

Uso De Marcadores Microsatélites Para Evaluar El Nivel De Heterocigosidad
En Líneas Endogámicas S₁ De Yuca
(*Manihot esculenta* Crantz).

ANA MARÍA CASTRO TRIANA

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL
PROGRAMA MEJORAMIENTO DE YUCA
GENÉTICA DE YUCA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA
ESCUELA DE POSGRADOS
MAESTRÍA FITOMEJORAMIENTO
2007

Uso De Marcadores Microsatélites Para Evaluar El Nivel De Heterocigosidad
En Líneas Endogámicas S₁ De Yuca
(*Manihot esculenta* Crantz).

Ana María Castro Triana

Trabajo de grado presentado para optar al título de maestría

Dirigido por:

Martin Fregene, PhD.

Hernán Ceballos, PhD.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL
PROGRAMA MEJORAMIENTO DE YUCA
GENÉTICA DE YUCA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA
ESCUELA DE POSGRADOS
MAESTRÍA FITOMEJORAMIENTO
2007

Nota de aceptación:

Firma del director

Firma del codirector

Firma del jurado

Firma del jurado

Palmira, 12 octubre de 2007

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Hernán Ceballos por su entera confianza.

Al Dr. Martin Fregene por haberme acogido como parte de su equipo.

Al Dr. Juan Carlos Pérez por sus enseñanzas, observaciones y consejos oportunos.

A los compañeros del laboratorio de Genética de Yuca por estar siempre atentos impulsando cada jornada de trabajo.

A los ayudantes de campo por acercarme al cultivo.

A Luz por mil días de ayuda y cariño.

A mi familia por hacerme sentir siempre cerca de casa.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN.....	11
1 OBJETIVOS	14
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2 MARCO TEÓRICO.....	15
2.1 LA YUCA	15
2.1.1 <i>Generalidades del cultivo</i>	15
2.1.2 <i>Biología y genética</i>	16
2.2 ENDOGAMIA	18
2.2.1 <i>Depresión por endogamia, heterosis y vigor</i>	19
2.2.2 <i>Líneas endogámicas</i>	20
2.2.3 <i>Correlación entre Heterocigosidad y Vigor</i>	24
2.2.4 <i>Situación en yuca</i>	28
2.3 MARCADORES GENÉTICOS	29
2.3.1 <i>Marcadores basados en hibridación</i>	31
2.3.2 <i>Marcadores basados en amplificación</i>	32
3 MATERIALES Y METODOS.....	36
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	36
3.2 EXTRACCIÓN DE ADN.....	37
3.3 ELECTROFORESIS	38
3.4 ANÁLISIS DE DATOS.....	39
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
4.1 SELECCIÓN DE MARCADORES.....	41
4.2 EVALUACIÓN DE HETEROCIGOSIDAD	43
4.3 EVALUACIÓN DE VIGOR	45
4.4 RELACIÓN ENTRE VIGOR Y HETEROCIGOCIDAD.....	48
5. CONCLUSIONES.....	57
6. PROYECCIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	60
ANEXOS.....	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema de incorporación de etapas de endogamia para la producción de mejores híbridos en especies alógamas. Las flechas horizontales indican los locus en estado homocigotos resultado de los cruces. S_n indica materiales en etapas avanzadas de autofecundación. Modificado de Ceballos 2006 (conversación personal.)..... 23
- Figura 2. Ejemplo de lecturas de un gel. H hace referencia a genotipos heterocigotos, A y B a genotipos homocigotos. a) Marcador EST ssry 49 para la familia AM331. b) Marcador EST ssry36 para la familia AM335. c) Marcador ssry 195 para la familia AM337. y d) Marcador ssry 195 para la familia AM338..... 42
- Figura 3. Distribución de los valores de heterocigosidad dentro de cada familia. Encerrados en los círculos rojos se encuentran los individuos más homocigotos (considerando 10% de selección). a) Familia AM331; b) Familia AM335; c) Familia AM337; d) Familia AM338..... 44
- Figura 4. Heterocigosidad y efecto de endogamia en el rendimiento. El punto rojo hace referencia al progenitor de cada familia. a) Familia AM331; b) Familia AM335; c) Familia AM337; d) Familia AM338. 49
- Figura 5. Heterocigosidad y efecto de endogamia en materia seca. El punto rojo hace referencia al progenitor de cada familia. a) Familia AM331; b) Familia AM335; c) Familia AM337; d) Familia AM338. 51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Promedios de heterocigosidad estimado para las familias AM331, AM335, AM337 y AM338.	43
Tabla 2. Análisis de varianza entre genotipos en las cuatro familia S_1 para las variables de altura de planta (AP), peso de raices frescas (PR), peso de follaje (PF), índice de cosecha (IC), contenido de materia seca (MS) y rendimiento de materia seca (RM)...	47
Tabla 3. Efecto de la depresión endogámica en las cuatro familias para altura de planta (AP), peso de raices frescas (PR), peso follaje (PF), índice de cosecha (IC), contenido de materia seca (MS) y rendimiento de materia seca (RM).	48

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Protocolo de miniextracción de ADN (Dellaporta S.L. <i>et al.</i> 1983). Modificado por el laboratorio de genética de Yuca, CIAT.....	69
Anexo B. Soluciones para PCR y electroforesis.....	71
Anexo C. Pasos y soluciones para tinción con plata. Modificado de Promega. 1993.	72
Anexo D. Tipo de repeticiones de los microsatélites escogidos	73
Anexo E. Posición de los microsatélites en el mapa de yuca. (Fregene <i>et al.</i> 1997)	75

RESUMEN

Se evaluó la heterocigosidad de líneas endogámicas S_1 obtenidas en el programa de mejoramiento del CIAT, a partir de cuatro clones élites de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mediante el uso de marcadores microsatélites, como perspectiva para la incorporación de líneas endogámicas como progenitores para el desarrollo de híbridos más competitivos. Se evaluaron 72 microsatélites y se calcularon los niveles de heterocigosidad y vigor para cada genotipo. Los progenitores presentaron una heterocigosidad de 45-50%. En la progenie se presentó una reducción general del 50% de heterocigosidad debido a efectos de endogamia. El efecto de endogamia se midió con respecto al rendimiento por planta. El rango de variación en el efecto de endogamia fue muy amplio, y la depresión afectó de manera diferente a cada variable evaluada en campo, tanto entre familias como entre genotipos, haciendo evidente la gran heterocigosidad en la que se encuentra la yuca. Los genotipos más heterocigotos no necesariamente presentaron los valores más altos de vigor por rendimiento. La selección de las líneas S_1 se discutió con base en individuos con bajo nivel de heterocigosidad pero muy vigorosos (tolerancia a endogámica) con el fin seleccionar los genotipos de baja carga genética y pasar a una generación más avanzada de endogamia.

Palabras clave: *Manihot esculenta*, heterocigosidad, líneas endogámicas, marcadores microsatélites.

ABSTRACT

The effect of selfing on heterozygosity and vigour was estimated in 316 S₁ selfing lines obtained by four cassava elite clones. The heterozygosity level, estimated by 72 simple sequence repeat (SSR) marker decrease 50% from S₀ to S₁ generation by inbreeding effect. Plant vigour estimated by dry matter yield had a large variation rank and inbreeding depression affected in different way in and between the families making evidence the great heterozygosity of cassava. No correlation between plant vigour and heterozygosity was found. Selection was discussed bias the lowers heterozygosity and higher vigour to select the best genotypes, grouping good genes and good genio combinations with high selection value, to pass to the next inbreeding generation.

Key words Cassava · Heterozygosity · Selfing lines · Molecular markers.

INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un importante recurso alimenticio para más de 1000 millones de personas (FAO 2002) en países tropicales. Este cultivo proveniente de Suramérica (Olsen y Schaal 1999), fue domesticado hace unos 10.000 años y desde entonces, es sembrado por cultivadores de las zonas tropicales de África, Asia y Latinoamérica.

La yuca es producida principalmente en fincas de pequeños agricultores en áreas agrícolas marginales. Generalmente es consumida por habitantes de la zona que cuentan con pocos recursos económicos.

El principal producto económico de la yuca son sus raíces, aunque sus hojas también representan un importante potencial en alimentación humana y animal. Este cultivo ocupa el cuarto lugar como alimento fuente de calorías en la dieta humana, después del arroz, la caña de azúcar y el maíz (Cock 1985) y en los últimos años se ha hecho evidente su enorme potencial en la industria para producción de alimentos procesados, alcohol, almidón, entre otros.

Pese a su importancia y a las expectativas que se han creado alrededor de este cultivo, su estudio y su mejoramiento ha sido lento, debido a la falta de tecnologías agrícolas, a la falta de desarrollo de cultivares con fines industriales y alimenticios, a la larga duración de los ciclos de selección, a la baja tasa de reproducción, y a la fuerte influencia del ambiente sobre la expresión de sus características agrícolas (Ceballos *et al.* 2002, 2004) .

Tanto mejoradores como agricultores seleccionan las plantas más vigorosas para tener mejor material para la próxima cosecha. Tradicionalmente se ha trabajado con materiales híbridos, de progenitores con elevado valor agronómico. Sin embargo, esta técnica no es

muy eficiente en elevar el rendimiento, pues no se logran eliminar las expresiones recesivas deletéreas que aparecen en la hibridación.

El programa de mejoramiento de yuca del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) tiene como expectativas para este cultivo alguno de los obstáculos que el mejoramiento convencional de la yuca presenta, aumentar el valor comercial de la yuca y profundizar en la exploración de su genoma. Estas estrategias se podría beneficiar con la identificación y aprovechamiento de la expresión de nuevos genes que confieran características antes no tenidas en cuenta, y con la eliminación (o disminución de frecuencias) de genes deletéreos que posiblemente pueden estar afectando expresiones relacionadas con características importantes para la producción del cultivo.

Bajo el marco de proponer alternativas que contribuyan a un mejoramiento de la yuca más eficiente, este trabajo busca abrir nuevas perspectivas mediante la introducción de endogamia uso de líneas puras para ser utilizadas en programas de hibridación, con el objetivo de obtener híbridos de mayor competitividad y productividad.

El proceso de autofecundación o cruzamiento entre individuos emparentados es una forma de desenmascarar alelos recesivos, contribuir a la reducción automática de la carga genética en las poblaciones mejoradas y diseñar progenitores para que produzcan híbridos más competitivos (Ceballos, *et al.* 2002).

Con la ayuda de herramientas moleculares es más rápido y eficiente evaluar ciertas características que en campo tomarían demasiado tiempo. Los marcadores microsatélites permiten comparar el grado de heterocigosidad en la que se encuentra un genotipo con respecto a sus progenitores, discriminar genotipos, cuantificar la variabilidad genética y correlacionar expresiones genotípicas con características de interés agronómico.

Este trabajo hace parte de los estudios iniciales para la incorporación de materiales a etapas avanzadas de autofecundación como una nueva metodología para el mejoramiento de yuca. Tiene como objetivo evaluar el nivel de heterocigosidad en el que se encuentran 316 líneas endogámicas S_1 provenientes de cuatro clones élites por medio de marcadores microsatélites y relacionarlo con las expresiones fenotípicas en campo, con el fin de recomendar los mejores genotipos que deben pasar a una segunda generación de autofecundación y determinar el uso potencial de marcadores moleculares en el proceso de selección para tolerancia a endocria en yuca.

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Estimar el nivel de heterocigosidad por medio de marcadores moleculares para líneas endogámicas S_1 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), en apoyo a la introducción de la endogamia en los programas de mejoramiento de yuca.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar marcadores microsátélites que permitan visualizar heterocigosidad en los individuos a evaluar.
- Estimar el nivel la heterocigosidad de cada una de las líneas S_1 de yuca.
- Evaluar dentro de los grupos familiares la relación entre el vigor del rendimiento en campo y el nivel de heterocigosidad obtenida por los marcadores moleculares.
- Identificar genotipos S_1 que sean tolerantes a endogamia definidos por presentar niveles de heterocigosidad iguales o menores a los esperados en la generación S_1 y un vigor fenotípico superior al de la media de la población.
- Recomendar las mejores líneas como progenitores para la segunda generación de endogamia (S_2) necesaria para continuar con los estudios de implementación de etapas avanzadas en el programa de mejoramiento de yuca.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 LA YUCA

La yuca *Manihot esculenta* Crantz pertenece a la familia Euphorbiacea. El género *Manihot* cuenta con más de 98 especies pero la de mayor importancia económica es *Manihot esculenta* Crantz. Se cree que la yuca fue originada por la hibridación de dos especies silvestres de *Manihot*, y luego este híbrido se reprodujo vegetativamente (Rogers y Appan 1973). Inicialmente se reportó el centro de origen para este cultivo en Centroamérica, incluyendo Colombia, Venezuela, Guatemala hasta el sur de México, debido a que en esta zona se ha presentado un gran número de variedades. Posteriormente, esta zona se referenció como centro de origen secundario y en Suramérica, específicamente en el nordeste de Brasil se cree que es el centro de origen primario, porque presenta su mayor diversidad genética en la cuenca amazónica. Las evidencias muestran que el área de domesticación comprende una extensa región desde México hasta Brasil, cultivándose desde hace 10.000 años (Olsen y Shaal 1999; Simmond 1976) desde donde posteriormente fue introducida a África y Asia por navegantes portugueses en el siglo 15 (Jenning y Hershey 1985).

2.1.1 Generalidades del cultivo

En el mundo se producen alrededor de 152 millones de toneladas de yuca al año, la mitad de los 16 millones de hectáreas dedicadas su cultivo se encuentran en África, un 30 por ciento en Asia y el 20 por ciento restante en América Latina (CIAT 1997). La yuca es sembrada en lugares del trópico y subtropico, principalmente por pequeños agricultores en ambientes marginales, gracias a su tolerancia a suelos ácidos y a largos periodos de sequía. Su cultivo está limitado a zonas cálidas, entre los 30° de latitud norte y 30° de latitud sur, a temperatura que oscilan entre 18 a 35°C y altitudes desde el nivel del mar hasta los 1800

m.s.n.m. (Okezie y Kosikowski 1991). Se adapta a precipitaciones que van desde 1000 a 3000 mm. anuales, pero necesita suelos bien drenados, ya que no resiste periodos prolongados de saturación de humedad en el suelo. Por ser altamente tolerante a la sequía, se acomoda bien en regiones con estaciones secas de hasta 6 meses. Esto se debe a que posee mecanismos fisiológicos que evitan la pérdida de agua y disminuyen el gasto energético cuando se presenta la sequía (Cock 1989).

Esta especie, como sucede con la mayoría de los cultivos, presenta una alta influencia del ambiente (interacción genotipo por ambiente) para muchas características relevantes, lo que ha hecho difícil la descripción morfológica a nivel varietal. El ambiente influye en la producción de ramas reproductoras, el número de hojas, la capacidad fotosintética, el momento de floración, la producción de raíces, el vigor, y contenido de materia seca entre otros aspectos importantes para su calidad y rendimiento.

2.1.2 Biología y genética

La yuca es un arbusto leñoso, predominantemente alógamo, monoico, con flores pistiladas y estaminadas creciendo en la misma inflorescencia, sobre el mismo racimo. Las flores femeninas ocupan las posiciones basales y las masculinas las distales; estas últimas son más pequeñas y generalmente más numerosas que las femeninas.

Su polinización es mediada por insectos, principalmente por abejas (*Apis mellifera*), quienes transportan el polen pegajoso viable hasta por 6 días, aunque también se ha reportado el fenómeno de apomixis (formación de semilla sin fertilización, Nassar y Collevatti 2005). Es una planta perenne cuya propagación se hace por semillas o por estacas. Las semillas son el medio de reproducción de la planta. No son importantes en reproducción y multiplicación comercial, pero son muy utilizadas en los programas de fitomejoramiento, pues es a través de la reproducción sexual como se pueden producir

nuevos cultivares genéticamente superiores. Las semillas sexuales normalmente sufren de dormancia y las plántulas que producen presentan una germinación muy lenta y son más débiles que las que provienen de estacas. Las estacas son los tallos de la planta y son el medio que se utiliza para la multiplicación vegetativa de la especie. Sirven como “semillas” para la producción comercial del cultivo. El tallo maduro es cilíndrico y su diámetro varía de 2 a 6 cm. Se puede observar tres colores básicos de tallo maduro: gris plateado, morado, y amarillo verdoso. Tanto el diámetro como el color de los tallos varían significativamente con la edad de la planta y con la variedad. Cuando se plantan estacas se producen brotes y raíces adventicias lo que generalmente tarda una semana. Una estaca puede producir a partir de la yema axilar de cada nudo, el brote de un nuevo tallo primario. El tallo primario luego de cierto periodo de crecimiento, produce eventualmente ramificaciones que pueden ser reproductivas (inflorescencia) o vegetativas (ramas laterales; Ceballos *et al.* 2002)

Las ramificaciones vegetativas son parte estable de la planta por lo que permiten hacer una descripción varietal y determinan la arquitectura de la planta, por lo tanto ayuda a definir el valor agronómico del material, porque influye en la cantidad de estacas que la planta produce, la cual varía de 5 a 10 estacas de 20 cm cada una.

La yuca no presenta barreras genéticas o fisiológicas para prevenir autofecundación. En la naturaleza pueden ocurrir tanto autopolinización como polinización cruzada. Sin embargo, la polinización cruzada se ve favorecida por el hecho que las flores femeninas de racimo abren primero que las masculinas, a este fenómeno se le conoce como protoginia. Aunque es posible que ocasionalmente, las flores masculinas y femeninas de distinto racimo pero de una misma planta, abran de manera simultánea y ocurra una autopolinización natural que produzcan plantas viables. Una vez que la flor femenina ha sido polinizada, comienza la formación del fruto a partir del ovario y su maduración requiere de 2 a 3 meses para ser completada (Kawano *et al.* 1978).

Como la yuca presenta reproducción vegetativa, las disfunciones a nivel reproductivo no son tan negativas. Por lo tanto, es común encontrar casos de androesterilidad, que pueden presentarse cuando las flores abortan antes de alcanzar la madurez o cuando las flores maduran pero las anteras no producen polen, o la disminución en la floración en plantas autopolinizadas. Sin embargo, la genética de la esterilidad en este cultivo no ha sido completamente estudiada.

La yuca presenta alotetraploidía, (Magoon *et al.* 1969) es decir que contiene en sus células somáticas dos copias de genomas diferentes provenientes de dos ancestros distintos. Es considerada diploide con origen alotetraploide segmental. Generalmente, la yuca se comporta como diploide porque no presenta interacciones entre alelos homólogos de distintos genomas en el momento de su recombinación, evitando así el aumento en el número de interacciones. Típicamente forma 18 bivalentes durante la meiosis por lo que se comporta como una especie diploide (Suárez *et al.* 2000). Contiene 36 cromosomas ($2n=2x=36$ cromosomas; Perry 1941), con número cromosómico básico de $x=9$, pero puede variar de 6 a 11.

2.2 ENDOGAMIA

La endogamia hace referencia al sistema de cruzamiento entre individuos emparentados. El efecto de la endogamia es una consecuencia del aumento en la homocigocidad media en todos los loci del genoma. Cuando los dos alelos de un locus homocigoto son idénticos por descendencia, es decir que son derivados por replicación del ADN de un único alelo en la población parental que originó el individuo endógamo, en este caso el individuo es autocigótico para este locus (Wright, 1922). Si el diploide homocigoto se forma por copias de genes de origen diferente, es decir, los dos alelos no son copias del mismo alelo de la generación ancestral sino que son alelos independientes, el individuo es alocigótico para ese locus. (Vallejo y Estrada 2002). Esto quiere decir que, un individuo homocigótico

puede ser autocigótico o alocigótico, pero el concepto de endogamia hace referencia solamente a los autocigotos.

Cuando ocurre endogamia se alteran las frecuencias genotípicas de la población, produce cambios en la media y en la varianza del carácter, aquí cada locus puede contribuir de forma diferente a su alteración. Las mayores alteraciones suceden cuando los alelos dominantes y recesivos de un locus se presentan con frecuencias iguales ($p=q=0.5$) en la población. Cuando genes dominantes están presentes en la herencia del carácter, el efecto de la endogamia sobre la varianza de la población depende de las frecuencias génicas iniciales. Si los genes que aumentan la expresión de un carácter son dominantes, la endogamia resultaría en reducción del promedio fenotípico de la población puesto que se disminuyen las frecuencias de los genotipos heterocigotos.

2.2.1 Depresión por endogamia, heterosis y vigor

La depresión por endogamia ha sido considerada como la desventaja práctica de la autofecundación para materiales tanto diploides como poliploides y se ejemplifica por la pérdida de vigor que normalmente ocurre cuando poblaciones típicamente de polinización abierta son autofecundadas por sucesivas generaciones. La depresión por endogamia se cuantifica como la reducción en la media que ocurre solo bajo efectos no aditivos (Miranda 1999). Esta reducción se debe principalmente a la expresión de alelos recesivos deletereos (Charlesworth y Charlesworth 1999) que representa un descenso en el crecimiento vegetativo de la especie generación tras generación, como está reportado para la mayoría de cultivos alógamos. Porcentajes de pérdida de vigor del 5% para espárragos *Asparagus brachyphyllus* (Ito y Currence 1965) hasta de 9% para cebolla *Allium cepa* L. (Jones y Davis 1944) en las primeras etapas de autofecundación y en generaciones avanzadas la depresión endogámica a llevado hasta la extinción de la variedad, como es el caso de una variedad de maíz *Zea mays* L. reportada por Paterniani (1978).

Por las razones anteriores, tradicionalmente se ha buscado la heterosis en los cultivos. El término heterosis (Shull 1952 en Hallauer y Miranda 1988) hace referencia al vigor manifestado en generaciones heterocigotas, derivadas del cruzamiento entre individuos genotípicamente diferentes o contrastantes. En otras palabras, es la expresión génica del efecto de la hibridación o cruce entre individuos no emparentados. El término vigor se usa como sinónimo de algún valor productivo, y refleja la capacidad de un genotipo de producir biomasa en un tiempo y en condiciones ambientales definidas (Rotili *et al.* 1999). Hay que tener en cuenta que esta definición es válida sólo para plantas cultivadas, para las poblaciones silvestres el vigor hace referencia sólo a su valor reproductivo.

El vigor es el resultado que supera la suma de los valores de genes por separado, es una propiedad del genotipo como un todo. Es posible estimar el vigor por medio de la medición de diferentes variables, dependiendo de la utilización del cultivo, si este es para producir, por ejemplo alimento fresco, deshidratado o forrajes. Por esta razón, para estimar vigor se debe escoger una variable que represente la actividad de todo el genoma y que pueda estar controlado por muchos genes (Rotili *et al.* 1999)

2.2.2 Líneas endogámicas

Un híbrido es un cruzamiento entre dos genotipos claramente diferentes. Se producen diferentes tipos de híbrido en todos los programas de mejoramiento, para combinar diferentes caracteres de los distintos genotipos. El híbrido debe mostrar un grado de heterosis razonablemente alto para que el cultivo y su producción sean estables y económicamente viables (Ceballos *et al.* 2002)

Los esquemas para realizar híbridos en maíz han servido como modelo para el trabajo en otros cultivos. Durante años se han estudiado diferentes variaciones en los métodos de hibridación, desde hace 100 años se viene investigando el uso de líneas endogámicas como

etapas previas para el desarrollo de progenitores para hibridación en maíz (Shull y East 1908 en Hallauer y Miranda 1988). Esto ha sido un paso importante para muchos programas de mejoramiento, especialmente para materiales alógamos diploides.

El desarrollo de líneas endogámicas consiste en la autofecundación de plantas individuales seleccionadas durante una o varias generaciones. Al autofecundar sucesivamente se obliga a los diferentes loci del genoma a que progresivamente vayan alcanzando el estado de homocigosis. El proceso de autofecundación es el caso más extremo de endogamia, se encuentran otras formas menos severas para aumentar el nivel de homocigosis, éstas dependen del grado de relación en que se encuentren los progenitores. Algunas veces el cruzamiento ocurre entre hermanos de la misma familia para evitar la pérdida rápida del vigor y aumentar la viabilidad (Stringfield 1974).

Los primeros estudios de las líneas endogámicas comenzaron con la utilización de las líneas puras (homocigosis completa) en maíz y fueron realizados por Shull (1908) y East (1908), quienes propusieron cruzamientos simples entre dos líneas endogámicas puras para producir materiales híbridos. Aunque éstos no fueron comercialmente exitosos, hoy en día, en los programas de mejoramiento, se trabaja con híbridos simples a partir de parentales desarrollados de líneas puras superiores de alto rendimiento (Hallauer y Miranda 1988).

El número de generaciones de autofecundación que se requiere para el desarrollo de una línea endogámica es variable, aunque el punto práctico de una línea es cuando se considera genéticamente fija luego de autofecundaciones sucesivas. El éxito de la línea depende de la habilidad del mejorador, del origen de las poblaciones, de los recursos disponibles, de los cruzamientos de prueba y evaluación de las líneas (Hallauer *et al.* 1988), la cual se cumple con base en la selección fenotípica. Una de las recomendaciones para su desarrollo es realizar evaluaciones tempranas de las líneas endogámicas desarrolladas (Jenkins 1935; Sprague 1946).

Jenkins (1935) propuso utilizar un sistema de desarrollo de líneas endogámicas que se basa en la evaluación de las líneas para el comportamiento de los híbridos en generaciones de autofecundación tempranas, tomando en cuenta que el comportamiento *per se* de las líneas endogámicas y sus caracteres no están estrechamente relacionados con su comportamiento en las combinaciones híbridas, por el contrario, al cruzar estas líneas, las plantas resultantes son generalmente más vigorosas que su parental. En general, la endogamia es perjudicial para el comportamiento del individuo (especialmente en cultivos de polinización cruzada como la yuca y el maíz) porque el vigor y la productividad disminuyen notoriamente.

En muchos cultivos la frecuencia de llegar a las líneas endogámicas en estados avanzados es muy baja y los modelos heteróticos no están bien establecidos. Jenkins propuso evaluar el comportamiento de los cruzamientos de prueba lo más temprano posible, no más allá de dos o tres generaciones de autofecundación, para descartar las líneas indeseables que probablemente no se van a usar en el programa. Havey (1998) sugiere que en el desarrollo de las líneas endogámicas de materiales mejorados, no se debería llevar más allá de una quinta generación de autofecundación.

Una vez se tienen las líneas se deben realizar cruzamientos de prueba para evaluar el capacidad combinatoria de los genotipos escogidos y su potencial para el desarrollo de los híbridos (Paliwal 2001).

Desde el punto de vista genético, una línea homocigota es estable, y concentra la estructura genética favorable para el vigor. Al ser utilizada como progenitor no ocurre la segregación genética que ocurre cuando se utilizan progenitores híbridos F_1 que se ven afectados por efectos genéticos de dominancia los que no pueden ser transmitidos a su descendencia (Ceballos *et al.* 2002). De esta manera es posible mejorar el valor de los progenitores seleccionándolos por medio de su habilidad combinatoria general. Además, lo que se gana de estabilidad en las líneas endogámicas sacrificando el rendimiento de la planta, se

recupera posteriormente con la combinación híbrida, la que puede ser diseñada más eficientemente.

En maíz, se han diseñado progenitores con un cierto grado de endogamia que al combinarse específicamente producen un material híbrido de excelente comportamiento en el campo (Figura 1).

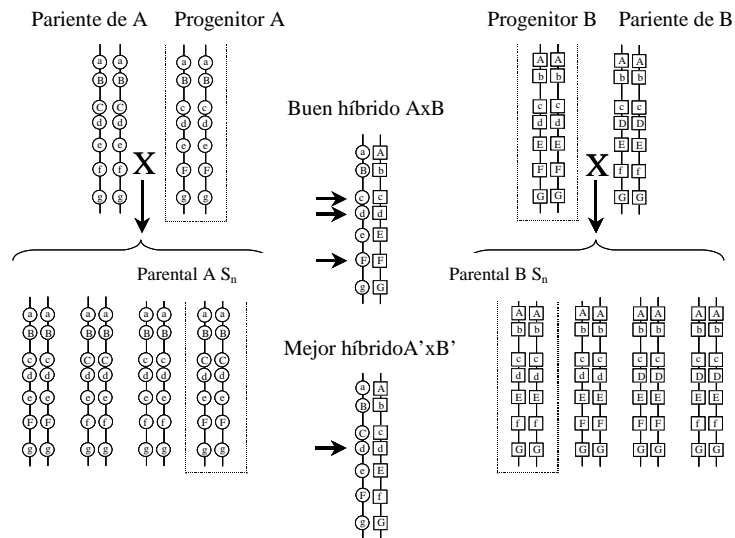


Figura 1. Esquema de incorporación de etapas de endogamia para la producción de mejores híbridos en especies alógamas. Las flechas horizontales indican los loci en estado homocigoto resultado de los cruces. S_n indica materiales en etapas avanzadas de autofecundación. Modificado de Ceballos 2006 (conversación personal.)

Entonces, si se escoge un progenitor A y se cruza con un progenitor B contrastante, se obtendrá un buen híbrido que presentará considerable grado de heterocigosidad debido al contraste de los progenitores. Pero si se escogen los mismos progenitores A y B y se llevan a generaciones avanzadas de endogamia, y posteriormente se cruzan entre ellos, se obtendrá

un muy buen híbrido, es decir, un material que se encuentra con mayor cantidad de loci en estado heterocigotos, esto disminuirá la frecuencia de loci homocigotos, y por lo tanto, los híbridos tenderán a ser más vigorosos (Ceballos 2006, conversación personal) La ventaja de seguir este proceso de líneas endogámicas es que permite eliminar o disminuir la frecuencia de genes deletéreos o indeseables que permanecen escondidos o enmascarados debido a la heterocigosis generalizada. La totalidad de estos genes indeseables se conoce como “carga genética” y se estima que en el caso de la yuca es prominente (Ceballos *et al.* 2002). Además, al desenmascarar los genes indeseables se permite explorar aun más el genoma (Rotili *et al.* 1999), por consiguiente aumentar el valor y la versatilidad del producto que se esté desarrollando.

2.2.3 Correlación entre Heterocigosidad y Vigor

La relación entre la heterocigosidad de una planta y el vigor que esta represente en campo es un asunto que se ha cuestionado los últimos años. La predicción general (Ginzburg 1979, 1983) plantea que los materiales más vigorosos son los que presentan mayor número de loci heterocigotos, por lo tanto para aumentar el vigor habría que aumentar el número de loci heterocigotos en el genoma de una planta, lo cual permitiría evaluar los efectos de endogamia en una población. Sin embargo, los intentos por evaluar la heterocigosidad, por medio de la medición de la heterocigosidad en múltiples loci ha traído diferentes puntos de vista. Hay dos alternativas para medir los efectos de endogamia: evaluando la depresión por endogamia de una generación a otra en campo, lo cual aumentaría la evaluación en el costo y en el tiempo. O medir por medio de marcadores moleculares la heterocigosidad en múltiples loci. Cuando la opción es por marcadores moleculares se examina la asociación entre los marcadores heterocigotos y los datos fenotípicos, lo cual se denomina correlación entre heterocigosidad- vigor (Slate *et al.*2004).

La heterocigosidad multilocus debe encontrarse asociada con el vigor por consecuencia de los efectos de la homocigosidad de los loci distribuidos a lo largo del genoma en poblaciones que individualmente presenten niveles de endogamia diferentes (Hansson y Westerberg 2002). En las poblaciones mejoradas, se pueden presentar individuos con diferentes coeficientes de endogamia, variando así, en el grado de heterocigosidad de una población en particular. En estas poblaciones, la heterocigosidad puede ser evaluada con un set de marcadores moleculares que hace posible diferenciar entre individuos que se encuentran en homocigosis e individuos en heterocigosis para un número particular de loci .

El estudio de la relación entre heterocigosidad y vigor ha sido estudiado bajo dos hipótesis. La “hipótesis de efecto general”(Ledig *et al.*1986) explica la depresión endogámica por medio de la heterocigosidad de múltiples loci que se encuentren distribuidos a lo largo del genoma, el efecto general muestra la sobredominancia asociativa y puede servir como un examen de la depresión endogámica en el sentido clásico (Slate *et al.* 2004). Este modelo aplica generalmente en poblaciones con un conocido grado de endogamia, en las poblaciones naturales es difícil predecir el grado de endogamia o autofecundación de la población. Sin embargo, en materiales mejorados que hacen parte de un programa de mejoramiento se puede controlar las polinizaciones conociendo el grado de consanguinidad de la población. Para cumplir este modelo general se debe asumir que el efecto de depresión por endogamia esta distribuido homogéneamente en el genoma y que los loci no se encuentran ligados.

Cuando estas condiciones no se cumplen, pierde importancia el efecto general y debe explicarse bajo un efecto local. La “hipótesis del efecto local” (Ohta y Kimura 1970, David 1998) hace referencia a la heterocigosidad evaluada por marcadores como resultado del efecto de homocigosis dentro de loci ligados. Requiere un desequilibrio de ligamiento, donde se presente una asociación de alelos de diferentes loci en los gametos. En poblaciones naturales esto sucede cuando se presentan eventos de cuellos de botella o deriva genética en poblaciones pequeñas. En poblaciones mejoradas esto puede ocurrir al

estrecharse el pool genético por la selección dirigida. A este nivel, los marcadores deben estar asociados entre loci neutrales y loci bajo selección, que participen en el vigor de la planta.

Esto presentaría una sobredominancia como resultado del vigor consecuencia de alelos deletéreos recesivos o sobredominancia de los loci ligados. (Hansson y Westerberg 2002). En este caso se debe hacer una revisión local, de solo una porción del cromosoma donde se encuentre el ligamiento. Se espera que como resultado de la segregación de los cromosomas en meiosis y dependiendo del número de ligaciones, se presente una variación en la homocigosidad a nivel de todo el genoma en individuos que incluso presenten el mismo coeficiente de endogamia (Bierne *et al.* 2000 en Hansson y Westerberg 2002).

Estudios anteriores muestran que con la evaluación de unos pocos loci, las correlaciones entre la heterocigosidad y vigor son muy debiles, en simulaciones con especies de extremos sistemas de reproducción como poliginia y autofecundación, Balloux 2004 reportó que cuando se utilizaron 200 marcadores en lugar de 20, la relación entre heterocigosidad y vigor se hizo más clara, pasó de correlaciones cercanas a cero a $r^2 > 0.1$. En poblaciones naturales de yuca con un alto grado de polinización abierta (Pujol, *et al.* 2005) se realizó un estudio de correlación entre la heterocigosidad multilocus, evaluada con 8 marcadores microsatélites y el vigor, tomando como referencia el peso de la planta, se reportó una correlación muy baja ($r^2 = 0.031$). Sucede igual con el tamaño de la población (Balloux 2004), que debilita las correlaciones entre heterocigosidad y vigor.

Teniendo en cuenta que en el presente estudio se evalúan las variaciones por descendencia entre y dentro los loci, y las variaciones de estado entre alelos, los marcadores deben ser además de abundantes, codominantes (Hansson y Westerberg 2002, Slate *et al.* 2004), para poder confirmar la hipótesis por efecto general con un gran número de marcadores y con individuos parcialmente autofecundada se podría encontrar una posible correlación.

La correlación también depende de la forma en que se estime la heterocigocidad por medio de marcadores genéticos. Hay muchos índices para estimar heterocigocidad, que aunque no varían mucho entre ellos, presentan diferencias estadísticas significativas .

Coulson *et al.* (2008) propusieron una medida basada en la distancia de los marcadores microsatélites usando el cuadrado de la diferencia en el número de presencia de dos alelos (d^2), es decir, el número de loci heterocigotos elevado al cuadrado, esto para contrarrestar la heterogeneidad del interior de ciertas poblaciones naturales que presentan tanto polinización abierta como autopolinizaciones. Sin embargo, esta medida presenta correlaciones muy débiles en poblaciones homogéneas (Pemberton *et al.* 2004).

La forma cruda de medir heterocigocidad es evaluando la proporción de loci heterocigotos, esto falla en poblaciones naturales para las cuales no se cuenta con un alto número de marcadores genéticos, se presentan diferencias en el número y las frecuencias de los alelos y para los que no siempre se puede utilizar la misma selección de marcadores en todos los individuos (Aparicio *et al.* 2006).

Cuando no se puede seleccionar los mismos marcadores para los individuos de la población, Coltman *et al.* (1999) propusieron estandarizar la heterocigocidad individual (H_s) como proporción de loci heterocigotos del individuo sobre la media de loci heterocigotos evaluados en toda la población, pero esta medida le da un peso igual a todos los loci sin tener en cuenta las frecuencias alélicas, asumiendo una relación lineal entre la heterocigocidad de un locus específico y el número de alelos, por lo tanto esta medida sobrestima el efecto de la variable loci.

Teniendo en cuenta las frecuencias alélicas, Amos *et al.* (2001 en Aparicio *et al.* 2006) propusieron una medida basada en los alelos que se comparten, donde la frecuencia de cada alelo cuenta para una sumatoria final, compartir alelos raros pesa más que compartir alelos comunes. Esta medida asimétrica de las frecuencias alélicas se complica cuando se presenta

inmigraciones que traen alelos nuevos o raros a la población nativa, cuando a individuos de parentales nativos e inmigrantes se les evalúa este índice de heterocigosidad presentan mayor homocigosidad que los individuos descendientes de ambos parentales nativos, lo cual es inexplicable biológicamente.

Aparicio *et al.* 2006 resuelven el problema proponiendo una medida de heterocigosidad (HL) que estima la contribución de cada locus y no de cada alelo, dándole mayor peso a los loci más informativos. Esto toma importancia cuando se cuenta con pocos marcadores moleculares y estos presentan diferente número de alelos, típicamente en poblaciones nativas.

La mayoría de los trabajos reportados que realizan correlaciones entre heterocigosidad y vigor son realizados a través de varias generaciones, sin tiempo puntual, generalmente a través de simulaciones, donde utilizan un modelo controlando el modo de reproducción a lo largo de cientos y hasta miles de generaciones, como es el caso de las simulaciones realizadas por Balloux 2004, a través de 2000 generaciones en modelos de poblaciones monoicas y dioicas de polinización abierta, donde además, se tienen en cuenta el tamaño de la población, la tasa de migración/inmigración y la tasa de mutación (Aparicio *et al.* 2006). En las poblaciones reales hacer estas estimaciones resulta más complicado y se debe asumir ciertas condiciones para el ajuste de los modelos.

2.2.4 Situación en yuca

El interés actual del mejoramiento se concentra en producir e identificar buenos híbridos a partir de los progenitores selectos. En el futuro, el énfasis será producir individuos especialmente diseñados para ser óptimos progenitores y poder así generar híbridos sobresalientes. La gran ventaja es que se garantiza un progreso genético más sostenido y, al menos desde el punto de vista teórico, más rápido.

Con las autofecundaciones de yuca se busca contribuir a la reducción automática de la carga genética en las poblaciones mejoradas y diseñar líneas endogámicas como progenitores que produzcan híbridos más competitivos. Existen algunos limitantes que justifican el hecho que hasta ahora estas ideas no hayan sido implementadas, algunos de ellos son los siguientes:

a. La carga genética en la yuca es prominente (Ceballos *et al.* 2002), por lo cual puede resultar difícil llegar a altos grados de homocigosis con plantas que puedan sobrevivir. Si bien esto es una limitación en la actualidad, es también una justificación en la necesidad de comenzar a realizar procesos de limpieza de carga genética en este cultivo. Es posible aumentar la tolerancia a endogamia en cultivos de polinización cruzada, como lo demuestra el maíz.

b. Debido al modo de reproducción de la yuca, el proceso de autofecundación se hace muy demorado. Para alcanzar un alto grado de homocigosis, se necesita por lo menos 4 o 5 autofecundaciones sucesivas y tener una buena inducción de floración. Sin embargo, se pueden obtener materiales totalmente homocigóticos de manera inmediata, por medio de “haploides duplicados” (Griffing 1975). Este procedimiento se basa en cultivar mediante técnicas *in vitro* tejido gametofítico haploide y luego multiplicarlo obteniendo material autocigótico (Lentini *et al.* 1994).

2.3 MARCADORES GENÉTICOS

Los marcadores genéticos debe mostrar una variación detectable entre los individuos de la población y un modo de herencia predecible según las leyes de Mendel. Esta variación puede ser considerada a diferentes niveles biológicos, desde cambios fenotípicos heredables significativos hasta la variación de un solo nucleótido. (Picca *et al.* 2004). En los análisis

genómicos, se han utilizado varios tipos de marcadores genéticos: morfológicos, bioquímicos (isoenzimas, proteínas) y marcadores basados en ADN.

Los marcadores morfológicos fueron los primeros en ser utilizados en estudios de genética y mejoramiento de plantas, se basan en la identificación de características fenotípicas visuales como forma, color o tamaño. Las limitantes de estos marcadores son, que se encuentran en baja disponibilidad en cada población, presentan bajo nivel de polimorfismo, pueden presentar alteraciones fenotípicas por el ambiente, varias características se encuentran bajo presión poligénica, presentan dominancia y muchos se expresan en estados adultos de la planta, lo cual prolonga el tiempo de evaluación. Los primeros marcadores morfológicos para yuca fueron descritos por Graner (1942), quien identificó la herencia de 2 marcadores, morfología de la hoja y color de la raíz. Posteriormente, Hershey y Ocampo (1982) identificaron 8 marcadores localizados en el tallo, hojas y raíz.

Luego apareció un grupo de marcadores basados en proteínas e isoenzimas, que permitieron conocer más de cerca la estructura genética y sistemática de algunas especies. Hoy se conoce que en los genes que codifican estas proteínas pueden presentar duplicaciones, translocaciones, inserciones de elementos móviles entre otros arreglos cromosómicos, los cuales han generado un alto grado de polimorfismo. Lefevre y Charrier (1993) utilizaron isoenzimas para la caracterización de las relaciones entre accesiones del germoplasma de yuca en Africa, pero su aplicación en la construcción de mapas presenta limitaciones por el número de marcadores isoenzimáticos disponibles, (menor a 50 marcadores) y por su reducido polimorfismo.

Con las nuevas técnicas de la biología molecular surgieron diferentes métodos para detectar variabilidad en una secuencia de ADN que ayuda a descifrar la naturaleza genética de las características cuantitativas, identificando las regiones cromosómicas que las afectan. Las enzimas de restricción, las sondas, y la reacción en cadena de la polimerasa, son algunas de

las técnicas que permiten tener un elevado número de marcadores moleculares y cubrir la mayor parte del genoma de un organismo (Picca *et al.* 2004).

Los marcadores moleculares actúan llevando la selección no sobre la característica directamente, sino sobre el marcador asociado a ella. Estos marcadores no están regulados ambientalmente, son detectable en todos los estadios de la planta y son abundantes, lo que hace que sean útiles en los programas de mejoramiento.

Uno de los mayores aportes de los marcadores moleculares a la agricultura es la participación en la selección asistida por marcadores (MAS molecular assisted selection), la cual se basa en conjugar la variabilidad fenotípica y la genotípica como fuente de información para utilizarla como criterio de selección. Si un marcador molecular está genéticamente ligado a un gen que controla un carácter de interés agronómico, la selección de este marcador resulta en la selección indirecta de dicho gen (Picca *et al.* 2004). La eficiencia de este proceso de selección indirecta depende de la segregación conjunta del marcador y el gen, esta en función de la distancia expresada como la probabilidad de recombinación genética entre el marcador y el gen de interés.

La utilización de los marcadores en los programas de mejoramiento es ventajosa porque permite que la selección sea más independiente del fenotipo y del ambiente. Los avances tecnológicos han permitido simplificar y abaratar el uso de estas metodologías sustituyendo por ejemplo, marcadores basados en hibridación de ADN por marcadores basados en amplificación de ADN que reducen costos y aumentan la eficiencia.

2.3.1 Marcadores basados en hibridación

Entre los marcadores basados en hibridación se encuentran los marcadores de Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), que identifica polimorfismos por el corte de la doble cadena de ADN, por medio de enzimas de restricción. Los fragmentos

generados por dichas enzimas se someten a electroforesis en gel de agarosa, para luego ser separados por tamaños. Para identificar las secuencias de interés en los productos heterogéneos (de bandas), es necesario hibridarlas con otras secuencias de cadena sencilla o sondas que deben ser marcadas radioactivamente con ^{32}P previamente obtenidas en el laboratorio (Ferreira y Grattapaglia 1998).

El más frecuente uso de los marcadores de ADN nuclear es para medir la variación genética en poblaciones de plantas. Éste se hace mediante los loci del ribosoma, los que se caracterizan por ser moderadamente variables y de fácil detección. La variabilidad típicamente observada la hace ideal para medir tales procesos como flujo de genes dentro y entre taxas (Soltis *et al.* 1998). Los RFLP son ampliamente utilizados para identificar genes que controlan un carácter de interés, necesitando solamente una población segregante y que los caracteres evaluados estén segregando en la población.

Los RFLP presentan expresión codominante, esto quiere decir que para cada locus estudiado se puede identificar genotipos homocigotos y heterocigotos permitiendo un análisis de la acción genética y de la interacción entre los alelos. Su limitación es que hay que diseñar previamente una biblioteca de sondas y los clones que van hacer utilizados como sondas, lo cual puede tardar unos cuantos meses.

2.3.2 Marcadores basados en amplificación

La amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa PCR produce un número ilimitado de copias del ADN. Esta técnica comprende la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN con la enzima ADN polimerasa, algunos reactivos y una fuente de calor. Esta técnica se basa en el apareamiento y la polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos utilizado como indicadores que delimitan la secuencia de ADN de doble cadena, la cual es blanco de la amplificación.

Estos iniciadores son sintetizados de forma artificial de manera que sus secuencias de nucleótidos se complementan con las secuencias que flanquean la región de interés (Ferreira y Grattapaglia 1998).

Como variación del protocolo de PCR se encuentra una técnica de amplificado arbitraria para encontrar polimorfismos (RAPDs), la cual utiliza un solo iniciador de diez nucleótidos de secuencia arbitraria. Por la diferencia de solo un par de bases o mutación de punto no se presenta complementariedad del iniciador con el sitio de unión e impide la amplificación de ese segmento. (Ferreira y Grattapaglia 1998). El análisis de los RAPDs se usa como método para mapeo genético y para la cuantificación de poblaciones de variabilidad genética en especies de cultivos relacionados (Soltis *et al.* 1998).

Otros marcadores de amplificación son los microsatélites que consisten en pequeñas secuencias, entre 2 a 8 nucleótidos que se repiten entre 2 hasta 30 veces y al azar a lo largo del genoma. Estas repeticiones pueden ser dinucleótidos (AC)_n, (AG)_n, (AT)_n; trinucleótidos (TCT)_n, (TTG)_n; tetranucleótidos (TATG)_n, donde n es el número de secuencias base repetidas dentro de los loci de microsatélite, su variación en longitud es detectada fácilmente con la reacción en cadena de la polimerasa (Roa *et al.* 2000).

Estos marcadores permiten detectar mutaciones a nivel de ADN mostrando un extenso polimorfismo, debido a la variación de la longitud de la unidad repetitiva en los diferentes loci (Powell *et al.* 1996). Cada segmento de tamaño diferente cuando es amplificado, representa un alelo de un locus que por recombinación pueden expandirse o contraerse generando variedad (Lagercrantz *et al.* 1993).

Las regiones que contienen secuencias simples repetidas son amplificadas por PCR a partir de un par de iniciadores específicos (de 20 a 30 nucleótidos) complementarios a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite (Hoelzel 1998).

La detección de las secuencias vía PCR se realiza en geles de poliacrilamida de alta resolución, estos geles permiten la separación de segmentos que difieren en unas pocas pares de bases, dependiendo del número de nucleótidos del elemento repetido en el microsatélite. Este tipo de electroforesis permite un desplazamiento proporcional al tamaño de las moléculas. Hoy en día, esta técnica es una de las más poderosas químicamente para la resolución de bandas, las cuales migran de acuerdo a la diferencia isoeléctrica bajo un gradiente de pH adecuado mostrando una gran sensibilidad (Bassam *et al.* 1991).

Una modificación de los microsatélites son los EST (Expressed Sequence Tags) que se derivan de clones de ADNc, ARNm transcripto a ADN utilizando la enzima transcriptasa reversa. La ventaja de estos microsatélites es que al ser derivados de ARNm maduro no presentan intrones ni ADN repetitivo. Los ESTs representan genes funcionales que son más útiles como marcadores moleculares que las secuencias anónimas (Picca *et al.* 2004).

Una de las características más importantes para este trabajo es que los marcadores microsatélites expresan codominancia (Paterson 1996), es decir, permiten diferenciar cuando un locus se encuentra en estado homocigoto de uno que se encuentra en estado heterocigoto y que además, se cuenta con marcadores distribuidos a lo largo de todo el genoma.

Los SSR se han utilizado en plantas principalmente para la caracterización de colecciones de germoplasma, mapeo genético, identificación de nuevas fuentes de variación entre especies silvestres y cultivadas, flujo de genes entre y dentro de poblaciones y asociación de características de interés agronómico mediante herencia de características cuantitativas y selección de genotipos que portan dichas propiedades (Fregene *et al.* 2001).

El uso de estos marcadores moleculares aplicados a cultivos busca hacer mejoramiento más eficiente, reduciendo el costo y tiempo para la producción de nuevas variedades (Fregene *et al.* 2001). En CIAT, se han utilizado los marcadores moleculares para identificar secuencias

en el genoma de yuca y entender la estructura de su diversidad genética. Se elaboró un mapa genético de yuca a escala molecular a partir de la segregación de marcadores RFLP, RAPD, microsatélites SSR, y varias isoenzimas (Fregene *et al.* 1997).

Para este caso en particular, la utilización de los marcadores moleculares nos permiten medir el nivel de heterocigosidad en plantas autofecundadas de yuca ayudando en la selección de materiales y permitirá hacer un seguimiento de las distancias genéticas de los parentales seleccionados hasta el final del proceso de autofecundación en etapas más avanzadas.

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

La población de estudio comprendió 316 líneas S_1 . Los progenitores son cuatro materiales elites pertenecientes al proyecto de mejoramiento de yuca del CIAT: SM 1219-9 (con 78 líneas S_1 que conforman la familia AM 331), SM 1511-6 (con 75 líneas S_1 que conforman la familia AM 335), SM 1665-2 (con 92 líneas S_1 que conforman la familia AM 337) y SM 1669-5 (con 71 líneas S_1 que conforman la familia AM 338).

Para la obtención de líneas S_1 los clones elites fueron autofecundados, frotando el polen de la flor estaminada contra los estigmas de una flor pistilada de la misma planta. Una vez se obtubieron las semillas en un número variable para cada clon, fueron germinadas y las plantas obtenidas fueron llevadas a campo y clonadas. Para el estudio de cada familia fueron seleccionadas 100 plantas al azar. Los materiales escogidos fueron sembrados en Ibagué, departamento del Tolima, en el Instituto Colombiano de Agronomía (CORPOICA) en un diseño de bloques completos al azar con 3 repeticiones y parcelas de 3 plantas. Para cada línea S_1 se evaluó altura de la planta (cms), contenido de materia seca (%), peso de raíces frescas (kg/pl), peso de follaje fresco (kg/pl), índice de cosecha y rendimiento de materia seca (kg/pl), el cual se obtiene de multiplicar el peso de raíces frescas (kg/pl) por el contenido de materia seca (%).

El trabajo de análisis molecular se realizó en el laboratorio de Genética de Yuca del Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, en Palmira, Valle del Cauca. La metodología utilizada se basa en el trabajo de Scotti *et al.* 2000, el cual plantea un método de medición para el nivel de heterocigosidad en plantas autofecundadas, que además permite la evaluación de las distancias genéticas de los parentales seleccionados a lo largo del proceso de autofecundación.

Los marcadores microsatélites escogidos para la evaluación hacen parte del programa de Genética de Yuca del CIAT. El programa cuenta con 800 iniciadores, de los cuales se escogieron los 500 que han presentado mayor polimorfismo en estudios anteriores. En una primera evaluación únicamente con los progenitores de cada familia se identificaron los marcadores que muestran el estado del locus en particular, homocigoto o heterocigoto. Los marcadores que se encontraron en estado heterocigotos se evaluaron en toda la población S_1 para ver su segregación e identificar la frecuencia de loci en estado heterocigoto de cada individuo.

3.2 EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN genómico se obtuvo a partir de tejido foliar fresco de los genotipos asequibles en campo. El material se recolectó en sobres de papel y se secó en un horno a 45 °C por 48 h. Se siguió el protocolo de miniextracción de ADN propuesto por Dellaporta *et al.* (1983) con algunas modificaciones realizadas por el laboratorio de Genética de yuca del CIAT (anexo A). Se utilizó de 0.5 g a 1.0 g de tejido vegetal, se maceró en seco y se adicionó arena fina para obtener el material en polvo.

La calidad de ADN se evaluó en geles de agarosa al 0.8%. Los geles se corrieron a 115 voltios por 45 minutos, se observaron en un transiluminador y se fotografiaron en una cámara polaroid foto/UV-21 USA.

Adicionalmente, se cuantificó el ADN en un fluorómetro DyNA QuantTM 200 Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA), basado en una solución de colorante, el cual detecta las uniones de adenina-timina que se presentan en el ADN, impidiendo a su vez leer ARN, puesto que éste no presenta timina. La calibración del fluorómetro se realizó con un patrón de ADN estándar de 100 ng/ μ l. A partir de la evaluación de la concentración se

realizaron las diluciones del material extraído a 10 ng/μl, y se almacenaron a 4 °C permanentemente.

El ADN obtenido se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los iniciadores seleccionados para cada familia. Para la preparación del cóctel de PCR se utilizó 3 μl de ADN a una concentración de 10 ng/ml, 0.3 μl de Taq-polimerasa, 0.3 μl iniciadores forward y reverse a una concentración de 0.2 Mm, 0.6 μl dNTPs en concentración 2,5 Mm y 1.5 μl Buffer para PCR (Anexo B), para cada muestra. El volumen de MgCl₂ varió según la necesidad de concentración requerida para la amplificación (Anexo D). Cada coctel se llevó a un volumen final de 15 μl con agua HPLC, se sirvió en una placa plástica y se llevó a reacción en un termociclador PTC-100TM MJResearch Inc (Massachusetts, USA). Las muestras se denaturalizaron a 95 °C por 5 minutos, se continuó con 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, alineamiento a 55 °C durante 1 minuto, polimerización a 72 °C por 2 minutos, y un ciclo final de extensión por 5 minutos. Para todos los grupo de amplificación se incluyeron controles blancos para detectar posibles contaminaciones (Hantula *et al.* 1997).

3.3 ELECTROFORESIS

Al ADN amplificado, se le adicionó 8 μl de buffer de carga (anexo B), se desnaturalizó a 94 °C por 3 min y se mantuvo en hielo hasta el momento de la carga en geles de alta resolución (poliacrilamida al 4%, anexo B) preparados en una cámara Owl (New Hampshire, USA) Aluminum Backed Sequencing System modelo S3S, con buffer al 1X a 50 °C. Se cargaron 3 μl de la muestra desnaturalizada en los pozos y se corrió con una fuente de poder BioRad Inc (California,USA) a 1600 voltios, 80 watos por 20-40 min.

Al terminar la corrida, se realizó la tinción con plata siguiendo el protocolo de Promega (1993, anexo C) y se leyeron las bandas resultantes con ayuda de un transiluminador y se documentaron en un scanner scanjet 2400 Hewlett-Packard (Houston, USA).

3.4 ANÁLISIS DE DATOS

El registro de los datos se realizó de acuerdo con los patrones de segregación que mostraron las progenes para cada uno de los marcadores evaluados. Para la lectura se designó la letra H para la presencia de 2 bandas (individuo heterocigoto para ese locus), la letra A para la presencia de una banda superior en el gel y la letra B para la presencia de una banda inferior (para diferenciar los individuos homocigotos). Normalmente la nomenclatura A y B se utilizan para diferenciar las bandas provenientes del padre y la madre, como en este caso no se conocen los progenitores de los materiales que se escogieron como progenitores, se calificó A y B solo para diferenciar las bandas. Se desarrolló una matriz de 0 para presencia de una banda (homocigoto para ese locus) y 1 para presencia de dos bandas. Las columnas representan los individuos de cada familia y las filas cada uno de los marcadores que se seleccionaron.

Con la sumatoria de todos los loci evaluados, la heterocigosidad se obtuvo por el porcentaje de loci heterocigotos (H%, Aparicio *et al.* 2006) para cada individuo y se evaluó su distribución (Statistix 8 2003). Se calculó el índice de heterocigosidad (HI) para cada planta, siguiendo la fórmula sugerida en Scotii *et al.* (2000) con ciertas modificaciones, por trabajar con promedios de microsatélites, $HI=100 \times (S_n H\% - S_{n-x} H\%) / S_{n-x} H\%$, donde S_n es la generación de endogamia que se está evaluando y S_{n-x} es la generación referencia. Para nuestro caso, se evaluó la generación S_1 y se tomó como generación referencia los parentales S_0 .

La información sobre la evaluación fenotípica en campo de las líneas S₁ y los progenitores (generación S₀) fue suministrada por el proyecto de mejoramiento de yuca del CIAT. Se determinó rendimiento como parámetro para medir el vigor con respecto al progenitor, si la línea S₁ presenta un rendimiento superior al progenitor este es vigoroso, si por el contrario, el rendimiento es inferior al progenitor, el individuo presenta un vigor negativo o no vigoroso.

Las variables que no se ajustaron a una distribución normal o presentaron variancias heterogéneas para las líneas fueron transformados mediante la función $\sqrt{(X + 0.5)}$ (Gomez y Gomez 1984).

El efecto de depresión por endogamia (InE%) se determinó con base en los promedios de las tres repeticiones de cada variable y se calculó siguiendo la formula $InE\% = 100 \times (S_n X - S_{n-x} X) / S_{n-x} X$, donde X hace referencia al parámetro evaluado (Scotti *et al.* 2000). Se realizaron correlaciones entre los resultados moleculares y los de campo. La heterocigosidad y vigor, e índice de heterocigosidad con efecto de depresión por endogamia. Los resultados se compararon entre y dentro de las familias. Los datos moleculares y agronómicos fueron analizados estadísticamente usando en el programa Statistix 8, 2003.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SELECCIÓN DE MARCADORES

De los 500 marcadores para yuca, se seleccionaron 72 marcadores que presentaron polimorfismo por lo menos para una de las cuatro familias en las evaluaciones con los parentales, incluir marcadores homocigotos, donde solo se presenta un alelo sería inútil para estimar las diferencias en homocigosidad, por que todos los individuos compartirían el mismo alelo, y se sobrestimaría la homocigosidad de todos materiales. También se tuvo en cuenta para la selección, los marcadores que presentaron buena diferenciación de bandas en la corrida del gel con las condiciones establecidas y una distribución alrededor de todo el genoma, aproximadamente 4 marcadores por cada cromosoma, con una distancia considerable entre la mayoría de ellos. En el anexo D se encuentra la conformación de las repeticiones de cada marcador seleccionado y en el anexo E se encuentra la distribución física de estos marcadores en el mapa de yuca con las distancias (en centimorgans) entre ellos.

La selección de los marcadores a utilizar es un punto crítico para el análisis de la correlación entre heterocigosidad y vigor (Balloux *et al.* 2004). Para esta selección, se tuvo en cuenta el alto grado de polimorfismo de los marcadores en trabajos anteriores (Chavarriaga-Aguirre *et al.* 1998; Roa *et al.* 2000), la selección de un número considerable de marcadores para poder cubrir gran parte del genoma y aumentar el poder de correlación con características de vigor de la planta en campo (Balloux *et al.* 2004), y que estuvieran lo más distantes posible para evitar evaluar loci ligados. Sin embargo, una asociación de un solo locus puede estar en desequilibrio de ligamiento sin importar la ubicación en el genoma.

En la Figura 2 se encuentra un ejemplo de la lectura de uno de los marcadores evaluados para cada familia. La codominancia de estos marcadores permite diferenciar los individuos heterocigotos de los homocigotos para el locus en particular. Se encontraron ciertos genotipos que presentan una banda que no corresponde a ninguna de las dos bandas del progenitor, esto muestra que se presentaron casos de polinización abierta, estos genotipos fueron retirados del ensayo. Para la familia AM331 (Figura 2a) se retiró el genotipo AM331-142 descubierto con el marcador ESTssry49, el genotipo presenta una banda superior perteneciente al progenitor SM 1219-9 y una banda inferior que proviene de un progenitor desconocido. En la familia AM337 (Figura 2c) se retiraron dos genotipos, AM337-A1 y AM337-E y para la familia AM338 (Figura 2d) se retiraron cinco genotipos AM338-17, AM338-84, AM338-119, AM338-179 y AM338-313.

Es posible que queden otros individuos dentro del ensayo que no hayan sufrido autofecundación pero es muy poco probable que no se hayan detectado, para eso se necesitaría que en los 72 loci evaluados el individuo presentara para todos los casos homocigosis del progenitor conocido. Este comportamiento no se encontró dentro de nuestra población de estudio. Por lo tanto se puede afirmar con relativa seguridad que las plantas que no fueron eliminadas son efectivamente resultado de una autofecundación.

[Figura 2. Ejemplo de lecturas de un gel. H hace referencia a genotipos heterocigotos, A y B a genotipos homocigotos. a\) Marcador EST ssry 49 para la familia AM331. b\) Marcador EST ssry36 para la familia AM335. c\) Marcador ssry 195 para la familia AM337. y d\) Marcador ssry 195 para la familia AM338.](#)

4.2 EVALUACIÓN DE HETEROCIGOSIDAD

Se decidió utilizar como estimativo del nivel de heterocigosidad la forma cruda (Aparicio *et al.* 2006) debido a que se cuenta con un alto número de marcadores y se utilizaron los mismos para todos los individuos, todos los loci presentan solo dos alelos, no se tuvo en cuenta las generaciones anteriores o pedigree, no se presenta efectos de inmigración o migración y las fecundaciones son controladas, es decir, todos los individuos se encuentran en las mismas condiciones de endogamia.

Se determinó el nivel de heterocigosidad con el que inician los progenitores de cada familia por medio del porcentaje de loci evaluados que se encuentran en estado heterocigoto. La heterocigosidad de los progenitores oscila entre 44.7% y 50% (Tabla 1). Las cuatro familias presentaron comportamientos similares. La reducción de individuos heterocigotos en las progenies fue de 50% en promedio, este resultado está acorde con lo esperado, en el paso de una generación el coeficiente de endogamia esperado¹ se incrementa en 1/2. En la tabla 1 también se encuentra los valores máximos, observamos que los individuos S₁ más heterocigotos se encuentran alrededor de 35% de heterocigosidad. Los individuos con valores mínimos que, pese a su baja heterocigosidad, son viables dentro de la población y presentan una heterocigosidad promedio del 10%.

Tabla 1. Promedios de heterocigosidad estimado para las familias AM331, AM335, AM337 y AM338.

Familia	Heterocigosidad (%)			
	AM331	AM335	AM337	AM338
Progenitor S ₀	49.1	50.0	44.7	45.3
Familia S ₁	25.3	24.0	20.7	19.2
Máximos	36.8	38.8	32.3	31.7
Mínimos	12.7	10.9	10.6	9.2

¹ Coeficiente de endogamia $F=1-(1/2)^t(1-S_0)$, donde t es el número de generaciones de autofecundación.

Los datos cumplen con una distribución normal (Figura 3), ninguna de las cuatro gráficas se encuentra sesgada hacia alguna cola, es decir que la mayoría de individuos presentan valores medios de heterocigosidad, los individuos que se encuentran en el extremo izquierdo muestran menor heterocigosidad.

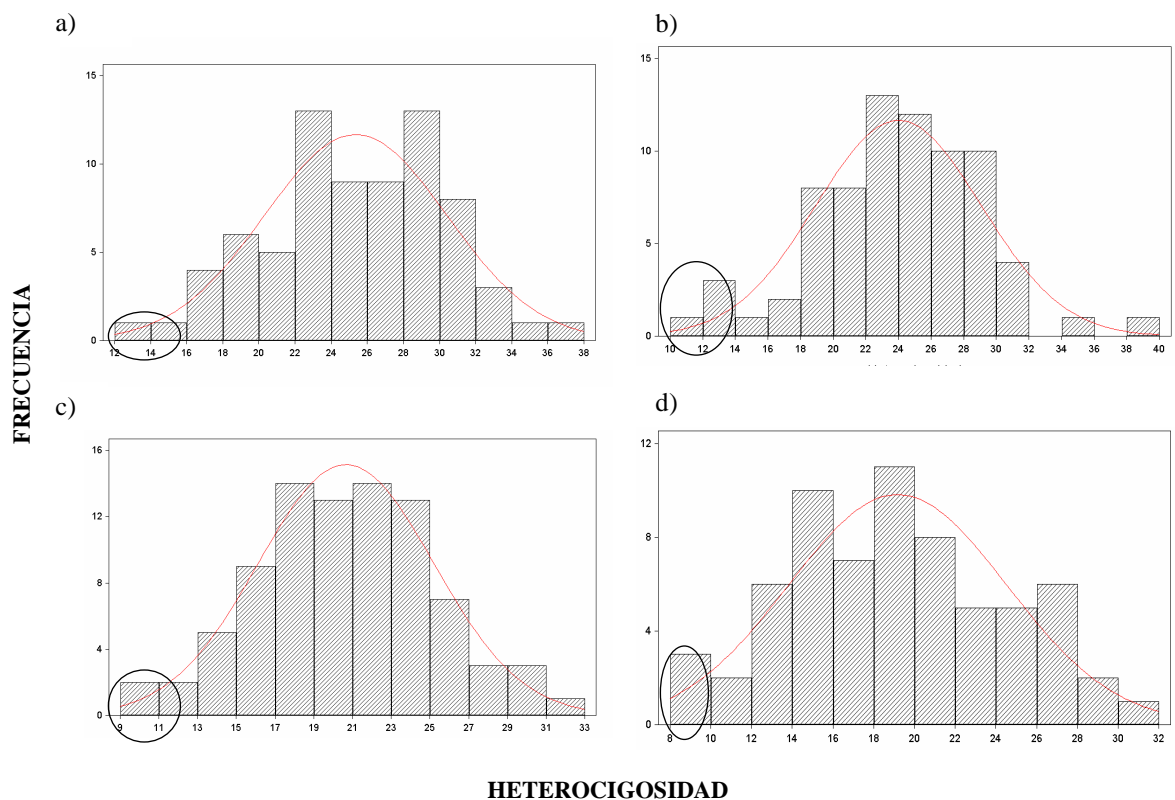


Figura 3. Distribución de los valores de heterocigosidad dentro de cada familia. Encerrados en los círculos rojos se encuentran los individuos más homocigotos (considerando 10% de selección). a) Familia AM331; b) Familia AM335; c) Familia AM337; d) Familia AM338.

Se deberán escoger los individuos más homocigotos con la intención de llegar más rápido a un estado avanzado de homocigosis o línea pura, pero hay que tener en cuenta su comportamiento en campo. Los genotipos que presentan los niveles de heterocigosidad más

bajos, considerando 10% de selección. Para la familia AM331 son: AM 331-87 con una heterocigosidad de 12.7% y AM331-21 con heterocigosidad de 14.5%. Para la familia AM335: los genotipos AM335-100 con H=10.9%, AM335-16 con H=12.1%, AM335-18 con H=13.2% y AM335-127 con 13.4%. Para la familia AM337: los genotipos AM337-70 con H=10.6%, AM337-B con 10.7%, AM337-36 con 11.9% y AM337-89 con 12.4% y para la familia AM338: los genotipos AM338- 172 con H=9.1%, AM338-205 con H=10%, AM338-90 con 10% y AM338-191 con 10.5% (Figura 3).

4.3 EVALUACIÓN DE VIGOR

Una vez se tuvieron todas las evaluaciones de campo, se determinó la depresión endogámica, la cual comienza a verse desde la primera generación, pues una vez realizadas las autofecundaciones de los progenitores, y al llevar a campo las 100 semillas escogidas para cada familia, estas germinaron lentamente, produjeron poca floración y algunas plantas no fueron viables y murieron antes de la primera evaluación. Se presentó una mortalidad de 24%. Sin embargo, la familia AM337 fue la menos sensible con solo 7% de mortalidad. Como menciona Hallauer y Miranda 1988, para la mayoría de las especies alógamas, la depresión comienza en la primera generación de autofecundación, pudiendo afectar severamente el proceso de endogamia aunque no necesariamente inhibirlo.

Se encontraron diferencias significativas entre los genotipos dentro de las diferentes familias para todas las variables evaluadas, esta variación es resultado de la segregación de individuos altamente heterocigotos y puede también incluir diferencias en la tolerancia a la endogamia (Tabla 2).

El efecto de la depresión en el comportamiento agronómico se presenta de manera diferente para cada una de las características agronómica. Para todas las variables evaluadas en campo las familias S_1 presentaron una reducción con respecto al progenitor S_0 . Las

características que son poco heredables y que son controladas por muchos loci se ven más afectadas por la endogamia. Para el caso de la yuca, el rendimiento de materia seca y el peso de las raíces frescas son las características que se encuentran más afectadas (-64.6% y -62.8% respectivamente). Para la variable peso de forraje también se presentó una depresión importante de -43.4%.

El contenido de materia seca en promedio presentó un efecto de -3.8% y altura de la planta de -7.6%, se ven levemente influenciadas por el efecto de endogamia, tanto que para la evaluación de materia seca en la familia AM331 se encontró un valor positivo de 0.76% es decir que no se presentó depresión sino por el contrario en promedio esta familia fue más vigorosa que su progenitor en un 0.76%. Esto puede deberse a que tanto materia seca como altura de planta, son características de alta heredabilidad y al parecer están controladas por pocos loci. Por esta razón, se determinó el valor del rendimiento de materia seca como el mejor estimativo para evaluar el efecto de endogamia de las plantas de yuca (Tabla 3).

En cuanto a las familias, AM 337 presentó la menor depresión por endogamia, valores inferiores al promedio para todas las variables excepto para índice de cosecha, hace pensar que esta familia es la mejor para autofecundar, porque es la de mayor tolerancia a endogamia. Por el contrario, la familia 335 fue la más afectada, presentando valores inferiores al promedio para todas las variables excepto índice de cosecha (Tabla 3).

Tabla 2. Análisis de varianza entre genotipos en las cuatro familia S₁ para las variables de altura de planta (AP), peso de raíces frescas (PR), peso de follaje (PF), índice de cosecha (IC), contenido de materia seca (MS) y rendimiento de materia seca (RM).

F.V.	GL	CUADRADOS MEDIOS					
		AP	PR	PF	IC	MS	RM
Repetición	2	5368.34**	0.35424ns	0.12968ns	0.02145*	27.4449**	0.09799ns
Líneas S1-331	73(72)	2097.02**	0.42185**	0.24775**	0.00693*	10.0247**	0.08086**
Error	119(116)	1047.73	0.19150	0.07618	0.00482	53,592	0.07618
XS ₁		229.14	3.17	2.14	0.57	27.70	0.90
XS ₀		246.15	9.92	2.94	0.76	29.74	2.93
CV%		14.23	24.64	17.77	6.77	8.30	17.64
<hr/>							
F.V.		AP	PR	PF	IC	MS	RM
Repetición	2	8446.17**	0.32531*	0.47266**	0.02988**	6.7506ns	0.08217*
Líneas S1-335	70	1094.81**	0.26519**	0.08794**	0.02437**	16.0531**	0.06777**
Error	113	528.24	0.07785	0.03820	0.00597	73,653	0.01820
XS ₁		193.86	1.62	1.03	0.59	32.25	0.53
XS ₀		216.81	4.50	1.80	0.71	35.31	1.59
CV%		11.94	19.67	16.37	12.70	8.37	13.44
<hr/>							
F.V.		AP	PR	PF	IC	MS	RM
Repetición	2	10108.7**	0.15139ns	1.35483**	0.17593**	523.513**	0.19311**
Líneas S1-337	83	1469.7**	0.25123**	0.10552**	0.03944**	21.380**	0.08303**
Error	157	740.8	0.06871	0.04560	0.00948	13,135	0.02815
XS ₁		164.31	1.63	1.61	0.47	31.17	0.52
XS ₀		174.80	3.29	1.93	0.63	32.10	1.07
CV%		16.50	18.90	15.14	20.87	11.70	23.76
<hr/>							
F.V.		AP	PR	PF	IC	MS	RM
Repetición	2	1140.74*	0.02168ns	0.05820ns	0.05293**	551.264ns	0.00315ns
Líneas S1-338	62(61)	1158.68**	0.29766**	0.11708**	0.03362**	665.232**	0.05729**
Error	104(103)	347.29	0.05313	0.02539	0.00866	374,841	0.01058
XS ₁		191.83	1.45	1.32	0.49	30.36	0.44
XS ₀		207.64	4.23	2.70	0.61	31.79	1.35
CV%		9.59	16.99	11.90	19.08	6.38	10.69

Los valores entre de paréntesis () son los grados de libertad para MS y RM. Sólo se utilizaron los individuos que produjeron raíces.

*P<0.05

**p<0.01

Tabla 3. Efecto de la depresión endogámica en las cuatro familias para altura de planta (AP), peso de raíces frescas (PR), peso follaje (PF), índice de cosecha (IC), contenido de materia seca (MS) y rendimiento de materia seca (RM).

Familia	Efecto de Endogamia (InE%)					
	AP	PR	PF	IC	MS	RM
AM331	-7.10	-69.73	-47.91	-28.73	0.76	-70.89
AM335	-10.48	-62.48	-57.15	-14.73	-8.07	-65.38
AM337	-6.32	-53.39	-17.59	-28.71	-3.34	-55.13
AM338	-6.70	-65.60	-49.52	-19.65	-4.57	-66.95
Promedio	-7.65	-62.8	-43.0425	-22.955	-3.805	-64.5875

4.4 RELACIÓN ENTRE VIGOR Y HETEROCIGOCIDAD

La relación entre el índice de heterocigosidad (HI) y el vigor o efecto de endogamia ($InE\%_{RM}$) respecto al rendimiento para todas las líneas se muestra en la Figura 4. El punto de referencia 0,0 representa la ubicación del parental. Ningún individuo igualó la heterocigosidad del progenitor, por esta razón todos presentan valores negativos de HI. Se ve gráficamente la reducción en la heterocigosidad para las cuatro familias.

Las líneas que conforman la familia AM331 presentaron en promedio una reducción en la heterocigosidad de $HI = -48.36$ (Figura 4a). La familia AM335 de $HI = -51.99$ (Figura 4b). La familia AM337 de $HI = -54.7$ (Figura 4c) y la familia AM338 presentó una reducción de $HI = -57.09$ (Figura 4d).

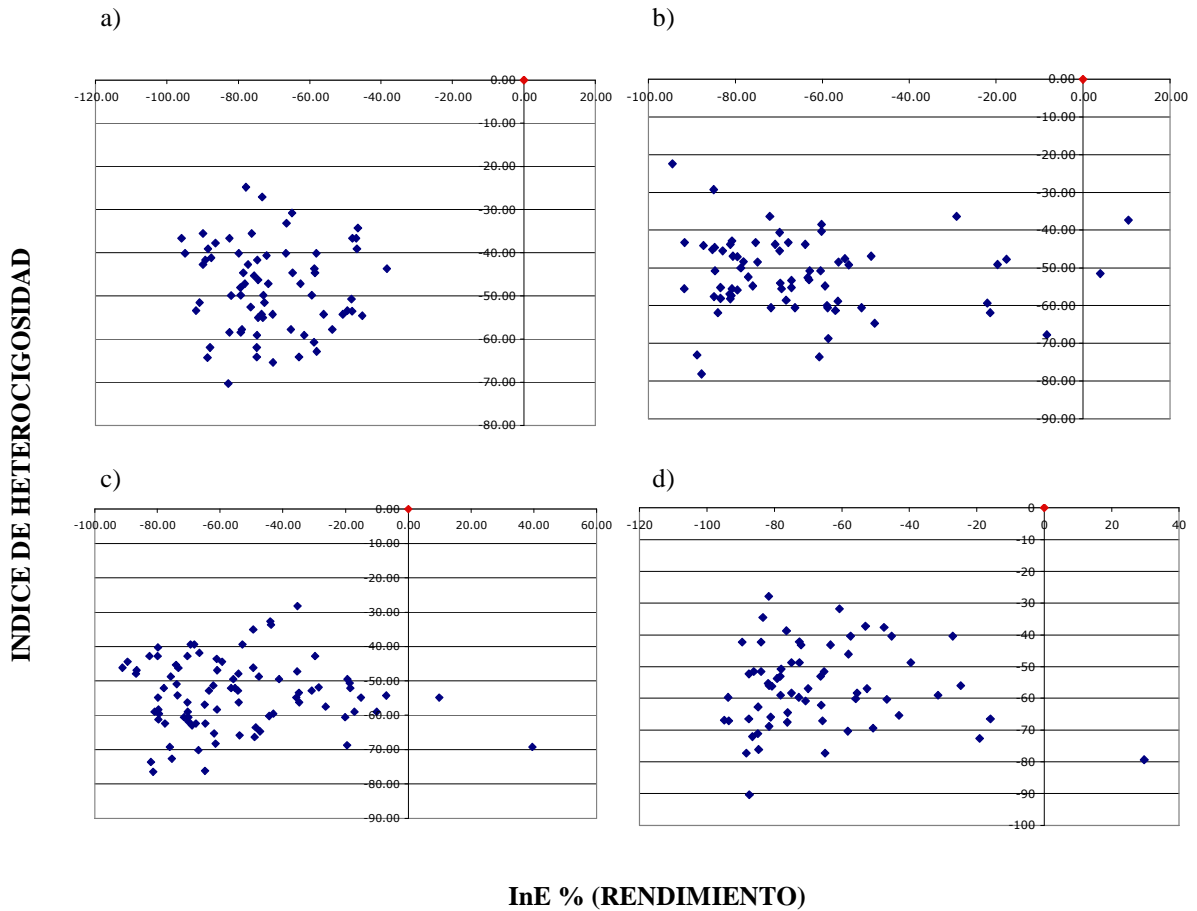


Figura 4. Heterocigosidad y efecto de endogamia en el rendimiento. El punto rojo hace referencia al progenitor de cada familia. a) Familia AM331; b) Familia AM335; c) Familia AM337; d) Familia AM338.

Con respecto al vigor, las cuatro familias AM331, AM335, AM337 y AM338 presentaron relaciones similares entre progenitor y progenie. El rango de variación es amplio pero todos los individuos presentan una depresión con respecto a su progenitor excepto por uno o dos individuos que presentan a pesar de la reducción de heterocigosidad un buen comportamiento en campo incluso superior al del progenitor (Figura 4b, 4c, y 4d), estos individuos son vigorosos por presentar tolerancia a la depresión endogámica. En la familia

AM331, ninguna línea presentó vigor o valores de rendimiento superiores al del progenitor (Figura 4a).

En general, el evento de endogamia se evidenció por una fuerte depresión por endogamia que se detectó con las evaluaciones en campo, y por la considerable reducción de la heterocigosidad multilocus para las cuatro familias evaluadas. Sin embargo, los materiales S_1 más vigorosos no fueron necesariamente los más heterocigotos. Por lo cual, no se presentó correlación entre el nivel de heterocigosidad y el vigor. La familia AM331 presentó un $r^2=0.056$, la familia AM335 un $r^2=0.016$, la familia AM337 $r^2=0.009$, y la familia AM338 un r^2 de 0.019. Sin embargo, se pueden diferenciar individuos, dentro de cada familia, con reacciones muy diferentes frente al efecto de endogamia.

Los resultados confirman que la yuca presenta una gran heterocigosidad puesto que en la progenie S_1 se presentó una segregación con un rango de vigor muy amplio en el rendimiento de materia seca. También se puede confirmar que el grado de depresión por endogamia varía enormemente no sólo entre familias, sino entre genotipos (Figura 4).

La correlación entre heterocigosidad y vigor se estimó también para el resto de las variables evaluadas en campo. El comportamiento para peso de la raíz fresca (datos no mostrados) fue muy similar al de rendimiento de materia seca tanto entre familias como de manera individual, esto es de esperarse puesto que el rendimiento se obtiene de multiplicar el peso de las raíces frescas (kg/pl) de una planta por el contenido de materia seca resultante de esas mismas raíces (%), sin embargo, a nivel de producción se maneja el término rendimiento por lo tanto se escogió esa evaluación. Si bien no existe una correlación entre nivel de heterocigosidad y el efecto de endogamia con respecto a estas dos características, son las más eficientes para evaluar depresión.

Por el contrario, el contenido de materia seca no fue una buena variable para analizar depresión por endogamia. El efecto de endogamia no es significativo 5.73% (Tabla3), en

promedio las líneas S₁ no sufrieron depresión o este efecto fue muy leve. Sin embargo, hay materiales muy deprimidos y otros muy vigorosos con respecto a materia seca, sin importar su nivel de heterocigosidad (Figura 5).

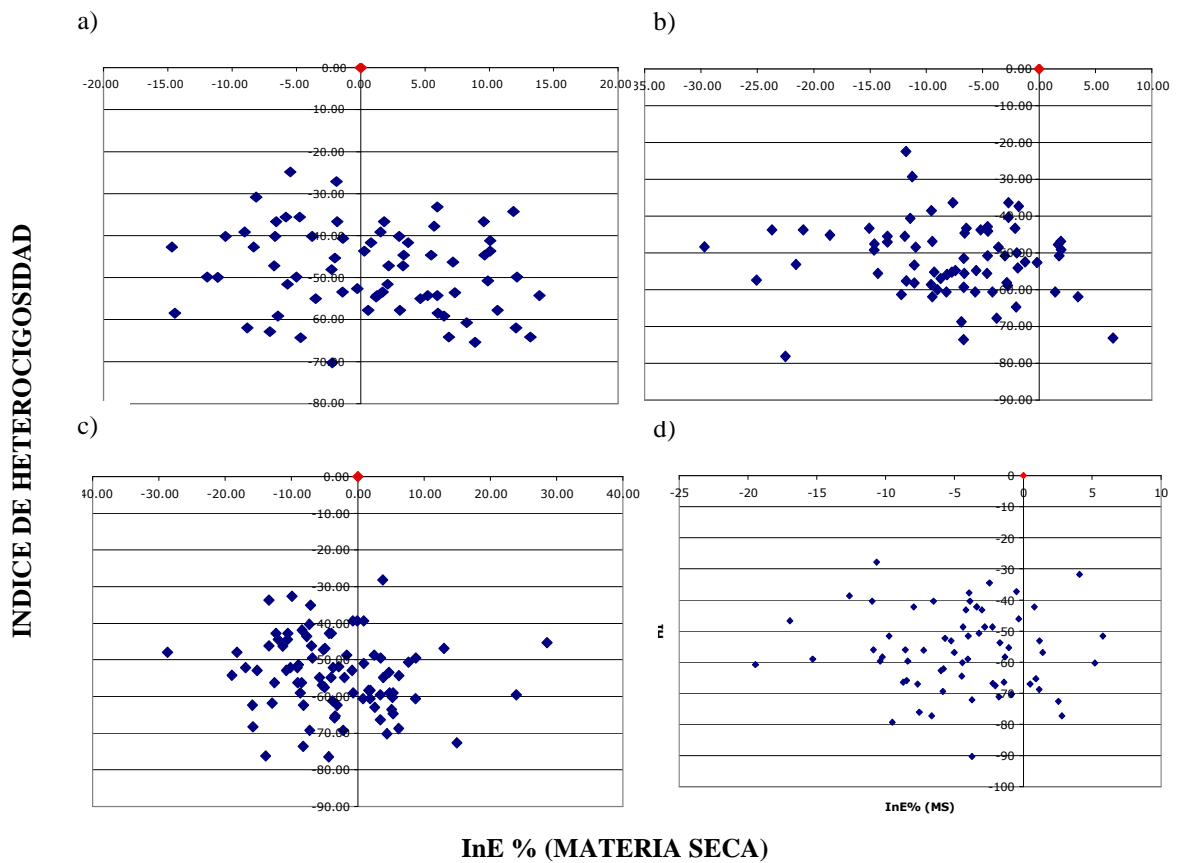


Figura 5. Heterocigosidad y efecto de endogamia en materia seca. El punto rojo hace referencia al progenitor de cada familia. a) Familia AM331; b) Familia AM335; c) Familia AM337; d) Familia AM338.

Los resultados obtenidos de no correlación para todas las variables entre heterocigosidad y vigor pueden explicarse bajo varias situaciones. En la evaluación del genoma no se puede

diferenciar los alelos autocigotos consecuencia de la endogamia (Slate *et al.* 2004) de los alocigotos, por medio de los marcadores moleculares se diferencia solamente los homocigotos de heterocigotos, por lo cual no se estaría evaluando la misma cantidad de loci involucrados en los efectos de endogamia que se registran en campo.

Si bien, los 72 marcadores ensayados presentan un buen cubrimiento del genoma, para cubrir el efecto general, partiendo del hecho que la endogamia afecta a todo el genoma de manera homogénea donde se va perdiendo la sobredominancia asociativa en conjunto, hasta este momento no se conocen marcadores microsatélites relacionados específicamente con rendimiento de materia seca, se desconoce los genes bajo selección.

Si los loci evaluados por microsatélites son neutrales (o no funcionales) no se puede correlacionar con características de producción en campo. Sin embargo, la heterocigosidad que se evalúa puede ser la asociación entre loci neutrales y loci bajo selección (Hansson y Westerberg, 2002), siguiendo la hipótesis del efecto local. Para esto habría que hacer un seguimiento de una porción del cromosoma en particular, todos los marcadores concentrados en el mismo cromosoma, para detectar un posible ligamiento, y correlacionar el vigor con la heterocigosidad a través de los loci involucrados (Slate *et al.* 2002).

Otra posibilidad es que la sumatoria del estado heterótico de cada marcador, paso para calcular el promedio de heterocigosidad, esté ocultando el comportamiento de uno o algunos de los loci que sí se encuentra relacionado con el rendimiento. Sin embargo, después de analizar el comportamiento de los 72 marcadores individualmente no se encontró ninguna tendencia entre los individuos con el mismo estado heterótico. Ningún marcador en particular presentó correlación entre heterocigosidad y vigor.

Los resultados pueden explicarse también, bajo el papel que se le da al vigor híbrido. La pérdida de vigor por no hibridación está enmascarando ese vigor dado por la calidad de ciertos genes y las combinaciones favorables de los mismos. La reducción de la

heterocigosidad por medio de la autofecundación los desenmascara y permite la expresión de genes recesivos y de las interacciones de genes complementarios que representan un alto valor de selección (Demarly 1979).

La idea de estos agrupamientos rompen la estructura de heterosis vista anteriormente, porque se han estado formando buenas combinaciones de loci, no necesariamente heterogéneas a través de la evolución y se encuentran agrupados en segmentos protegidos en los cromosomas, tienen inhibidores de recombinación y además sus uniones están controladas por factores genéticos que actúan en epístasis cis o en trans. En condiciones normales estos bloques protegidos se comportan como unidades segregacionales, pero en malas condiciones (alteración del medio ambiental, cambios en el régimen de mejoramiento, tejidos de cultivos, entre otros) puede verse alterada la cohesión estructural (Demarly 1979). En este modelo se asume que la depresión por endogamia esta distribuida homogéneamente en el genoma y que los loci no se encuentran ligados. Sin embargo, cuando estas condiciones se violan, la lectura de los resultados explican menos el efecto general y pasan a ser de efecto local (Slate *et al.* 2004), es decir, que la contribución de cada uno de los loci al vigor es significativamente diferente pero los marcadores que si se encuentren ligados van a responder de manera similar en la correlación heterocigosidad-vigor.

Estos agrupamientos se logran despejar aun más en S_2 o S_3 (Rotili *et al.* 1999), al autofecundar, estos no contribuyen a la disminución de heterocigosidad sino que pasan manteniendo su expresión y por lo tanto manteniendo un elevado vigor. Si bien, este modelo de endogamia esta planteado para plantas autotetraploides (Demarly 1979) se adapta muy bien con los resultados de este trabajo y permite posibles explicaciones y predicciones del comportamiento de los materiales autofecundados en próximas generaciones.

Pemberton (2004) plantea que la correlación entre heterocigosidad y vigor requiere una nueva interpretación. Sin embargo, es importante tener en cuenta la información con la que se cuenta en poblaciones mejoradas, donde se mantiene controlada la diversidad alélica, la forma de reproducción, donde los análisis de una generación son decisivos para continuar con la segunda generación y donde generalmente se conoce el pedigree de la población.

Este trabajo hace una revisión robusta en el primer estado de endogamia de poblaciones mejoradas de yuca, donde la finalidad es seleccionar individuos tolerantes a depresión para seguir una segunda generación de autofecundación. Sin embargo, el estudio del efecto de endogamia en generaciones siguientes permitirá conocer el comportamiento de la población frente al efecto real de endogamia, predecir el estado de heterocigosidad en que se encuentra una población en un determinado estado de endogamia por medio del seguimiento de los marcadores evaluados en esta ocasión.

4. 5. SELECCIÓN DE INDIVIDUOS

Para evaluar un individuo en términos de depresión endogámica se debe tener en cuenta de dónde proviene la variación. La variación de la depresión endogámica depende del nivel original de heterocigosidad del parental, y de su organización genética. La selección de los individuos no se puede hacer sólo con base en la depresión endogámica porque la comparación entre progenitor y progenie está sesgada por la herencia del progenitor (Rotili *et al.* 1999). Si el progenitor proviene de un cruce $S_0 \times S_0$, puede incrementar o no el rango de heterocigosidad y por consiguiente variar el vigor. Como vemos en estos resultados, es posible encontrar dos individuos S_1 (derivados de dos progenitores diferentes) con una depresión endogámica similar, pero con un porcentaje de rendimiento muy diferente. Entonces, la selección deberá estar basada en la combinación simultánea de baja heterocigosidad y vigor de la progenie en sí misma. Se espera que al hacer la selección de

la mejor genotipo y llevarlo a la siguiente generación de endogamia, ocurra una reducción de la depresión como está reportado para el caso de alfalfa (Rotili *et al.* 1999).

El individuo AM335-84 mostró una reducción en la heterocigosidad de 51.5% y un vigor de 3.97% superior al progenitor. Este es un buen material para llevar a una segunda generación de autofecundación, la S_2 resultante seguirá reduciendo en heterocigosidad pero seguramente seguirá siendo viable con respecto al vigor por ser tolerante a endogamia. De esta misma familia también sobresalen otros buenos materiales que aunque no hayan superado a su progenitor en vigor, la depresión es leve y presentan una muy baja heterocigosidad. El individuo AM335-119, presenta una reducción de 67.74% en heterocigosidad y una depresión por endogamia de apenas 8.33%. Seguido se encuentran los materiales AM335-120, que muestra reducción de heterocigosidad de 61.9% con depresión de 21.39% y AM335-156, con reducción de heterocigosidad igual a 59.4% y una depresión de vigor del 22%. El individuo AM335-87 aunque presentó un vigor por encima del progenitor de 10.44%, la reducción de heterocigosidad fue inferior a lo esperado, $HI=37.3\%$, si se siguiera el proceso de autofecundación con este individuo no se llegaría tan rápido a la obtención de una línea pura (Figura 4).

Para la familia AM337, los individuos AM337-138, con reducción de H de 69.23% y un vigor de 39.53% por encima del progenitor, y AM337-59, con reducción de H 54.86% y un vigor de 9.89%, son excelentes candidatos para pasar a S_2 . Los materiales AM337-90 y AM337-293, con una reducción de $H=54.25$ y 58.9%, y una leve depresión de 7.02% y 10.11%, respectivamente, también hacen parte del grupo de las líneas para llevarla a la próxima generación de autofecundación. Hay que tener en cuenta que la familia AM337 fue la familia con mayor frecuencia de materiales sobrevivientes y una menor depresión por endogamia en las diferentes características agronómicas evaluadas.

En la familia AM338 se encontró un material sobresaliente, AM338-172 el cual presentó una reducción muy fuerte en heterocigosidad de 79.3% y un elevado vigor superior al

progenitor en 29.7%. Además se encontraron otros buenos materiales como AM338-110 con 66.46% de reducción en la heterocigosidad y una depresión del 15.9% y AM338-119 con una reducción de 72.57% en heterocigosidad y una depresión del 19.12% con respecto al rendimiento.

Por último para la familia AM331, los datos muestran que hacer una selección en S_1 sería ineficiente. Los materiales más vigorosos presentan una depresión del 40%. Sin embargo, puede que estas líneas presenten una correlación en estados más avanzados de endogamia, en S_2 o S_3 (Scotti *et al.* 2000).

5. CONCLUSIONES

Se seleccionaron 72 marcadores útiles para evaluar el estado de heterocigosidad en líneas endogámicas de yuca, por su alto polimorfismo, por que cubren el genoma y por que permitirán hacer un seguimiento en las generaciones siguientes de endogamia.

La heterocigosidad reportada para las líneas S_1 fue de 22.3%, en esta primera generación de autofecundación se redujo 1/2 de la heterocigosidad que se encontró en los progenitores S_0 .

Los materiales S_1 más vigorosos no son necesariamente los más heterocigotos. Pero la selección de individuos se debe hacer en base a la combinación de baja heterocigosidad y al vigor medido por rendimiento que refleja la tolerancia que tiene el material a depresión por endogamia.

Se confirma que la yuca presenta una gran heterocigosidad porque la segregación de la progenie S_1 mostró un rango de vigor muy amplio. Y el efecto de depresión por endogamia varía enormemente no sólo entre familias, sino entre genotipos dentro de cada familia.

La familia AM337 es la más tolerante a endogamia por presentar menor depresión para todas las características agronómicas, mantener mayor número de individuos viables en campo y reducir su heterocigosidad más de lo esperado en la primera generación de endogamia. Contrario a la familia AM331 para la cual la selección en esta primera generación es ineficiente puesto que no presenta materiales sobresalientes bajo el criterio de selección.

Se recomienda pasar a una segunda generación de autofecundación a los siguientes individuos: De la familia AM335, AM335-84, AM335-119, AM335-120 y AM335-156. De la familia AM337, los individuos AM337-138, AM337-59, AM337-90 y AM337-293 y

de la familia AM338, AM338-172, AM338-110 y AM338-119 por cumplir con los criterios de selección.

6. PROYECCIONES

Para seguir con el estudio de las líneas endogámicas se deberá llevar a etapas más elevadas de autofecundación (S_2 , S_3 y S_4) las plantas que se seleccionaron por ser las más tolerantes dentro de cada familia y evaluar la reducción progresiva de la heterocigosidad. Se debe hacer una selección en cada generación para hacer más eficiente el proceso, utilizando los marcadores ya escogidos para hacer un seguimiento de las distancias genéticas de los parentales seleccionados hasta el final del proceso de autofecundación en las etapas más avanzadas.

Sin embargo, se deberá profundizar en el conocimiento de los marcadores microsatélites, y trabajar en la detección de loci que representen características cuantitativas (QTL), en especial aquellos que estén relacionados con rendimiento de materia seca, y habría que tener en cuenta los ligamientos que se presentan entre ellos, con esto se precisarían los resultados y se podría fortalecer la correlación entre heterocigosidad y vigor para hacer una escogencia de materiales con mayores criterios de selección.

BIBLIOGRAFÍA

- Aparicio, JM. Ortego, J. Cordero, J. 2006. What should we weigh to estimate heterozygosity, alleles or loci? *Molecular Ecology*. 15:4659-4665.
- Balloux, F. Amos, W. Coulson, T. 2004. Does heterozygosity estimate inbreeding in real populations? *Molecular Ecology*. 13: 3021-3031.
- Bassam, B. Caetano, G. Gresshoff, P. 1991. Fast and sensitive silver of DNA in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*. 80-83.
- Ceballos, H. Morante, N. Calle, F. Lenis, J. Jaramillo, G. Pérez, J. 2002. La Yuca en el Tercer Milenio. Capítulo 18. Mejoramiento Genético de la Yuca. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia*. p. 322.
- CIAT. 1997. Improved Cassava for the Developing World. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia*.
- Charlesworth, B. Charlesworth, D. 1999. The genetic basis of inbreeding depression. *Genet Res* 74: 329-340.
- Chavarriaga-Aguirre, P. Maya, MM. Bonierbale, MW. Kresovich, S. Fregene, M. Tohme, J. Kochert, G. 1998. Microsatellites in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. *Theor. Appl. Genet* 97: 493-501.
- Cock, J. 1989. La yuca, Nuevo potencial para un cultivo tradicional. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*. Cali, Colombia.

- Cock, J. 1985. Cassava: new potencial for a neglected crop. *West-view Press*, Boulder, Colorado.
- Coltman, DW. Pilkington, JG. Smith, JA. Pemberton, JM. 1999. Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free living, island population. *Evolution*. 57:971-983.
- David, P. 1998. Heterozygosity- fitness correlation: new perspective on old problems. *Heredity*. 80:531-537.
- Dellaporta, S. Wood, J. Hicks, J. 1983. A plant DNA minipreparation. Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1. 14:19-21.
- Demarly, Y. 1979. The concept of linkat. *Proc. Conf. Broadening Genet. Base Crops. Wageningen, 1978. Pudoc, Wageningen 1979.* 257-265.
- East, E.M. 1908. Inbreeding in corn. In *Connecticut Agric. Exp. Sta. Rpt. 1907*, p. 419-428.
- FAO/FIDA (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Fondo Internacional de desarrollo Agrícola) 2002. La economía mundial de la yuca: hechos, tendencias, y perspectivas. Roma, Italia. 53.
- Ferreira, M. Grattapaglia, D.1998. Inducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. *Embrapa*. Brasilia, DF. p. 221.
- Fregene, M. Angel, F. Gomez, R. Rodriguez, F. Chavarriga, P. Roca, W. Tohme, J. Bonierbale, MW. 1997. A molecular genetic map for cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theoretical and Applied Genetics*. 95:431-441.

- Fregene, M. Roca, W. Okogbenin E. Akano, A. Mba, C. Chavarriaga, P. Tohme, J. Ospina, B. Ceballos, H. 2001. Cassava's potencial in Asia in the 21st century present situation and future research and development needs. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) and Institute of Agricultural Sciences of South Vietnam (IAS)*. Cali, Colombia.
- Ginzburg, L. R. 1979. Why are heterozygotes often superior in fitness? *Theor. Pop. Biol.* 15:264-267.
- Ginzburg, L. R. 1983. Theory of Natural Selection and Population. *Growth. Benjamin/Cummings*, Menlo Park, Ca.
- Gomez, K. Gomez, A. 1984. Statistical Procedures for agricultural research. Capítulo 7. Problem Data. 2ed. *Johnwiley & Sons*. NY. USA. p. 272-313.
- Graner, E.A. 1942. Genética de Manihot. *Bragantia*. 2, 13-22.
- Griffing, B. 1975. Efficiency change due to use of double-haploids in recurrent selection methods. *Theoretical and Applied Genetics*. 46: 367-386.
- Hallauer, A. Miranda, F. 1988. Quantitative genetics in maize breeding. 2^a. ed. *Iowa State University Press*, Iowa, E.U. p 468.
- Hallauer, A. Russell, W. Lamkey, K. 1988. Corn breeding. En: G.F. Sprague y J.W. Dudley, eds. *Corn and corn improvement*, Madison, WI, USA, American Society of Agronomy. p. 463-564.

- Hansson, B. Westerberg, L. 2002. On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology*. 11:2467-2474.
- Hantula, J. Dusabenyagasani, M. Hamelin, R. 1997. Random Amplified Microsatellites (RAMS) a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Eur. J. For.Path.* 26: 159-166.
- Havey, MJ. 1998. Concepts and breeding of heterosis in crops plants. Capitulo 9. Molecular analyses and heterosis in the vegetables: can we breed them like maize?. *Crop Science Society of America*. Publicación especial N° 25. 109-116.
- Hershey, C. Ocampo, C. 1989. New market genes found in cassava. *Cassava Newsletter*. 13:1, 1-5.
- Hoelzel, A. 1998. Molecular analysis of populations. A practical approach. Department of Biological Sciences. *University Durham*. p. 237-26 .
- Ito, P.J. Currence, T.M. 1965. Inbreeding and Heterosis in asparagus. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 86: 660-664.
- Jenkins, M. 1935. The effects of inbreeding and of selection within inbred lines of maize upon the hybrids made after successive generations of selfing. *Iowa State Coll. J. Sci.*, 9: 429-450.
- Jenning, D. Hershey, C. 1985. Cassava breeding a decade of progress from international programs. *Progress in Plant Breeding. Butterworths*. London, Boston. p. 89-116.
- Jones, H. Davis, G. 1944. Inbreeding and heterosis and their relation to the development of new varieties of onions. *USDA Tech. Bull.* N°. 874. USDA, Washington. DC.

- Kawano, K. Amaya, A. Daza, P. Rios, M. 1978. Factor affecting efficiency of hybridization and selection in cassava. *Crop Science*. 18:373-377.
- Lagercrantz, U. Ellegren, H. Anderson, L. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic acids Research*. 21. 5:1111-1115.
- Lefevre, F. Charrier, A. 1993. Isoenzyme diversity within Africa Manihot germplasm. *Euphytica*. 66:73-80.
- Ledig, F. 1986. Heterozygosity , heterosis and fitness in outbreeding plants. *Conservation Biology: The science of scarcity and Diversity*. Ed. Soulé M. Sinauer Associates, Inc. New York. p. 77-90.
- Lentini, Z. Reyes, P. Martínez, C. Núñez, V. Roca, W. 1994. Mejoramiento de arroz con cultivo de anteras: Aplicaciones en el desarrollo del germoplasma adaptado a ecosistemas latinoamericanos y el Caribe. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*. Cali, Colombia. p. 79.
- Magoon, M.L. Krishnan, R. Vijaybai, K. 1969. Morphology of pachytene chromosomes and meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. *Cytologia* 34: 612-618.
- Miranda, F. 1999. Genetics and exploitation of heterosis in crops. Capítulo 7. Inbreeding and heterosis. *American Society of Agronomy*. p. 69-77.
- Nassar, N. Collevatti, R. 2005. Microsatellite markers confirm high apomixis level in cassava bred clones. *Hereditas*. 142:33-37.

- Okezie, B. Kosikowski, F. 1991. Cassava as a food. *CRC Critical reviews in food science and nutrition*. 17. 3:259-275.
- Ohta, T. Kimura, M. 1970. Development of associative overdominance through linkage disequilibrium in finity populations. *Genetical Research*. 16: 165-177.
- Olsen, K. Schaal, B. 1999. Evidence on the origen of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 5586-5591.
- Paliwal, R.L. 2001. Maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. <http://www.fao.org/DOCREP/3/X7650S/X7650S00.HTM>
- Paterniani, E. 1978. Melhoramento e producao do milho no Brasil Piracibada/ ESALQ. *Marprint. Fundacao Cargill*. p. 650.
- Paterson, A. H. 1996. Genome Mapping in Plants. *Academic Press, California and R. G. Landes Company, Austin, USA*.
- Pemberton, J. 2004. Measuring inbreeding depression in the wild: the old ways are the best. *Trends in Ecology and Evolution*. 19, 12: 613-615
- Perry, A. 1941. Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae. *American Journal of Botany*. 30:527-54.
- Picca, A. Herguera, M. Salomón, N. Carrera, A. 2004. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Capitulo 4. Marcadores moleculares. (http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2_cap4.pdf) p. 61-68.

- Promega. 1993. DNA Silver Staining System, Technical Manual.
- Powell, W. Morgante, M. Doyle, J. McNicol, J. Tingey, S. Rafalki, A. 1996. Genepool variation in genus *Glycine* subgenus *Soja* revealed by polymorphic nuclear and chloroplast microsatellites. *Genetics*. 144: 793-803.
- Pujol, B. David, P. McKey, D. 2005. Microevolution in agricultural environments: how a traditional Amerindian farming practice favours heterozygosity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae)
- Roa, A. Chavarriaga, P. Duque, M.M. Bonierbale, N. Iglesias, C. Thome, J. 2000. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. *American Journal of Botany* Vol. 87 N°11; p. 1647- 1655.
- Rogers, D.J. Appan, S.G. 1973. *Manihot; Manihotoides* (Euphorbiaceae). Flora Neotropica. Monograph no. 13. *Hafner Press*, NY. EU. p. 272.
- Rotili, P. Gnocchi, G. Scotti, C. Zannone, L. 1999. Some aspects of breeding methodology in alfalfa: En Busbice, T. Rotili, P. Bingham, T. Proc. "The Alfalfa genome" Conf. (www.naaic.org/TAG/TAGpapers/rotili/rotili.html)
- Scotti, C. Pupilli, F. Salvi, S. Arcioni, S. 2000. Variation in vigour and in RFLP-estimated heterozygosity by selfing tetraploid alfalfa: new perspectives for the use of selfing in alfalfa breeding. *Theor. Appl. Genet.* 101:120-125.
- Shull, G. 1952. Beginnings of the heterosis concept. Gowen JW (ed.) Heterosis. *Iowa State College Press*, Ames. p. 14-48.

- Shull, G.H. 1908. The composition of a field of maize. *Am. Breed. Assoc. Rep.*, 4: 296-301.
- Simmonds NE. 1976. Evolution of crop plants. 3^a. ed. *Longman* Londres, UK. p. 339.
- Slate, J. David, P. Dodds, KG. Veenliet, BA. Glass, BC. Broad, TE. McEwan, JC. 2004. Understanding the relationship between the inbreeding coefficient and multilocus heterozygosity: theoretical expectations and empirical data. *Heredity*. 93, 255-265.
- Slate, J. Visscher, PM. McGregor, SStevens, DR. Tate, ML. Pemberton, JM. 2002. A genome scan for QTL in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). *Genetics*. 162:1863-1873.
- Soltis, D. Soltis, P. Doyle, J. 1998. Molecular systematics of plants II DNA Sequencing. *Kluwer Academic Publishers*. New York.
- Sprague, G.F. 1946. Early testing of inbred lines of corn. *J. Am. Soc. Agron.* 38: 108-117.
- Statistix 8 for Windows. Analytical Software. 2003. Tallahassee, FL. USA.
- Stringfield, G. 1974. Developing heterozygous parent stocks for maize hybrids. DeKalb Ag. Research. IL. USA.
- Suárez, M.C. Bernal, A. Gutierrez, J. Tohme, J. Fregene, M. 2000. Developing expressed sequence tags (ESTs) from polymorphic transcript-derived fragments (TDFs) in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Genome*. 43:62-67.
- Vallejo, F. Estrada, E. 2002. Mejoramiento Genético de Plantas. Capítulo 13. Endogamia. *Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira*. p. 163- 182.

Wright, S. 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. *Am Nat* 56: 330-339.

ANEXOS

Anexo A. Protocolo de miniextracción de ADN (Dellaporta S.L. *et al.* 1983). Modificado por el laboratorio de genética de Yuca, CIAT.

1. Colectar una hoja o cogollo (entre 0.15 g y 0.2 g de tejido vegetal) y guardarlas en un sobre de papel a 65 °C.
2. Pasar a un tubo eppendorf de 1.5 ml y macerar en seco con arena y ayuda de un taladro.
3. Adicionar 800 µl de buffer de extracción precalentado a 65 °C.
4. Adicionar 50 µl de SDS al 20%.
5. Agitar vigorosamente la mezcla para homogenizar.
6. Incubar en baño de agua a 65 °C y mezclar por inversión de 5 a 6 veces, durante 15 min.
7. Retirar los tubos del baño y dejar enfriar a temperatura ambiente por 2 min.
8. Adicionar 250 µl de acetato de potasio 5M frío y mezclar por inversión.
9. Incubar en hielo por 20 min.
10. Centrifugar a 12000 rpm en una centrífuga eppendorf por 10 min.
11. Adicionar un volumen de isopropanol frío y mezclar suavemente por inversión.
12. Incubar a -80 °C por 1 h y centrifugar a 12000 rpm por 10 min.
13. Eliminar el sobrenadante y remover el exceso de isopropanol invirtiendo los tubos sobre una toalla de papel.
14. Resuspender el precipitado en 500 µl de TE 50:10 (50 Mm Tris-HCl/10 Mm EDTA) incubar a 65 °C de 10 a 15 min con agitación suave y constante.
15. Adicionar un volumen de isopropanol frío y mezclar por inversión suave.
16. Incubar a -80 °C por 1h y centrifugar a 1200 rpm por 10 min.
17. Eliminar el sobrenadante y remover el exceso de isopropanol invirtiendo los tubos sobre una toalla de papel por 1 h.

18. Adicionar de 100 a 200 μ l, dependiendo del tamaño del precipitado, de TE 10:1 (10 mM Tris-HCl/1 Mm EDTA que contiene 10 mg/ml de RNAsa) y guardar los tubos a 4 °C toda la noche o disolver el precipitado en baño de agua a 65 °C.
19. Evaluar la calidad en un gel de agarosa.

BUFFER DE EXTRACCIÓN

Para 1 L de solución:

100 ml de Tris-HCl 1M 100 Mm

100 ml de EDTA 0.5M 50 Mm

100 ml de NaCl 5M 500 Mm

1. Completar el volumen con agua deionizada.
2. Autoclavar por 15 min.
3. Adicionar 1% (v/v) de PVP 40000 MW.
4. Adicionar 700 μ l de β -mercapto etanol.

Anexo B. Soluciones para PCR y electroforesis.

1. Buffer para PCR

KCL	500 mM
Tris-HCL pH 8.8	100 mM
Tritón X-100	1%

2. Buffer TBE 10X

TRIS	107.80 g
EDTA	7.44 g
Ácido Bórico	55.00 g

Se completa el volumen a 1 litro con agua deionizada.

3. Buffer de carga 3X

Formamida	95%
NAOH	10 mM
Azul de Bromofenol	0.05%
Xylene Cyanol	0.05%

4. Acrilamida 4 % para 5 L

Acrilamida 40%	500 ml
TBE 5X	1000 ml
UREA (5M)	1501.5 g
Agua destilada	3500 ml

Se pesan la urea (5M) y se vierten en solución líquida de TBE 5X y 3000 ml de agua destilada, se deja agitar mínimo por 6 h. Aparte, se deja agitando la acrilamida en 500 ml de agua destilada mínimo por 1 h. Se mezclan por 1 h y se completa a 5 L. Por último, se filtra al vacío, se envasa y se refrigera.

Anexo C. Pasos y soluciones para tinción con plata. Modificado de Promega. 1993.

1. Fiajdora

Preparación: Ácido acético al 10%. H₂O bidestilada

Tiempo de exposición: 25 minutos

2. Agua deionizada

Tiempo de exposición: 15 minutos

3. Tinción en plata

Preparación: Nitrato de plata (AgNO₃) al 1%. H₂O bidestilada

Tiempo de exposición: 30 minutos

4. Agua deionizada

Tiempo de exposición: 10 segundos

5. Reveladora

Preparación: Carbonato de sodio (Na₂CO₃). Formaldehído (H₂CO) al 37%.

Tiosulfato de sodio (10mg/ml). H₂O bidestilada. Usar a temperatura de 10°C.

Tiempo de exposición: de 5 a 8 minutos

6. Parada

Preparación: Glicina 2% (g/v). EDTA 0.5%

Tiempo de exposición: 5 minutos

7. Agua deionizada

Tiempo de exposición: 30 minutos

Anexo D. Tipo de repeticiones de los microsatélites escogidos

Microsatélite	Tipo de repetición	Tamaño	T ⁰ C	Mg
SSRY4	GA(16)TA GA(3)	287	45	1.5
SSRY6	CA(7)N(51)CA(17) N(47)CA(15)	298	45	1.5
SSRY10	CA(17)	153	55	1.5
SSRY12	CA(19)	266	55	1.5
SSRY19	CT(8)CA(18)	214	55	1.5
SSRY20	GT(14)	143	55	1.5
SSRY21	GA(26)	192	45	1.5
SSRY23	CA(17)	247	55	1.5
SSRY31	GA(21)	188	55	1.5
SSRY38	CA(17)	122	55	1.5
SSRY40	GA(16)	231	55	1.5
SSRY44	GA(28)	194	55	1.0
SSRY47	CA(17)	244	55	1.5
SSRY48	CA(11)	178	55	1.5
SSRY50	CA(6)N(6)GA(31)	271	55	1.5
SSRY51	CT(11)CG CT(11) CA(18)	298	55	1.5
SSRY52	GT(19)	266	55	1.5
SSRY59	CA(20)	158	55	1.5
SSRY61	CA(12)	233	55	1.5
SSRY63	GA(16)	290	55	1.5
SSRY72	CA(10)	141	55	1.5
SSRY76	GT(17)GA(21)	273	55	1.5
SSRY83	GTCGTG GT(22)CT GT(2)	239	55	1.5
SSRY84	GA(24)	203	55	1.5
SSRY88	CA(7)TACATA GA(22)	243	55	1.0
SSRY90	GGA(5)TAT GGA(2)	193	55	1.0
SSRY95	CT(19)CA(16)CC CA(2)CC CA(3)	282	55	1.5
SSRY98	GT(11)	209	55	1.5
SSRY99	GT(15)GA(13)AA GA(3)	192	55	1.5
SSRY100	CT(17)TT CT(7) CCCT	210	55	1.5
SSRY101	GCT(13)	213	55	1.5
SSRY102	GT(11)	179	55	1.0
SSRY105	GT(6)GC GT(2)GA(16)	225	45	1.5
SSRY122	GA(12)GT GA(3)GT GA(3)GT GA(6)N(41)GA(14)	273	55	1.5
SSRY141	CT(8)CG CT(2)	262	55	1.5
SSRY145	-	143	55	1.5
SSRY161	CT(11)TT CT(21)CA(19)	220	22	1.5

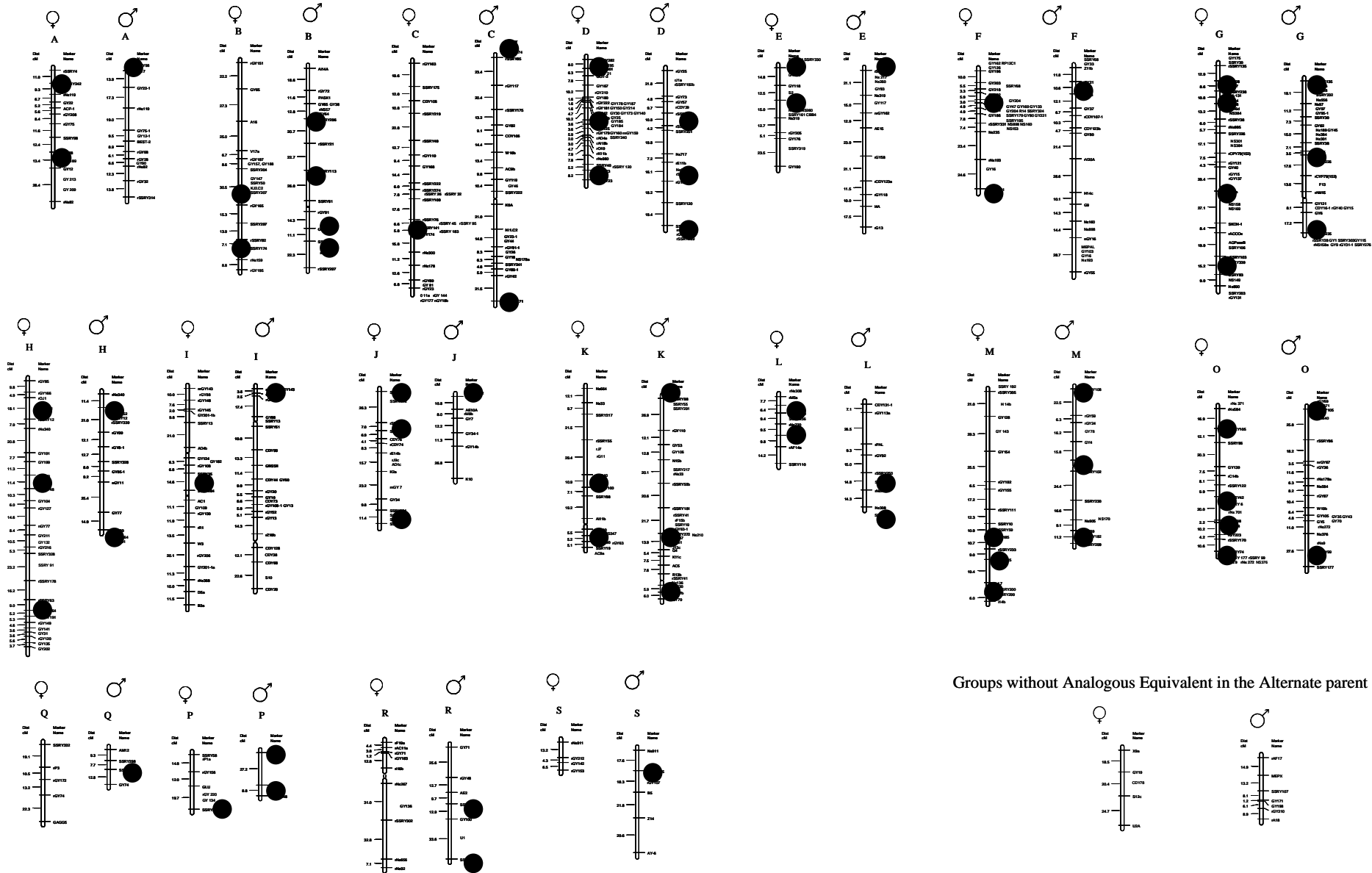
Anexo D. Continuación

Microsatélite	Tipo de repetición	Tamaño	T °C	Mg
SSRY164	GA(29)	187	45	1.5
SSRY171	TA(5)CATA GATA(8) GC GA(23)GTGA(2)	291	55	1.5
SSRY172	CT(17)	201	55	1.5
SSRY174	GA(16)	136	55	1.5
SSRY177	CCT(6)CTN(65)CT(4)AT CT(18)	268	45	1.5
SSRY179	GA(28)	226	55	1.5
SSRY182	CA(17)N(31)GAGG GA(8)	253	55	1.5
SSRY191	(GA)8GTGA(GGGA)2GGA	186	60	1.5
SSRY195	(GA)6CA(GA)6CA(GA)3	186	60	1.5
SSRY200	CT(CTT)4N6(CTCTT)2CT	205	60	1.5
SSRY205	(CT)11	201	60	1.5
SSRY225	(GA)20	234	59	1.5
SSRY226	(GA)8(N)7(GA)5	219	59	1.5
SSRY229	(CT)9TT(CT)5	199	60	1.5
SSRY239	(GA)15GG(GA)2	208	60	1.5
SSRY240	(GA)22	181	60	1.5
SSRY248	(GA)12	247	58	1.5
SSRY250	(CT)18(ATCT)2CTAT(CT)2	197	60	1.5
SSRY251	(CT)8	213	60	1.5
SSRY269	(GA)55(N)22(GA)36(N)26(GA)11(N)30(GA)20	413	58	1.5
SSRY276	(CT)10	243	60	1.5
SSRY284	(CT)12	194	58	1.5
SSRY296	(CT)3TT(CT)2(GT)7GG(GT)3GGT	195	60	1.5
SSRY313	(CT)14	204	60	1.5
SSRY324	(GA)27GGA	206	60	1.5
(ESTs)SSRY36*	TC(7)	200	55	2.0
(ESTs)SSRY49*	TC(8)	200	55	2.0
NS40	(GA)16	175	55	2.5
NS53	(TC)30	242	55	2.5
NS136	(CT)28	200	55	2.5
NS169	(CA)11	319	55	2.5
NS170	(CT)10TTCCTTTTATGC(GT)17	285	55	2.5
NS260	(GT)10(GA)22AA(GA)4AA(GA)6	224	50	2.5
NS720	(GT)17	157	55	2.5
NS928	(GA)21	283	55	2.5

- No se conoce la secuencia

* Marcadores que aun no se encuentran localizados en el mapa.

Anexo E. Posición de los microsatélites en el mapa de yuca. (Fregene *et al.* 1997)



Groups without Analogous Equivalent in the Alternate parent