</i>	<i>chi</i> ² <i>ind</i>	<i>LOD</i>
SSRY64												
	0,152	15,727	197	0,026	2,82	73	6	24	94	95,27	98,33	22,80
SSRY45												

	0,130	13,305	200	0,024	2,55	81	16	10	93	109,52	109,71	26,64
EST65												
	0,237	25,809	198	0,030	3,90	82	9	38	69	54,63	61,40	12,48
rSSRY171												
Grupo 8												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi2 L</i>	<i>chi2 ind</i>	<i>LOD</i>
EST92												
	0,273	30,594	187	0,033	4,64	59	22	29	77	38,64	38,12	8,71
SSRY29												
Grupo 9												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi2 L</i>	<i>chi2 ind</i>	<i>LOD</i>
EST93												
	0,188	19,790	186	0,029	3,34	43	17	18	108	72,34	60,72	16,93
SSRY68												
	0,042	4,221	190	0,015	1,47	57	4	4	125	159,35	155,07	42,79
NS53												
Grupo 10												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi2 L</i>	<i>chi2 ind</i>	<i>LOD</i>
NS207												
	0,010	0,966	207	0,007	0,68	110	0	2	95	199,08	199,11	57,42
NS170												
	0,052	5,255	191	0,016	1,63	98	4	6	83	153,09	152,94	40,46
SSRY182												
Grupo 11												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi2 L</i>	<i>chi2 ind</i>	<i>LOD</i>
NS210												
	0,065	6,504	201	0,017	1,76	99	4	9	89	152,36	152,66	39,59
SSRY78												
	0,121	12,303	199	0,023	2,45	105	2	22	70	114,58	118,01	28,09
rSSRY19												
Grupo 12												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi2 L</i>	<i>chi2 ind</i>	<i>LOD</i>
NS717												
	0,257	28,427	210	0,030	4,10	76	30	24	80	49,54	49,75	11,23
SSRY40												
	0,201	21,302	199	0,028	3,39	68	28	12	91	71,16	72,40	16,54
SSRY240												
Grupo 13												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi2 L</i>	<i>chi2 ind</i>	<i>LOD</i>
NS74												
	0,261	28,936	184	0,032	4,45	47	9	39	89	42,09	44,72	9,52
NS217												
	0,118	11,989	204	0,023	2,39	78	14	10	102	119,29	118,48	29,32
NS319												
	0,287	32,700	195	0,032	4,84	62	21	35	77	35,33	36,00	7,92
rSSRY319												
	0,214	22,907	196	0,029	3,59	71	26	16	83	64,00	64,56	14,77
SSRY123												
	0,091	9,193	198	0,020	2,11	77	10	8	103	132,55	131,58	33,41
rSSRY180												

Grupo 14												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi2 L</i>	<i>chi2 ind</i>	<i>LOD</i>
SSRY191												
	0,266	29,582	177	0,033	4,62	52	29	18	78	38,92	37,95	8,79
SSRY63												
Grupo 15												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi2 L</i>	<i>chi2 ind</i>	<i>LOD</i>
SSRY103												
	0,277	31,232	184	0,033	4,76	64	13	38	69	36,54	41,07	8,22
SSRY303												
	0,186	19,529	199	0,028	3,20	95	14	23	67	78,52	77,50	18,40
rSSRY67												
Grupo 16												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi2 L</i>	<i>chi2 ind</i>	<i>LOD</i>
SSRY112												
	0,215	23,009	172	0,031	3,84	78	4	33	57	55,84	64,06	12,88
rSSRY50												
Grupo 17												
Locus	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>sr</i>	<i>sd</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>chi2 L</i>	<i>chi2 ind</i>	<i>LOD</i>
SSRY151												
	0,280	31,611	193	0,032	4,70	63	28	26	76	37,44	37,03	8,41
SSRY152												
RESUMEN MAPA												
Promedios	0,2	19,9	195,3	0,0	3,3	74,4	13,9	21,6	85,4	84,9	86,3	21,0
Sumatoria	6,4	696,0	6837,0	0,9	115,6	2605,0	486,0	757,0	2989,0	2970,2	3019,0	734,6
Maximo	0,3	34,4	210,0	0,0	5,1	116,0	31,0	51,0	125,0	199,1	199,1	57,4
Minimo	0,0	1,0	172,0	0,0	0,7	43,0	0,0	2,0	57,0	31,0	31,2	6,9

Anexo F. Genotipos con alto potencial genético para generar el segundo ciclo de retrocruzamiento

	Marcadores asociados							Características fenotípicas									
	EST100	SSRY122	SSRY171	SSRY40	SSRY240	SSRY123	SSRY64	SSRY45	DFP	MS0	ESC	TAM	CARGEN	PUD	TIPP	FORM	PROD
B1PD280-217	H	H	H	A	A	A	A	A	0,0	42,1	2	1	1	0	2	4	3,5
B1PD280-272	H	H	H	H	H	A	A	A	0,0	41,2	0	2	1	1	4	4	3,5
B1PD280-85	H	H	H	H	H	H	H	H	0,0	40,4	1	2	1	0	2	-	8,0
B1PD280-142	H	H	A	H	A	H	H	H	0,0	40,3	3	2	1	0	4	3	6,0
B1PD280-103	A	-	H	H	H	H	A	A	0,0	39,0	1	2	1	0	4	-	3,5
B1PD280-83	H	H	A	H	H	H	H	H	0,0	38,7	1	2	1	0	4	-	3,0
B1PD280-40	H	A	A	A	A	H	H	H	0,0	38,4	1	2	1	0	2	-	4,3
B1PD280-232	H	H	H	H	H	H	A	A	0,0	38,4	2	1	1	0	3	2	2,7
B1PD280-18	A	A	H	H	A	A	H	H	0,0	38,2	2	2	1	1	3	2	-
B1PD280-102	H	A	A	A	A	A	H	-	0,0	38,1	3	2	1	0	3	-	2,5
B1PD280-226	A	A	H	H	H	H	H	H	0,0	37,9	1	1	1	0	2	2	2,7
B1PD280-5	H	H	H	A	A	A	A	A	0,0	37,7	-	1	2	0	4	4	-
B1PD280-256	H	H	H	H	A	H	H	H	0,0	37,7	1	2	1	0	5	3	2,0
B1PD280-158	A	A	H	A	H	A	H	A	0,0	36,9	1	2	1	0	4	4	5,0
B1PD280-208	H	H	A	H	H	H	H	H	0,0	36,3	1	1	-	1	3	4	5,0
B1PD280-29	H	H	H	A	A	H	H	A	0,0	36,2	1	2	1	0	3	1	5,7
B1PD280-265	A	H	H	A	A	A	A	A	0,0	35,7	1	1	1	0	5	3	3,3
B1PD280-229	H	A	A	A	H	A	H	H	0,0	35,1	1	2	1	0	3	4	3,3
B1PD280-49	H	H	A	A	H	A	H	H	0,0	34,3	1	2	1	0	2	2	6,8
B1PD280-8	H	A	H	H	H	H	A	A	0,0	34,1	2	2	2	0	4	1	5,0
B1PD280-35	H	H	A	H	H	H	-	H	0,0	34,0	-	2	1	1	5	3	2,5
B1PD280-150	H	H	H	H	-	H	H	H	0,0	33,6	1	2	1	0	2	1	4,0
B1PD280-11	H	H	A	H	H	A	H	H	0,0	33,1	1	2	1	1	3	2	6,0
B1PD280-151	H	A	A	H	H	H	H	H	0,0	33,1	2	2	1	0	5	3	2,5
B1PD280-21	A	A	A	A	H	A	H	H	0,0	31,3	2	1	1	0	2	4	2,7
B1PD280-9	A	H	A	H	H	H	H	H	0,0	30,7	2	2	1	1	3	3	4,9
B1PD280-138	H	H	A	A	H	H	H	H	0,0	30,4	-	1	1	0	3	1	5,0
B1PD280-19	A	H	A	H	H	A	-	H	0,0	28,9	1	2	1	0	-	1	-
B1PD280-41	H	A	H	H	H	A	H	A	0,0	28,0	1	2	1	0	2	2	6,7
B1PD280-127	A	A	H	H	H	H	A	A	0,0	26,5	1	1	1	0	3	4	1,5
B1PD280-116	H	A	A	A	H	A	H	H	0,5	43,5	1	2	1	0	5	3	5,7
B1PD280-61	H	A	H	A	H	A	-	A	1,0	36,4	1	2	1	0	3	-	5,3
B1PD280-14	A	H	H	H	H	H	A	A	1,0	34,0	1	1	1	0	-	2	-
B1PD280-90	H	H	A	A	A	H	H	A	1,7	38,6	1	1	1	0	5	-	3,0
B1PD280-92	H	A	H	H	H	A	H	A	2,5	39,0	3	2	1	0	4	-	5,5
B1PD280-96	A	A	H	H	H	H	H	H	2,5	39,0	1	1	1	0	3	-	4,0
B1PD280-248	H	H	A	A	A	A	H	H	2,5	37,5	1	2	1	0	4	3	4,0
B1PD280-98	H	H	A	A	A	H	H	H	2,8	36,8	2	1	1	0	5	-	3,0
B1PD280-206	H	H	H	A	H	A	H	H	3,9	32,7	1	-	-	1	4	2	8,0
B1PD280-100	H	-	H	H	H	A	-	A	5,0	41,0	2	1	1	0	3	-	5,0