

**MAPEO DE REGIONES DEL GENOMA ASOCIADAS CON EL CONTENIDO DE  
 $\beta$ -CAROTENO EN YUCA *Manihot esculenta Crantz***

**ANA CRUZ MORILLO CORONADO**

**9004005**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS AGRARIAS-FITOMEJORAMIENTO  
PALMIRA  
2009**

**MAPEO DE REGIONES DEL GENOMA ASOCIADAS CON EL CONTENIDO DE  
 $\beta$ -CAROTENO EN YUCA *Manihot esculenta Crantz***

**ANA CRUZ MORILLO CORONADO**

**9004005**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Doctor  
en Ciencias Agrarias, Área Mejoramiento Genético de Plantas

**DIRIGIDO POR:**

**PhD. MARTIN FREGENE**

**I.A PhD. HERNAN CEBALLOS**

**Biol. PhD. HERNANDO RAMIREZ**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS AGRARIAS-FITOMEJORAMIENTO  
PALMIRA  
2009**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE PALMIRA

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**ACTA DE JURADO DE TESIS**

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN**  
**MEJORAMIENTO GENETICO VEGETAL**

En Palmira a los 09 días del mes de octubre de 2009, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores: KARINA LOPEZ LOPEZ, GERARDO GALLEGO SANCHEZ Y HUVER POSADA SUAREZ

Para calificar la Tesis de Grado de:

**ANA CRUZ MORILLO CORONADO**

Titulada:

**“Mapeo de Regiones del genoma asociadas con el contenido de  $\beta$ -Caroteno en Yuca *Manihot esculenta* Crantz”** bajo la dirección de los Doctores Hernán Ceballos Lascano y Hernando Ramírez.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los Doctores KARINA LOPEZ LOPEZ, GERARDO GALLEGO SANCHEZ Y HUVER POSADA SUAREZ y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA

REPROBADA

KARINA LOPEZ L.

GERARDO GALLEGO S.

HUVER POSADA S.

## **DEDICATORIA**

Todo el esfuerzo, el trabajo y los logros obtenidos en esta investigación se lo dedico:

A Dios, por ser el promotor de cada una de nuestras acciones y por darnos la fortaleza y la voluntad para alcanzar nuestros sueños e ideales.

A mis padres, que con su ejemplo de vida me han enseñado el verdadero significado de la disciplina y la perseverancia.

A mis hermanos por estar siempre ahí brindándome todo su apoyo y sus palabras de aliento para seguir siempre adelante.

A mis familiares y amigos por compartir conmigo y ser el motor que me impulso a culminar con éxito este trabajo de investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor expresa sus más sinceros agradecimientos a:

Al doctor Hernán Ceballos, Dr. Martín Fregene y al Dr. Hernando Ramírez por haberme brindado la oportunidad de trabajar a su lado, por sus valiosos aportes y apoyando en este trabajo de investigación.

A Yacenia Morillo, por haber compartido conmigo todos los procesos que conllevaron a la culminación de esta investigación porque gracias a su trabajo, esfuerzo y mucha dedicación se generaron las poblaciones que fueron utilizadas en este estudio.

A los integrantes del laboratorio de Genética de yuca especialmente a Janneth Gutiérrez, Adriana Alzate, Adriana Nuñez, Ana María Castro, Eliana Macea, Tatiana Ovalle y Diana Falla por su apoyo incondicional y amistad.

Al Magíster Jaime Alberto Marín Colorado por su asesoría y acompañamiento a lo largo de este proceso de investigación.

Al laboratorio de Bioquímica y calidad de yuca en CIAT especialmente a Alba Lucía Chávez y a Teresa Sánchez por su colaboración en las evaluaciones de las poblaciones utilizadas en este estudio.

A los trabajadores de campo del programa de genética y mejoramiento de yuca por el mantenimiento de las poblaciones y por sus enseñanzas.

A la Dr. Martha Lucia Orozco y el Dr. Javier Narváez, por haberme permitido realizar mi pasantía en la Universidad de California Riverside por compartir sus conocimientos y experiencias, porque admiro su calidad humana, su vocación, dedicación y ejemplo.

A la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira y su cuerpo de docentes en el área de posgrados por contribuir con sus experiencias y conocimientos a mi formación personal y profesional.

Al profesor Jaime Eduardo Muñoz Flores por su calidad humana, su sencillez, por honrarme con su amistad, por su apoyo incondicional, por su ejemplo de entrega con la universidad y la ciencia, digno de imitar.

A los compañeros de la escuela de posgrados por compartir no solo las aulas de clase sino sus experiencias de vida y todos aquellos momentos inolvidables.

A todos los compañeros que trabajan en el Laboratorio Integrado de Investigaciones, por momentos que compartimos y por que siempre estuvieron ahí, dispuestos a ayudarme en el momento que más lo necesitaba.

A mis grandes amigos especialmente a Amparito por su apoyo, su calidad humana, su tenacidad y por haber compartido juntas cada una de las experiencias que me llevaron a culminar con éxito el presente trabajo.

A todas aquellas personas que creyeron en mí y me apoyaron incondicionalmente durante el desarrollo de este trabajo de investigación y que contribuyeron de una u otra forma en mi formación académica y profesional y es por ellos y para ellos que hoy culmino una etapa importante de mi vida.

**La facultad y los jurados de Tesis no serán responsables de las ideas emitidas por el ó los autores de la misma”.**

**(Artículo 24, Resolución 04 de 1974 del Consejo Directivo).**

## TABLA DE CONTENIDO

Pág.

PRÓLOGO .....	19
BIBLIOGRAFÍA .....	30

### PARTE I

<b>CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE POBLACIONES SEGREGANTES PARA EL CONTENIDO DE CAROTENOS EN YUCA .....</b>	<b>35</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>36</b>
<b>1.1 MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>48</b>
1.1.1 Determinación del Contenido de Carotenos totales en poblaciones segregantes de yuca ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	48
1.1.2 Determinación del Color de las Raíces de Yuca ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz) .....	49
1.1.3 Extracción y cuantificación de carotenos totales en raíces.....	50
1.1.4 Cuantificación del contenido de carotenoides.....	52
1.1.5 Análisis de distribución de Frecuencias del Contenido de Carotenos Totales en poblaciones F1.....	53
<b>1.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>53</b>
1.2.1 Análisis de Segregación del Contenido de Carotenos Totales en poblaciones F1.....	53
1.2.2 Análisis de Distribución de Frecuencias del contenido de carotenos totales en las poblaciones F1. ....	55
1.3 CONCLUSIONES .....	65
1.4 BIBLIOGRAFÍAS .....	67

### PARTE II

<b>EVALUACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES MEDIANTE EL ANÁLISIS DE GRUPOS SEGREGANTES (BSA) PARA EL CONTENIDO DE CAROTENOS EN LAS RAÍCES DE YUCA. ....</b>	<b>73</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>74</b>
<b>2.1 MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>88</b>
2.1.1 Técnicas Moleculares Aplicadas.....	88
2.1.1.1 Extracción de ADN.....	88
2.1.1.2 Cuantificación del ADN .....	89
2.1.1.3 Análisis de Grupos Segregantes (BSA) .....	89
2.1.1.4 Amplificación de los microsátélites. ....	90



2.1.1.4 Amplificación de los microsatélites..	91
2.1.1.5 Electroforesis Vertical con geles de poliacrilamida.	92
<b>2.1.2 ANALISIS DE LA INFORMACIÓN</b>	<b>92</b>
2.1.2.1 Análisis de los datos moleculares	92
2.1.2.2 Registro de datos.	92
2.1.2.2 Mapeo de Microsatélites	93
<b>2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>95</b>
2.2.1 Análisis de los datos moleculares en las poblaciones F1	<b>95</b>
2.2.1.1 Análisis de Grupos Segregantes (BSA)	95
2.2.1.2 Análisis de Mapeo Genético	102
<b>2.3 CONCLUSIONES</b>	<b>109</b>
<b>2.4 BIBLIOGRAFIA</b>	<b>111</b>

### PARTE III

<b>IDENTIFICACIÓN DE QTLS PARA CAROTENOS EN EL GENOMA DE LA YUCA Y VALIDACIÓN EN POBLACIONES S1</b>	<b>125</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>126</b>
<b>3.1 MATERIALES Y METODOS</b>	<b>132</b>
3.1.1 Validación De QTLS en Familias S1	<b>134</b>
3.1.2 Análisis de distribución de frecuencias del contenido de carotenos totales en las familias S1	<b>135</b>
3.1.3 Evaluación de marcadores microsatélites polimórficos en las familias S1 evaluadas.	<b>136</b>
<b>3.2 RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>137</b>
3.2.1 Análisis de QTLS	<b>137</b>
3.2.2 Validación de QTLs en Familias S1	<b>145</b>
3.2.3 Análisis de Distribución de Frecuencias del contenido de carotenos totales en las familias S1	<b>147</b>
3.2.4 Concentración de $\beta$ -Caroteno en raíces de yuca en las familias S1	<b>150</b>
3.2.5 Concentración de Fitoeno en raíces de yuca en las Familias S1	<b>153</b>
3.2.6 Correlación entre el contenido de carotenos totales y el contenido de Beta-caroteno en raíces de yuca de las familias S1	<b>156</b>
3.2.7 Relación entre el Contenido de Carotenos y el color de raíz en las familias S1	<b>157</b>
3.2.8 Correlación entre el contenido de Beta caroteno y el color de raíz	<b>158</b>
3.2.9 Estudio de Heredabilidad del Contenido de Carotenoides en las Familias S1	<b>161</b>
3.2.10 Análisis de Marcadores Microsatélites en las familias S1	<b>165</b>
<b>3.3 CONCLUSIONES</b>	<b>171</b>
<b>3.4 BIBLIOGRAFIAS</b>	<b>173</b>

<b>PARTE IV</b>	
<b>ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL CARÁCTER</b>	
<b>CAROTENOS TOTALES EN EL GERMOPLASMA DE YUCA, <i>Manihot</i></b>	
<b><i>esculenta</i> Crantz</b> .....	
	<b>181</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>182</b>
<b>4.1 MATERIALES Y METODOS</b> .....	189
<b>4.1.1 ANALISIS DE LA DIVERSIDAD GENETICA</b> .....	<b>189</b>
4.1.1.1 Similaridad en término de marcadores moleculares: Coeficiente de Similaridad de Nei-Li.....	189
4.1.1.2 Matriz de variable Binaria.....	190
4.1.1.3 Método de clasificación.....	190
4.1.1.4 Análisis Boot Strapping.....	190
4.1.1.5 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	191
4.1.1.6 Diversidad genética.....	191
4.1.1.7 Heterocigocidad Esperada.....	191
<b>4.2 RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	194
<b>4.2.1 Análisis de la Variabilidad del Carácter Contenido de Carotenos Totales</b> ..	<b>194</b>
<b>4.2.2 Análisis del Contenido de Carotenos Totales y Marcadores Microsatélites asociados</b> .....	<b>201</b>
<b>4.3 CONCLUSIONES</b> .....	204
<b>4.4 BIBLIOGRAFIAS</b> .....	206
<b>5.0 DISCUSION GENERAL</b> .....	215
<b>5.1 BIBLIOGRAFIAS</b> .....	225
<b>ANEXOS</b> .....	<b>228</b>

## LISTA DE TABLAS

	Pág
<b>Tabla 1.1</b> Actividad relativa como pro-vitamina A de diversos carotenoides.....	<b>39</b>
<b>Tabla 1.2</b> Familias evaluadas para altos contenidos de carotenos con base en peso fresco .....	<b>49</b>
<b>Tabla 1.3</b> Segregación para el contenido de carotenos totales basado en el peso fresco en varias familias de yuca.....	<b>54</b>
<b>Tabla 1.4</b> Estadística Descriptiva del Contenido de Carotenos Totales ( $\mu\text{g/g}$ ) en las familias CM9816, GM708 y GM734.....	<b>56</b>
<b>Tabla 2.1</b> Evaluación de los 800 marcadores microsatélites por BSA.....	<b>95</b>
<b>Tabla 2.2</b> Marcadores microsatélites polimórficos evaluados en las familias segregantes para el contenido de $\beta$ -caroteno, GM708, GM734 y CM9816 con sus respectivos valores de correlación.....	<b>98</b>
<b>Tabla 2.3</b> Marcadores microsatélites polimórficos en las tres familias evaluadas (GM708, GM734, CM9816) y su ubicación en los grupos de ligamiento correspondientes en el mapa generado para la característica contenido de carotenos (Marin, 2008). Entre paréntesis su ubicación correspondiente en el mapa genético de yuca (Fregene <i>et al.</i> , 1997).....	<b>105</b>
<b>Tabla 3.1</b> Familias S1 para el estudio de herencia del carácter contenido de carotenos en raíces de yuca.....	<b>135</b>
<b>Tabla 3.2</b> Asociación entre marcadores SSRs y el Contenido de $\beta$ -caroteno en las familias GM708, GM734 y CM9816 revelada por el análisis de simple marcador (regresión simple). .....	<b>138</b>
<b>Tabla 3.3</b> Marcadores SSR asociados con carotenos totales (2008) por análisis de regresión simple con QGENE. ....	<b>140</b>
<b>Tabla 3.4</b> Marcadores microsatélites asociados con el color de pulpa de la raíz (2008) por análisis de regresión simple con QGENE. (Marin, 2008). ....	<b>141</b>

<b>Tabla 3.5</b> Contenido de carotenos totales y de beta-carotenos con base en peso fresco (PF) para los parentales de las familias S1.....	<b>146</b>
<b>Tabla 3.6</b> Segregación para el contenido de carotenos totales ( $\mu\text{g/g}$ ) con base en peso fresco en 12 familias S1.....	<b>147</b>
<b>Tabla 3.7</b> Contenido de $\beta$ -caroteno obtenido mediante el análisis HPLC para los progenitores y sus respectivas progenies S1 (Morillo Y. 2009). ....	<b>150</b>
<b>Tabla 3.8</b> Contenido de Luteína obtenido mediante el análisis HPLC para los progenitores y sus respectivas progenies S1 (Morillo Y, 2009). ....	<b>152</b>
<b>Tabla 3.9</b> Contenido de $\alpha$ -caroteno obtenido mediante el análisis HPLC para los progenitores y sus respectivas progenies S1 (Morillo Y, 2009). ....	<b>153</b>
<b>Tabla 3.10</b> Contenido de Fitoeno obtenido mediante el análisis HPLC para los progenitores y sus respectivas progenies S1. (Morillo Y, 2009). ....	<b>154</b>
<b>Tabla 3.11</b> Análisis de correlación de los marcadores microsatélites asociados a Bajos contenidos de $\beta$ -carotenos en las familias S1: AM-691, AM697, AM-698 y AM720 y su ubicación relativa en los Grupos de Ligamiento correspondientes al mapa genético-molecular de yuca (Fregene <i>et al.</i> , 1997).....	<b>166</b>
<b>Tabla 3.12</b> Análisis de correlación de los marcadores microsatélites asociados a contenidos Intermedios de $\beta$ -caroteno en las familias S1: AM-689, AM692, AM-712 y AM718 y su ubicación relativa en los grupos de ligamiento correspondiente al mapa genético-molecular de yuca (Fregene <i>et al.</i> , 1997).....	<b>167</b>
<b>Tabla 3.13</b> Análisis de correlación de los marcadores microsatélites asociados con altos contenidos de carotenos en las familias S1: AM-690, AM710 y AM-702 y su ubicación relativa en los grupos de ligamiento correspondientes en el mapa genético-molecular de yuca (Fregene <i>et al.</i> , 1997).....	<b>168</b>
<b>Tabla 4.1</b> Contenido de Carotenos Totales en 67 accesiones del banco de germoplasma .....	<b>201</b>
<b>Tabla 4.2</b> Análisis de Correlación y Regresión de marcadores microsatélites polimórficos en las 67 accesiones del banco de germoplasma con su respectiva ubicación en los grupos de ligamiento en el mapa genético molecular de yuca (Fregene <i>et al.</i> , 1997). ....	<b>203</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
<b>Figura 1.1.</b> Cromatograma donde se detectan los compuestos carotenoides (1,2 y 3) de una muestra de raíz de yuca. ....	42
<b>Figura 1.2.</b> Regleta de intensidad de parénquima de yuca. ....	50
<b>Figura 1.3.</b> Pasos de la metodología de extracción y detección de carotenoides en yuca por el método colorimétrico y HPLC. ....	53
<b>Figura 1.4.</b> Variación en el color de las raíces en algunos individuos de la familia CM9816. ....	544
<b>Figura 1.5.</b> Gráficas de Distribución del contenido de carotenos ( $\mu\text{g/g}$ ). A. Familia CM9816. B. Familia GM734 y C. Familia GM708. ....	57
<b>Figura 1.6.</b> Agrupación hipotética de los fenotipos que explica la herencia del contenido de carotenos basados en dos factores recesivos. ....	588
<b>Figura 1.7.</b> Relación entre la intensidad de color en las raíces (basada en la escala visual de 1 a 9) y el promedio del contenido de caroteno para cada clase. ....	61
<b>Figura 1.8.</b> Relación entre la intensidad de color en las raíces (basada en la escala visual del 1 al 9) y el contenido de caroteno para una muestra de alrededor de 750 clones de yuca. ....	62
<b>Figura 1.9.</b> Progresos obtenidos en el Incremento en el Contenido de Carotenos Totales y en el Contenido de $\beta$ -caroteno en el programa de mejoramiento de CIAT. ....	63
<b>Figura 2.1.</b> Representación esquemática de la biosíntesis de los carotenoides en plantas. ....	76
<b>Figura 2.2.</b> Representación de las funciones de mapeo de Haldane y Kosambi ..	84
<b>Figura 2.3.</b> Representación esquemática de la metodología: Análisis de Grupos Segregantes o BSA. ....	90

<b>Figura 2.4.</b> Patrones de amplificación obtenidos con los marcadores NS-717, SSRY-324, SSRY-195, NS-158, SSRY-313,y SSRY-251 en as familias GM708, GM734 Y CM9618. ....	<b>96</b>
<b>Figura 2.5.</b> Mapa de ligamiento genético para el contenido de carotenos totales en yuca, Mahihot esculenta Crantz, basado en una población de 229 individuos S1 resultante del cruce entre COL1684XMTA1 evaluado con 140 marcadores SSR. (Marin, 2008).....	<b>104</b>
<b>Figura 2.6. a.</b> Posible QTL en el grupo de ligamiento 3 explica entre el 20 - 40% de la varianza fenotípica y muestra un efecto de gen aditivo b. Variación en la intensidad del color y valores c. Gel de poliacrilamida tenido con plata, mostrando la amplificación de algunos individuos de la familia AM320 con el marcador SSRY251.....	<b>107</b>
<b>Figura 3.1.</b> Marcadores microsatélites asociados a posibles QTLs para la característica contenido de carotenos totales (2008), color de pulpa de la raíz (2006-2008), análisis realizado con QGENE. Figura 3.1a. Grupo de ligamiento 1. Figura 3.1b. Grupo de ligamiento 22 (Marin, 2008) .....	<b>142</b>
<b>Figura 3.2.</b> Análisis de Distribución de Frecuencias del Contenido de Carotenos en las Familias S1: AM-691, AM-698 y AM-720. ....	<b>148</b>
<b>Figura 3.3.</b> Análisis de Distribución de Frecuencias del Contenido de Carotenos en las Familias S1: AM-689, AM-692 AM-712.y AM-718. ....	<b>149</b>
<b>Figura 3.4.</b> Ruta biosintética de los carotenoides (Cunningham, 2002) mostrando los factores genéticos claves. ....	<b>155</b>
<b>Figura 3.5.</b> Relación entre la intensidad de color en las raíces (basada en una escala visual de 1 a 8) y el promedio del contenido de Beta-caroteno, Alfa-caroteno, Luteína y Fitoeno en cada clase.. ....	<b>156</b>
<b>Figura 3.6.</b> Relación entre el contenido de carotenos totales (( $\mu\text{g/g}$ con base en peso fresco) y el contenido de $\beta$ -caroteno en 93 genotipos S1 analizados por el método HPLC. . ....	<b>157</b>
<b>Figura 3.7.</b> Relación entre la intensidad de color en las raíces (basada en una escala visual de 1 a 8) y el promedio del contenido de carotenos totales ( $\mu\text{g/g}$ con base en peso fresco) en cada clase.. ....	<b>158</b>
<b>Figura 3.8.</b> Relación entre la intensidad de color en las raíces (basada en una escala visual de 1 a 8) y el promedio del contenido de beta caroteno ( $\mu\text{g/g}$ con base en peso fresco) en cada clase. ....	<b>159</b>

**Figura 3.9.** Relaciones entre el promedio de los valores de TCC para los progenitores (datos a partir del 2005 y 2007) y sus respectivas progenies S1....**162**

**Figura 4.1** Dendrograma de la estructura genética de 67 accesiones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), basado en el Coeficiente de Similaridad de Nei-Li.....**195**

**Figura 4.2.** Distribución de Frecuencia del Contenido de Carotenos Totales en las 67 accesiones de del banco de germoplasma de yuca. ....**202**

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág</b>
<b>ANEXO A</b> Protocolo de Miniextracción de ADN a partir de hojas jóvenes de yuca (Dellaporta S.L, et al. 1983, A plant ADN minipreparation version II. Plant Molecular Biology Reporter 1(14):19-21.) Modificado por el Programa de Genética de Yuca. .....	<b>229</b>
<b>ANEXO B</b> Lista de los 800 marcadores SSR usados en este estudio.....	<b>232</b>
<b>ANEXO C</b> Preparación del gel de poliacrilamida .....	<b>250</b>



## RESUMEN

El contenido de  $\beta$ -caroteno en yuca es importante para llegar a suplir las deficiencias vitamina A, en regiones donde la yuca es la principal fuente de alimento. Las familias utilizadas para el análisis molecular del contenido de  $\beta$ -caroteno fueron: GM 708, GM 734 y CM 9816 las cuales exhiben un amplio patrón de segregación para este carácter. Se usó el Análisis de Grupos Segregantes (BSA) para la evaluación de aproximadamente 800 marcadores microsatélites y para determinar la asociación con el color del parénquima de la raíz se hizo un análisis de correlación y regresión simple entre los datos fenotípicos y los datos genotípicos de cada marcador. Se encontraron valores de correlación positivos y significativos para los marcadores: SSRY313, NS717, SRRY251 los cuales parecen estar fuertemente asociados con los altos contenidos de carotenoides, los cuales según los estudios de mapeo genético se encuentran ubicados en el grupo de ligamiento D del mapa genético molecular de yuca y grupo de ligamiento 1 para el mapa de la característica contenido de carotenos. Los análisis de mapeo por intervalo y por intervalo compuesto mostraron que existen cinco QTLs están controlando la expresión del contenido de  $\beta$ -caroteno y tres el color de pulpa de la raíz, lo cual fue validado en poblaciones S1. El estudio de diversidad genética mostró que existe variabilidad en cuanto al contenido de carotenos totales la cual puede ser eficientemente utilizada en los programas de mejoramiento tendientes a mejorar la calidad nutricional de las raíces de yuca.

**Palabras claves:** Yuca, carotenos, SSR, mapeo genético, QTLs.

## SUMMARY

The  $\beta$ -carotene content in cassava is important to meet the Vitamine A deficiency in regions where the cassava is the main food source. The families used for the genetic-molecular analysis of the  $\beta$ -carotene content were: GM 708, GM 734 and CM 9816, which exhibit an variety pattern of segregation for this character. Analysis of Bulks Segregant (BSA) was used for the assessment of approximately 800 microsatellites markers and to determine the association with the color of parenquima of the root an analysis was a simple correlation and regresion between the phenotypic and genotypic datas of each marker. Positive values of correlation were found for the markers: SSRY313, NS717, SRRY251, which could be associated with high carotenoides content. We found a positive correlation values for the markers: SSRY313, NS717, SRRY251 which appear to be strongly associated with high levels of carotenoids. Which according to studies of genetic mapping is located in the linkage group D of molecular genetic map of cassava. Validation of QTLs populations S1 revealed the complex nature of the property, its high heritability ( $h^2 = 0.64$ ) and is controlled by a series of multiple alleles made little impact with dominant genes and many genes with major additive effect and epistatic effects. The studies showed that genetic diversity is a high variability which can be efficiently used in programs for conservation and breeding seeking to improve the nutritional quality of cassava roots (*Manihot esculenta* Crantz).

**Key words:** Cassava, carotenes, SSR, Genetic mapping, QTLs.

## PRÓLOGO

La yuca, *Manihot esculenta* Crantz, junto con el maíz, la caña de azúcar y el arroz constituyen fuentes importantes de energía en la dieta de la mayoría de los países tropicales del mundo. Las especies fueron originadas en Sur América (Allem, 2002 y Olsen y Shaal, 2001) y fue mas o menos domesticada hace 10.000 años atrás. Actualmente la yuca es un cultivo importante en las regiones entre latitudes entre los 30 N° y 30 S y una superficie de 1800 m.s.n.m.. Es un cultivo muy rústico que crece bien bajo condiciones marginales donde otros pocos cultivos pueden sobrevivir. La mayoría de las variedades de yuca son tolerantes a la sequía, pueden producir en suelos degradados y son resistentes a las plagas y enfermedades más importantes. El cultivo es naturalmente tolerante a suelos ácidos y tiene la flexibilidad de ser cosechada cuando los agricultores lo requieran.

Aunque el producto más común, es el almidón de sus raíces, el follaje de la yuca tiene una excelente calidad nutricional para el consumo humano y animal y ofrece un gran potencial. El follaje de la yuca no es ampliamente explotado a pesar de su valor nutritivo (Buitrago, 1990; Babu y Chatterjee, 1999). Sin embargo, el consumo del follaje es relativamente común en ciertos países de África, Asia y América Latina. El uso del follaje para la alimentación animal se ha documentado ampliamente, por ejemplo, en el secado de las hojas y el uso de la harina en dietas para cerdos y aves. Tal forma de uso del follaje, responde bien a los intereses de los fabricantes de alimentos balanceados que a los productores de yuca (Preston *et al.*, 2005), o a necesidades de suplemento proteico de los ganaderos. En general, el uso de la yuca se ha orientado fundamentalmente a la raíz y se ha ignorado el potencial nutricional y pigmentante del follaje. Para contribuir a potenciar el uso de la yuca como forraje, se han realizado esfuerzos

de investigación y desarrollo que buscan extender los usos o potenciar este cultivo, es así como se ha intentado establecer la yuca como un componente fundamental en la alimentación de rumiantes. Existen a demás resultados generados en otros países tropicales que pueden ser validados en las condiciones de manejo de nuestros sistemas de producción. Entre estos resultados se puede mencionar: el tipo de planta para forraje, rendimiento por edad y corte, fertilización, cosecha manual, cosecha mecánica, efecto en la producción de leche, ensilaje de hojas, heno de hojas, entre otros. Sin embargo su mayor uso se encuentra en la industria del papel, textiles y adhesivos los cuales utilizan el almidón de la yuca como materia prima esencial.

El almidón de sus raíces es una valiosa fuente de energía y puede ser consumida o procesada en diferentes formas para el consumo humano y diferentes propósitos industriales tales como almidones, alimentación animal o alcohol (Ceballos *et al.*, 2006). Las raíces de almacenamiento de la yuca no son tuberosas y por lo tanto no pueden ser usadas con fines de reproducción. Los tallos son comúnmente usados como material de siembra. La yuca puede ser propagada tanto por estaca como por semilla botánica. Siendo la propagación vegetativa la forma más ampliamente usada por los agricultores para los fines de multiplicación y siembra. La propagación de semilla sexual ocurre bajo condiciones naturales y es muy usada en los programas de mejoramiento (Rajendran *et al.*, 2000).

Además del potencial cianogénico de las raíces, otras características importantes de las raíces de yuca son el contenido de materia seca, porcentaje de amilosa en la composición del almidón, contenido de proteínas y carotenoides. Hay una variación en la calidad del almidón en relación al porcentaje de amilosa con un promedio del 3-5% (Wheatley *et al.*, 1993). Las raíces de yuca tienen un bajo contenido de proteína con un promedio de 2-3% (con base a peso seco). Sin embargo, resultados preliminares sugieren que el contenido de proteínas en las

raíces puede ser considerablemente mas alto (6-8%) en algunas variedades particularmente de Centro América (CIAT, 2002). También se ha estudiado la existencia de una amplia variabilidad en el contenido de carotenoides presentes en las raíces amarillas de yuca como un esfuerzo para tratar de suplir las deficiencias de vitamina A en los países en donde la yuca es ampliamente cultivada y altamente consumida (Iglesias *et al.*, 1997; Chávez *et al.*, 2000).

La forma de consumo de la yuca varía de un país a otro y de una región a otra. En África, la yuca es universalmente consumida como vegetal para hornear o cocinar en la forma de pastas o masas hechas con harina de yuca (Okiezie y Kosikwski 1981). En los países de África Tropical la yuca proporciona un promedio de 230 cal/ persona/día. Sin embargo, en Zaire y Congo, el promedio de consumo es superior a 1000 cal/día, o sea cerca de 1 Kg de yuca fresca; esta cantidad representa aproximadamente la mitad de la energía total consumida por la gente de estos países. Se estima que 70 millones de personas obtienen de la yuca alrededor de 500 cal/día.

En Asia, la yuca es un producto alimenticio cotidiano solamente en Indonesia, en el Sur de la India y en ciertas regiones de Vietnam, a pesar de que se cultiva ampliamente, especialmente en el sureste asiático. En Indonesia, el promedio diario de consumo es de aproximadamente 200 cal/persona, y en algunos casos más de la mitad del total de las calorías consumidas proviene de la yuca. En el Estado de Kerala, India, se estima un consumo per cápita de 744 cal/día para 20 a 30 millones de personas. Tailandia es el mayor productor de la región pero los tailandeses consumen poca yuca; la mayor parte de la producción se exporta (Cock, 1989).

En América Latina la yuca es un alimento indispensable en Paraguay y Brasil; se estima que cerca de 125 millones de personas de esos países obtienen de ella más de 200 cal/día. En Brasil, el consumo es alto en las regiones rurales del

nordeste (480 cal/día) y muy bajo en las ciudades del sur (menos de 20 cal/día) (Cock, 1989). La yuca es un alimento indispensable en las regiones selváticas de Bolivia, Perú y Ecuador, así como en la Costa Norte y el Departamento de Santander en Colombia, y en las áreas rurales de muchas islas caribeñas, particularmente en la República Dominicana. La yuca es entonces un importante producto alimenticio en las regiones productoras de América del Sur, en donde el consumo diario en los países tropicales es de 150 a 160 calorías por persona (Cock, 1989).

En yuca, los pigmentos carotenoides se han estudiado con el fin de incrementar estos contenidos y contribuir a mejorar su calidad de nutricional. Los pigmentos carotenoides son los responsables de los colores rojos, amarillo y naranja y la protección antioxidante en una amplia variedad de plantas, animales, bacterias y hongos. En las plantas, los carotenoides juegan un papel importante en el desarrollo, estabilidad de la membrana y en la fotosíntesis disipando los excesos de energía absorbida por el mecanismo fotosintético (Demmig-Adams y Adams 2002). Ellos también sirven como precursores de otros componentes biológicamente importantes, (Millborrow 2001; Bouvier *et al.*, 2003; Fester *et al.* 2002; Giuliano *et al.* 2003). Ejercen funciones de protección debido a su alto potencial antioxidante y son también componentes importantes de la dieta humana. Fuertes evidencias sugieren que las dietas ricas en carotenoides pueden prevenir la aparición de algunos estados crónicos de las enfermedades (Mares-Perlman *et al.*, 2002) y ciertos cánceres (Giovannucci 2002).

En los seres humanos, los carotenoides pueden llevar a cabo funciones importantes. El papel más ampliamente estudiado y mejor entendido de los carotenoides es su actividad de provitamina A pues, la deficiencia de vitamina A es la causa principal de muerte prematura en los países menos desarrollados, particularmente entre niños. La vitamina A, la cual tiene muchas funciones vitales en los humanos, puede ser producida dentro del cuerpo a partir de ciertos

carotenoides, notablemente el  $\beta$ -caroteno. El  $\beta$ -caroteno dietario es obtenido a partir de varios vegetales y frutas, tales como zanahorias, espinaca, duraznos, albaricoques y batatas. (<http://www.astaxanthin.org/carotenoides.htm>)

En la nutrición humana, algunos pigmentos carotenoides ( $\beta$ -carotenos, alfa-carotenos, criptoxantina) son convertidos en vitamina A después de la división molecular seguido por la reducción. Otros carotenoides (por ejemplo, licopeno, luteína y zeaxantina) funcionan como poderosos antioxidantes y se han asociado a una disminución de las probabilidades de desarrollar ciertos tipos de cáncer, enfermedades vasculares y deterioro visual (Tanumihardjo y Yang 2005).

La vitamina A es un micronutriente esencial para el normal funcionamiento de los sistemas visual e inmune, crecimiento y desarrollo, mantenimiento de la integración del epitelio celular y para la reproducción (Sommers A y West KP Jr. 1996). El mejoramiento del estado de la vitamina A en niños puede reducir los índices de mortalidad en un 23 a 32% (Sommers A y West KP Jr. 1996; Fawzi *et al.*, 1993). Entre 100 a 140 millones de niños presentan deficiencias de vitamina A (WHO, World Health Organization, 2004). Además del efecto directo de la deficiencia de vitamina A, hay evidencia de que el metabolismo de la vitamina A interactúa con el hierro y el zinc, mejorando el estado de la vitamina A se puede mejorar no solo la vitamina A sino otros componentes (Gibson R. S, 2005). Los carotenoides provitamina A de los vegetales y las frutas constituyen los dos tercios de la dieta en la ingesta de vitamina A en todo el mundo y más del 80% en la ingesta en los países en desarrollo (Combs GF, 1998).

El hambre, la desnutrición y las deficiencias de micronutrientes son problemas serios en los países en desarrollo por el impacto que ocasionan sobre la salud y el bienestar de la población, especialmente en los grupos de más bajos ingresos y especialmente en países como Colombia donde persisten factores políticos, sociales y económicos que condicionan la prevalencia de estos problemas. La

marginalidad social de millones de personas que viven en pobreza extrema, las hace altamente vulnerables a la desnutrición y la enfermedad por la limitada accesibilidad a una dieta adecuada y a servicios eficientes de salud.

La deficiencia de vitamina A es un problema importante en la salud pública de los países en vías de desarrollo, causando ceguera prevenible en un estimado de 20.0000 a 100.000 niños, jóvenes, cada año. Las principales fuentes de vitamina A se encuentran en muchos alimentos los cuales no hacen parte de la dieta o están más allá del alcance de muchas de las personas que viven en países en vías de desarrollo, quienes, por lo tanto, dependen fuertemente de los carotenoides presentes en los alimentos vegetales que pueden ser convertidos a vitamina A (carotenoides provitamina A). Los carotenoides están relacionados en la intensificación de la función inmunológica, en el tratamiento y prevención del cáncer y en la reducción de la morbilidad y mortalidad (Adewusi y Bradbury 1993).

El trabajo que se hace actualmente para combatir la deficiencia nutricional de micronutrientes en el mundo en desarrollo se orienta a suministrar suplementos de vitaminas y de minerales a las mujeres embarazadas y a los niños pequeños, y a fortificar los alimentos con esos nutrientes mediante procesos que se aplican en poscosecha. Se han logrado muchos resultados con este enfoque. En las regiones que gozan de una infraestructura adecuada y tienen mercados bien establecidos que distribuyen alimentos procesados como la sal, el azúcar y las harinas de cereales, la fortificación de los alimentos puede mejorar enormemente el consumo de micronutrientes de las poblaciones vulnerables. No obstante, la fortificación y el suministro de suplementos de carácter comercial tienen sus limitaciones. Es posible que los alimentos fortificados no lleguen a gran parte de la gente que más los necesita porque la infraestructura de mercados es insuficiente. Asimismo, el suministro de suplementos depende de una infraestructura de salud altamente funcional, que raras veces se encuentra en los países en desarrollo. Se necesitan, por tanto, nuevos enfoques para complementar lo que se está haciendo.



Las estrategias basadas en alimentos básicos enriquecidos nutricionalmente ofrecen oportunidades claras de hacer esto en forma sostenible. El sistema agrícola, hoy en día proporciona el sustento que mantiene a una población mundial de alrededor de 7.500 millones de habitantes. Lo importante es encontrar formas de hacer que este sistema proporcione las cantidades trazas de yodo, hierro,  $\beta$  caroteno (Pro-Vitamina A), así como el de otros microelementos y vitaminas, a todas las personas, particularmente aquellas que viven en las condiciones más difíciles (Combs *et al.*, 1996).

La biofortificación de cultivos se plantea como una estrategia para disminuir la deficiencia por micronutrientes a través de los alimentos, de forma sostenible y enfocada en los pobres. Emplea técnicas de fitomejoramiento que aprovechan la variabilidad existente en las diferentes variedades de las especies cultivadas respecto a su contenido de micronutrientes, para aumentar ese contenido en los cultivos en cuestión (Welch, 2002; Gregorio, 2002).

El consorcio internacional HarvestPlus trabaja en el desarrollo, la evaluación y la difusión de cultivos biofortificados, enfocando su actividad hacia los cultivos más importantes en África y en Asia y cuantos productos se consuman más en esas regiones. El proyecto AgroSalud hace el mismo trabajo en América Latina, con los cultivos de mayor importancia en esta región, es decir, arroz, frijol, maíz, camote y yuca. En este proyecto colaboran el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), el Centro Internacional de la Papa (CIP), la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA) y el Consorcio Latinoamericano y del Caribe de Aportando a la Investigación y al Desarrollo de la yuca (CLAYUCA). Su objetivo es mejorar el contenido nutricional de los cultivos mencionados, especialmente en el contenido de hierro y de zinc en el arroz y en el frijol; el de triptófano, lisina y  $\beta$ -caroteno en el maíz amarillo; y el de  $\beta$ - - caroteno en el camote y en la yuca.

El potencial para incrementar la densidad de micronutrientes en los alimentos básicos por mejoramiento convencional existe (Graham *et al.*, 1996, 1999 y 2001), pues hay evidencia de una adecuada variación genética entre los cultivares en cuanto a las concentraciones de  $\beta$ -caroteno, otros carotenoides funcionales, hierro, zinc y otros minerales, haciendo posible la selección de materiales con alto valor nutricional. En todos los cultivos estudiados, es posible combinar, características de alta densidad de nutrientes con alta productividad, a diferencia del contenido de proteína y la producción, las cuales están correlacionadas negativamente; el control genético es simple, permitiendo hacer un mejoramiento económico. Actualmente, líneas naranjas claras de batata con altos niveles de  $\beta$ -caroteno (sobre 200 mg/g) han sido identificados, y frijoles con mejores características agronómicas y tipo de grano y 50-70% con más hierro han sido obtenidos a través del mejoramiento convencional. Usando las nuevas herramientas biotecnológicas se ha podido obtener materiales con mayores contenidos de micronutrientes como es el caso del arroz dorado en donde ya se tiene una línea transgénica avanzada que produce 37 mg de carotenoides/g de materia seca de carotenoides, del cual 31 mg/g es  $\beta$ -caroteno, está ahora disponible (Paine, 2005).

Por otra parte, la posibilidad de mejorar la cantidad de provitamina A en los cultivos básicos es realmente muy buena. Todos los cultivos alimenticios básicos almidonados que son generalmente blancos, también tienen variedades que son amarillas. Aunque la genética de esta característica es relativamente compleja y algo desconocida, se puede lograr un progreso rápido debido a que la ganancia genética en el contenido de carotenos puede ser estimada visualmente con exactitud, mostrando correlaciones que oscilan desde 0.6-0.8. Por lo tanto, es necesario caracterizar el material parental para establecer que las fuentes de pigmentación tengan una alta actividad de provitamina A en humanos, (Graham y Welch 1996).

Se conocen variedades amarillas de todos los cultivos básicos principales (trigo, arroz, maíz, yuca, papas y sorgo), al menos en los bancos de germoplasma del mundo, y en su domesticación pareció ser la norma de los cultivos básicos antes de la aparición de los esfuerzos del mejoramiento vegetal moderno en el siglo XX. En algunos, casos, las variedades amarillas son comunes. La yuca amarilla es conocida en el norte del Brasil y es preferida como vegetal fresco a las variedades blancas que son usadas para hacer harina. Los recursos de los bancos de germoplasma, son tales, que debe ser posible para los mejoradores producir cereales y tubérculos con suficiente provitamina A y otros carotenoides esenciales, por métodos convencionales (mejoramiento vegetal convencional) o utilizando herramientas biotecnológicas para satisfacer los requerimientos nutricionales diarios de la gente más pobre del mundo , que depende casi exclusivamente de los cultivos básicos para sobrevivir y que no tiene acceso a otras fuentes más ricas en estos micronutrientes debido al factor económico.

Entre los cultivos contemplados dentro de los proyectos dirigidos a solucionar los problemas de deficiencias y desnutrición en el mundo, la yuca ocupa un lugar privilegiado ya que es un cultivo de gran importancia en la nutrición de más de 1000 millones de personas en el mundo tropical (FAO, 1991), en donde las posibilidades de mejorar la calidad de las fuentes nutricionales son limitadas y las deficiencias en vitaminas y minerales constituyen un problema de salud pública, por la prevalencia de enfermedades tales como xeroftalmia y anemia perniciosa, entre otras.

Durante los últimos 30-40 años, modificaciones en el esquema de mejoramiento del cultivo de yuca han sido implementadas para dinamizar los procesos de selección recurrente y así obtener información de la genética del germoplasma disponible. Herramientas biotecnológicas han sido adaptadas para yuca e incorporadas a los diferentes proyectos de mejoramiento genético. Un mapa genético ha sido desarrollado y la selección asistida por marcadores es

actualmente usada para diferentes características. Protocolos de transformación genética están disponibles y están siendo usados exitosamente para la incorporación de diferentes genes. Técnicas de cultivo de tejidos, también están siendo utilizadas para la propagación, limpieza y conservación del germoplasma, rescate de embriones, producción de líneas dobles haploides. Todas estas tecnologías están siendo utilizadas con el fin de lograr que las raíces de yuca mejoren su calidad nutricional.

El proyecto para fortificar variedades de yuca con altos contenidos de  $\beta$ -caroteno se ha iniciado en CIAT como una alternativa para combatir la deficiencia de este micronutriente clave, en áreas en donde la yuca es ampliamente cultivada y consumida. El incremento en el contenido de  $\beta$ -caroteno incluye, métodos de mejoramiento convencional, mediante la identificación de genotipos superiores y la captura de esa superioridad genética, así como la utilización de herramientas de biología molecular, que permitan la identificación de genes asociados al contenido de  $\beta$ -caroteno en yuca.

Este trabajo de investigación hace parte del proyecto de CIAT que tiene como objetivo principal el mejorar la calidad nutricional de algunos alimentos que son altamente cultivados y consumidos por las comunidades marginales del trópico, a través de la identificación de genotipos superiores de yuca que posean altos niveles de  $\beta$ -caroteno en sus raíces y su utilización en programas de mejoramiento. En este sentido los marcadores moleculares son una herramienta que permiten localizar los genes responsables de los fenotipos deseados como resistencia a enfermedades, altos contenido de  $\beta$ -carotenos y almidón en la raíz entre otros (Cock 1989), para así hacer más eficiente la selección de genotipos cada vez más ricos en carotenoides provitamina A que puedan en parte ser una alternativa para solucionar los problemas de salud pública de las regiones más pobres del mundo.

El objetivo de este trabajo de investigación fue identificar regiones asociadas con el contenido de  $\beta$ -caroteno en el genoma de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) como un paso previo al aislamiento o clonación de genes que están controlando el carácter y la selección asistida por marcadores (MAS) como herramientas útiles dentro de programas de mejoramiento tendientes a la calidad nutricional de los cultivos.

En la primera parte de este trabajo de tesis se hace referencia a la caracterización bioquímica o la evaluación del contenido de carotenoides en poblaciones segregantes de yuca (F1) obtenidas por el programa de mejoramiento de yuca en CIAT a través de diferentes cruzamientos entre raíces blancas, cremas y amarillas. Con el fin de seleccionar las familias que posteriormente serán usadas en los análisis moleculares.

La segunda parte de este estudio comprende la evaluación de marcadores microsatélites mediante el Análisis de Grupos Segregantes (BSA) y el mapeo genético para llegar a identificar los marcadores correlacionados con el contenido de carotenoides en las raíces de yuca.

En la tercera parte se identifico regiones de loci que codifican para características cuantitativas (QTLs) en el mapa genético generado para la característica y posteriormente se hizo una validación de dichos marcadores usando poblaciones S1 que fueron generadas por la autofecundación de algunos genotipos Seleccionados por el programa de mejoramiento de yuca en CIAT.

En la cuarta y última parte de este trabajo se realizo un análisis de diversidad genética del contenido de carotenoides, usando algunas accesiones del banco de germosplama de yuca que se encontraban disponibles en el campo, con el fin de encontrar el grado de asociación que puede presentarse entre dichas accesiones como también determinar la variabilidad genética existente .

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- ADEWUSI, S.R.A y J.H. BRADBURY. 1993. Carotenoids in Cassava: Comparison of open column y HPLC method of analisis. *Journal of the Science of Food y Agriculture* 62: 375-383.
- 2- ALLEM, A.C. 2002. The origins and taxonomy of cassava. In: R.J. Hillocks, J.M. Tres, y A.C.Bellotti (Eds.), *Cassava: Biology, Production y Utilization*. CABI Publishing, pp.1–16.
- 3- BABU, L. and CHATTERJEE, S.R. 1999. Protein content y amino acid composition of cassava tubers y leaves. *J. Root Crops* 25(20): 163–168.
- 4- BOUVIER F, SUIRE C, MUTTERER J, CAMARA B (2003) Oxidative remodelir of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD y CsZCD genes involved in crocus secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell* 15:47– 62.
- 5- BUITRAGO, A., J.A. 1990. *La yuca en la alimentacio´ n animal*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, 446 pp.
- 6- CEBALLOS, H.; SÁNCHEZ, T.; CHÁVEZ, A.L.; IGLESIAS F., C.A.; DEBOUCK, D.G.; MAFLA B., G.; TOHME M., J. 2006. Variation in crude protein content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. *Journal of Food Composition y Analysis* 19:589-593.

7- CHÁVEZ, A.L., BEDOYA, A.J., SÁNCHEZ, T., IGLESIAS, C., CEBALLOS, H., y ROCA, W. 2000. Iron, carotene y ascorbic acid in cassava roots y leaves. *Food y Nutrition Bulletin* 21(4): 410-413.

8- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 2002. IP3, Improved cassava for the developing World. *Annual Report. 2002*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.

9- COCK, J.H. 1989. La yuca, Nuevo potencial para un cultivo tradicional. Cali, Colombia. Publicación CIAT. 240p.

10- COMBS GF, (1998). *The Vitamins. Fundamental Aspects in Nutrition y Health*, Academic Press, London, pp 618 (1998).

11- COMBS, G.F., R.M. WELCH, J.M DUXBURY, N.T UPHOFF y M.C. NESHEIM. 1996. Food-based approaches to preventing micronutrient malnutrition: an international research agenda. Ithaca, New Andork, Cornell International Institute for Food, Agriculture an Development (CIIFAD). 68p.

12- DEMMIG-ADAMS B, ADAMS WW III (2002) Antioxidants in photosynthesis y human nutrition. *Science* 298:2149–2153.

13- FAO. 1991. Necesidades de vitamina A, hierro, float y vitamina B12. Informe de una consulta mixta FAO/OMS de expertos. Roma, Italia, FAO. 124.P.

14-FAWZI W.W; HALMERS, T.C; HERRERA, G.M; MOSTELLER, C. 1993. Vitamin A supplementation y child mortality and meta-analysis. *J.AM. Med.Assoc.*269:898-903.

- 15- FESTER T, HAUSE B, SCHMIDT D, HALFMANN K, SCHMIDT J, WRAY V, HAUSE G, STRACK D (2002) Occurrence y localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. *Plant Cell Physiol* 43:256–265.
- 16- GIBSON, R.S.,2005. Principles of nutritional Assessment 2<sup>nd</sup> Edn, Oxford University. Press, Oxford, ISBN: 1684-5374, pp:163-208.
- 17- GIOVANNUCCI E (2002) Lycopene y prostate cancer risk. Methodological considerations in the epidemiologic literature. *Pure Appl Chem* 74:1427–1434.
- 18- GIULIANO G, AL-BABILI S, VON LINTIG J (2003) Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. *Trends Plant Sci* 8:145–149.
- 19- GRAHAM RD, WELCH RM. 1996.Breeding for staple-food crops with high micronutrient density: Agricultural Strategies for Micronutrients. Working Paper No 3; 1996. International Food Policy Research Institute, Washington, D.C.
- 20- GRAHAM RD, SENADHIRA D, BEEBE SE, IGLESIAS C, ORTIZ-Monasterio I.1999.Breeding for micronutrient density in edible portions of staple food crops: conventional approaches. *Field Crops Res.* 1999; 60:57–80.
- 21- GRAHAM R, WELCH R, BOUIS H. Addressing micronutrient malnutrition through the nutritional quality of staple foods: principles, perspectives, y knowledge gaps. *Adv Agron.* 2001; 70:77–142.
- 22- GREGORIO, G.B. 2002. Progress in breeding for trace minerals in staple crops, *J Nutr* 132 (2002), pp. 500S–502S.
- 23- IGLESIAS, C., MAYER, J.,CHAVEZ, A.L., CALLE, F. 1997. Genetic potential y stability of carotene content in cassava roots. *Euphytica* 94: 367-373.



- 24- <http://www.astaxanthin.org/carotenoides.htm>. Junio.2005.
- 25- MARES-PERLMAN. 2002. The Body of Evidence to Support a Protective Role for Lutein y Zeaxanthin in Delaying Chronic Disease. *J. Nutr.* 2002;132:518S-524.
- 26- MILLBORROW BV (2001) The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J Exper Bot* 52:1145– 1164.
- 27- OKEZIE, B.O y F.V. KOSIKOKOWSKI. 1981. Cassava as a food. *CRC Critical reviews in food science y nutrition* 17(3): 259-275.
- 28- OLSEN, K.M. Y B.A. SCHAAL (2001). Microsatellite variation in cassava y its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. *American Journal of Botany* 88: 131-142.
- 29- PAINE JA, SHIPTON CA, CHAGGAR S, HOWELLS RM, KENNEDY MJ, VERNON G, WRIGHT SY, HINCHLIFFE E, ADAMS JL. 2005. A new version of Golden Rice with increased pro-vitamin A content. *Nat Biotechnol.* 2005; 23:482–7.
- 30- PRESTON, T.R.; RODRÍGUEZ, L.; VAN LAI, N.; HA CHAU, L. (2005) El follaje de la yuca (*Manihot esculenta* Cranz) como fuente de proteína para la producción animal en sistemas agroforestales. Finca Ecológica, UTA Foundation, College of Agriculture y Forestry Thu Duc, Vietnam. En, ; accesada en Enero de 2005.
- 31- RAJENDRAN, P.G., RAVINDRAN, C.S., NAIR, S.G. Y NAYAR, T.V.R. 2000. True cassava seeds (TCS) for rapid spread of the crop in non-traditional areas. Central Tuber Crops Research Institute (Indian Council of Agricultural Research), Thiruvananthapuram, Kerala, India.

32- SOMMER, A, WEST K.1996. Vitamin A deficiency health, survival y vision. OxfordUniversity, Press, Inc. New Andork.

33- TANUMIHARDJO SA, YANG, Z.2005. Carotenoids: epidemiology of health effects. In: Caballero B, Allen L, Prentice A, editors. Encyclopedia of human nutrition, 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Elsevier Ltd; 2005. p. 339–45.

34- WELCH, R.M.2002.The impact of mineral nutrients in food crops on global human health, *Plant y Soil* 247 (2002), pp. 83–90.

35- WHEATLEY, C.C. y CHUZEL, G. 1993. Cassava: the nature of the tuber y use as a raw material. In: R. Macrae, R.K. Robinson y M.J. Sadler (Eds.), Encyclopedia of Food Science, Food Technology y Nutrition. Academic Press, San Diego, CA, pp. 734–743.

36- World Health Organization (2003) Micronutrient deficiencies. Combating vitamin A deficiency. The Challenge. <http://www.who.int/nut/vad.htm>.

**PARTE I**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE POBLACIONES SEGREGANTES PARA  
EL CONTENIDO DE CAROTENOS EN YUCA**

## INTRODUCCION

Los carotenoides son una clase de pigmentos naturales liposolubles, ampliamente distribuidos en la naturaleza, que se encuentran en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos como raíces, flores y frutos; principalmente en las plantas, algas y bacterias fotosintéticas, donde juegan un papel importante en la fotosíntesis. También se encuentran en algunas bacterias no fotosintéticas, levaduras y mohos, donde pueden llevar a cabo una función protectora contra el daño por la luz y el oxígeno. Aunque los animales parecen ser incapaces de sintetizar pigmentos carotenoides, muchos animales los incorporan a partir de sus dietas. En los animales, los carotenoides proveen coloraciones brillantes, sirven como antioxidantes y pueden ser una fuente de la actividad de la vitamina A (<http://www.astaxanthin.org/carotenoides.htm>).

Los humanos y animales no pueden sintetizarlos, sin embargo, son capaces de absorberlos con modificaciones en su estructura básica (Ortega, 1991) como por ejemplo, el  $\beta$ -caroteno, el cual puede ser convertido a retinol (vitamina A; Olsen 1989). Los carotenoides de vegetales y animales son usualmente encontrados en fracciones lipídicas, ligados a proteínas o esterificados con ácidos grasos. La estructura de un carotenoide es lo que en últimas determina qué funciones biológicas potenciales puede tener ese pigmento. El patrón distintivo de alternación de enlaces dobles y simples en el esqueleto de polieno de los carotenoides es lo que les permite absorber excesos de energía de otras moléculas, mientras que la naturaleza de los grupos terminales específicos en estos pigmentos puede influenciar su polaridad. La primera característica puede contribuir a las propiedades antioxidantes de los carotenoides biológicos, mientras que la última puede explicar las diferencias en la forma que los carotenoides

individuales interaccionan con las membranas biológicas. Algunos de los carotenoides más comunes e importantes encontrados en los alimentos vegetales son: Licopeno,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y luteína. (<http://www.astaxanthin.org/carotenoides.htm>).

Los carotenoides, se presentan ubicuamente en los cromoplastos en flores y frutos, están siendo considerados como metabolitos secundarios sirviendo como atrayentes de insectos y animales. Más de 600 carotenoides han sido identificados en la naturaleza, aproximadamente 50 de los cuales tienen actividad de vitamina A (Isler, 1981). Se estima que anualmente se producen más de 100.000.000 de toneladas de carotenoides. La mayor parte de esta cantidad se encuentra en forma de fucoxantina (en diversas algas) y en los tres principales carotenoides de las hojas verdes: luteína, violaxantina y neoxantina. En algunas especies, como *Lactuca sativa*, la lactucaxantina es un pigmento mayoritario.

La distribución de carotenoides entre los distintos grupos de plantas no presenta un patrón único. En verduras, el contenido en carotenoides sigue el modelo general de los cloroplastos de todas las plantas superiores, siendo generalmente luteína,  $\alpha,\beta$ -caroteno, violaxantina y neoxantina, en este orden, los mayoritarios. En pequeñas cantidades se encuentran zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina y anteraxantina. En frutos, las xantofilas suelen encontrarse en mayor proporción, aunque en algunos casos, los pigmentos mayoritarios son carotenos, como es el caso del licopeno del tomate. A veces, en ciertos frutos ocurre que algún carotenoide, además de ser mayoritario, se limita a una sola especie de plantas.

Los pigmentos carotenoides son los responsables de los colores rojos, amarillo y naranja y la protección antioxidante en una amplia variedad de plantas, animales, bacterias y hongos. En las plantas, los carotenoides juegan un papel importante en el desarrollo, estabilidad de la membrana y en la fotosíntesis, disipando los excesos de energía absorbida por el mecanismo fotosintético (Demmig-Adams y

Adams 2002). Ellos también sirven como precursores de otros componentes biológicamente importantes, (Millborrow 2001; Bouvier et al. 2003; Fester *et al.* 2002; Giuliano *et al.* 2003), ejercen funciones de protección debido a su alto potencial antioxidante y son también componentes importantes de la dieta humana. Fuertes evidencias sugieren que las dietas ricas en carotenoides pueden prevenir la aparición de algunos estados crónicos de las enfermedades (Mares-Perlman *et al.*, 2002) y ciertos tipos de cánceres (Giovannucci, 2002).

Además de la contribución de los carotenoides al color atractivo de las frutas y verduras, se destaca, por su importancia a nivel fisiológico y dietético, la propiedad de que algunos de ellos pueden tener actividad como provitamina A (Isler, 1981; Simpson, 1983). Ciertos carotenoides son capaces de convertirse en vitamina A, como ocurre en insectos, peces, reptiles, aves y mamíferos. Estos carotenoides de pro-vitamina A, según se los conoce, totalizan más de 50, de éstos, el trans  $\beta$ -caroteno efectúa la contribución más extensa a la actividad de la vitamina A en productos alimenticios.  $\alpha$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina (3-hidroxi- $\beta$ -caroteno) contribuyen en menor grado. La tabla 1.1 muestra varias actividades de pro-vitamina A de los carotenoides expresadas en función de la actividad del  $\beta$ -caroteno, que se considera del 100%. (Axtaxanthin Molecular Graphic, <http://www.astaxanthin.org/carotenoids.htm>).

**Tabla 1.1** Actividad relativa como pro-vitamina A de diversos carotenoides.  
Fuente: Simpson y Tsou, 1986.

<b>Carotenoide</b>	<b>Potencia Vitamínica %</b>
$\beta$ -caroteno	100
$\alpha$ -caroteno	50-54
$\gamma$ -caroteno	42-50
3,4-deshidro- $\beta$ -caroteno	75
$\beta$ -caroteno-5,6-epóxido	21
$\alpha$ -caroteno-5,6-epóxido	25
3-oxo- $\beta$ -caroteno	52
3-hidroxi- $\beta$ -caroteno	50-60
(criptoxantina)	48
4-hidroxi- $\beta$ -caroteno	Activo
$\beta$ -2'-apo-carotenal	72
$\beta$ -8'-apo-carotenal	Inactivo
Licopeno	Inactiva
Luteína	Inactivo
3,3-dihidroxi- $\beta$ -caroteno (zeaxantina)	

La capacidad de los carotenos para actuar como provitamina A depende de la conversión en retinol por los animales, así como de la presencia de  $\beta$ -ionona. Los carotenos que contienen como mínimo un anillo de  $\beta$ -ionona pueden convertirse en retinol en los animales. De esta forma, el carotenoide más importante al respecto es el  $\beta$ -caroteno, que contiene dos de estos anillos.

La vitamina A tiene muchas funciones vitales en los humanos y es producida principalmente a partir del  $\beta$ -caroteno, el cual se puede obtener a partir de varios vegetales y frutas tales como zanahoria, espinaca, duraznos, albaricoques, batatas etc. Actualmente se ha venido demostrando el papel de los carotenoides como potenciadores positivos de la respuesta inmune. En este sentido parece ser

que elevadas dosis de  $\beta$ -caroteno aumentan el ratio entre los linfocitos CD4 y CD8, que es muy bajo en enfermos de VIH (Olson, 1999). El papel protector de diversos antioxidantes, como  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico, para las células humanas, frente a la radiación ultravioleta, ha sido evaluado, llegándose a la conclusión de que el primero es el más eficiente, probablemente debido a su localización en la membrana celular, (Snodderly, 1995).

Las primeras cuantificaciones que se hicieron del contenido de carotenoides fueron inicialmente debido a su color, por lo tanto el contenido de carotenos totales fue determinado simplemente por extracción, medida espectrofotométricamente y su cálculo basado en el coeficiente de absorción del  $\beta$ -caroteno o de aquel carotenoide principal (Rodríguez-Amaya, 1993 a,b).

El contenido de carotenoides totales también fue usado para estimar el valor de vitamina A de los alimentos. Sin embargo, temprano se comprendió que grandes cantidades de carotenoides sin actividad de provitamina A estaban presentes en muchos alimentos. Por lo tanto se propusieron métodos que involucraban la separación de la fracción de los “carotenos” por cromatografía de columna abierta (columna clásica de flujo por gravedad). El más conocido de estos métodos es el de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) introducido en su forma presente en 1955. Según Wills *et al.*, 1984; Mercadante y Rodríguez-Amaya (1991) y Mercadante y Rodríguez-Amaya (1989) (citados por Rodríguez-Amaya, 1993) con el ajuste correcto de las fases estacionario y móvil, la cromatografía de columna abierta puede ser utilizada para separar y cuantificar las provitaminas individualmente. A medida que el análisis cuantitativo de los carotenoides se hacía más exacto, las concentraciones absolutas de éstos se obtenían por separación en una o dos columnas abiertas eluidas con mezclas de solventes de polaridad variable y por cuantificación individual por medio de su absorbancia máxima y sus respectivos coeficientes de absorción, siendo el contenido de carotenoides totales la suma de los valores individuales (Rodríguez-Amaya, 1993 a,b).



Posteriormente se utilizaron detectores de radiación para estudiar la absorción de sustancias, no solamente en la zona del espectro visible, sino también en ultravioleta e infrarrojo. Se denomina espectrofotometría a la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, y a las mediciones a una determinada longitud de onda.

La relación exacta entre la absorbancia y la concentración es conocida como la ley de Beer. Un enunciado de la ley de Beer es:

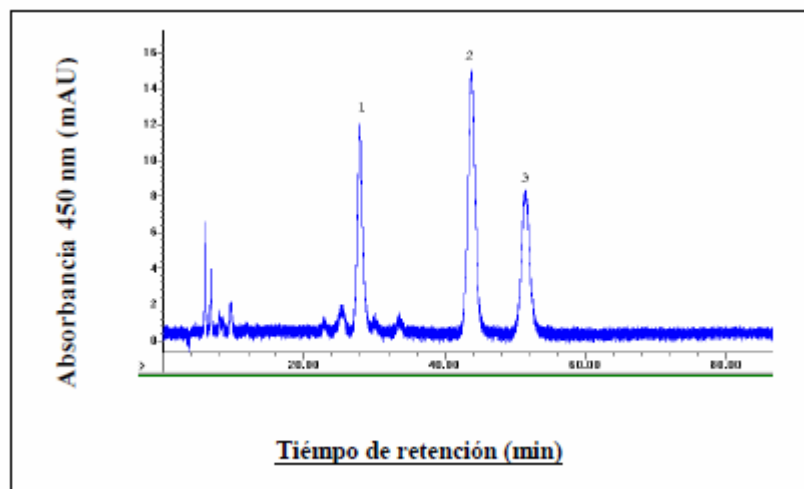
$$A = a b c$$

En donde A es absorbancia, a es “absortividad” o “coeficiente de extinción”, b es la “longitud de la trayectoria”, y c es la concentración. La absortividad es la habilidad inherente de una especie química a absorber luz y es constante a una longitud de onda dada. La longitud de la trayectoria es la distancia que la luz viaja a través de la solución medida. Es el diámetro interno de la cubeta. La longitud de la trayectoria es medida en centímetros o milímetros. La concentración puede ser expresada en varias unidades, usualmente en molaridad, partes por millón, o gramos por 100 ml.

Entre más grande sea la absortividad molar, el método es más sensible. No es raro encontrar valores de absortividad molar tan grandes como 10000 L/mol cm y aún mayores. Por ejemplo, la absortividad molar del  $\beta$ -caroteno es de ( $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ ) 2592 a 453 nm en éter de petróleo (Rodríguez-Amaya, 1989). La absortividad es constante a una “longitud de onda dada”, lo cual implica que cambia con la longitud de onda. La mayor sensibilidad analítica ocurre a la longitud de onda a la cual la absortividad es máxima. Esta es la misma longitud de onda que exhibe la

absorbancia máxima en el espectro de absorción molecular de esa especie química (Kenkel, 1992).

Con la introducción de la tecnología de la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), la investigación en los carotenoides de los alimentos ha sido intensificada en los últimos años. El sistema básico del HPLC consiste de un reservorio para el solvente, bomba, inyector, columna, detector y software para el análisis. La bomba permite que la fase móvil fluya a través de todo el sistema. En la cabeza de la columna está el dispositivo de inyección el cual introduce la muestra al sistema. Al final del efluente, un detector detecta los componentes de la muestra y la señal resultante es exhibida como picos en un registro (Figura 1.1). Este registro puede detectar, a través de un software, la presencia de picos, corregir líneas base, calcula áreas, tiempos de retención y determinar la concentración de los componentes usando factores de calibración almacenados (Kenkel, 1992).



**Figura 1.1** Cromatograma donde se detectan los compuestos carotenoides (1,2 y 3) de una muestra de raíz de yuca, procesada en un HPLC 10 cinco0 (Hewlett Packard), con una columna YMC-C30, detector ultravioleta-visible. Unidad de Biotecnología, CIAT, 2005.

La cuantificación de carotenos por HPLC requerirá de una resolución óptima y una calibración exacta con estándares apropiados, ya que los carotenoides varían en absorptividades y en la longitud de onda de máxima absorbancia, el cálculo de los porcentajes de área y la normalización son de una aplicabilidad cuestionable. La calibración con estándares externos plantea algunos problemas. Solamente  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno están comercialmente disponibles, las soluciones estándar tienen que ser preparadas frescas y ser verificadas espectrofotométricamente con regularidad. Los estándares para otras provitaminas tienen que ser obtenidos a partir de fuentes naturales y deben ser purificados cromatográficamente; o se pueden colocar y acumular fracciones eluidas de varias corridas en HPLC (Rodríguez-Amaya, 1989).

Las fases estacionarias para el análisis de carotenoides por HPLC, cada vez son más modernas y resultan ser más apropiadas para la separación de estos compuestos. La columna de carotenoides YMC (Waters: World learders in HPLC y Mass spectrometry, <http://www.waters.com/WatersDivision/pdfs/lc3YMC.pdf>) representa un avance importante en la cromatografía de los isómeros de los carotenoides. Separaciones de los isómeros cis y trans del  $\beta$ -caroteno y de los isómeros de xantofilas polares como luteína y zeaxantina son posibles bajo las mismas condiciones de elución. Las columnas de HPLC convencionales son incapaces de resolver estas mezclas complejas de isómeros geométricos polares y no polares. La columna de carotenoides YMC usa una nueva fase enlazada  $C_{30}$ , desarrollada y optimizada sobre un soporte de silica esférico de alta área superficial. La fase  $C_{30}$  proporciona una retención mayor y una mejor selectividad que las fases  $C_{18}$ , proporcionando una resolución excelente de los isómeros polares y no polares (Waters: World learders in HPLC y Mass spectrometry, <http://www.waters.com/WatersDivision/pdfs/lc3YMC.pdf>).

Con el gran avance tecnológico en la identificación de los compuestos carotenoides en CIAT se inició una investigación para evaluar el potencial de la

yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en cuanto a su contenido de carotenoides especialmente aquellos con actividad pro-vitamina A. El objetivo de este proyecto es mejorar el estado nutricional de las personas que viven en ambientes marginales en el trópico, seleccionando y promoviendo genotipos de yuca con alto y buena biodisponibilidad de micronutrientes y vitaminas. Esta investigación es apoyada por el *Biofortification Challenge Program* y financiada con recursos de DANIDA y USAID.

En yuca, los estudios iniciales del mejoramiento de esta característica tuvieron como objetivos determinar el rango de variación en el contenido de carotenoides en accesiones de banco de germoplasma de yuca y clones élite del programa de mejoramiento de CIAT, establecer su importancia relativa, medir el grado de asociación entre el color de la raíz y el contenido de carotenoides en yuca para finalmente explorar alternativas para mejorar aún más la concentración de los carotenoides ya encontrados. Algunos de estos estudios son presentados a continuación:

Safo-Katanka *et al.*, 1983, encontraron que el contenido de carotenoides de la yuca aumentaba con la edad, con concentraciones de 300, 325 y 350.6 0.79 mg/100 g. Pepping *et al.*, 1988, cuantificaron el contenido de  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno en hojas de yuca por medio de un método de HPLC de fase reversa, encontrando una concentración de  $\beta$ -caroteno de 2820  $\mu$ g/100 g de materia fresca en la porción comestible. No se encontraron cantidades apreciables de  $\alpha$ -caroteno. Ortega (1991), concluyó que los principales carotenoides presentes en raíces de cultivares de yuca analizadas fueron el  $\beta$ -caroteno y su isómeros neo- $\beta$ -caroteno, trans- $\beta$ -caroteno y neo- $\beta$ -caroteno U.

Usando el método de espectrofotometría, Bedoya (1999) cuantificó el contenido de carotenos totales en raíces y hojas de yuca de 600 genotipos. Las concentraciones en raíces oscilaron entre 0.102 y 1.040 mg/100 g de materia

fresca. En hojas el rango encontrado fue de 23.28 a 86.22 mg/100 g de materia fresca. Bolaños (2001) cuantificó el contenido de carotenos totales por medio de colorimetría en hojas y raíces de 682 genotipos de yuca pertenecientes al Banco de Germoplasma del CIAT. Las concentraciones de carotenos totales en raíces oscilaron entre 0.13 y 0.92 mg/100 g de materia fresca, y en hojas el rango de concentraciones para carotenos osciló entre 18.71 y 96.2 mg/100 g de materia fresca.

En la evaluación realizada por Chávez *et al.*, 2005, de 2457 raíces de genotipos de yuca en donde se tenían especies nativas y clones mejorados, se encontraron asociaciones importantes entre el contenido de carotenoides y características de interés, sin embargo hay que tener en cuenta que se trato de un estudio exploratorio y que el tamaño de muestra no fue muy grande. Los contenidos de carotenos en las raíces fluctuó entre 1.02 a 10.40  $\mu\text{g/g}$  de raíces frescas y se encontró una correlación positiva con la intensidad del color ( $r=0.860$ ) y el potencial cianogénico ( $r=0.305$ ). Niveles promedios de Fe y Zn fueron 17.1 y 7.5 mg/kg, respectivamente.

Las muestras analizadas demuestran que las raíces de yuca son una valiosa fuente de caroteno, el cual puede ayudar a aliviar las deficiencias de vitamina A en los países en desarrollo. Aunque la asociación negativa entre contenido de caroteno y deterioro fisiológico poscosecha (DFP) es aún preliminar, es un hecho relevante: si el alto contenido de carotenos en las raíces reducen o retrasan DFP, esto podría animar a los agricultores a sembrar clones de yuca con raíces amarillas, y por lo tanto, ayuda a superar el frecuente rechazo de los agricultores a adoptar nuevas variedades. Sin embargo, se necesitan más estudios sobre DFP bajo condiciones controladas, para corroborar la evidencia preliminar encontrada en este estudio.

Con estas investigaciones se concluyó que existe suficiente variabilidad genética para el contenido de carotenoides en raíces de yuca y hay buenas oportunidades para incrementarlo por mejoramiento tradicional, las raíces de yuca amarilla tienden a tener un menor deterioro post-cosecha y que el color de las raíces es un buen indicador del contenido de carotenos en las raíces de yuca.

También se han realizado investigaciones con el fin de determinar los efectos de los diferentes métodos de procesamiento tradicionales en el contenido de carotenoides en las raíces de yuca, entre estas tenemos los estudios realizados por:

Bedoya (1999) estimó los efectos de tres métodos de procesamiento diferentes sobre el contenido de carotenos totales de raíces de yuca de 26 genotipos. Los tres métodos utilizados fueron cocción en agua por 15 minutos, raíces secadas al horno durante 24 horas a 60°C y raíces secadas al sol por 6 días. Los promedios de carotenos totales dados en mg/100 g de porción comestible para los diferentes tratamientos fueron: en el control (raíces frescas) 0.52, raíces cocidas 0.31 (40.4% de pérdida), raíces secadas al horno 0.33 (36.5% de pérdida), raíces secadas al sol 0.21 (60% de pérdida).

En diferentes investigaciones realizadas en el CIAT, Chávez *et al.*, (2000), estudiaron los efectos de diferentes métodos de procesamiento sobre el contenido de carotenos en un grupo de 28 genotipos. En promedio, la cocción fue el método que menos redujo el contenido de carotenos (34%), seguido por el secado al horno para producir harina con un 44% de reducción. La producción de harina secada al sol redujo la concentración de carotenos al nivel más bajo (73% de reducción), lo cual indica que los carotenos son fotolábiles.

Moorthy *et al.*, (1990) cuantificaron el contenido de  $\beta$ -caroteno en raíces de 21 clones de yuca por medio del método AOAC y también examinaron el método de

la cocción en los carotenos, donde no se encontró una reducción notable en el contenido de  $\beta$ -caroteno después de la cocción.

En una extensa revisión de literatura llevada a cabo por Rodríguez-Amaya (1993) en cuanto a la naturaleza y distribución de los carotenoides en los alimentos, también se revisaron los efectos de los procesamientos sobre el contenido de los carotenoides y se llegó a la conclusión que la cocción y el procesamiento por calor, especialmente el enlatado y el secado a altas temperaturas, reducen marcadamente los niveles de carotenoides.

Los estudios anteriores demuestran que la estimación del contenido de carotenoides en las raíces de yuca puede ser en algunos casos subestimada o sobrevalorada pues hoy en día aunque los métodos de cuantificación se han convertido en herramientas cada vez mas eficientes y eficaces, la propiedades fisico-químicas inherentes a estos compuestos hace que su determinación en el laboratorio sea una aproximación de los contenidos reales. Por otra parte aunque los métodos de procesamiento pueden generar pérdidas de los carotenoides los estudios anteriores muestran que los procedimientos mas comúnmente utilizados por los agricultores son los que generan menores pérdidas.

Teniendo en cuenta que existen evidencias de la existencia de variabilidad genética en cuanto al contenido de carotenoides en las raíces de yuca, un primer paso en el desarrollo de este trabajo de investigación fue determinar dicha variabilidad en 756 materiales segregantes de yucas, blancas por blancas, amarillas por amarillas, blancas por cremas, amarillas por blancas y amarillas por cremas, pertenecientes a 32 familias como un paso previo a la selección de las mejores familias para los análisis moleculares.

## 1.1 MATERIALES Y METODOS

### 1.1.1 Determinación del Contenido de Carotenos totales en poblaciones segregantes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz).

Este trabajo se realizó bajo la coordinación del Proyecto de Mejoramiento y Genética de Yuca, en los laboratorios de Bioquímica en CIAT, ubicado en el Km 17 recta Cali- Palmira (Colombia). Para seleccionar las familias que posteriormente fueron usadas en la identificación de las regiones del genoma asociadas a la producción de  $\beta$ -caroteno, se evaluaron una población segregante 756 individuos pertenecientes a 32 familias. La población segregante fue el producto del cruzamiento de raíces de yuca blancas por blancas, amarillas por amarillas, blancas por cremas, amarillas por blancas y amarillas por cremas desarrolladas por el programa de Mejoramiento de Yuca en CIAT (Tabla 1.2).

Para la determinación del color y del contenido de carotenos totales de cada planta se seleccionaron las cinco mejores raíces, por su estado estado fitosanitario, que estuvieran libres de daño mecánico y sin pudrición precosecha.



**Tabla 1.2** Familias evaluadas para altos contenidos de carotenos con base en peso fresco.

<b>Cruzamiento</b>	<b>Madre</b>	<b>Color</b>	<b>Padre</b>	<b>Color</b>	<b>No Individuos</b>
GM 808	AM 320- 66	4	SM 1511- 6	1	4
GM 811	AM 320-115	5	CM 4365- 3	1	13
GM 820	AM 320- 127	4	CM 4365- 3	1	12
GM 812	CM 4574- 7	1	AM 320- 115	5	8
GM 878	CM 6921- 3	1	AM 320- 115	5	6
GM 884	CM 8475- 4	1	AM 320- 115	5	9
GM 890	SM 805- 15	1	CM 507- 34	2	20
GM 893	SM 805- 15	1	MPER 297	3	20
GM 894	SM 1219- 9	1	AM 320- 15	5	12
GM 895	SM 1219- 9	1	MPER 297	3	9
GM 837	SM 1460- 1	1	CM 996- 6	3	23
CM 9319	SM 1551-18	3	SM 980- 4	2	18
GM 809	SM 1741-1	1	AM 320- 66	4	39
GM 810	SM 1859- 26	2	AM 320- 66	4	4
CM 9345	MBRA 481	3	MBRA 675	1	18
GM 705	MBRA 1A	3	MCOL 1734	2	9
GM 708	MBRA 1A	3	MMAL 66	2	66
GM 718	MCOL 2206	2	CM 2772- 3	2	8
GM 716	MCOL 2206	2	MCOL 2056	2	67
GM 725	MCOL 2206	2	MMAL 66	2	34
CM 9312	MCOL 2285	3	SG 804-5	1	28
CM 9816	MCOL 2295	3	SM 980- 4	2	8
GM 833	MCR 87	3	CM 507- 34	2	10
GM 849	MCR 87	3	CM 4574- 7	1	38
GM 900	MCR 87	3	SM 1741- 1	1	7
GM 834	MPER 297	3	CM 507- 34	2	8
GM 904	MPER 297	3	MCOL 2056	2	6
GM 734	MTAI 2	2	CM 3750-7	1	66
GM 739	MTAI 2	2	MCOL 2056	2	82
GM 740	MTAI 2	2	MCOL 2206	2	41
GM 738	MTAI 2	2	MCOL 1734	2	34
GM 742	MTAI 2	2	MMAL 66	2	29
<b>Total</b>					<b>756</b>

### 1.1.2 Determinación del Color de las Raíces de Yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

El color de las raíces se determinó mediante la escala numérica propuesta por Echeverri (2000), usada posteriormente por Bolaños (2001), la cual consta de ocho colores y en donde el color del parénquima de la raíz es evaluado en una

escala de 1 a 8, siendo 1 el valor correspondiente a raíces que presentan parénquima blanco, asociado con bajo contenido de carotenos y 8 aquellas raíces amarillas, con altos contenidos de carotenos. (Figura 1.2).

**Figura 1.2** Regleta de intensidad de parénquima de yuca.



### 1.1.3 Extracción y cuantificación de carotenos totales en raíces

La extracción y cuantificación del contenido de carotenos en raíces de yuca, se realizó siguiendo la metodología empleada por Safo-Katanga *et al.*, (1984), modificado por Bedoya (1999) y descrita por Chávez *et al* (2005), de la siguiente manera:

Se cosecha 2 -3 plantas de cada clon; de cada planta se elige las mejores 5 raíces, se desecha las partes distal y proximal de cada una y las fracciones restantes se parten en cuatro, se escoge de cada raíz dos cuartos opuestos, se

pican, se mezclan bien y se extrae tres muestras, 5g para el análisis de carotenos, a los cuales se les adiciona 5 ml de éter de petróleo y de acetona, se homogenizo en un homogenizador (turrax) por un minuto y se centrifuga por 10 minutos a 3000 rpm para extraer la fase etérea. Se realiza una segunda extracción, repitiendo los pasos anteriores.

Una vez obtenidas las fases etéreas, se agrega agua deionizada con NaCl y se agita en un vórtex y posteriormente se centrifuga a 3000 rpm por 10 minutos; se extrae los desechos de agua con sal y se adiciona nuevamente agua y NaCl y se centrifuga, con el fin de lograr una mejor extracción del caroteno, y eliminar así todos los residuos de acetona que hubieran podido quedar durante el proceso. Finalmente todas las muestras se llevan a un volumen de 15 ml para leer la absorbancia en el espectrofotómetro.

Obtenida la absorbancia del extracto etéreo la separación y cuantificación de los carotenos se hizo por HPLC, utilizando un equipo Hewlett Packard serie 1050, con una columna YMC-C30, especial para separar carotenoides y un detector ultravioleta-visible de arreglo de diodos. La detección se realizó por espectrofotometría visible leyendo la absorbancia a 450 nm. La identificación de  $\beta$ -caroteno se hizo teniendo en cuenta el tiempo de retención y el espectro visible comparado con un estándar comercial. Con cada uno de los extractos obtenidos se procede de la siguiente manera, se concentran a sequedad en vacío con el rotoevaporador, se resuspenden en un 1 ml con acetona y luego se centrifuga a 14000 rpm por 2 minutos y finalmente se inyectan en el sistema HPLC.

Las condiciones generales del HPLC fueron: Entre los solventes utilizados tenemos en la Fase A el Metanol, para la fase B, el Metiliterbutil éter, un gradiente lineal de 90 minutos, un flujo de 0.6 ml/min, una temperatura de 22 ° C, un volumen de inyección de 20  $\mu$ l y la detección se hizo usando UV, 450 nm. Se utilizó estándares comerciales de  $\beta$ -caroteno para hacer la cuantificación.

#### 1.1.4 Cuantificación del contenido de carotenoides

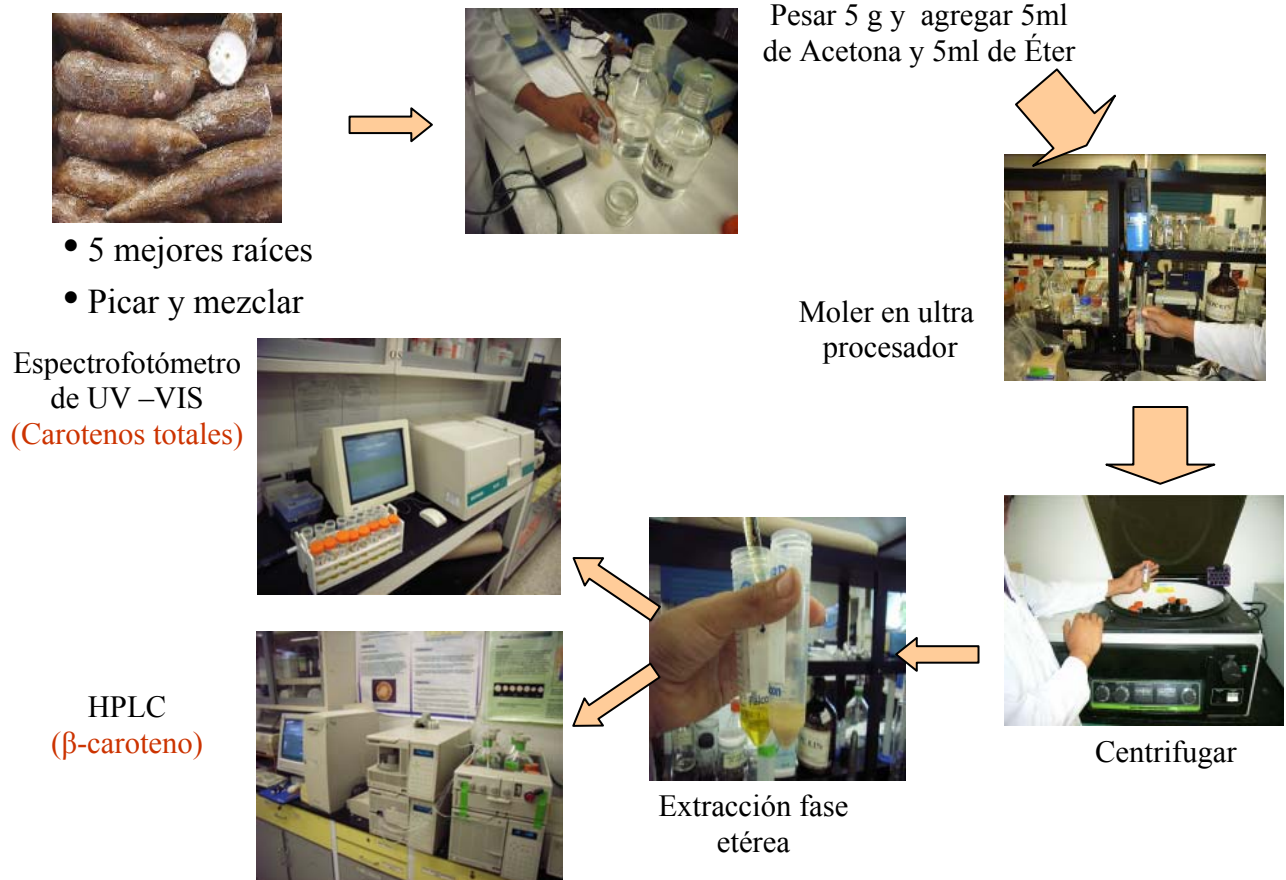
El contenido de carotenos totales fue determinado por el método de absorción espectrofotométrico. La detección fue hecha a una longitud de onda de  $\lambda = 450$  nm para extractos de raíz y se usó éter de petróleo como referencia para medir el blanco. La identificación y cuantificación fue hecha comparando los tiempos de retención y el espectro U.V con estándares comerciales. En la Figura 1.3 se puede observar los pasos de la metodología para la extracción y detección de carotenoides totales por el método colorimétrico y de HPLC. Finalmente se calcula el contenido de carotenoides totales utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g/g} = (A \times \text{Volumen final} \times 10^4) / (A_{1\text{cm-1\%}}) \times \text{peso de la muestra}$$

Donde:

- \* A= absorbancia a 450 nm.
- \* Volumen final = Volumen en mililitros de la solución antes de la lectura.
- \*  $A_{1\text{cm-1\%}}$  = Coeficiente de absorción del  $\beta$ -caroteno en éter de petróleo = 2592.
- \* Peso de la muestra en gramos.

# EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOS



**Figura 1.3** Pasos de la metodología de extracción y detección de carotenoides en yuca por el método colorimétrico y HPLC.

## 1.1.5 Análisis de distribución de Frecuencias del Contenido de Carotenos Totales en poblaciones F1:

El contenido de carotenos totales y  $\beta$ -caroteno se analizaron usando estadística descriptiva (medidas de tendencia central, de variación y de desviación, correlación y regresión) mediante el programa Microsoft Excel y SAS (SAS, 2005). Se construyeron histogramas de frecuencia y gráficas de dispersión. Las asociaciones entre el contenido de carotenos totales y los diferentes carotenoides individuales evaluados por el método HPLC, así como la intensidad de color del parénquima, fueron evaluadas utilizando el análisis de regresión lineal.

## 1.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.2.1 Análisis de Segregación del Contenido de Carotenos Totales en poblaciones F1:

Aproximadamente 756 individuos de una población segregante de 32 familias de yuca fueron evaluadas para el contenido de carotenos totales (evaluación basada en el método del análisis de espectrofotometría) en sus raíces (Tabla 1.3). Tres familias fueron seleccionadas por su alto promedio en el contenido de carotenos y/o el gran contraste entre sus progenies (gran desviación estándar y amplio rango de variación). Las familias seleccionadas fueron usadas para tratar de identificar regiones del genoma de yuca asociadas con los altos contenidos de  $\beta$ -caroteno y a la vez tratar de elucidar la herencia de esta característica en las raíces de yuca. Posteriormente las plantas fueron autopolinizadas para producir progenies S1 (para fijar la variación encontrada en esta etapa) y basados en estos resultados se hicieron análisis de mapeo genético e identificación y validación de QTLs asociados al contenido de carotenoides en raíces de yuca usando marcadores moleculares microsatélites.

En la Figura 1.4 se presenta la variación del color de las raíces en algunos individuos pertenecientes a la familia CM9816.

**Tabla 1.3** Segregación para el contenido de carotenos totales basado en el peso fresco en varias familias de yuca.

Familia	Tamaño	Contenido de Carotenos, peso fresco ( $\mu\text{g/g}$ )			
		Promedio	Dev.Est	Mínimo	Máximo
AM 320-127 x CM 4365-3	n=12	1.52	1.23	0.45	3.44
AM 320-115 x CM 4365-3	n=16	1.69	1.12	0.44	3.54
AM 320-66 x SM 1511-6	n=4	2.56	1.25	0.86	3.57
CM 4574-7 x AM 320-115	n=8	1.46	1.00	0.45	2.68
CM 6921-3 x AM 320-115	n=6	1.73	1.49	0.35	3.50
CM 8475-4 x AM 320-115	n=9	1.79	1.82	0.30	4.81
SM 805-15 x CM 507-34	n=20	2.46	2.08	0.19	6.78
SM 805-15 x MPER 297	n=20	4.46	2.44	0.76	8.77
SM 1219-9 x AM 320-15	n=12	1.56	1.06	0.17	3.16
SM 1219-9 x MPER 297	n=9	2.79	0.63	2.05	3.99
SM 1460-1 x CM 996-6	n=24	1.67	1.32	0.14	4.20
SM 1551-18 X SM 980-4	n=18	3.22	1.70	0.44	7.61
SM 1859-26 x AM 320-66	n=4	4.62	2.26	2.21	7.55
MBRA 481 x MBRA 675	n=18	3.00	1.93	0.22	8.38
MBRA 1A x MCOL 1734	n=9	5.13	0.87	3.91	6.39
<b>MBRA 1A x MMAL 66</b>	<b>n=66</b>	<b>3.14</b>	<b>2.65</b>	<b>0.16</b>	<b>11.16</b>
MCOL 2206 x CM 2772-3	n=8	3.61	1.88	0.90	6.27
MCOL 2206 x MCOL 2056	n=68	1.73	1.13	0.30	4.78
MCOL 2206 x MMAL 66	n=36	1.81	1.32	0.44	5.92
MCOL 2285* SG 804-5	n=30	3.60	0.95	2.05	5.67
<b>MCOL 2295 x SM 980-4</b>	<b>n=8</b>	<b>4.83</b>	<b>2.96</b>	<b>1.45</b>	<b>9.99</b>
MCR 87 x CM 4574-7	n=64	2.16	2.18	0.21	8.45
MCR 87 x CM 507-34	n=10	1.86	1.57	0.49	5.48
MCR 87 x SM 1741-1	n=7	2.23	1.89	0.25	5.70
MPER 297 x CM 507-34	n=8	3.66	1.10	1.98	5.15
MPER 297 x MCOL 2056	n=6	3.25	1.13	2.21	5.01
<b>MTAI 2 x CM 3750-7</b>	<b>n=68</b>	<b>3.62</b>	<b>1.74</b>	<b>0.44</b>	<b>8.45</b>
MTAI 2 x MCOL 2056	n=82	2.35	1.51	0.36	6.23
MTAI 2 x MCOL 2206	n=41	3.10	1.97	0.44	7.98
MTAI 2 x MMAL 66	n=32	2.82	1.68	0.73	6.90
MTAI x MCOL 1734	n=34	3.69	1.85	0.59	7.00
SM 1741-1 x AM 320-66	n=46	1.42	0.93	0.17	2.98



**Figura 1.4** Variación en el color de las raíces en algunos individuos de la familia CM9816.

### **1.2.2 Análisis de Distribución de Frecuencias del contenido de carotenos totales en las poblaciones F1.**

A partir de las evaluaciones del contenido de carotenos totales mediante espectrofotometría y teniendo en cuenta las gráficas de distribución de frecuencias, las medidas de tendencia central y el número de individuos se escogieron tres familias, denominadas, GM708, GM734 y la CM9816. Las cuales presentaron un amplio patrón de segregación en cuanto a la característica contenido de carotenos y nos podrían ayudar a entender los mecanismos genéticos-moleculares que regulan la síntesis, el transporte y la acumulación de carotenos en las raíces de yuca.

En la tabla 1.4 se presentan algunas de las medidas de tendencia central o estadística descriptiva, obtenidas en los análisis de las familias GM708, GM734 y CM9816, en donde se puede observar que el contenido de carotenos es muy variable encontrándose valores desde 0.45 hasta 11.16  $\mu\text{g/g}$  en cruzamientos realizados entre parentales intermedios (coloración crema), bajos (coloración blanca) y altos (amarillos) demostrando la naturaleza cuantitativa de la variable.

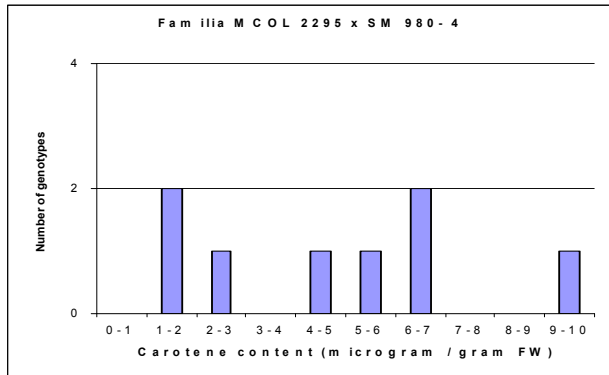


**Tabla 1.4** Estadística Descriptiva del Contenido de Carotenos Totales ( $\mu\text{g/g}$ ) en las familias CM9816, Gm708 y GM734.

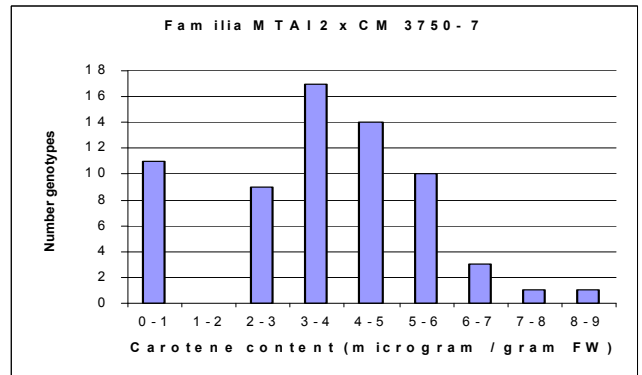
<b>Parámetro</b>	<b>Contenido de Carotenos Totales (<math>\mu\text{g/g}</math> PF)</b>
<b>CM9816 (MCOL2295 x SM980-4)</b>	
Average	5.38
Desviación Estándar	1.69
Mínimo	4.00
Máximo	8.00
<b>GM708(MBRA1AxMMAL66)</b>	
Average	3.68
Desviación Estándar	2.30
Mínimo	1.00
Máximo	8.50
<b>GM734(MTAI2xCM3750-7)</b>	
Average	3.60
Desviación Estándar	1.61
Mínimo	1.00
Máximo	8.00

En la Figura 1.5 se puede observar de manera gráfica la forma de distribución de la característica en las familias seleccionadas, la cual muestra diferentes clases o agrupamientos del contenido de carotenos en estas familias. La distribución continua que se observa es una característica propia de caracteres cuantitativos, gobernados por muchos genes, en donde se presentan diferentes tipos de interacciones tanto intra como Inter loci, en donde cada uno de ellos contribuye aditivamente a la expresión fenotípica de la característica y se ven afectados por el ambiente, lo cual hace complejo el proceso de mejoramiento de ésta y muchas otras características de interés.

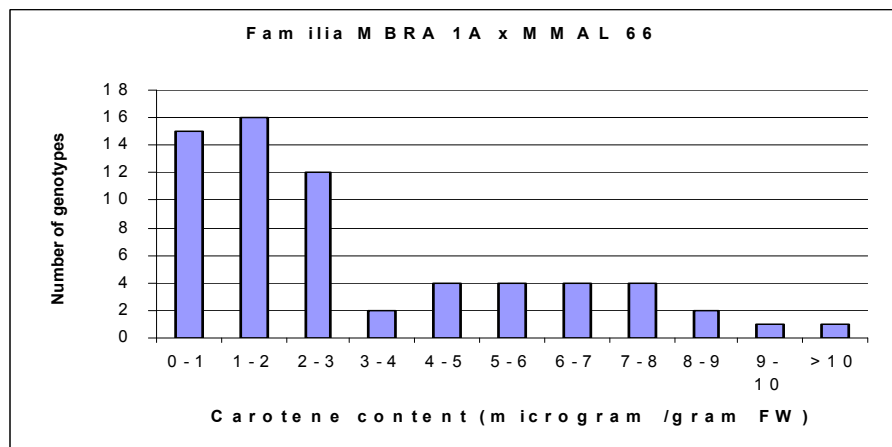
### A. FAMILIA CM9816



### B. FAMILIA GM734



### C- FAMILIA GM708

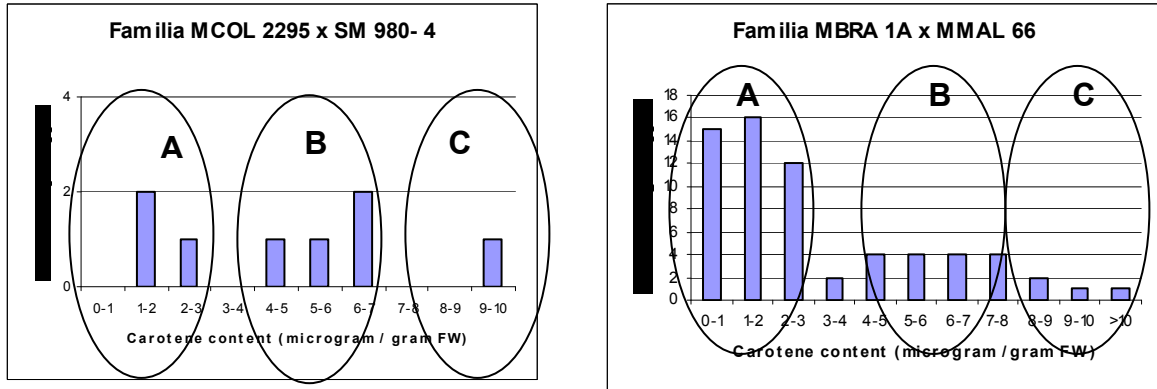


**Figura 1.5** Gráficas de Distribución del contenido de carotenos ( $\mu\text{g/g}$ ). A. Familia CM9816. B. Familia GM734 y C. Familia GM708.

Basados en los resultados de la caracterización morfológica del color y del contenido de carotenos totales de las raíces, se hizo el ejercicio de examinar la herencia del contenido de carotenos en las familias evaluadas y así se planteó que podrían ser dos loci recesivos los que están determinando la mayor parte de la variación observada. La herencia recesiva para el contenido de carotenos en las raíces de yuca, es sorprendente porque para otros cultivos la herencia está relacionada con el efecto producido por genes en estado dominante. En la Figura

1.6 se trata de ilustrar esta hipótesis, mediante la agrupación hipotética de los genotipos de la familia CM9816 derivada del cruzamiento entre MCOL 2295 x SM908-4 y de la familia GM 708 resultante del cruzamiento entre MBRA 1A x MMAL 66, que explican la herencia del contenido de  $\beta$ -caroteno basada en dos factores recesivos.

En el grupo A, ambos loci tienen por lo menos una copia dominante (A-B) y por lo tanto, hay poco caroteno. En el grupo B, una de las dos copias está en estado homocigoto recesivo (aaB- o además A-bb). En el grupo C, por su parte, ambos loci están en estado homocigoto recesivo (aabb). Por autopolinización de las plantas de cada grupo y analizando su segregación se podrá confirmar o rechazar esta hipótesis. La autopolinización de las plantas del grupo A deberán generar una amplia variación a demás ellas pueden producir pocas plantas homocigotos para uno o ambos loci. En otras palabras, plantas del grupo A generaran progenies que unen los tipos A, B y C. Plantas del grupo B y C, por otra parte, no producirían



**Figura 1.6** Agrupación hipotética de los fenotipos que explica la herencia del contenido de carotenos basados en dos factores recesivos.

Las distribuciones de frecuencias para el contenido de carotenos totales con base en peso fresco en las progenies  $S_1$  derivadas de la autofecundación de las familias (CM 9816, GM 708 y GM 893) no se ajustaron a un tipo de distribución normal. Las distribuciones que se obtuvieron son típicas de caracteres cuantitativos, en donde no se observa clases fenotípicas contrastantes, sino

diferentes expresiones de la característica. Lo anterior pone de manifiesto que la característica contenido de carotenos en las raíces de yuca no está controlada por uno o dos genes dominantes, sino por la acción de varios genes menores los cuales aportan diferencialmente a la expresión del carácter.

Algunos trabajos plantean que el color de raíz es de herencia simple, que un factor dominante es responsable del color amarillo, y alelos recesivos determinan el color blanco y crema presente en yuca, llegando a concluir que el color de raíz (blanco/crema/amarillo) fue determinado parcialmente por un gen dominante y la estabilidad de compuestos provitamina A pueden ser genotipo dependientes (Hershey, 1983; Hershey y Ocampo, 1989). Otro trabajo plantea la hipótesis que dos genes con efectos epistáticos controlan el color de raíz, un gen presenta dominancia completa el cual interviene en el transporte de carotenos y el otro gen con dominancia parcial interviene en la acumulación de caroteno en la raíz de yuca (Jos *et al.*, 1990).

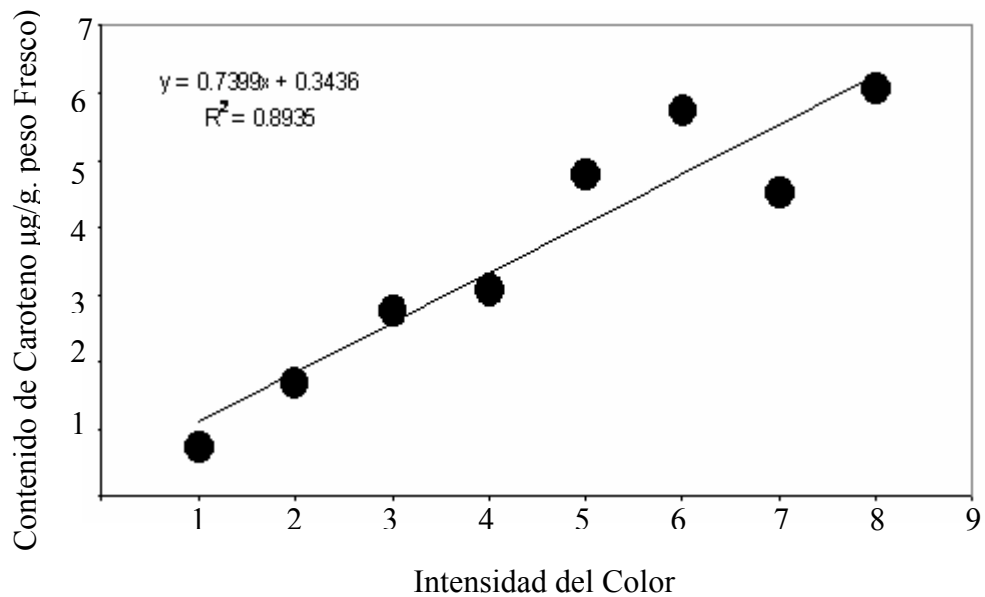
Iglesias *et al.*, (1997), determina que el color amarillo presenta un grado de dominancia, pero los padres contrastantes estudiados difieren en cuanto a la composición alélica para un locus, sugiriendo que la herencia de color de raíz y el contenido de carotenos deben ser de herencia más compleja. Se plantea que aunque existen genes mayores dominando el transporte y la acumulación de carotenos en raíz, la variabilidad cuantitativa observada dentro de clases de color de raíz, sugiere que un número de genes con efecto pequeño está involucrados en la acumulación de carotenos en raíz. Como conclusión general la herencia de concentración de carotenos puede ser determinada por dos genes, uno controlando el transporte del producto de precursores para la raíz, el otro responsable en el proceso de acumulación, los genes presentan efectos epistáticos. Sin embargo, hacen falta estudios que involucren diferentes tipos de poblaciones, un mayor número de individuos y ambientes para determinar cual es la herencia de la característica en las raíces de yuca.

Los estudios de herencia y de heredabilidad de la característica (Marin, 2001, Morillo Y 2009) muestran que a pesar de que se observa un amplio patrón de segregación de la característica, los altos valores de heredabilidad encontrados ( $r= 0.63$ ) y la baja interacción de la característica con el medio (Bolaños, 2001) permiten concluir que la herencia de la característica contenido de carotenos totales que aunque este mostrando distribuciones continuas no es una característica poligénica sino que pueden ser uno o hasta tres genes mayores y otros pocos menores los que aditivamente están contribuyendo a la variación fenotípica observada en el contenido de carotenos en las raíces de yuca.

### **1.2.3 Relación entre el contenido de carotenos y el color de la raíz:**

Se ha establecido que hay una buena correlación entre el contenido de caroteno y la intensidad del color en las raíces, (Marin, 2002,2008; Bolaños, 2001; Morillo Y., 2009) por lo cual para este estudio se consideró el análisis del contenido de carotenos promedio para cada clase de intensidad de color considerada.

Se encontró un alto grado de asociación entre el contenido de carotenos y el color de la raíz de 0.74 con un  $R^2$  de 0.89, lo que significa que el 89% de la variabilidad observada en el contenido de carotenos, puede ser explicada por la variabilidad en el color del parénquima, en donde cada incremento en la intensidad del color representa un incremento proporcional en la concentración de carotenos. (Figura 1.7).

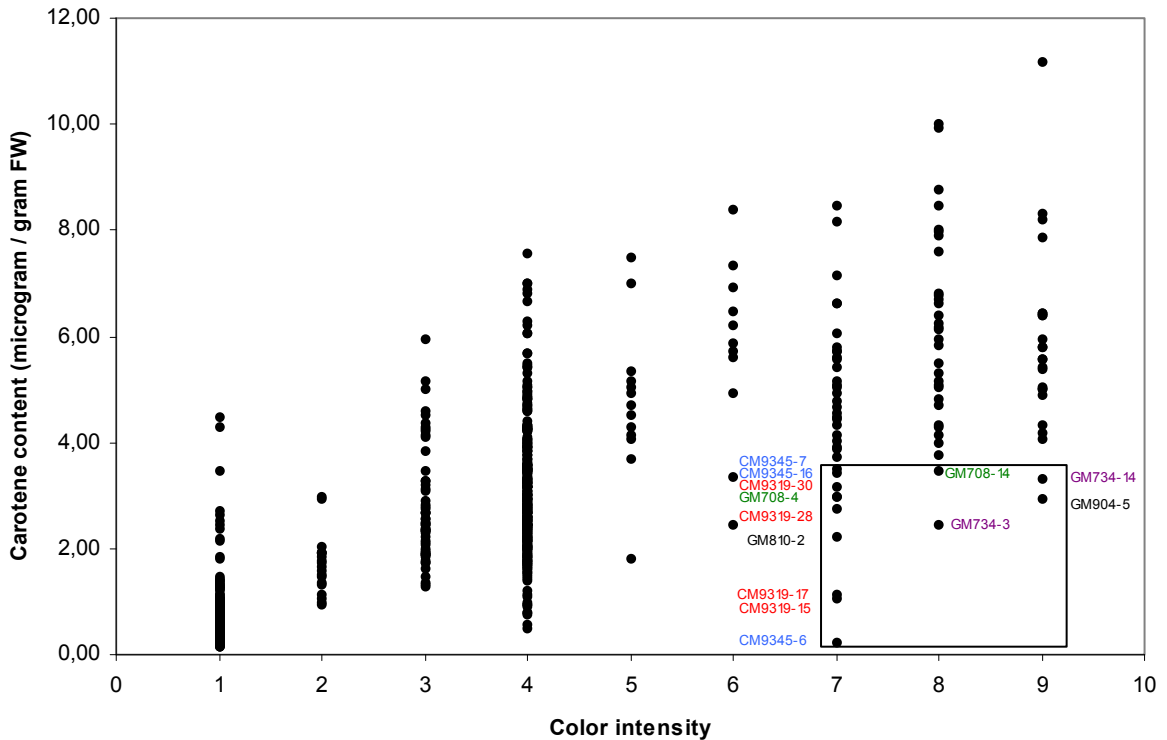


**Figura 1.7.** Relación entre la intensidad de color en las raíces (basada en la escala visual de 1 a 9) y el promedio del contenido de caroteno para cada clase.

Se logró determinar que hay una gran variación para el contenido de caroteno dentro de cada intensidad de color como se muestra en la Figura 1.8, en el cuadro que se encuentra en el lado derecho de ésta se muestran varios clones que presentaron una alta intensidad de color pero bajos contenidos de carotenos, esto es una situación atípica. Esto se podría explicar al considerar que las raíces de estos clones (varios son miembros de la misma familia y, por lo tanto, genéticamente relacionados) podrían tener otros pigmentos diferentes de los carotenos en una mayor proporción.

En el borde izquierdo de la figura se puede observar la ausencia de raíces con relativamente alto contenido de carotenos pero bajo o no intensidad de color en las raíces brillantes. Iglesias *et al*, 1997, propusieron que quizás el ligamiento entre alto contenido de carotenos y la intensidad del color puede ser quebrada. Sin embargo, los datos presentados aquí sugerirían que el ligamiento no puede ser superado. Finalmente, esto podría ser analizado teniendo en cuenta mucha de la

variación que existe para el contenido de carotenos en las clases del número 4 (en un rango de alrededor de 1 a 8 ug/g).



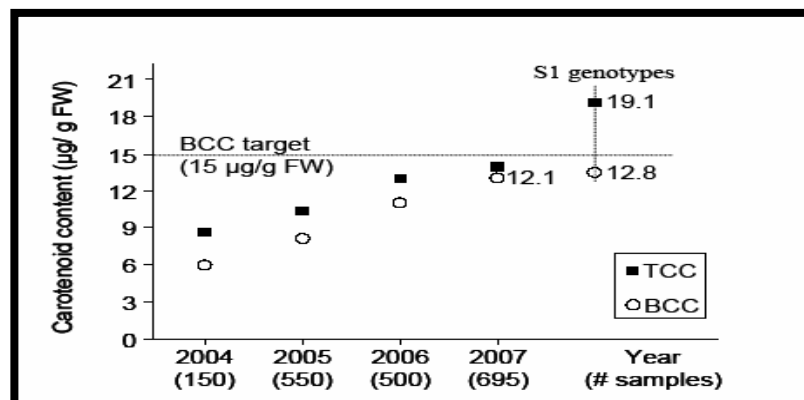
**Figura 1.8.** Relación entre la intensidad de color en las raíces (basada en la escala visual del 1 al 9) y el contenido de caroteno para una muestra de alrededor de 750 clones de yuca.

En evaluaciones del color de pulpa de la raíz y contenido de carotenos totales realizados en una población S1 en los años 2006 y 2008 (Marin, 2002 2008). Se encontró correlación fenotípica altamente significativa entre color de pulpa-2008 y contenido de carotenos totales-2008 con un valor de  $r = 0.81$ ; una correlación de  $r = 0.91$  entre color de pulpa entre los años 2006 y 2008. Estos resultados confirman la fuerte correlación que existe entre color de pulpa de raíz y el contenido de carotenos total reportados por Iglesias (1997); Boiteux y Carvalho (2001); Bolaños (2006); Chávez *et al.* (2000-2005), en donde se ha encontrado que en una evaluación de 2457 genotipos de raíz de yuca incluyendo especies nativas y clones mejorados, encontrando que el contenido de carotenos en las

raíces, fluctúa entre 1.02 a 10.40 mg/g de raíces frescas, se encontró una correlación positiva con la intensidad del color ( $r = 0.86$ ). Esta correlación tan alta sugiere que color de raíz amarilla es probablemente un carácter estable con respecto del ambiente.

Bolaños (2006) evaluó la interacción genotipo por ambiente en ciertas accesiones de la colección núcleo de yuca y encontró que esos genotipos de raíces amarillas, se mantenían estables a través de los diferentes ambientes estudiados. Además en el análisis de regresión lineal se encontró que el  $R^2$  entre los caracteres contenido de carotenos totales y color pulpa de raíz explica el 65% entre estos y un  $R^2 = 10\%$  entre contenido de carotenos y materia seca.

Los resultados anteriores muestran principalmente que existe una variabilidad genética en cuanto al contenido de carotenos en las raíces de yuca y que se han venido realizando grandes esfuerzos para incrementarlos. En la Figura 1.9 se muestra los esfuerzos y el progreso en los últimos tres años en el incremento del contenido de carotenoides totales (TCC) y el contenido de  $\beta$ -caroteno (BCC) en el proyecto de yuca en el CIAT. Los datos presentados ilustran los niveles máximos medidos en cuantificaciones no replicadas en materiales con vigor completo y genotipos parciales endocriados (S1).



**Figura 1.9** Progresos obtenidos en el Incremento en el Contenido de Carotenos Totales y en el Contenido de  $\beta$ -caroteno en el programa de mejoramiento de CIAT.



Es importante enfatizar que los altos niveles en los contenidos de carotenos totales y  $\beta$ -caroteno observados durante las evaluaciones realizadas durante este período de tiempo han permitido una ganancia inicial de 2  $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno por año. Si esta ganancia se mantiene estable en los siguientes ciclos de selección, posiblemente en los siguientes años se puedan llegar a obtener clones de yuca que tengan 15  $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno (base a peso fresco), lo cual se vería también grandemente beneficiado por el uso de nuevas tecnologías tales como el NIR, el uso de herramientas biotecnológicas que apoyarían efectivamente el proceso de mejoramiento de la característica en búsqueda de genotipos con una mejor calidad nutricional.

### 1.3 CONCLUSIONES

A partir de las evaluaciones del contenido de carotenos totales mediante espectrofotometría de aproximadamente 756 individuos segregantes, pertenecientes 32 familias de yuca, y teniendo en cuenta las gráficas de distribución de frecuencias, las medidas de tendencia central y el número de individuos se escogieron Tres familias. Las cuales presentaron un amplio patrón de segregación en cuanto a la característica contenido de carotenos y que fueron autopolinizadas para las producir progenies S1 (para fijar la variación encontrada en esta etapa) para elucidar la herencia del contenido de carotenos en raíces de yuca.

Se encontró un alto grado de asociación entre el contenido de carotenos y el color de la raíz de 0.74 con un  $R^2$  de 0.89, lo que significa que el 89% de la variabilidad observada en el contenido de carotenos, puede ser explicada por la variabilidad en el color del parénquima, en donde cada incremento en la intensidad del color representa un incremento proporcional en la concentración de carotenos. Estos resultados coinciden con los encontrados en los realizados por diferentes investigadores, con diferentes poblaciones y en diferentes épocas, (Iglesias (1997); Boiteux y Carvallo (2001); Bolaños (2006); Chávez *et al* (2000-2005), Marin (2001,2008), Morillo Y. (2009)).

A demás también se logro determinar que hay una gran variación para el contenido de caroteno en las raíces de yuca dentro de cada intensidad de color, ya que clones que presentaron alta intensidad de color tuvieron bajos contenidos, esto atípico, y se puede explicar por el hecho de que estas raíces pueden presentar otros pigmentos diferentes a los carotenos en mayor proporción. El

cultivo de la yuca ha mostrado amplio patrón de segregación del contenido de carotenoides brindando así la oportunidad de seleccionar los mejores genotipos y poder en última instancia suplir las deficiencias en aquellas regiones en donde es ampliamente cultivada y ampliamente consumida.

Teniendo en cuenta los análisis de segregación del contenido de carotenos totales de las familias F1 se propuso una primera hipótesis sobre la herencia del contenido de carotenos en las raíces de yuca. La hipótesis que se planteó fue que podrían ser dos loci recesivos los que determinen la mayor parte de la variación observada. La herencia recesiva para el contenido de carotenos en las raíces de yuca, sorprendente porque para otros cultivos la herencia esta relacionada con el efecto producido por genes en estado dominante. Sin embargo se sugiere que el color de raíz y el contenido de carotenos deben ser de herencia más compleja, en donde se consideren factores genéticos que estén controlando el transporte del producto de precursores para la raíz, y otros responsables de los procesos de acumulación así como los diferentes tipos de interacciones que se pueden presentar entre ellos.

## 1.4 BIBLIOGRAFÍAS

- 1- BEDOYA, J.M. 1999. Determinación del potencial genético con respecto al contenido de Pro-vitamina A y vitamina C en la colección núcleo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), de CIAT. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.
- 2- BOITEUX M. F. y CARVALHO L. B. 2001 Biochemical Diversity of Carotenoids Accumulation in Cassava Storage Root, en: Cassava Biotechnology Network St Louis Missouri.
- 3- BOLAÑOS E.A. 2001. Caracterización de la diversidad genética en cuanto a contenido de carotenos de raíces y hojas de 682 genotipos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de la colección de CIAT y de 411 genotipos en cuanto a minerales. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.
- 4- BOLAÑOS E.A. 2006. Caracterización de la diversidad genética en cuanto a contenido de carotenos de raíces y hojas de 682 genotipos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de la colección de CIAT y de 411 genotipos en cuanto a minerales. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.
- 5- BOUVIER F, SUIRE C, MUTTERER J, CAMARA B (2003) Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD y CsZCD genes involved in crocus secondary metabolite biogenesis. Plant Cell 15:47– 62.

6- CHÁVEZ, A.L., BEDOYA, A.J., SÁNCHEZ, T., IGLESIAS, C., CEBALLOS, H., y ROCA, W. 2000. Iron, carotene y ascorbic acid in cassava roots y leaves. *Food y Nutrition Bulletin* 21(4): 410-413.

7- CHÁVEZ, A.L., SÁNCHEZ, T., JARAMILLO, G., BEDOYA, J.M., BOLAÑOS, E.A., CEBALLOS, H y IGLESIAS, C. A. 2005. Variation of quality traits in cassava roots evaluated in lyraces y improved clones. *Euphytica* 143: 125-133.

8- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 2005. Project IP3, Improved cassava for the developing World. *Annual Report. 2003*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.

9- DEMMIG-ADAMS B, ADAMS WW III (2002) Antioxidants in photosynthesis y human nutrition. *Science* 298:2149–2153.

10- ECHEVERRI, J. 2001. Determinación del potencial genético en hojas y raíces de 500 genotipos con respecto al contenido de pro-vitamina A y vitamina C; y de 397 en cuanto al contenido de pro-vitamina A en raíces del Banco de Germoplasma de Yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de CIAT. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

11- FESTER T, HAUSE B, SCHMIDT D, HALFMANN K, SCHMIDT J, WRAY V, HAUSE G, STRACK D (2002) Occurrence y localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. *Plant Cell Physiol* 43:256–265.

12- GIOVANNUCCI E (2002) Lycopene y prostate cancer risk. Methodological considerations in the epidemiologic literature. *Pure Appl Chem* 74:1427–1434.

13-GIULIANO G, AL-BABILI S, VON LINTIG J (2003) Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. *Trends Plant Sci* 8:145–149.

- 14- HERSHEY, C.H y AMAYA, A. 1983. Genética, citogenética, estructura floral y técnicas de hibridación de la yuca. En: Domínguez, C.E (ed). Yuca: Investigación, producción y utilización. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 113-126 p.
- 15- HERSHEY, C.H. y OCAMPO, C. 1989. Description of new genetic markers in Cassava. *Cassava Newsletter*. 13: 1-5.
- 16- <http://www.astaxanthin.org/carotenoides.htm>. Junio.2005.
- 17- <http://www.waters.com/waterdivisión/pdf/lc3YMC.pdf>
- 18- IGLESIAS, C., MAYER, J., CHAVEZ, A.L., CALLE, F. 1997. Genetic potential y stability of carotene content in cassava roots. *Euphytica* 94: 367-373.
- 19- ISLER, 1981, Carotenoids as Colorants y Vitamin A Precursors, .In: J.C. Bauernfeind, Editor, .Academic Press, New Andork (1981), p. xiii.
- 20- JOS, J.S., NAIR, S.G., MOORTHY, S.N y NAIR, R.B. 1990. Carotene enhancement in cassava. *J Root Crops*. 16: 5-11 p.
- 21- KENKEL, J. 1992. Analytical Chemistry refresher manual. Chelsea, Lewis Publishers. 358 p.
- 22- MARES-PERLMAN. 2002. The Body of Evidence to Support a Protective Role for Lutein y Zeaxanthin in Delaying Chronic Disease. *J. Nutr.* 2002; 132:518S-524.
- 23- MARIN J. A. 2002. Mapeo genético y análisis asistido por marcadores “microsatélites” de la genética del rendimiento en una población F2 de yuca (*Manihot sculenta* Crantz). Universidad del Tolima, Facultad de Ciencias, programa de biología. Tesis de Pregrado.

- 24- MARIN J.A. 2008. Carotenos en Yuca: Mapeo Genético y Análisis De QTLs en una población S1 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias, Área mejoramiento genético de plantas.
- 25- MERCADANTE, A.Z y RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 1989. Comparison of normal-phase y reversed-phase gravity-flow column methods for provitamin A determination. *Chromatographia*. 28: 249-252.
- 26- MERCADANTE, A.Z y RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 1991. Performance of thin-layer chromatography versus HPLC in the screening of carotenoids. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 11: 200-209.
- 27- MILLBORROW BV (2001) The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J Exper Bot* 52:1145– 1164.
- 28- MOORTHY, S.N., JOS, J.S., NAIR, R.B y SCREEKUMARI, M.T. 1990. Variability of  $\beta$ -carotene content in cassava germplasm. *Food Chemistry* 36: 233-236.
- 29- MORILLO, Y. 2009. Herencia del contenido de carotenos en raíces de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Datos sin publicar.
- 30- OLSEN JA (1989) Provitamin A function of carotenoids. *J Nat* 119:105–108.
- 31- OLSON JA.1999. Carotenoids y human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 1999; 49(1-S): 7-11.

- 32- ORTEGA-FLORES, C.I., 1991. Carotenóides com atividade próvitamínica A e teores de cianeto em diferentes cultivares de myioca no Estado de Sao Paulo. (Carotenes with pro-vitamin A activity y levels of cyanide in different cultivars from the State of Sao Paulo). M.S. Thesis. Universidade de Sao Paulo. Sao Paulo, Brazil. 77 p.
- 33- PEPPING, F., M.J. VENCKEN y C.E. WEST. 1988. Retinol y Carotene content of foods consumed in East Africa determined by Alto Performance Liquid Chromatography. *Journal of the Science of Food y Agriculture*. 45 (4): 359-371.
- 34- RODRIGUEZ - AMAYA, D.B. 1989. Critical review of provitamin A determination in plants foods. *Journal of micronutrient analysis*. 5: 191-225 p.
- 35- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1993a. "Nature y distribution of carotenoids in foods." In *Shelf-Life Studies of Foods y Beverages. Chemical, Biological, Physical y Nutritional Aspects*. Ed. by G. Charalambous. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 547-589.
- 36- ———. 1993b. "Stability of carotenoids during the storage of foods." In *Shelf Life Studies of Foods y Beverages. Chemical, Biological, Physical y Nutritional Aspects*. Ed. by G. Charalambous. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 591-628.
- 37- SAFO-KATANGA, O., ABOAGYE, P., AMARTEY, S.A y OLDHAM, J.H. 1983. Studies on the nutrient content of yellow-pigmented Cassava. In: *Proceedings of the second triennial symposium of the international society for tropical roots crops*. August 14-19. Dovala, Camerón. International Development Research Centre. 103-104.



38- -----1984. Studies on the content of yellow-pigmed scassava. In: Terry, E.R. et al. (eds). *Tropical Roots crops production y Uses in Africa*. IDRC, Ottawa, Canada. pp.103-104.

39- SAS. Institute Inc. 2005. SASA OnlineDoc® 9.13. Cary, NC: SAS Institute Inc; Available in <http://support.sas.com/onlinedoc/913/docMainpage.jsp>.

40- SIMPSON, K. L. 1983. Relative Value of Carotenoids as Precursors of Vitamin A. In: *Proc. Nutr. Soc.* 42:7-17.

41- SIMPSON, K.L. Y TSOU, S.C.S., 1986. Vitamin A y provitamin composition of foods. In: Bauernfeind, J.C. Editor, 1986. *Vitamin A deficiency y its control* Academic Press, New Andork, pp. 461–478.

42- SNODDERLY, D.M. (1995) Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids y antioxidant vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62(suppl):1448S-1461S.

43- WILLS, R.B, WONG, .W.K SCRIVEN. F.M. y GREENFIELD, H. Nutrient composition of Chinese vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 32 (1984), pp. 413–416

**PARTE II**

**EVALUACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES MEDIANTE EL  
ANÁLISIS DE GRUPOS SEGREGANTES (BSA) PARA EL CONTENIDO DE  
CAROTENOS EN LAS RAÍCES DE YUCA.**

## INTRODUCCIÓN

Avances significativos en el campo de la bioquímica, la genética, la fisiología y la biología molecular, entre otras ramas del conocimiento, han permitido elucidar los diferentes procesos y reacciones que ocurren en los diferentes organismos y que conducen a la formación de una gama muy variada de carotenoides de importancia biológica como nutricional ( $\beta$ -caroteno). Así la síntesis de los carotenoides es un proceso metabólico crucial para el entendimiento de la biología molecular de la carotenogénesis (Cunningham y Gantt, 1998), sin embargo hace falta comprender las señales y los mecanismos que dirigen la regulación espacial y temporal de esta ruta biosintética.

En este sentido los primeros estudios que se realizaron estuvieron encaminados hacia el estudio de la ruta biosintética de los carotenoides la cual fue elucidada entre 1950 y 1960 usando aproximaciones bioquímicas clásicas, con inhibidores específicos y mutantes bloqueados en ciertos pasos en la ruta (Figura 2.1) (Cunningham, 2002). La primera reacción específica de la ruta es la condensación cabeza-cabeza de dos moléculas de *trans* de GGPP (*Geranyl-geranylpirofosfato*) para formar fitoeno. Todas las reacciones subsecuentes involucran la conversión de esta estructura básica (Cunningham y Gantt, 1998).

La reacción de síntesis de fitoeno está catalizada por la enzima *Fitoeno sintasa*, la cual sufre una serie de cuatro reacciones de desaturación, hasta formar licopeno. Esas desaturaciones sirven para alargar las series conjugadas de enlaces carbono-carbono que constituyen el cromóforo en los pigmentos carotenoides (Fraser y Bramley, 2004). Estas desaturaciones son catalizadas por las enzimas

Fitoeno desaturasa (PDS) y Z-Caroteno desaturasa (ZDS) (Shaub *et al.*, 2005). En las plantas producen una forma *cis* de licopeno, produciendo pro-licopeno el cual debe ser isomerizado a la forma *trans*-licopeno por la isomerasa, CRTISO (Isaacson *et al.*, 2002).

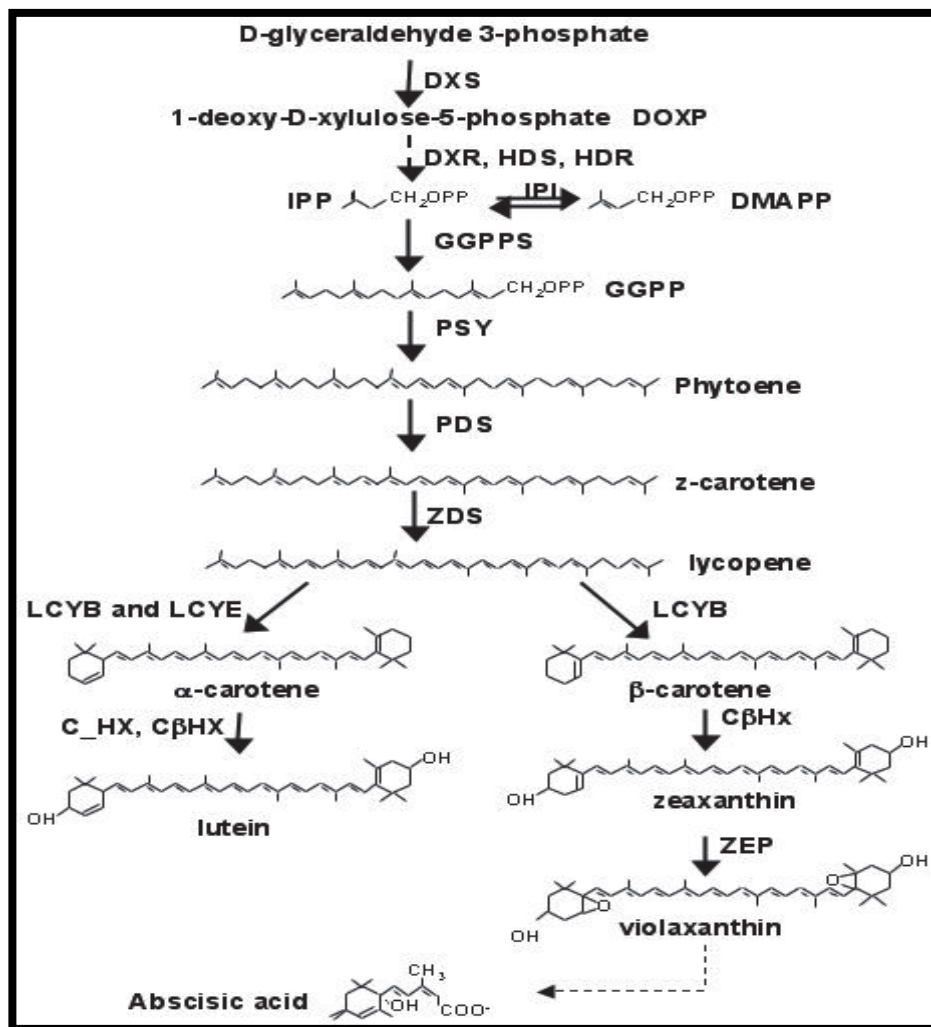
Los carotenoides en el aparato fotosintético de las plantas son componentes bicíclicos (Cunningham y Grantte, 1998). En esta reacción de ciclización de licopeno, se forman dos tipos de anillos, los anillos beta como un grupo final a ambos lados del  $\beta$ -caroteno y los anillos con  $\alpha$ -caroteno. Estos anillos difieren únicamente en la posición del doble enlace en el anillo (Cunningham, 2002).

Un solo producto génico, la Licopeno  $\beta$ -ciclasa (LCY- $\beta$ ) cataliza la formación del  $\beta$ -caroteno (Fraser y Bramley, 2004) y de un anillo de  $\alpha$ -caroteno a partir de licopeno. (Cunningham, 2002). A partir de  $\alpha$ -caroteno ó  $\beta$ -caroteno se forman los carotenoides oxigenados (xantofilas), los cuales comprenden la mayoría de los pigmentos en la membrana del tilacoide en plantas (Cunningham, 2002).

Los genes y las enzimas involucradas en la biosíntesis de los pigmentos carotenoides han sido ampliamente estudiados (Bartley y Scolnik 1995; Cunningham y Gantt 1998; Hirschberg 2001) y la ruta de los carotenoides es altamente conservada en plantas y bacterias fotosintéticas aunque muy pocas especies de plantas acumulan niveles detectables en las raíces. Recientemente dos enzimas adicionales involucradas en la biosíntesis de los carotenoides fueron identificadas. (Tian *et al.*, 2004 a,b ; Isaacson *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002). Un esquema simplificado de la ruta de los carotenoides y los correspondientes genes y enzimas se muestra en la figura 2.1.

Estudios de manipulación transgénica de la ruta, mutantes naturales o inducidos, silenciamiento de genes, mapeo de loci con características cuantitativas (QTL) en algunas plantas como zanahoria (Hauptmann *et al.*, 1997) tomate (Fraser *et al.*,

2002; Romer *et al.*,2000), canola (Ravanello *et al.*, 2003), papa (Romer *et al.*, 2002; Decreux *et al.*,2004), tabaco (Bush *et al.*, 2002; Mann *et al.*, 2000), arroz (Ye *et al.*, 2000; Paine *et al.*, 2005) y Arabidopsis (Lindaren *et al.*, 2003; Stalberg *et al.*,2003) entre otras, han permitido descifrar la ruta y su control, brindando así oportunidades directas para la manipulación del tipo y las cantidades de esos componentes nutricionalmente importantes.



**Figura 2.10.** Representación esquemática de la biosíntesis de los carotenoides en plantas. El isopentil pirofosfato (IPP) es sintetizado en plastidios a través del non-mevalonato route, y comienza con la síntesis de DOXP por DOXP sintasa (DXS).

Las otras enzimas que participan en la biosíntesis de carotenoides y ácido abscísico son: isopentil pirofosfato sintasa (IPI), geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS), fitoeno sintasa (PSY), fitoeno desaturasa (PDS), z-caroteno desaturasa (ZDS), caroteno isomerasa (CRTISO), licopeno  $\epsilon$ - ciclasa (LCYE), licopeno  $\beta$ - ciclasa (LCYB),  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (C $\beta$ Hx),  $\epsilon$ -caroteno hidroxilasa (C $\epsilon$ Hx) y zeaxantina epoxidasa (ZEP). El nombre y la estructura de los carotenos sintetizados y xantofilas están incluidos (Cunningham, 2002).

La elucidación de la ruta biosintética de los carotenoides y los enormes progresos en la clonación de genes proporcionaron las herramientas necesarias para encaminarse en la ingeniería metabólica de la ruta (Tucker, 2003; Fraser y Bramley 2004). Esto ha dado lugar a plantas transgénicas estables con mejor calidad nutricional, con un incremento en su habilidad para la síntesis de carotenoides de alto valor y una mejor tolerancia a estreses abióticos. La mayoría de las manipulaciones se han concentrado en la ruta con el objetivo de incrementar el contenido de licopeno y  $\beta$ -caroteno. Se cuentan con varios estudios de sobre-expresión constitutiva (Fray *et al.*, 1995; Busch *et al.*, 2002) enfocados en la fitoeno sintasa (PSY) y ha dado lugar a varios efectos pleiotrópicos y/o de co-supresión no deseados. Estas investigaciones también revelaron la existencia de un equilibrio en los precursores y una intrincada interacción entre los diferentes isoprenoides que forman la ruta (Laule *et al.*, 2003).

En la última década, la investigación en carotenoides ha sido predominantemente enfocada en la ruta biosintética de estos compuestos. El éxito en el aislamiento en los genes biosintéticos, identificación de los productos/intermediarios de la ruta y la manipulación de las etapas claves de esta son los principales logros. Sin embargo, la generación de plantas transgénicas y mutantes frecuentemente resultan en efectos fisiológicos, moleculares y bioquímicos, lo cual presumiblemente refleja nuestro pobre entendimiento de los aspectos regulatorios asociados con la síntesis de carotenoides. La explotación de los recursos

genéticos generados y la aplicación de modernas técnicas de genómica y post-genómica podrían considerablemente mejorar nuestro conocimiento acerca de los productos de los genes y los procesos fisiológicos que indirectamente regulan y afectan la formación de los carotenoides valiéndose de las ventajas de los organismos genéticamente modificados y no modificados, para calidad nutricional de los cultivos alimenticios sin descuidar su adaptación ambiental.

Metodologías como el Análisis de Grupos Segregantes (Bulked Segregant Analysis o BSA) pueden ser también empleadas para estudiar la genética de los pigmentos carotenoides. Esta técnica fue desarrollada por Michelmore *et al.* (1991) con RAPDs en lechuga (*Lactuca* spp.) y ha sido utilizada para la identificación de marcadores moleculares ligados a un carácter monogénico, dominante o recesivo. El método consiste en comparar 2 grupos de muestras de ADN de individuos pertenecientes a una población segregante. En cada grupo fenotípico los individuos son idénticos para un carácter o gen de interés pero no para otros genes. Dos grupos contrastantes para un carácter, por ejemplo, resistencia o susceptibilidad a una enfermedad en particular, son analizadas para identificar marcadores que los caractericen. Los marcadores ligados al locus que determina el carácter de interés son polimórficos, mientras que el resto de las bandas son monomórficas (Peleman 1999, Li *et al.* 2000).

En yuca (*Manihot esculenta* Crantz) la técnica del Análisis de Grupos Segregantes o BSA ha sido utilizada para la identificación de marcadores RAPDs, ligados a genes de resistencia a antracnosis (Akinbo *et al.*, 2007). Akano *et al.*, (2002) usó BSA en “landraces” para identificar marcadores microsatélites o SSRs, ligados a otro gen de resistencia al mosaico de la yuca (Cassava Mosaic Disease, CMD), designado como *CMD2*. También ha sido usada para la identificación de marcadores moleculares asociados con la resistencia a plagas como el Acaro verde (*Mononychellus tanajoa*) (Macea, 2007) y el mapeo de características de importancia económica, como deterioro fisiológico, contenido de  $\beta$ -caroteno y de

proteína entre otros. Todos estos estudios han permitido identificación de regiones genómicas asociadas a características de interés lo cual resulta en un valioso aporte al programa de mejoramiento genético de la yuca (Fregene *et al.*, 2001).

Los marcadores microsatélites, son ahora los marcadores seleccionados en muchas áreas de genética molecular ya que ellos son altamente polimórficos igualmente entre líneas estrechamente relacionadas, la técnica requiere baja cantidad de ADN, puede ser fácilmente automatizada, es reproducible entre laboratorios y altamente transferible entre poblaciones (Gupta *et al.*, 1999). Por ejemplo, un total de 18.828 secuencias de microsatélites, han sido detectadas en el genoma de arroz (The Rice Genome Mapping project, 2005), de las cuales solamente 10 -15% han sido ya usadas, sugiriendo el alto potencial disponible para tales sistemas marcadores. Los microsatélites, son marcadores codominantes y son excelentes para estudios de genética de poblaciones y mapeo genético (Jarne y Lagoda, 1996; Goldstein y Schlotterer, 1999).

Los SSRs 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 un 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).



Por otra parte, se han desarrollado, mapas de ligamiento para la identificación de genes en rutas biosintéticas de carotenoides, en varias especies que pueden ser usados para localizar genes conocidos de una ruta dentro de una región genómica específica (Thorup *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2001). Estos “marcadores funcionales” representan variantes alélicas de genes con una función bioquímica conocida, siendo por lo tanto, útil en el aislamiento de genes candidatos que controlan una características potencialmente relacionada a una ruta específica (Pflieger *et al.*, 2001; Varshney *et al.*, 2005).

Las técnicas de mapeo genético y el análisis de ligamiento fueron desarrollados en 1911 por D.H Morgan y su estudiante Alfred H. Sturtevant y que todavía hoy son usadas de la misma manera pero con técnicas mucho más avanzadas. La base del mapeo genómico es el fenómeno de “crossing-over” de los cromosomas durante la meiosis, donde los cromosomas homólogos intercambian secciones de su secuencia de genes. La tendencia de dos genes para recombinarse es usada como una medida de su ligamiento y de distancia en un mapa genético. Por ejemplo dos genes recombinan más fácilmente cuando se encuentran más lejos dentro del mapa genético y cuando raramente recombinan se dice que están “ligados” y están muy juntos en el mapa genético. Los mapas de ligamiento genético proporcionan un método directo para seleccionar genes vía marcadores fácilmente detectables, una guía para los experimentos de secuenciación mostrando las posiciones de los genes y otras características de las secuencias.

El primer mapa genético construido en un organismo fue en las moscas de las frutas *Drosophila melanogaster*, en la cual se usaron genes que especifican distintos fenotipos tales como color de los ojos y forma del ala como marcadores (Sturtevant, 1931). En plantas los mapas genéticos de algunas especies cultivadas tales como el maíz y el tomate fueron entre los primeros mapas de ligamiento genético construidos (Emerson *et al.*, 1935; MacAurthur, 1934), estos se basaron

en marcadores morfológicos tales como enanismo, albinismo y morfología de la hoja. El primer mapa de ligamiento genético basado en marcadores de ADN en plantas fue en *Brassica*, a finales de 1988 y principios de 1990. Este fue principalmente basado en marcadores RFLP, el cual permitió la rápida construcción de los mapas de ligamiento en muchas especies de plantas y la localización de los genes que controlan características cuantitativas en estos mapas.

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

Los análisis realizados para la construcción de mapas de ligamiento usan los datos obtenidos desde una población segregante para estimar las frecuencias de recombinación que posteriormente son usadas para determinar el arreglo lineal de los marcadores genéticos, minimizando los eventos de recombinación. El porcentaje de recombinación está dado por los eventos de entrecruzamiento que se puedan presentar después del proceso meiótico cuando se forman quiasmas entre dos loci; los eventos de cruzamiento sencillo no son independientes por cuanto siempre existe interferencia asociada al organismo en cuestión, la localización del cruzamiento, factores ambientales y otros numerosos factores que son considerados por la función de mapeo desarrollada por Kosambi (1944).

En especies diploide, la mayor parte de los gametos están en acoplamiento esto será con dos alelos dominantes o dos alelos recesivos. Para los cruces en fase de repulsión, los gametos contienen un alelo dominante y uno recesivo. Por lo tanto el fundamento del mapeo genético reside en la relación directa entre la frecuencia de recombinación y la distancia física entre los loci. Es así como determinando la

frecuencia de recombinación entre dos genes, uno puede estimar la distancia de mapa entre los mismos, siendo la unidad de mapeo equivalente a una frecuencia de recombinación del 1%.

Mientras los genes localizados en cromosomas diferentes segregan independientemente (no ligados) y tienen una frecuencia de recombinación de 50%, genes ligados tienen una frecuencia de recombinación menor del 50% (Hartl, 1988). La probabilidad de que un entrecruzamiento produzca recombinación entre genes esta directamente relacionado con la distancia entre los dos genes-la más baja frecuencia de recombinación entre dos marcadores, cuanto mas cerca esten ubicados en el cromosoma (por el contrario, la más alta frecuencia de recombinación entre dos marcadores, cuando están lo más alejados en el cromosoma).

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

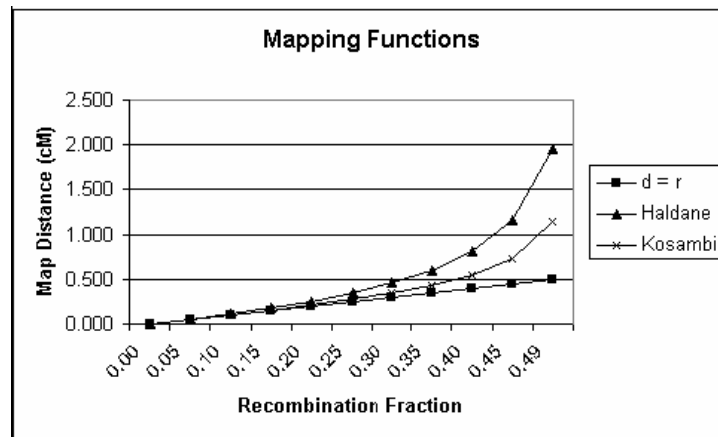
La construcción de mapas de ligamiento molecular requiere el uso de procedimientos estadísticos diseñados para elegir valores de variables que maximizan una función definida y permiten incluir clases ambiguas (dobles heterocigotos -AaBb- en una población F2 contienen tipos recombinantes y no recombinantes), por esa razón se estima la máxima verosimilitud (maximum likelihood), procedimiento que permite obtener la máxima posibilidad de que los marcadores estén ligados, se basa en el orden de los marcadores que producen la distancia mas corta y a su vez que tengan la probabilidad más baja de que se realicen múltiples recombinaciones, y cuya expresión es maximizada mediante el

uso de la frecuencia de recombinación ( $r$ ), valor que se encuentra limitado entre 0-0.5 (Staub *et al.*, 1996, Young, 1994).

El valor de LOD (Logarithm of Odd Distance) explica el logaritmo (10) de la razón entre dos hipótesis, un valor de  $LOD > 4,0$  es equivalente a decir que es 10000 veces más probable que dos marcadores estén ligados a que no lo estén. El LOD disminuye cuando el valor  $r$  incrementa e incrementa con el incremento en el tamaño de muestra (Staub *et al.*, 1996, Young, 1994). El investigador debe determinar un valor del umbral de LOD bajo el cual el ligamiento no es considerado significativo (Churchill y Doerge, 1994). Cuando el umbral del LOD es alcanzado, muy pocos marcadores son asignados a los grupos de ligamiento (loci independientes) y grupos de ligamiento más pequeños son identificados. Comparación de mapas creados a partir de una serie de valores de LOD frecuentemente permiten al investigador determinar la estabilidad de grupos de ligamiento putativos. Es claro que algún mapa solamente se aproxima a la realidad y que la distancia mapa entre los marcadores cambiará cuando nueva información (por ejemplo, marcadores) llegue a estar disponible.

La distancia entre dos genes es determinada por su fracción de recombinación la cual usualmente se expresa en términos de centiMorgans (cM). Un Morgan es la distancia sobre la cual, un entrecruzamiento ocurre por meiosis. Cuando consideramos el mapeo de más de dos puntos en el mapa genético, esto resultaría más práctico si las distancias en el mapa fueran aditivas. La interferencia es el efecto en el cual la ocurrencia de un entrecruzamiento en una cierta región reduce la probabilidad de un entrecruzamiento en una región adyacente. Una función de mapeo da la relación entre la distancia entre dos localizaciones cromosómicas en el mapa genético (en cM) y su frecuencia de recombinación.

Las diferentes funciones de mapeo están representadas en la figura 10. Por debajo de 15cM hay pequeñas diferencias entre las diferentes funciones de mapeo y seguramente se puede asumir que  $d=c$ . (Figura 2.2).



**Figura 2.2** Representación de las funciones de mapeo de Haldane y Kosambi.

Los análisis de ligamiento y el mapeo son computarizados. Varios paquetes de computador están disponibles para el mapeo del ligamiento genético pero los más ampliamente usados son JoinMap (Stam, 1993a), MAPMAKER/EXP (Lyer *et al.*, 1987), GMENDEL (Echt *et al.*, 1992), LINKAGE (Suiter *et al.*, 1983), y Map Manager QTX (Manly *et al.*, 2001). Los principios básicos en la construcción del mapa son básicamente los mismos para los diferentes programas estadísticos.

Para la construcción de mapas genéticos el programa más utilizado es el MAPMAKER, en el cual una serie de comandos como el "sequence" sirven para establecer los grupos de ligamiento entre los loci considerados, el "group" que divide los marcadores en las secuencias dentro de los grupos de ligamiento y finalmente para determinar si dos marcadores cualesquiera están ligados, el programa, calcula la distancia de máximo ligamiento y los valores de LOD correspondientes entre los dos marcadores: Si el valor de LOD es más grande que algún threshold y si la distancia es menos que cualquier otro threshold, luego los

marcadores serán considerados ligados. Por default, los valores LOD threshold es 3.0 y la distancia threshold es 80 Haldane cM. Para encontrar los grupos de ligamiento, el programa considera el ligamiento transitivo. Esto es, si el marcador A está ligado al marcador B, y si B está ligado a C, luego A, B y C serán incluidas en el mismo grupo.

Para determinar el orden más probable de los marcadores dentro de un grupo de ligamiento, el MAPMAKER, calcula la máxima probabilidad de ligamiento del mapa (por ejemplo, las distancias entre todos los marcadores y un dato dado) y las correspondientes probabilidades

En yuca los trabajos de mapeo se iniciaron con las investigaciones de Angel *et al.*, (1993), quienes utilizaron varias accesiones de yuca y sus parientes silvestres mediante análisis de marcadores RFLPs y RAPDs, se concluyó que el uso combinado de estos marcadores permitiría la construcción de un mapa detallado de yuca y posteriormente a esto, el primer mapa de ligamiento de yuca fue desarrollado y publicado por Fregene *et al.*, (1997).

El primer mapa molecular fue construido a partir de la segregación de 132 RFLPs, 30 RAPDs, 3 SSRs, y 3 marcadores isoenzimáticos, utilizando una población F1 obtenida mediante el cruce de dos parentales elite “TMS 30572 y CM2177-2” procedentes de Nigeria y Colombia, respectivamente. El mapa obtenido consta de 20 grupos de ligamiento que cubren 931.6 cM del genoma de la yuca o un estimado de 60% del genoma (Fregene *et al.*, 1997). Este estudio adicionalmente permitió el diseño de marcadores, análisis de ligamiento y comprensión de la organización del genoma.

Posteriores trabajos se encaminaron hacia la saturación del mapa, entre ellos encontramos los de Chavarriaga *et al.*, (1998) quienes lograron el aislamiento y caracterización de 14 microsatélites que amplifican secuencias repetitivas de tipo

GA; posteriormente, se desarrollaron 172 marcadores de tipo SSR a partir de librerías genómicas (Mba *et al.*, 2001). Finalmente se llegó a un mapa que consiste de 239 RFLPs, 80 RAPDs, 7 SSR, 6 ESTs, 3 isoenzimas y 5 genes desconocidos, y según estimaciones parece estar saturado en un 80%. Posteriores trabajos han contribuido hacia una mayor saturación del mapa, la búsqueda de QTLs y la construcción de nuevos mapas usando familias F<sub>2</sub> (Zárate, 2002; Marín, 2002) para características de importancia económica como deterioro fisiológico (Rosero, 2008., Cuambe, 2007) y contenido de carotenos (Marín, 2008).

Un mapa genético permite analizar las regiones cromosómicas donde pueden ubicarse genes responsables de una determinada característica y en su caso identificarlos. Esto permite a los investigadores reducir a unos miles o centenares de miles de pares de bases la zona de análisis. La construcción de estos mapas permite una primera fase para identificar marcadores moleculares (fragmentos de ADN) asociados a un gen de interés. Si la distancia que separa en el cromosoma a estos marcadores del gen que buscamos es pequeña (baja probabilidad de recombinación) podemos emplear el análisis de estas regiones de ADN para identificar aquellos individuos que con mayor probabilidad sean portadores de una determinada forma (alelo) del gen responsable del carácter estudiado.

El desarrollo de un mapa genético de alta resolución, con marcadores moleculares distribuidos de forma regular y a corta distancia unos de otros en todos los cromosomas, es el objetivo a corto plazo más importante en estos proyectos de cartografía genética. Se calcula que con unos 1000 marcadores polimórficos, uniformemente distribuidos por todo el genoma se alcanzarían probabilidades significativas de detectar asociaciones con un gen objeto de estudio. El mapeo genético provee un medio directo para estudiar un número de genes influenciando un carácter, la localización de estos genes a lo largo del cromosoma, y el efecto de la variación en dosis de estos genes. Provee la información necesaria para implementar el mejoramiento asistido por marcadores de ADN. Usando mapas

genéticos, se puede evaluar la correspondencia de genes que está regulando el fenotipo en diferentes poblaciones o diferentes taxas. Marcadores de ADN en el mapa genético proveen de un punto de inicio para la localización y el marcaje de genes agronómicamente importantes y de genes de interés, incluyendo genes mayores y caracteres cuantitativos resultantes de la interacción de genes menores. Por ejemplo, un número de genes agronómicamente importante de QTLs en arroz han sido desarrollados. Tal es el caso de genes para la resistencia al añublo, resistencia a bacteriosis, resistencia a insectos, sensibilidad al fotoperíodo han sido marcados con RFLP.

La construcción de un mapa genético genera información básica sobre la estructura y organización de un genoma tal como reordenamientos cromosómicos (inversiones, translocaciones, duplicaciones) e identificación de regiones con alta densidad de genes. Por otro lado un mapa genético constituye el punto de partida para proyectos de clonado posicional de genes. Los mapas no solo son de ayuda en la selección en Mejoramiento. Son una herramienta fundamental en el estudio de la herencia. El disponer del mapa genético de una especie permite, conocer su estructura genética, predecir en donde pueden estar los genes que nos interesan, obtener conocimiento de la evolución de las especies, clonación de genes mediante la estrategia conocida como clonación basada en el mapeo (map-based cloning), identificación y localización de Loci que codifican para Caracteres Cuantitavos (QTLs)

Teniendo en cuenta lo anterior los estudios de mapeo genético y análisis de QTLs son herramientas importantes en genética molecular, genética clásica y mejoramiento genético convencional. Con ayuda de los marcadores SSR se construyó el mapa genético para la característica contenido de carotenos totales (Marin, 2008) y se logró identificar regiones asociadas a loci que codifican para características cuantitativas en el genoma de yuca.



## **2.1 MATERIALES Y METODOS**

### **2.1.1 Técnicas Moleculares Aplicadas:**

Los estudios moleculares se llevaron a cabo en el Laboratorio de Genética de Yuca en CIAT, a continuación se describen las metodologías usadas:

#### **2.1.1.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN genómico se hizo siguiendo el protocolo descrito por Dellaporta (1983), modificado para miniextracción, en el laboratorio de genética de yuca del CIAT el cual se describe a continuación: Se cosecharon hojas jóvenes en cada una de las tres familias seleccionadas (GM708, GM734 y CM9816), las cuales se secaron al horno a 65 °C por 24 horas, a continuación, se maceró el tejido y se adicionó a tubos eppendorf de 1.5 ml de 1 a 2 g más 800ul de Buffer de Extracción (Anexo A) y 50ul de SDS (20%); las muestras se incubaron a 65°C por 15 min. Posteriormente se les adicionó 250 µl de Acetato de Potasio 5M frío (pH 5.2), y se mantuvieron en hielo por 20 min.

Transcurrido este tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos y al sobrenadante se le adicionó isopropanol frío y se dejó en incubación a -20°C por 1 hora, se centrifugó a 12000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante, y el pellet, se lavó con un 1 ml etanol (70%) y se centrifugó por 5-10 min a 14000 rpm. Se descartó el sobrenadante y al pellet se le adicionó 100ul de RNAsa con Buffer TE 10:1. Para evaluar la calidad del ADN obtenido se realizó una electroforésis en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con Bromuro de Etidio, los geles fueron corridos a 220 voltios durante 40 minutos luego observados y fotografiados con una cámara polaroid (Foto/U.V. 21- USA).

### **2.1.1.2 Cuantificación del ADN:**

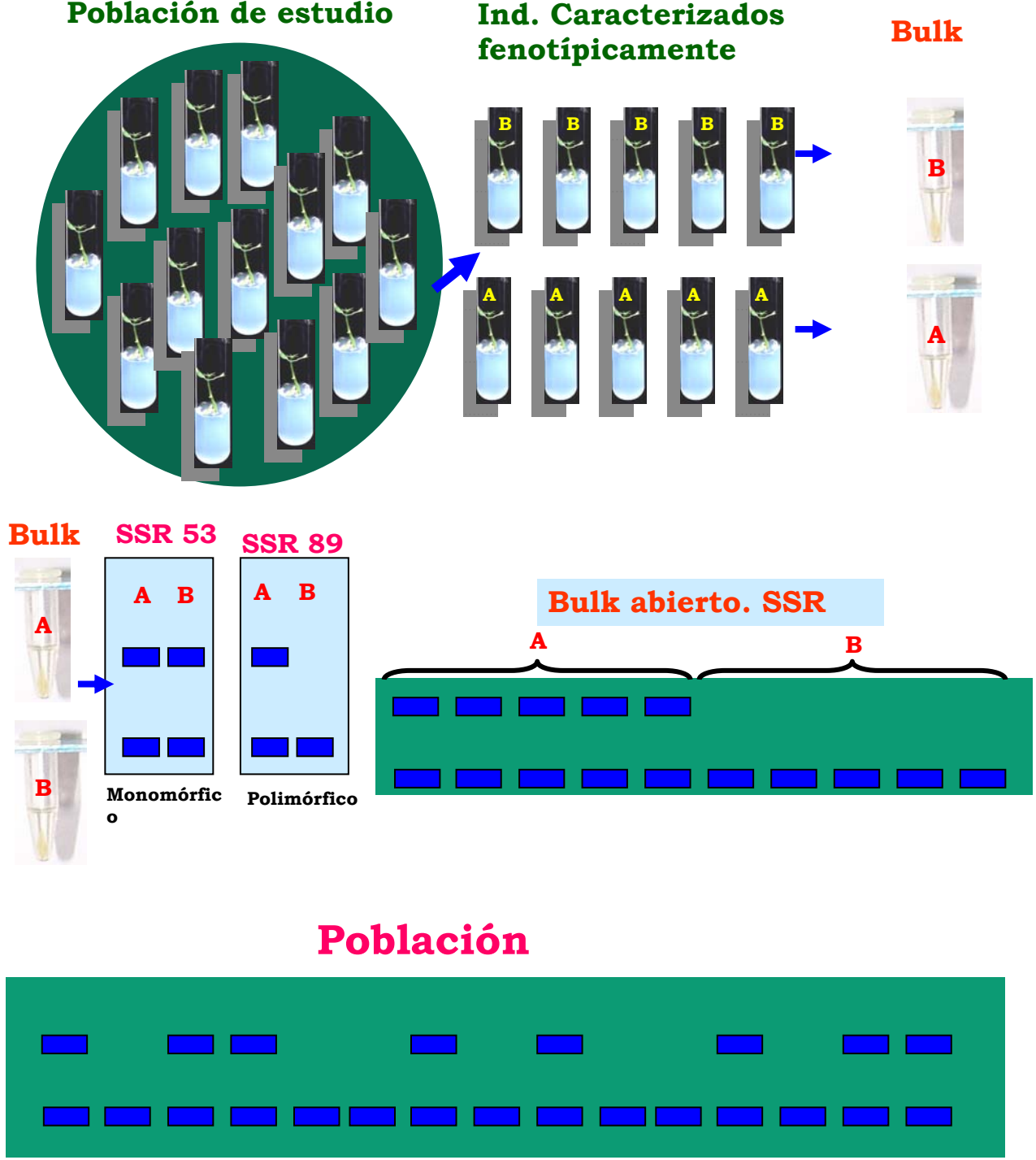
La cuantificación del ADN obtenido a partir del tejido foliar, se hizo mediante el uso de un fluorómetro de ADN modelo DYNA QUANT 200 marca Hoefer, utilizando como estándar de calibración ADN Lambda a 100 ng/  $\mu$ l. También se cuantificó en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-VIS 160<sup>a</sup>). Después de establecer la concentración de cada muestra se hizo una dilución para llevar cada ADN a una concentración final de 10 ng/ $\mu$ l.

### **2.1.1.3 Análisis de Grupos Segregantes (BSA)**

La formación de los bulks se hizo teniendo en cuenta la evaluación de la escala visual para color de las raíces que se tenía para cada uno de los materiales. Para cada familia evaluada se formaron tres grupos o Bulks, Bajo (blanco), medio (rosado) y alto (amarillo). Los 800 marcadores microsatélites, diseñados por librerías enriquecidas desarrolladas por CIAT (Mba *et al.*, 2001), y los ADNs de los bulks y los padres fueron genotipificados con SSR que se tienen para yuca de acuerdo a la metodología descrita por Mba *et al.*, (2001).

Una vez analizados los marcadores microsatélites polimórficos en los bulks se hizo una evaluación para todos los individuos que conformaban el bulk y en aquellas evaluaciones en donde el polimorfismo se mantenía en los individuos, al igual que en los bulks, se evaluaba en la familia entera. En la figura 2.3 se puede observar un esquema general de esta metodología.

# Esquema: Análisis de Bulk segregantes BSA



**Figura 11.3.** Representación esquemática de la metodología: Análisis de Grupos Segregantes o BSA. Fuente: CLAYUCA.

#### 2.1.1.4 Amplificación de los microsatélites.

Aproximadamente 800 pares de primers cuyas secuencias fueron diseñadas a partir de clones de una librería genómica enriquecida por secuencias microsatélites, en estudios realizados por Mba *et al.*, (2001), Garcia, (2002) y Zarate (2002), respectivamente, fueron amplificados vía PCR. (Anexo B).

Las temperaturas de alineamiento para los microsatélites fueron de 45 °C y 55°C, previa evaluación del programa genética de yuca. La amplificación se realizó en un termociclador MJ research PTC-100™ Programmable Thermal Controller con hot bonnet (MJ Research, Inc – USA). El cóctel para realizar las reacciones de amplificación contenía, Búffer 10X (15 ul), MgCl<sub>2</sub> 25 mM (2.0), dNTPs 200 uM (1.0 ul), Primer F 0.2 uM (0.5 ul), Primer R 0.2 uM (0.5 ul), Taq Polimerasa 1 unidad (0.3 ul), Agua HPLC (15 ul), ADN 10 ng/ul, (5.0 ul), para un volumen final de la reacción de 25 µl., utilizando las siguientes condiciones de amplificación (ciclo de PCR modificado de Mba *et al.*, 2001).

#### Programa de PCR

Paso 1:	94 °C	2 minutos
Paso 2:	94 °C	1 minuto
Paso 3:	45 o 55 °C	1 minuto
Paso 4:	72 °C	2 minutos
Paso 5:	Ir al paso 2 30 veces	
Paso 6:	72 °C	5 minutos
Paso 7:	14 °C	
Paso 8:	Fin	

### **2.1.1.5 Electroforesis Vertical con geles de poliacrilamida.**

Para la detección y visualización de los "Microsatélites" se hizo mediante una electroforesis de tipo vertical en geles de poliacrilamida al 4% (ver anexos), con un espesor de 0.4mm (McCouch *et al.*, 1997), preparados en un equipo de secuenciación Sequi-Gen GT Nucleic Acid Electrophoresis Inc U.S.A. Bio-Rad 2001.

Una vez armado y polimerizado el gel, se hizo una precorrida, hasta que el gel alcanzo una temperatura de 55 °C (Ver anexo C). A cada reacción de amplificación se le adicionó 7 µl de solución tampón de carga (formamida), luego se denaturó por 3 minutos a 94 °C. Posteriormente se sembró 4 µl de las muestras empleando un peine preformado de 100 pozos. El gel se corrió a 100 W/cm<sup>3</sup> durante 90 minutos. Para visualizar polimorfismo el gel se sometió al proceso de tinción con plata (Ver anexo c).

## **2.1.2 ANALISIS DE LA INFORMACIÓN**

### **2.1.2.1 Análisis de los Datos Moleculares**

#### **2.1.2.2 Registro de datos.**

La evaluación de los microsatélites polimórficos para las diferentes poblaciones segregantes de yuca, fue registrada en una matriz de datos; en donde se tiene los individuos en una fila y en otra fila la presencia del alelo segregado por parte de la madre (A) y el alelo del padre (B) y la heterocigosidad se registraba con la letra (H), para la ausencia de algunas de estas bandas o nula amplificación se representó con el símbolo ( - ) que significa dato perdido, los datos se ingresaron en una matriz en un archivo Microsoft Excel texto.

### **2.1.2.2 Mapeo de Microsatélites:**

El mapeo de microsatélites se hizo en un trabajo colaborativo con Marin (2008), en el cual se desarrolló el primer mapa genético para el contenido de carotenos y se analizó QTLs en una población S1 de yuca, compuesta por 229 individuos producto de la autofecundación de la variedad tailandesa MTAI-8, producto del cruzamiento de la variedad colombiana MCOL 1684 y la variedad Tailandesa MTAI 1, perteneciente a la familia AM320. En este estudio la segregación normal de la característica fue calculada con chi-cuadrado, para las tres diferentes clases genotípicas, obtenidas en las evaluaciones de los marcadores microsatélites en las familias seleccionadas. Los datos del polimorfismo en la progenie de los marcadores microsatélites se interpretaron de acuerdo con la información aportada por los parentales que dieron origen a cada uno de los cruzamientos, haciendo una prueba de Chi cuadrado ( $P < 0.01$ ), para asegurar que los marcadores segregaron a una razón 1:2:1 de genotipos homocigotos y heterocigotos según las proporciones esperadas.

LOD (Logaritmo decimal del Odd Ratio), es definido como el valor de probabilidad empleado para análisis de ligamiento que deriva de dos probabilidades: La primera es la probabilidad de que los datos obtenidos sean el resultado de un ligamiento con una fracción de recombinación ( $P_p$ ) y la segunda de que estos datos sean el resultado de un no ligamento ( $P_{0.5}$ ). El LOD es el logaritmo del cociente de esas dos probabilidades, un LOD= 4.0 significa que es 10000 ( $10^4$ ) veces más factible que los datos observados haya sido obtenido por un ligamiento que por eventos aleatorios (Cubero. J. *et.al.*, 1997).

Para el análisis de ligamiento genético entre marcadores se realizó a través del empleo del programa estadístico MapMaker Versión 2.0 (Lyer *et al.*, 1989), en un computador Macintosh G4 (Apple Inc, U.S.A). El programa funciona bajo el cálculo de recombinación y probabilidad de ligamiento (LOD), que luego, aplica el método de máxima probabilidad para obtener una estimación del mejor orden de los loci

en el mapa (Lyer *et al.*, 1992), haciendo un análisis de ligamiento de dos puntos o ligamiento pareado. Este programa me indica los marcadores que segregan conjuntamente por encontrarse ligados al mismo cromosoma. Mientras en otros programas el análisis de dos puntos se usa en el proceso de ordenamiento de los marcadores, aquí este es empleado en la identificación de los grupos de ligamiento, para luego ordenar los marcadores dentro de los grupos.

El orden de los marcadores se determinó escogiendo un pequeño grupo de 6 marcadores con un LOD de 4.0 y una frecuencia de recombinación máxima de 3.0, utilizando el comando “compare” el cual calcula la máxima probabilidad de cada orden posible de los marcadores y evaluando el orden correcto con el comando “Ripple”. Cuando se usa el comando “compare”, se está dando la orden al programa para que compute la máxima probabilidad de ligamiento del mapa para cada orden específico de los marcadores, y para reportar los ordenes sorteados por las probabilidades de sus mapas. Mientras el MAPMAKER examina todos los órdenes, solamente los 20 más probables son reportados (por default). Para cada uno de esos 20 órdenes, el MAPMAKER muestra la probabilidad Log de los órdenes relativo a mejor probabilidad encontrada. Las unidades de distancia en el mapa de ligamiento se calculan en centimorgans (cMs) con la función de Kosambi que asume presencia de interferencia en los eventos de recombinación (Kosambi 1944). Se utiliza el comando “Try” para incluir en los grupos de ligamiento aquellos marcadores que no fueron agrupados. Finalmente se obtiene la ubicación de los marcadores en un mapa.

## 2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.2.1 ANÁLISIS DE LOS DATOS MOLECULARES EN LAS POBLACIONES F1:

#### 2.2.1.1 Análisis de Grupos Segregantes (BSA):

El estudio el Análisis de Grupos Segregantes (BSA) permitió la selección rápida y confiable de los marcadores polimórficos al evaluar en poco tiempo, 800 marcadores microsatélites, provenientes de diferentes fuentes, unos de ADN genómico, otros cDNA y finalmente otros generados a partir de marcadores ESTs (Fregene *et al*, 1997-2001; Roa *et al*, 2000; Mba *et al*, 2001; CIAT, 2002; CIAT, 2006) (Ver anexo C), fueron evaluados, en las familias segregantes para el contenido de carotenos, GM708, GM734 y CM9816. La selección de los marcadores polimórficos se hizo teniendo en cuenta los patrones de amplificación obtenidos y por comparaciones entre parentales y bulks. En la tabla 2.1 se observa que de los 800 marcadores microsatélites 162 fueron no analizables, de los 638 restantes 352 fueron homocigotos (monomórficos) y 286 polimórficos.

**Tabla 2.1** Evaluación de los 800 marcadores microsatélites por BSA.



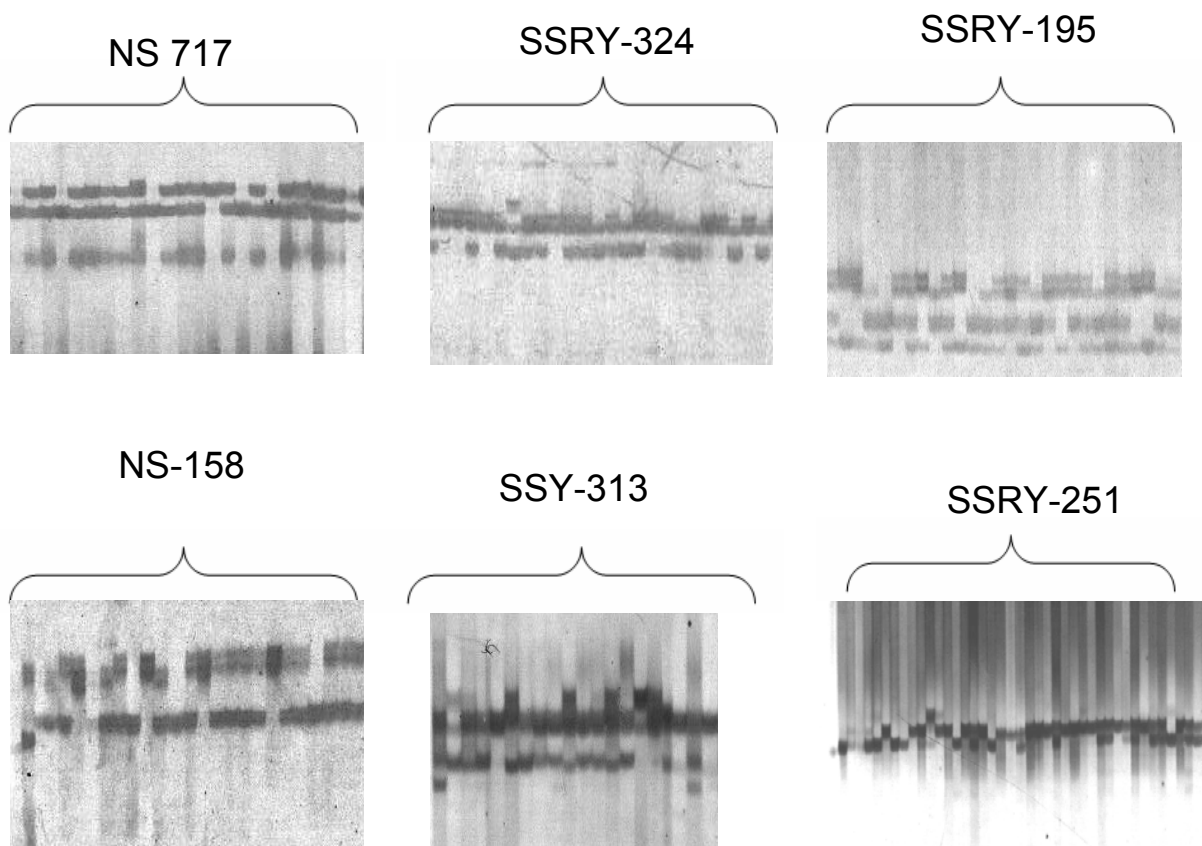
NO  
ANALIZABLES

Debido a que se encontraron un gran número de marcadores polimórficos (286) se hizo una una nueva selección basada en la información que estaba aportando



cada marcador y si se conocía su ubicación en el mapa genético molecular de yuca, así finalmente nos quedamos con un total de 140 marcadores microsátélites que serían utilizados en la elaboración del mapa para la característica y los estudios de identificación y validación de los QTLs. De la evaluación realizada con los 140 marcadores microsátélites, se obtuvo que 64 marcadores fueron polimórficos para las tres familias evaluadas, distribuidos así, veinte marcadores microsátélites mostraron polimorfismos en la familia GM708 y GM734 y veinte cuatro en la familia CM9816.

En la figura 2.4 se presentan los patrones de amplificación obtenidos en la evaluación de algunos marcadores polimórficos.



**Figura 2.4.** Patrones de amplificación obtenidos con los marcadores NS-717, SSRY-324, SSRY-195, NS-158, SSRY-313,y SSRY-251 en as familias GM708, GM734 Y CM9618.

Estos mismos 64 marcadores microsatélites polimórficos se usaron para evaluar a los individuos que conformaban cada bulk (bulk alto, bulk bajo) y en cada una de las familias seleccionadas, obteniéndose los siguientes resultados. En la familia GM708 de los 20 marcadores evaluados a nivel de los individuos pertenecientes a cada bulk 11 fueron seleccionados, porque mantuvieron su polimorfismo con valores de correlación comprendidos entre 14-40%, siendo los marcadores SSRY-313, NS-717, SSRY-251, SSRY-9 y SSRY-66, los que presentaron mayores correlaciones con el alto contenido de caroteno, por lo tanto fueron unos de los marcadores seleccionados para su evaluación con todos los individuos de la familia (62 individuos).

En la familia GM734 se encontró que de los veinte marcadores microsatélites evaluados, doce tuvieron valores de correlación con carotenos entre 16-37%, siendo los marcadores SSRY-242, SSRY-251, NS-717, SSRY-178, SSRY-313, SSRY-9, que mostraron los más altos valores de correlación con esta característica. Por otra parte, en la familia CM9816 de los 24 marcadores evaluados 10 fueron seleccionados para ser evaluados con los 40 individuos pertenecientes a ésta, con valores de correlación comprendidos entre el 20-41% con carotenos, entre éstos los marcadores SSRY-195, SSRY-313, SSRY-251, NS-158, NS-717, SSRY-9, SSRY-66 fueron los marcadores que explicaron en una gran parte la variación fenotípica observada.

En la tabla 2.2 se pueden observar los resultados obtenidos de la evaluación de los marcadores anteriormente seleccionados a nivel de todos los individuos que conformaban cada una de las familias seleccionadas. Así, en la familia GM708 se evaluaron los siete marcadores microsatélites polimórficos anteriormente identificados, compuesta por 62 individuos. Con el análisis de correlación se obtuvieron valores que fluctuaron entre 14-44%, siendo los marcadores SSRY-313 y SSRY-251 los que presentaron un mayor grado de asociación con el contenido de  $\beta$ -caroteno. Por otra parte también se pudo observar que los marcadores, NS-

717(32%), SSRY-178 (31%), SSRY 242 (28%), SSRY-9(27%) NS-267(26%) y SSRY-226(23%) mantuvieron valores altos de correlación al evaluarse en con un mayor número de individuos provenientes del cruzamiento entre MBRA-1A X MMAL-66.

Al evaluarse los doce marcadores microsatélites con los 64 individuos de la familia GM734 provenientes del cruzamiento entre MTAI-2 X CM3750-7, los valores de correlación estuvieron en un rango comprendido entre el 10-51%, siendo los marcadores SSRY-251 (51%), NS-717 (41%) ,SSRY-313 (35%) y el SSRY-242 (31%) los que mostraron un mayor grado de asociación con los altos contenido de  $\beta$ -caroteno.

Para la familia CM9816 (SM980-4 X MCOL2295) se evaluaron un total de once marcadores microsatélites destacándose los marcadores SSRY-313 (47%),NS-158 (43%), SSRY-9 (42%), SSRY-195 (42%) y NS-717 (41%) que explican en gran parte de la variación fenotípica observada en la segregación para el contenido de  $\beta$ -caroteno en los individuos evaluados.

**Tabla 2.2** Marcadores microsatélites polimórficos evaluados en las familias segregantes para el contenido de  $\beta$ -caroteno, GM708, GM734 y CM9816 con sus respectivos valores de correlación.

<b>Microsatélite</b>	<b>Fam.GM708</b>	<b>Fam.GM734</b>	<b>Fam.CM9816</b>
SSRY-313	44	35	47
SSRY-251	42	51	35
NS-717	32	41	41
SSRY-178	31	11	-
SSRY-242	28	31	30
SSRY-9	27	10	42
NS-267	26	10	-
SSRY-226	23	-	-
SSRY-66	16	27	28
SSRY-324	14	-	23
SSRY-21	-	18	-
NS53	-	17	-
NS119	-	14	-
NS267	-	10	-
SSRY195	-	-	42
SSRY330	-	-	37
NS158	-	-	43
SSRY172	-	-	33

Los valores de correlación obtenidos en las tres familias con los marcadores microsatélites evaluados se pueden considerar altos dada la naturaleza cuantitativa de la característica, contenido de  $\beta$ -carotenos, la influencia del ambiente, el control genético, entre otros factores que afectan de una u otra forma la expresión de la característica. Por otra parte ha sido ampliamente reportado en la literatura el alto polimorfismo de los marcadores microsatélites de ahí su uso en diferentes tipos de investigaciones especialmente aquellas relacionadas con el mapeo genético de características de interés (Morgante, 1993; Kresovich *et al.*, 1995; Hanley *et al.*, 2002; Liebhard *et al.*, 2002; Gonzalo *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005).

En yuca, en estudios de mapeo genético usando este tipo de marcadores se han encontrado valores de polimorfismo de 38% (Zarate, 2002), 32% (Okogbenin *et al.*, 2006) y 45% (Cuambe, 2007) y en diversidad genética se han encontrado valores de polimorfismos muy altos (Chavarriaga *et al.*, 1999; Roa *et al.*, 2000; Olsen, 2001; Fregene *et al.*, 2001; Kizito *et al.*, 2007), llegándose a encontrar incluso valores de hasta el 50% de polimorfismo lo cual es resultado de la alta heterocigocidad presente en la especie y lo cual corresponde con los valores encontrados en este estudio al evaluar marcadores microsatélites en poblaciones de yuca provenientes del cruzamiento entre individuos contrastantes en cuanto al contenido de carotenos se refiere. Lo anterior pone de manifiesto la utilidad de este tipo de marcadores en este tipo de estudio y en especies altamente heterocigotas.

Seis de estos marcadores microsatélites, el SSRY-313, SSRY242, NS-717, SSRY-251, SSRY-9 y SSRY-66, polimórficos entre las familias evaluadas (GM708, GM734 y CM9816) que están ligados con el carácter  $\beta$ -caroteno en las raíces de yuca, también han mostrado valores de correlación altos y significativo. Marin (2002) quien utilizó la variedad Tailandesa MTA18 (AM320) y utilizó el Análisis de Grupos Segregantes (BSA) con 650 marcadores microsatélites

identificó rasgos de características cuantitativas (QTLs) asociados a rendimiento y carotenos totales con estos mismos marcadores (SSRY-313, SSRY251, SSRY-66, NS717 y SSRY-9) que presentaron valores de correlación altos (40.7, 37,27.6, 24.9, 18.7% respectivamente) explicando gran parte de la variación observada para el contenido de carotenos en las raíces de yuca en una población S1.

Los resultados anteriores muestran que las fuentes que incrementan los contenidos de carotenoides pueden ser comunes pero a la vez son únicas y dependen de la fuente evaluada, por esta razón vemos marcadores microsatélites que mantienen su polimorfismo entre las distintas familias evaluadas y a la vez la presencia de loci únicos. Poniendo de manifiesto que existen efectos aditivos los que están controlando la característica contenido de carotenos en las raíces de yuca.

Estos marcadores microsatélites que están mostrando valores altos de correlación con los altos contenidos de carotenos pueden ser incluidos en programas de Selección Asistida por Marcadores (MAS) el cual consiste en el uso de los marcadores de ADN para la identificación de individuos deseables dentro de una población, por ligamiento del marcador molecular a la característica deseable. Para obtener un máximo beneficio, los marcadores moleculares deben estar estrechamente ligados uno o más loci objetivo, el cual frecuentemente puede ser un loci de características cuantitativas (Goff y Salmeron, 2004). En la década pasada la mayoría de los institutos de investigación y compañías de mejoramiento comenzaron a usar a marcadores moleculares y MAS para incrementar la efectividad de selección en el mejoramiento para acortar el tiempo de desarrollo de variedades (Ribaut y Hoisington, 1998). Ejemplos exitosos en MAS incluye selección de marcadores en programas de retrocruces (MABC). Usando programas de mejoramiento convencional este toma entre 6-8 retrocruces para recuperar el genoma parental. Si los marcadores estrechamente ligados están flanqueando al QTL e igualmente marcadores uniformemente espaciados a partir

de otros cromosomas del parental recurrente son usados para la selección, la recuperación del parental recurrente puede ser acelerada.

En maíz la Selección Asistida por Marcadores redujo reduciendo el número de generaciones necesarias para recuperar el genoma recurrente en un tiempo más corto que 8 a 3 generaciones (Frisch *et al.*, 1999). En el mejoramiento en maíz se ha utilizado para transferir cualidades fenotípicas (QPM), controlado por un alelo mutante de un gen llamado opaco 2 a partir de una línea mejorada a otra línea mejorada (CIMMYT, 1999). Mientras que en arroz, la MAS se ha centrado en la piramidación de genes de resistencia a enfermedades, particularmente a blight y blast (Koebner, 2003). En yuca, la aplicación de MAS ha sido desarrollada más recientemente en comparación con otros cultivos, con la construcción de mapas genéticos de ligamiento usando RFLPs, isoenzimas, marcadores SSRs en CIAT (Fregene *et al.*, 1997; Mba *et al.*, 2001). A pesar de la baja saturación de loci en los mapas genéticos de yuca, los loci marcadores están distribuidos al azar en los grupos de ligamiento y la información de estos mapas han sido utilizada en la genética de yuca. El uso de estos mapas ha permitido la identificación de varios QTLs para el añublo bacterial de la yuca (Jorge *et al.*, 2000, 2001), QTLs para raíces de alta calidad y arquitectura de la planta.

El uso de estos mapas han permitido la identificación de un QTL para diferentes características como potencial de glucósido cianogénico (CNP), contenido de materia seca así como genes para la resistencia a CMD han sido mapeados incluyendo un gen mayor (CMD2) (Akano *et al.*, 2002). MAS para el mejoramiento de la resistencia a CMD esta siendo exitosamente aplicado para introducir resistencia dentro de gen pools en CIAT (Fregene y Mba, 2004; CIAT, 2003) y también para introgresar resistencia al lorito verde (CGM) y CMD en variedades locales de Tanzania (Kullaya *et al.*, 2004). El uso potencial en la identificación de QTL en yuca estaría en la piramidación de genes de resistencia a enfermedades junto con esas características agronómicas en un genotipo. La unión de muchos

genes y alelos a partir de loci diferentes es prácticamente difícil a través del análisis fenotípico solamente. Los QTLs dispersos en diferentes líneas parentales pueden ser recombinados a través de una evaluación para marcadores moleculares estrechamente ligados a tales genes.

El costo de la utilización de MAS es el factor limitante más importante para su uso en los programas de mejoramiento especialmente en los países en desarrollo debido a su alto costo. Esto hace que el uso de MAS sea restringido a grandes programas de mejoramiento (Chahal y Gosal, 2002) tales como los encontrados en los Centros de investigación del CGIAR tales como el CIAT o el IITA. Otros factores que afectan la eficiencia en el uso de la investigación de MAS en el futuro son: nuevos desarrollos y mejoramientos en las tecnologías de marcadores tales como el uso de polimorfismos de un simple nucleótido (SNPs) (Collard *et al.*, 2005), la disponibilidad de mapas de alta densidad y la integración de la genómica funcional con el mapeo de QTL tales como el análisis de microarreglo y Secuencias expresadas (ESTs) (Morgante y Salamini, 2003; Yerson *et al.*, 2004). Para mejorar la eficiencia de MAS se requiere del conocimiento de secuencias de ADN de los genes posibilita el diseño del “marcador perfecto” el cual es actualmente localizado dentro de la secuencia actual del gen (Collard *et al.*, 2005). Sin embargo el conocimiento de la secuencia de los genes para características importantes especialmente en yuca esta todavía en proceso. Entre tanto los científicos seguirán usando los mapas de QTLs y los marcadores de genes de características agronómicas importantes.

#### **2.2.1.2 Análisis de Mapeo Genético**

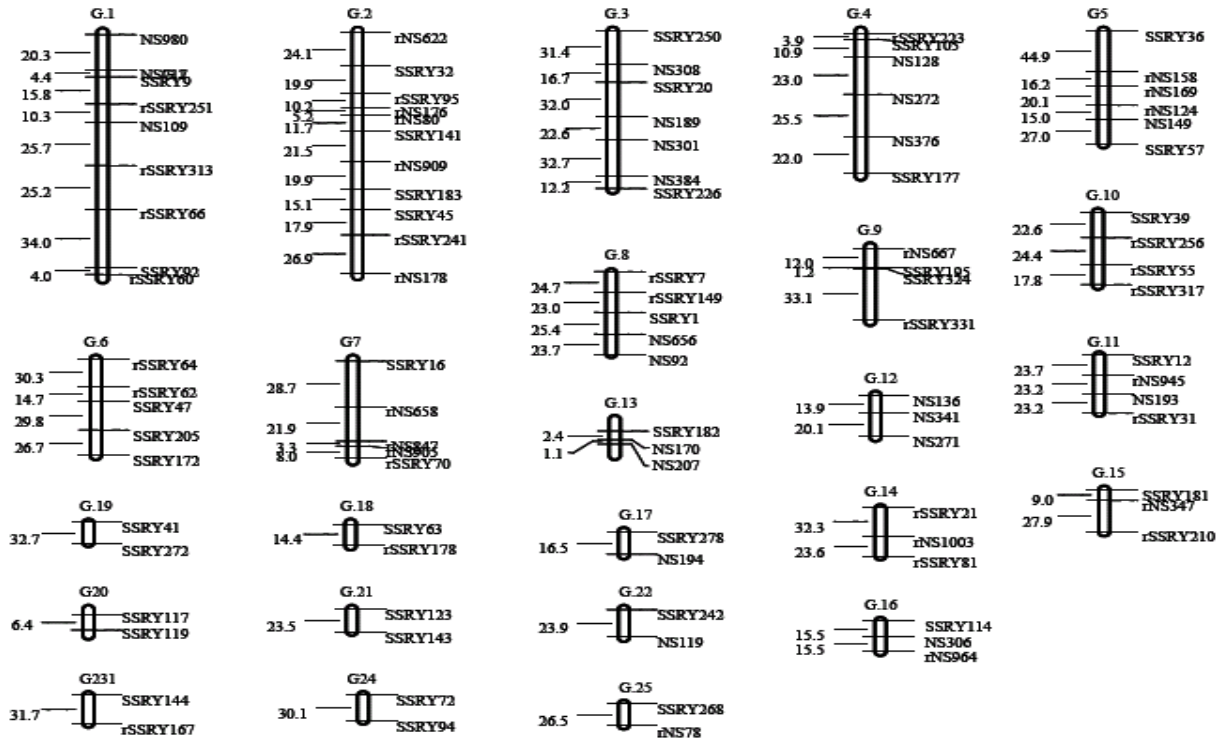
Los datos de polimorfismo de los marcadores microsatélites se obtuvieron con base en los patrones electroforéticos generados en la evaluación de los marcadores microsatélites en las familias GM708, GM734 y CM9816. Una vez identificado el modelo de segregación se construyó la matriz de datos usando el programa Excel (Microsoft) en la cual se consideraron los loci segregantes

presentes en los padres y en las progenies y posteriormente se utilizó SAS, MAPMAKER, Macintosh V.2.0, MAPDISTO V. 1.7.0, QGENE V. 2.3, WinQTLCart 2.5 (Lyer, 1992; Nelson J.C. 1997; Loreux, 2000) para la ubicación de los marcadores asociados con el contenido de carotenos en el mapa generado para la característica por Marín (2008).

La construcción del mapa de ligamiento para la característica contenido de carotenos en raíces de yuca realizado en colaboración con Marin (2008) usó una población S1 de yuca conformada por 299 individuos y 140 microsatélites los cuales formaron 25 grupos de ligamiento con un LOD mínimo de 4.0, lo cual significa que es diez mil veces más probable que dos marcadores se encuentren ligados a que no lo estén. Se formaron 25 grupos de ligamiento y 74 intervalos, para 20 grupos establecidos previamente (Fregene, 1997) y 22 grupos por (Okogbenin *et al*, 2006), con espacio promedio entre marcadores de 21.5 cM, para un total de espacio marcado de 1476.6 cM (Kosambi cM) (Figura 2.7) (Marin 2008).

Los 25 grupos de ligamiento encontrados por Marin (2008) exceden el número haploide de cromosomas de la yuca ( $n=18$ ) mostrando así que existen regiones que deben ser saturadas usando diferentes tipos de marcadores moleculares. La falta de uniformidad de la distribución de los marcadores a lo largo de los grupos de ligamiento muestra una baja densidad en ciertas regiones y una mezcla de loci estrechamente ligados, lo cual sugiere que otros eventos de recombinación o loci mapeados no fueron distribuidos eventualmente a través del genoma (Marin, 2008). Este mapa es el primer mapa genético de yuca generado a partir de una población S1 basado en marcadores “microsatélites” para la característica contenido de carotenos totales en raíces de yuca el cual debe ser saturado, que puede ser usado como base para la selección de los marcadores microsatélites que pueden ser evaluados en diferentes tipos de poblaciones de raíces amarillas. (Figura 2.5).





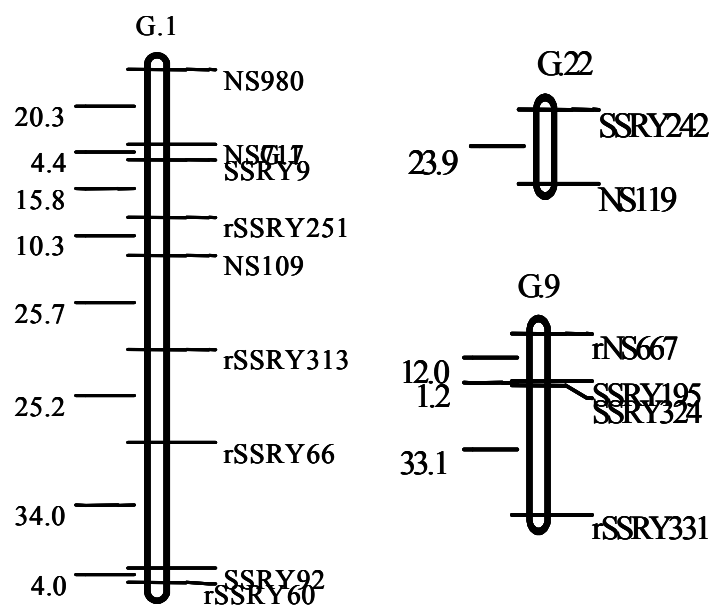
**Figura 2.5.** Mapa de ligamiento genético para el contenido de carotenos totales en yuca, Mahihot esclulenta Crantz, basado en una población de 229 individuos S1 resultante del cruce entre COL1684XMTA1 evaluado con 140 marcadores SSR. (Marin, 2008).

En la tabla 2.3 se presentan los grupos de ligamiento en los cuales se encuentran ubicados los marcadores que mostraron mayores valores de correlación con el contenido de carotenos en las familias evaluadas, teniendo en cuenta el mapa de QTLs para carotenos realizado por (Marin,2008). Se puede observar que aunque la mayoría de los marcadores que resultaron polimórficos para las tres familias evaluadas se encuentran dentro de una misma región cromosómica hay algunos marcadores microsatélites que resultaron polimórficos en algunas de las familias se encuentran dispersos en diferentes grupos de ligamiento, lo cual puede deberse a que en el mapa hay una falta de uniformidad de los marcadores a lo largo de los grupos de ligamiento lo cual se evidencia por una baja densidad en ciertas regiones y una mezcla de loci estrechamente ligados, lo cual sugiere que

otros eventos de recombinación o loci mapeados no fueron distribuidos eventualmente a través del genoma. Esa baja densidad de marcadores en ciertos grupos de ligamiento puede estar relacionada con regiones altamente homocigotas y elevados eventos en la frecuencia de recombinación, esto se ha visto en varios cultivos (Bonierbale *et al*, 1988; Causse *et al.*, 1994; Lagercrantz y Lydiate 1995; Castiglioni *et al*, 1999). Además la presencia de 37 marcadores microsatélites no ligados muestra claramente que existen regiones sin mapear y que es necesario saturar usando diferentes tipos de marcadores moleculares. (Marin, 2008).

**Tabla 2.3** Marcadores microsatélites polimórficos en las tres familias evaluadas (GM708, GM734, CM9816) y su ubicación en los grupos de ligamiento correspondientes en el mapa generado para la característica contenido de carotenos (Marin, 2008). Entre paréntesis su ubicación correspondiente en el mapa genético de yuca (Fregene *et al.*, 1997).

Microsatélite	Grupo de Ligamiento
SSRY-313	G-1 (D)
SSRY-251	G-1 (D)
SSRY-66	G-1 (D)
SSRY-9	G-1 (D)
SSRY-242	G-22 (A)
SSRY-195	G-9 (F)

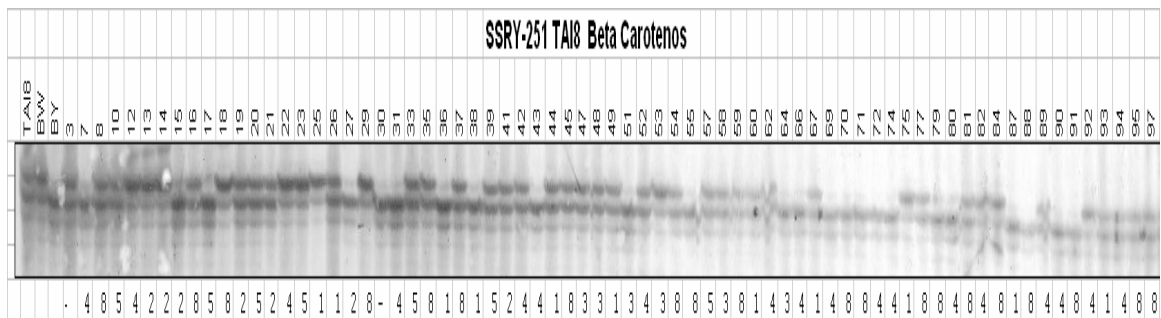
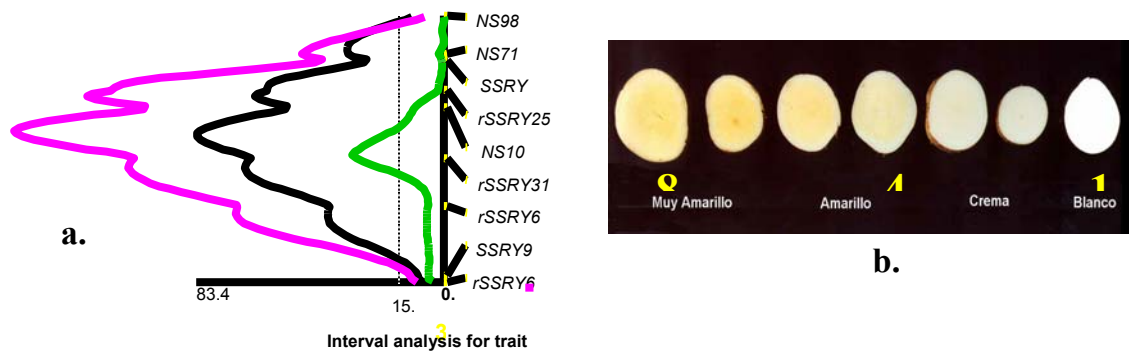


El mapa presentado en la figura 2.5 es un buen punto de partida para ser saturado con nuevos marcadores microsátélites, debido a que estos marcadores son de gran utilidad en la detección proporcionan marcadores rápidamente detectables para genes agrónomicamente importantes y de características cuantitativamente heredadas y facilitan su manipulación en poblaciones segregantes. Los mapas de ligamiento proporcionan un método directo para la identificación de genes vía marcadores fácilmente detectables, una guía para los experimentos de secuenciación por mostrar las posiciones de los genes y otras secuencias características. Los mapas de ligamiento están basados en las frecuencias de recombinación y la distancia entre los puntos en un mapa genético es un reflejo de las frecuencias de recombinación entre los puntos.

Es necesario tener en cuenta que en la construcción de un mapa de ligamiento la identificación de un número de marcadores que revelen diferencias entre los parentales (marcadores polimórficos), es muy importante, pues es, crítico que suficiente polimorfismos existan entre los parentales para construir un mapa de ligamiento. En general, las especies de polinización cruzada, con la yuca, poseen más altos niveles de polimorfismos comparados con las especies de autofecundación. Una vez un número suficiente de marcadores polimórficos han sido identificados entre los parentales, ellos deben ser usados para genotipificar la población de mapeo entera. Las progenies heredaran un marcador a partir de uno de los parentales (homocigoto dominante o homocigoto recesivo) o ambos parentales (heterocigoto) pero el método de evaluación es diferente entre marcadores codominantes, dominantes ya que esta última no es capaz de mostrar diferencias entre los individuos homocigotos y heterocigotos.

Estudios de mapeo genético del contenido de carotenos totales fueron realizados inicialmente por Marin (2002), en el cual usó una población basada en clones S1 que fue obtenida del parental (Rayon 60), se uso para construir el mapa genético molecular para la característica contenido de  $\beta$ -caroteno. Cinco QTLs potenciales

fueron detectados en los grupos de ligamiento 2, 3, 5, 11 y 24, pero solamente dos de ellos (en los grupos de ligamiento 3 y 4) mostraron una significancia de  $P \leq 0.001$ . (Figura 2.6)



**Figura 2.6. a.** Posible QTL en el grupo de ligamiento 3 explica entre el 20 - 40% de la varianza fenotípica y muestra un efecto de gen aditivo b. Variación en la intensidad del color y valores c. Gel de poliacrilamida tenido con plata, mostrando la amplificación de algunos individuos de la familia AM320 con el marcador SSRY251. Los valores de color son 8= Color de la raíz naranja claro o rosado; 4-5= crema y 1-2 = Blanco.

El QTL en el grupo de ligamiento 3 produjo un LOD de 83.48 con los marcadores SSR explicando desde el 7 al 40.7% de la varianza fenotípica total. Nueve marcadores SSR podrían ser detectados: rSSRY313 (40.7%), rSSRY251 (37%), NS9 (33.6%), SSRY66 (27.6%), NS717 (24.9%), SSRY9 (18.7%), NS980 (9%),

SSRY92 (7.8%) y rSSRY60 (7%). Los números dentro del paréntesis indican la proporción de la varianza fenotípica explicada por cada SSR. (Marin, 2002).

Al parecer hay tres regiones del genoma de yuca asociadas con el contenido de  $\beta$ -caroteno en las raíces localizadas en los grupos 3, 2 y 24 para el mapa genético desarrollado por Marin (2002) en una población  $S_1$ . Interacciones o efectos epistáticos entre estas dos regiones están siendo evaluadas en este momento, dos genes (fitoeno sintasa y fitoeno desaturasa) han sido involucradas en la biosíntesis del caroteno (Hirschberg *et al.*, 1997), estos genes fueron mapeados pero no están asociados con regiones del genoma controlando el contenido de  $\beta$ -caroteno.

Los mapas genéticos-moleculares tanto el de contenido de carotenos totales (Marin, 2008) y el desarrollado por Fregene *et al.*, 1997, serán utilizados para la identificación de loci que codifican para características cuantitativas (QTLs) y que de una u otra forma contribuyan a localizar regiones del genoma asociadas con los altos contenidos de carotenoides en las raíces de yuca.

## 2.3 CONCLUSIONES

En este estudio el Análisis de Grupos Segregantes (BSA) permitió la selección rápida y confiable de los marcadores polimórficos al evaluar en poco tiempo 800 marcadores microsatélites, identificando marcadores ligados a los altos contenidos de carotenoides con valores de correlación significativos.

Los análisis de correlación entre el contenido de carotenos totales y los marcadores microsatélites en las tres familias evaluadas fluctuaron entre 10-51%, siendo los marcadores SSRY-313, SSRY-251, NS-717 Y SSRY-242 los que presentaron un mayor grado de asociación con el contenido de carotenos. Por otra parte también se pudo observar que los marcadores, SSRY-226 (23%), SSRY 195 (42%), SSRY-330 (37%) NS-158 (43%) y SSRY-172 (33%) mantuvieron valores altos de correlación en algunas de las familias evaluadas.

En un trabajo colaborativo, Marin (2008) se construyó el mapa de ligamiento para la característica contenido de carotenos en raíces de yuca usando una población S1 de yuca, con 140 microsatélites los cuales formaron 25 grupos de ligamiento (LOD mínimo de 4.0) y 74 intervalos, 20 grupos establecidos previamente (Fregene, 1997) y 22 grupos por (Okogbenin *et al*, 2006), con espacio promedio entre marcadores de 21.5 cM, para un total de espacio marcado de 1476.6 cM (Kosambi cM).

Los marcadores microsatélites, SSRY-313, SSRY-251, NS-717, etc, ubicados dentro del grupo de ligamiento D del mapa genético de yuca, correspondiente al grupo de ligamiento 1 de carotenos, han mostrado valores de correlación significativos con los altos contenidos de carotenoides en las diferentes poblaciones en los que han sido evaluados. Convirtiendo a esta región en un área potencial que debe ser estudiada con mayor detalle en estudios tendientes a la identificación de los factores genéticos que controlan el contenido de carotenos en las raíces de yuca.

## 2.4 BIBLIOGRAFIA

- 1- AKANO AO, DIXON AGO, MBA C, BARRERA E, FREGENE M (2002). Genetic mapping of a dominant gene conferring resistance to the cassava mosaic disease (CMD). *Theor. Appl. Genet.* 105: 521–525.
- 2- AKINBO O., M. GEDIL, E. J. A. EKPO, J. OLADELE2 Y A. G. O. DIXON.2007. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 6 (6), pp. 677-682, 19 March 2007.
- 3- ANGEL F, ARIAS D, TOHME J, IGLESIAS C, ROCA W (1993) Towards the construction of a molecular map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): comparison of restriction enzymes y probe source in detecting RFLPs. *J Biotechnol* 31:103-113.
- 4- BARTLEY, SCOLNIK A. y G. GUIULIANO. 1995 Molecular Biology of carotenoid Biosynthesis in plants. *Annu.Rev.Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 45: 287-301.
- 5- BONIERBALE MW, PLAISTED RL, TANKSLEY SD. 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato y tomato. *Genetics* 120: 1095–1103.
- 6- BUSCH M, SEUTER A, HAIN R (2002) Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 128:439–453.
- 7- CASTIGLIONI, P., P. AJMONE-MARSAN, R. VAN WIJK y M. MOTTO. 1999. AFLP markers in molecular linkage map of maize: codominant scoring y linkage group distribution. *Theor Appl Genet* 99: 425–431.



- 8- CAUSSE MA, FULTON TM, CHO YG, AHN SN, CHUNWONGSE J, WU K, XIAO J, YU Z, RONALD PC, HARRINGTON SE, SECOND G, MCCOUCH SR, TANKSLEY SD. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251–1274.
- 9- CHAHAL, G.S. y GOSAL, S.S. 2002. *Principles y Procedures of Plant Breeding. Biotechnological y Conventional Approaches*. Alpha Science International Ltd. Pangbourne Engly. 585 pp.
- 10- CHAVARRIAGA, P. AGUIRRE, M. M. MAYA, M.W. BONIERBALE. S. KRESOVICH. M.A. FREGENE. J. THOME. G. KOCHERT. Microsatellites in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) discovery, inheritance and variability. *Theor Appl Genet* (1998) 97: 493-501.
- 11- CHAVARRIAGA-AGUIRRE P, MAYA MM, BONIERBALE MW, KRESOVICH S, FREGENE MA, TOHME J, KOCHERT G 1999. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): Discovery, inheritance y variability. *Theor Appl Genet* 97: 493-501.
- 12- CHEN X, SALAMINI F, GEBHARDT C (2001) A potato molecular function map for carbohydrate metabolism y transport. *Theor Appl Genet* 102:284–295.
- 13- CHURCHILL, G.A., y R.W. DOERGE, 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 163:1169-1175.
- 14- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 2002. IP3, Improved cassava for the developing World. *Annual Report. 2002*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.

- 15- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 2003. Project IP3, Improved cassava for the developing World. *Annual Report. 2003*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- 16- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 2006. IP3, Improved cassava for the developing World. *Annual Report. 2006*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- 17- COLLARD, B.C.Y., JAHUFER, M.Z.Z., BROUWER, J.B. y PARY, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping y marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142, 169-196.
- 18- CUAMBE, C.E. 2007. Evaluación del deterioro fisiológico poscosecha y mapeo preliminar de QTLs en el primer retrocruzamiento derivado del híbrido interespecífico (CW429-1) entre *Manihot esculenta* Crantz y la especie silvestre *Manihot walkerae* Croizat. Universidad Nacional de Colombia. Tesis Maestría.
- 19- CUBERO, J: FLORES. F. y MILLAN t, 1997. Complementos de Mejora Vegetal. Universidad de Córdoba, Colombia. P 21-40.
- 20- CUNINGHAM. F. GRANTT. 1998 Genes y Enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu.Rev.Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49: 557-583.
- 21- CUNNINGHAM F. 2002. Regulation of Carotenoid synthesis y accumulation in plants. *Pure Appl. Chem.* 74, No. 8, 1409-1417.
- 22- DECREUX L., MORRIS W., HEDLEY P., SHEPHERD T., DAVIES, MILLAM S. & TAYLOR M. 2004. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of  $\beta$ -carotene and lutein. *J. Exp. Bot.* 409: 81-89.

- 23- DELLAPORTA SL, WOOD J, HICKS JR 1983. A plant DNA minipreparation: versión II. *Plant Mol Biol. Rep* 1: 19-21.
- 24- ECHT C, KNAPP S, LIU BH (1992). Genome mapping with non-inbred crosses using Gmendel 2.0. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 66: 27-29.
- 25- EMERSON, R. A., G. W. BEADLE Y A. C. FRASER, 1935 A summary of linkage studies in maize. *Cornell Univ. Agric. Exp. Stn. Memoir* 180: 1–83.
- 26- FRASER D. y BRAMLEY P. 2004. The biosynthesis y nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid research.* 43 228-265.
- 27- FRASER PD, ROMER S, SHIPTON CA, MILLS PB, KIANO JW, MISAWA N, DRAKE RG, SCHUCH W, BRAMLEY PM (2002) Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1092–1097.
- 28- FRAY RG, WALLACE A, FRASER PD, VALERO D, HEDDEN P, BRAMLEY PM, GRIERSON D (1995) Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J* 8:693–701.
- 29- FREGENE M., F. ANGEL., R. GOMEZ, F. RODRIGUEZ, P. CHAVARRIAGA, W. ROCA, J. TOHME, M. BONIERBALE. 1997. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta Crantz*). *Theor Appl Genet* 95; 431-441.
- 30- FREGENE M. y MBA C. 2004. Marker-Assisted Selection (MAS) In: *Cassava Breeding*. (Ed. Hershey C.). FAO, Rome Italy.

- 31- FREGENE M, E. OKOGBENIN, C. MBA, F. ANGEL, MARIA CHRISTINA SUAREZ, GUTIERREZ JANNETH, P. CHAVARRIAGA, W. ROCA, M. BONIERBALE y J. TOHME. 2001. Genome mapping in cassava improvement: Challenges, achievements y opportunities. *Euphytica* Vol: 120 pp: 159–165.
- 32- FRISCH, M., BOHN, M. y MELCHINGER, A.E. 1999. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. *Crop Science* 39, 1295-1301.
- 33- GARCIA LIBREROS T. 2002. Saturación del mapa genético de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) usando marcadores moleculares microsátélites. Tesis Facultad de Ciencias, programa académico de Biología. Universidad del Valle. Santiago de Cali, 70p.
- 34- GONZALO, M; OLIVER, M; GARCIA-MAS, J; MONFORT, A; DOLCET-SANJUAN, R. et al. 2005. Simple sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet.* 802-811.
- 35- GOFF, S.A. y SALMERON, J.M. 2004. Back to the future of cereals. *Scientific American* 291, 42-49.
- 36- GOLDSTEIN DB Y SCHLÖTTERER. (1999) *Microsatellites: evolution y applications*. Oxford University Press, Oxford.
- 37- GUPTA P.K., VARSHNEY R.K., SHARMA P.C., RAMESH B.(1999): Molecular markers y their applications in wheat breeding. *Plant Breed*, 118: 369-390.

- 38- HANLEY, S; BARRER, J.H.A; VAN OOIJEN, J.W; ALDAM, C; et al. 2002. A genetic linkage map of willow (*Salix viminalis*) based on two *Lycopersicon esculentum* x *L. pennelli* F2 population. *Theor Appl Genet.* 99: 254-271.
- 39- HARTL DL (1988) A primer of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- 40- HAUPTMANN, R, ESCHENFELDT, W.H., ENGLISH, J. and BRINKS, F.L. (1997) Enhanced carotenoid accumulation in storage organs of genetically engineered plants. Us Patent, 5.618988.
- 41- HIRSCHBERG J (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr.Opin.Plant.Biol* 4:210–218.
- 42- HIRSCHBERG, J., COHEN, M., HARKER, M., LOTAN, T., MANN, V., Y PECKER, I. (1997). Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants y algae. *Pure Appl. Chem.* 69, 2152–2158.
- 43- ISAACSON T., RONEN G., ZAMIR D. y HIRSHBERG. 2002. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of  $\beta$ -carotene y Xanthophylls in Plants. *The plant Cell.* 4, 333-342.
- 44- JARNE, P y P. J.L. LAGODA. 1996. Microsatellites, from molecules to populations y back. *Trends Ecology Evolution:* 11: 424-429.
- 45- JORGE, V., FREGENE, M.A., DUQUE, M.C., BONIERBALE, M., TOHME, J. y VERDIER, V. 2000. Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease. *Theoretical y Applied Genetics* 101, 865-872.

- 46- JORGE, V., FREGENE, M., VELEZ, C.M., DUQUE, M.C., TOHME, J. y VERDIER, V. 2001. QTL analysis of field resistance to *Xanthomonas asonopodis* pv. *manihotis* in cassava. *Theoretical y Applied Genetics* 102, 564-571.
- 47- KISITO, E.B; RÖNNBERG-WÄSTLJUNG, A.C; EGWANG, T; GULLBERG, U. et al. 2007. Quantitative trait loci controlling cyanogenic glucoside y dry matter content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. *Hereditas*. 144: 129-136.
- 48- KOEBNER, R. 2003. MAS in Cereals: Green for maize, amber for rice, still red for wheat y barley marker assisted selection. A fast track to increase genetic gain in plant y animal breeding. <http://www.fao.org/biotech/conf10.htm> (accessed 25 May 2006).
- 49- KOSAMBI, D.D. 1944. The estimation of map distance from recombination values. *American Journal Eugen* 12: 172-175.
- 50- KRESOVICH, S., SZEWC-MCFADDEN, A.K., BLIEK, S.M. Y MCFERSON, J.R. 1995. Abundance y characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theor. Appl. Genet.* 91: 206–211.
- 51- KULLAYA, A., MATUNDA, K., KULEMBEKA, H., FERGUSON, M., MARIN, J., OSPINA, C., BARRERA, E., JARVIS, A., MORANTE, N., CEBALLOS, H., TOHME, J. y FREGENE, M. 2004. Molecular marker assisted y farmer participatory improvement of cassava germplasm for farmer/market preferred traits in Tanzania. In: *Adding Value to a Small-Farmer Crop*. (Eds. A. Alves y J.Tohme). *Proceedings on the Sixth International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. 8-14 March 2004*. CIAT, Cali Colombia, pp 70.

- 52- LAGERCRANTZ UFL, LYDIATE DJ. 1995. RFLP mapping in *Brassica nigra* indicates differing recombination rates in male y female meioses. *Genome* 38: 255–264.
- 53- LAULE O, FURHOLZ A, CHANG HS, ZHU T, WANG X, HEIFETZ PB, GRUISSEM W, LANGE M (2003) Crosstalk between cytosolic y plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6866–6871.
- 54- LI, Y.-C., T. FAHIMA, J.H. PENG, M.S. RODER, V.M. KIRZHNER, A. BEILES, A.B. KOROL, and E. NEVO. 2000. Edaphitic microsatellite DNA divergence in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, at a microsite: Tabigha, Israel. *Theor. Appl. Genet.* 101:1029–1038.
- 55- LIEBHARD, R; GIANFRANCESSCHI, L; KOLLER, B; RYDER, C.D; TARCHINI, R. et al. 2002. Development y characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh). *Mol Breed.* 10: 217-241.
- 56- LINDAREN L., STALBRG K & HOGLUND A. 2003. Seed- specific overexpression of an endogenous *Arabidopsis* phytoene synthase gene results in delayed germination an increased level of carotenoids, chlorophyll and Abscisic acid. *Plant Physiol.* 132: 779-785.
- 57- LYER, E.S., Y D. BOTSTEIN. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 126: 735-742.
- 58- LYER, E., P. GREEN., J. ABRAHMSON., A. BARLOW., J. M. DAL., S.E. LINCOLN y L. NEWBURG. 1987. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental y natural populations. *Genomics* 1: 174-181.

- 59- LYER, E.S., LINCOLN. S.E Y DALY. M.J. 1992. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER Version 2.0: A tutorial y reference manual. Whitehead Institute, Cambridge, Mass.
- 60-LORIEUX M, PERRIER X, GOFFINET B, LANAUD C, GONZALEZ D DE L (1995b). Maximum-likelihood models for mapping genetic markers showing segregation distortion. 2. F2 populations. Theor. Appl. Genet. 90: 81-89.
- 61- MACARTHUR JW (1934). Linkage groups in the tomato. J Genet 29:123–133.
- 62- MACEA, E. 2007. Identificación de marcadores microsatélites asociados con la resistencia al ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis de grado. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Programa Académico de Biología, Santiago de Cali. 2007.
- 63- MANLY KF, CUDMORE JR RH, MEER JM (2001). Map Manager QTX, crossplatform software for genetic mapping. Mamm. Genome 12: 930–932.
- 64- MANN V. HERKER, I PECKER. J HIRSCHBERG.2000. Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. Nature Biotechnol. 18: 888-892.
- 65- MARIN J. A. 2002. Mapeo genético y análisis asistido por marcadores “microsatélites” de la genética del rendimiento en una población F2 de yuca (*Manihot sculenta* Crantz). Universidad del Tolima, Facultad de Ciencias, programa de biología. Tesis de Pregrado.
- 66- MARIN J.A. 2008. Carotenos en Yuca: Mapeo Genético y Análisis De QTLs en una población S1 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias, Área mejoramiento genético de plantas.



- 67- MBA, R.E.C., P. STEPHENSON., K. EDWARDS., S. MELZER., J. NKUMBIRA., U. GULLBERG., K. APEL., M. GALE., J. TOHME y M. FREGENE. 2001. Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. *Theoretical y Applied Genetics* 102: 21-31.
- 68- MC COUCH, S.R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y.G.; HUANG, N.; ISHII, T. Y BLAIR, M. 1997. Microsatellite Marker Development, Mapping y Applications in Rice Genetics y Breeding. *Plant Molecular Biology*. 35: 89-99.
- 69- MICHELMORE R.W., PARAN I., KESSELI R.V. (1991): Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9828–9832.
- 70- MORGANTE M, OLIVIERI AM. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics *Plant J* 3: 175-182.
- 71-MORGANTE, M. y SALAMINI, F. 2003. From plant genomics to breeding practice. *Current Opinions in Biotechnology* 14, 214-219.
- 72- NELSON J.C. 1997. Q-gene: Software for marker based genome analysis y breeding. *Molecular breeding* 3:229-235.
- 73- OKOGBENIN, E; MARIN, J; FREGENE, M. 2006. An SSR-based molecular genetic map of cassava. *Euphytica*. 147: 433-440.

74- OLSEN, K.M. Y B.A. SCHAAL (2001). Microsatellite variation in cassava y its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. *American Journal of Botany* 88: 131-142.

75- PAINE JA, SHIPTON CA, CHAGGAR S, HOWELLS RM, KENNEDY MJ, VERNON G, WRIGHT SY, HINCHLIFFE E, ADAMS JL. 2005. A new version of Golden Rice with increased pro-vitamin A content. *Nat Biotechnol.* 2005; 23:482–7.

76- PARK H, KREUNEN SS, CUTTRISS AJ, DELLAPENNA D, POGSON BJ (2002) Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation and photomorphogenesis. *Plant Cell* 14:321–332.

77- PELEMAN J. 1999. Application of the AFLP technique in marker assisted breeding. [Http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/1999/whicmarker/index.htm](http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/1999/whicmarker/index.htm).

78- PFLIEGER S, LEFEBVRE V, CAUSSE M (2001) The cyadate gene approach in plant genetics: a review. *Mol Breed* 7:275–291.

79- RAVANELLO MP, KE D, ALVAREZ J, HUANG B, SHEWMAKER CK (2003) Coordinate expression of multiple bacterial carotenoid genes in canola leading to altered carotenoid production. *Metab Eng* 5:255–263.

80- RIBAUT, J. M. y HOISINGTON, D. 1998. Marker-assisted selection: new tools y strategies. *Trends in Plant Science* 3, 236-239.

81- ROA, A.C., P. CHAVARRIAGA-AGUIRRE, M.C. DUQUE, M.M. MAYA, M.W. BONIERBALE, C. IGLESIAS y J. TOHME. 2000. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism y degree of relationship. *Am J Bot* 87: 1647–1655.

82- ROMER S, FRASER PD, KIANO JW, SHIPTON CA, MISAWA N, SCHUCH W, BRAMLEY PM (2000) Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nat Biotech* 18:666–669.

83- ROMER S, LUBECK J, KAUDER F, STEIGER S, ADOMAT C, SANDMANN G. 2002. Genetic engineering of a zeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation. *Metabolic Engineering* 4, 263–272.

84- ROSERO, A. 2008. Avances en la introgression asistida por marcadores moleculares de la resistencia al deterioro fisiológico post-cosecha desde *Manihot walkerae* Croizat en poblaciones de yuca *M. esculenta* Crantz. Tesis de grado para optar por el título de Magíster en Ciencias Agrarias con énfasis en mejoramiento genético de Plantas. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. 99 p.

85- SAS Institute Inc.2005. SAS OnlineDoc® 9.1.3. Cary, NC: SAS Institute Inc; Available in : <http://support.sas.com/onlinedoc/913/docMainpage.jsp>.

86- SHAUB P, AL-BABILI S., DRAKE R. y BEYER P. 2005. Why is Golden Rice (Yellow) instead of red?. *Plant Physiology Preview*. [www.aspb.org](http://www.aspb.org)©.

87- STALBERG K, LINDGREN O, EK B, HOGLAND AS (2003) Synthesis of ketocarotenoids in the seed of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 36:771–779.

88- STAM P (1993a). Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant J.* 3: 739-744.

- 89- STAM P (1993b). JoinMap Version 1.4: A computer program to generate genetic linkage maps. CPRO-DLO, Wageningen. Centre for Plant Breeding y Reproduction Research CPRO-DLO, Wageningen, The Netherlys.
- 90- STAUB, J.E., SERQUEN, F.C. and GUPTA, M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. HortScience. 31(5): 729-741.
- 91- STURTEVANT, A. H., 1931. Two new attached-X lines of *Drosophila melanogaster*, y further data on the behavior of heterozygous attached-X's. Pub. Carnegie Inst. Washington,421, 61–81.
- 92- SUITER, K. A., J. F. WENDEL, Y J. S. CASE. 1983. LINKAGE-1: a PASCAL computer program for the detection y analysis of genetic linkage. J. Hered. 74:203-204.
- 93- THORUP TA, TANANDOLAC B, LIVINGSTONE KD, POPOVSKY S, PARAN I, JAHN M (2002) Cyidate gene analysis of organ pigmentation loci in the Solanaceae. Proc Natl Acad Sci USA 97:11192–11197.
- 94- TIAN L, DELLAPENNA D (2004 a). Progress in understying the origin y functions of carotenoid hydroxylases in plants. Arch Biochem Biophys 430:22–29.
- 95- TIAN L, MUSETTI V, KIM J, MAGALLANES-LUNDBACK M, DELLAPENNA D (2004 b) The Arabidopsis LUT1 locus encodes a member of the cytochrome P450 family that is required for e-ring hydroxylation activity. Proc Natl Acad Sci USA 101:402–407.
- 96- TUCKER G (2003) Nutritional enhancement of plants. Curr Opin Biotechnol 14:221–225.

- 97- VARSHNEY RK, GRANER A, SORRELLS ME (2005) Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends Plant Sci* (in press).
- 98- YANG J Y ZHU J (2005). Methods for predicting superior genotypes under multiple environments based on QTL effects. *Theor Appl Genet*, 110: 1268-1274.
- 99- YE X, SALIM AB, KLOTI A, JING Z, LUCCA P, BEYER P, POTRYKUS. 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287:303–305.
- 100- YERSON, J.V., DELSENY, FREGENE, M.A., JORGE, V., MBA, C., LOPEZ, C., RESTREPO, S., SOTO, M., PIEGU, B., VERDIER, V., COOKE, R., THOME, J. y HORVATH, P.D. 2004. An EST resource for cassava and other species of Euphorbiacea. *Plant Molecular Breeding* 56, 527-539.
- 101- YOUNG, N.D.1994. Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers. *DNA-Based Markers in Plant*. 1:39-57.
- 102- ZARATE, L.A. 2002. Mapeo Genético de una Población F1 de Yuca Cultivada. Universidad del Tolima. Facultad de Ciencias. Programa de Biología. Ibagué (Tolima)-Colombia.

**PARTE III**  
**IDENTIFICACIÓN DE QTLs PARA CAROTENOS EN EL GENOMA DE LA**  
**YUCA Y VALIDACIÓN EN POBLACIONES S1**

## INTRODUCCION

Muchas características de importancia económica son producidas por la acción de varios genes, dichas características son llamadas poligénicas, cuantitativas o de herencia compleja. Algunos ejemplos de características de herencia cuantitativa son: la precocidad, la productividad y el crecimiento volumétrico. Los loci que controlan la expresión de la mayoría de las características cuantitativas son llamados “QTLs (Quantitative Trait loci) o loci que controlan características cuantitativas. Con la ayuda de los mapas genéticos construidos con base en marcadores moleculares se puede estudiar la arquitectura de características cuantitativas logrando identificar, mapear y medir la magnitud del efecto de los principales factores genéticos involucrados en el control de estas características y llegar a manipular estos factores individualmente durante los procedimientos de selección y recombinación genética (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

El mapeo de características cuantitativas a través de la identificación de *loci* de caracteres cuantitativos se considera una herramienta importante dentro del mejoramiento genético de plantas (Cerón-Rojas y Sahagún-Castellanos, 2007; Martínez-Gómez *et al.*, 2005). Los QTLs son identificados dentro del genoma de una planta basado en el principio de asociación entre los marcadores moleculares polimórficos y el fenotipo de los individuos de una población de mejoramiento.

El mapeo de QTLs, tiene por objeto identificar y localizar genes que controlan caracteres cuantitativos de interés agronómico. El mapeo de QTLs permite obtener información sobre el número, posición cromosómica, magnitud del efecto e interacciones de los loci que controlan la expresión de dichos caracteres. El procedimiento incluye la construcción de mapas genéticos y la búsqueda de asociación entre caracteres cuantitativos y marcadores polimórficos. Una asociación significativa entre los caracteres y los marcadores, puede ser evidencia

de la presencia de un QTL en una región cercana a la localización de los marcadores. El mapeo de QTLs es un problema de prueba múltiple. Las pruebas no son independientes entre marcadores debido al ligamiento entre ellos y a su posible interacción. La asociación entre los marcadores y los caracteres se evalúa mediante diferentes métodos, los cuales para el análisis de QTLs cada vez se refinan con el fin de aumentar la potencia de detección, la precisión y la exactitud en el número, magnitud y distribución de los QTLs.

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

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

Para determinar el ligamiento genético entre marcadores y QTLs depende de la existencia de desequilibrio de ligamiento (“linkage disequilibrium”) entre los alelos en el locus marcador y los alelos del QTL, este desequilibrio genera efectos cuantitativos asociados al marcador que pueden ser detectados y estimados a través del análisis estadístico más acorde. Se puede decir que cuando las frecuencias genotípicas de los gametos difieren del producto de las frecuencias de los alelos componentes ha ocurrido un desequilibrio de ligamiento entre dos loci, produciéndose una asociación significativa entre dichos loci (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Para poder detectar un QTL, se debe saber: si esta relacionado con la magnitud del efecto del QTL sobre la característica, la distancia entre marcadores, el tipo de población, el tamaño de la población segregante en evaluación, de la frecuencia de recombinación del marcador y el QTL, y la



heredabilidad del carácter en estudio (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Melchinger *et al.*, 1998).

El número de QTLs segregantes y el tamaño de su efecto, en un cruce, está determinado por las diferencias fenotípicas de los parentales y por la varianza genotípica de la progenie. La varianza genotípica puede ser estimada, como la diferencia entre la varianza experimental total o varianza fenotípica y la varianza ambiental. La varianza ambiental puede ser estimada a partir de las medias genotípicas de la población progenie replicada en diferentes ambientes (Lee, 1995).

El mapeo de QTLs consiste en buscar asociaciones entre marcadores polimórficos y caracteres cuantitativos, si la asociación resulta significativa quiere decir que el QTL está cercano del marcador; los QTLs pueden ser mapeados en el genoma mediante el uso de marcadores moleculares que cubran buena parte del genoma lo cual da la posibilidad de que algunos QTLs estén asociados con estos, es decir si los genes como los marcadores están segregando en una población genéticamente definida pueden establecerse relaciones de ligamiento entre ellos mediante la asociación de la variación de las características cuantitativas y el marcador molecular (Terán, 1999).

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

Las metodologías más comunes para el mapeo de QTL son: Análisis simple, análisis de intervalo y análisis de intervalo compuesto. Análisis simple: El análisis más simple para detectar QTL es el análisis utilizando un solo marcador a la vez y no requiere un mapa molecular completo. La distribución de los valores del carácter es examinada separadamente para cada marcador. Análisis de intervalo: Para tomar ventaja de los mapas moleculares, se desarrolló este análisis, en el cual en lugar de analizar la población con un marcador a la vez, el análisis se hace para un par de marcadores adyacentes simultáneamente. Este análisis permite una mejor estimación de la posición y el efecto de los QTLs, así como el poder de detección con respecto a sus efectos en caracteres cuantitativos. El máximo beneficio del análisis de intervalo es cuando existen marcadores con distancias grandes entre ellos (mayor que 20 cM).

Bajo estas condiciones, es probable encontrar muchos entrecruzamientos entre los marcadores, lo cual se compensa con el análisis de intervalo. Sin embargo, cuando los marcadores están muy distanciados (mayor que 35 cM), aun el análisis de intervalo es ineficiente para detectar QTLs. Los dos análisis anteriores son sesgados cuando existen múltiples QTLs ligados al marcador-intervalo considerado. Análisis de intervalo compuesto: Este análisis considera el intervalo entre dos marcadores y además unos pocos marcadores bien seleccionados en cada análisis para controlar la varianza causada por otros QTLs.

En los últimos cinco años se han desarrollado métodos estadísticos y biométricos para analizar la presencia y efectos de los QTLs (1). Tres tipos básicos de análisis pueden mencionarse: (a) contraste de clases marcadoras, (b) regresión múltiple (Haley *et al.*, 1994) y (c) método de máxima verosimilitud (Darvasi y Soller, 1995; Haley *et al.*, 1992). Los dos últimos métodos tienen mayor potencia discriminante que el primero. Existe un programa de ordenador muy extendido llamado MAPMAKER basado en la máxima verosimilitud que permite la identificación y

mapeo de los QTLs. Debido a las limitaciones encontradas en los métodos de análisis se están haciendo grandes esfuerzos para progresar en este área.

Generalmente se asume que una característica cuantitativa ( $Y$ ) de interés en un QTL putativo está normalmente distribuida con una media esperada  $\mu_j$  y una varianza de  $\sigma^2$ . Las contribuciones genéticas de un QTL a la característica fenotípica son reflejadas en la media o varianza de la distribución normal. Para un genotipo un QTL dado, se puede particionar esta media esperada ( $\mu_j$ ) en los siguientes componentes: Media general ( $\mu$ ), efecto aditivo ( $a$ ), efecto dominante ( $d$ ) y efectos epistáticos, aditivo x aditivo ( $iaa$ ), aditivo x dominante ( $iad$ ), dominante x aditivo ( $ida$ ) y dominante x dominante ( $idd$ ). Si se asume que esos efectos son fijos, ellos pueden ser estimados directamente en un modelo mixto. Con este modelo fijo basado en las funciones de mapeo se puede especificar los componentes genéticos de  $\mu_j$  basados en diferentes componentes genéticos o beneficios del mapeo.

Las aplicaciones mas obvias del análisis de QTL son: 1) Selección Asistida por Marcadores MAS (*Marker-Assisted Selection*) en mejoramiento y pre-mejoramiento, y 2) la clonación de QTL para ser utilizados en experimentos de transformación. Su éxito (o eficacia) depende fundamentalmente de la fiabilidad y exactitud del análisis de QTLs de donde se obtuvo la información. Las regiones cromosómicas donde se encuentran los QTLs son generalmente grandes y pueden incluir muchos marcos abiertos de lectura (ORF) o también alelos favorables de varios QTLs en repulsión. Esta situación puede aumentar el lastre por ligamiento al aplicar el análisis de QTLs en mejora o en la introgresión de genes en germoplasma elite, arrastrando características no deseadas que están ligadas a los QTLs. Por eso, un objetivo fundamental del análisis de QTLs es localizarlos en estrechas franjas cromosómicas lo cual implica una consideración global de distintos aspectos: tipo de diseño experimental o población segregante, su tamaño, número, contenido informativo y nivel de polimorfismo de los

marcadores de ADN, y las metodologías estadísticas que se utilicen tanto para construir el mapa de ligamiento como para realizar el análisis de QTLs.

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

Otras investigaciones fueron desarrolladas para identificar las regiones QTLs relacionadas con la productividad, mediante datos de producción y arquitectura de la planta, QTLs primarios usando modelo simple, y QTLs secundarios mediante un modelo de interacción de QTL primario, fueron detectados mediante mapeo por intervalo. Un total de 30 QTLs primarios y 84 QTLs secundarios fueron detectados, y los resultados en las correlaciones sugieren que los QTLs encontrados para arquitectura de la planta pueden ser usados para mejorar la productividad. Así mismo, se realizó un análisis genético para encontrar características y regiones QTLs asociadas al rendimiento temprano, encontrándose un total de 27 QTLs controlando el rendimiento temprano, 2 para peso seco del follaje, 8 para índice de cosecha y 17 para diámetro de raíz (Okogbenin y Fregene, 2002; 2003).

Esta tercera parte tiene como objetivo principal identificar Loci de Características Cuantitativas QTLs asociados al contenido de carotenos y a su vez validar su presencia en poblaciones S1.

### 3.1 MATERIALES Y METODOS

Los métodos de cartografía para QTLs utilizados fueron: Regresión a un único marcador: Análisis de Simple Marcador (A.S.M); Cartografía de un Intervalo: Análisis de Mapeo por Intervalo (A.M.I); Cartografía de Intervalos Compuestos: Análisis de Mapeo por Intervalo Compuesto (A.M.I.C). Los programas de computador que se usaron fueron QGENE (Nelson, J.C. 1995).y el programa MAPMAKER/QTL versión 1.1 (Stephen E. Lincoln, 1993). Para el programa QGENE se generaron dos matrices una con la información genotípica de los individuos de la población de mapeo con respecto a cada marcador, junto con los valores observados para cada genotipo con respecto a la variable cuantitativa evaluada. La otra matriz de datos lleva la información del mapa, o sea la ubicación de los marcadores en los grupos de ligamiento, con sus distancias entre marcadores.

Se realizó un análisis de asociación entre marcadores y el genotipo para el cual se tienen los datos, este análisis se fundamenta en una regresión simple, en donde la variable dependiente es la característica cuantitativa (Contenido de carotenos, Color de Pulpa de la raíz,) y la variable independiente es el número de alelos en el locus marcador, dependiendo de la segregación del individuo, usando el comando Un Punto (Single point). Usando el comando "regresión por Intervalo (interval regresion)" se hizo el análisis de mapeo por intervalo, el cual se fundamenta en una regresión múltiple teniendo en cuenta no solo un locus marcador, sino todos los marcadores como variable independiente sobre el valor de la característica cuantitativa. Y un comando "multiplot" permite visualizar los resultados de la regresión simple.

Para crear el mapa de QTLs se usó el programa MAPMAKER/QTL el parte de la correlación entre la herencia de marcadores genéticos particulares y la variación en el fenotipo para cada individuo en la población. Este tipo de programa ofrece mapeo de intervalos, previa construcción de un mapa de ligamiento genético, además calcula el LOD score para los posibles QTLs encontrados. Al igual que el programa, QGENE, este programa necesita un archivo con los datos del mapa construido.

Para correr el programa MAPMAKER/QTL, los datos se guardaron en dos archivos, el primero es un "sample.data" conteniendo los datos de los microsatélites, y un "sample.traits", conteniendo los valores de las características cuantitativas. Y esos archivos se leen en MAPMAKER/QTL, con el comando "load data". Para realizar el mapa de QTLs, a cada punto del genoma, se le hace un computo de LOD score para la comparación de la hipótesis de un posible QTL en esa posición (simple aditividad, dominancia o ningún termino) con la hipótesis de un no QTL (solamente un termino de ruido apropiado). Si el LOD score excede un valor estadístico (threshold) predeterminado, un QTL puede estar presente. La posición del QTL es estimada a ser el intervalo sobre el cual el LOD score esta dentro de un cierto threshold del pico (Lyer, 1989). El QTL es declarado significativo cuando  $P < 0.05$  y cuando explican gran parte de la variación fenotípica observada dado por el valor de  $R^2$ .

La acción de QTLs individuales fue primero localizado para probar la hipótesis de  $a = 0 + d = 0$ , después, se usó para determinar el centro de acción de cada QTL con gran aditividad, dominancia o recesividad. Con tres modelos uno aditivo  $d = 0$ , uno dominante  $d = a$  y uno recesivo  $d = -a$ . Así el intervalo de ligamiento y los tipos de acción de los genes (Aditivo, dominante) fue determinando el porcentaje de la variación fenotípica total para cada QTL (Paterson *et al.*, 1990).

Para el mapeo por intervalos QTLs asociados a características como contenido de carotenos y color de pulpa de la raíz en yuca, se usó un LOD 3.0 como valor estadístico “threshold” para declarar la presencia de un QTL, y se han confirmado usando un modelo de QTL múltiple de mapeo por intervalo (Mapmaker/QTL) y regresiones múltiples (Zeng, 1993) hasta que los QTLs sean altamente significativos ( $P < 0.001$  en un modelo de regresión múltiple, y que cada QTL contribuya al modelo de QTL múltiple para un LOD adicional 1.0 en el mapeo por intervalo).

### **3.1.1 Validación De QTLs en Familias S1:**

La validación de los QTLs que han sido identificados previamente mediante el uso marcadores microsatélites polimórficos en las familias GM708, GM734 y CM9816, se hizo en familias de raíces amarillas autofecundadas ( $S_1$ ) desarrolladas a partir de algunos genotipos de raíces amarillas seleccionados.

Las familias S1 utilizadas para evaluar los marcadores polimórficos asociados con el contenido de carotenos en raíces de yuca encontrados en las evaluaciones realizadas con poblaciones segregantes, fueron obtenidas a partir de una población de más de 50 familias de hermanos completos y de un grupo de cinco familias seleccionadas. Las autopolinizaciones fueron hechas durante el primer semestre del 2006, con el fin de estudiar la herencia del contenido de carotenoides en raíces de yuca y la identificación de clones con altos contenidos de carotenoides para ser usados como fuente parental para esta característica. Las familias S1 utilizadas en este estudio se muestran en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Familias S1 para el estudio de herencia del carácter contenido de carotenos en raíces de yuca.

<b>Progenitor</b>	<b>Familia S<sub>1</sub></b>	<b>No Genotipos</b>
CM 9816-1 (4.48) Intermedio	AM 689	71
CM 9816-2 (10.98) Alto	AM 690	90
CM 9816-5 (1.70) Bajo	AM 691	73
CM 9816-6 (6.86) Intermedio	AM 692	48
GM 893-5 (9.17) Alto	AM 710	29
GM 893-8 (6.80) Intermedio	AM 712	57
GM 893-16 (6.94) Intermedio	AM 718	38
GM 893-18 (2.62) Bajo	AM 720	40
GM 708 - 20 (0.43) Bajo	AM 697	38
GM 708 - 27 (0.46) Bajo	AM 698	34
GM 708 - 47 (12.04) Alto	AM 700	2
GM 708 - 63 (12.75) Alto	AM 702	30
<b>Total</b>		<b>550</b>

### **3.1.2 Análisis de distribución de frecuencias del contenido de carotenos totales en las familias S1:**

El contenido de carotenos totales y  $\beta$ -caroteno se analizaron usando estadística descriptiva (medidas de tendencia central, de variación y de desviación, correlación y regresión) mediante el programa Microsoft Excel y SAS (SAS, 2005). Se construyeron histogramas de frecuencia y gráficas de dispersión.

- Se utilizó la estadística descriptiva para datos cuantitativos (medidas de tendencia central, de variación y de desviación), mediante el programa Microsoft Excel y SAS (SAS, 2005).
- Se construyeron histogramas de frecuencia y gráficas de dispersión.



- Las asociaciones entre el contenido de carotenos totales y los diferentes carotenoides individuales evaluados por el método HPLC, así como la intensidad de color del parénquima, fueron evaluadas utilizando el análisis de regresión lineal.

### **3.1.3 Evaluación de marcadores microsatélites polimórficos en las familias S1 evaluadas:**

La evaluación de marcadores microsatélites polimórficos en las familias S1 se hizo teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las evaluaciones anteriores por lo cual se utilizaron los marcadores microsatélites (SSRY) que tuvieron altos valores de correlación con la característica contenido de carotenos y que produjeron patrones electroforéticos claramente diferenciables. Las condiciones de amplificación, los perfiles térmicos y la separación de los productos amplificados que se usaron fueron las mismas que se describieron en los capítulos anteriores. Se hizo análisis de correlación con el fin de determinar el grado de asociación entre el contenido de carotenos y el marcador molecular, se usaron los programas MAPMAKER y QTLCartographer para determinar las posiciones relativas en el mapa y la validez de los QTLs encontrados.

## 3.2 RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.2.1 Análisis de QTLs:

Aprovechando la información del mapa genético molecular de yuca desarrollado por Fregene y colaboradores (1997) y el de QTLs para carotenos generado por Marin (2008) se ubicaron los marcadores microsatélites asociados con QTLs en los diferentes grupos de ligamiento formados, utilizando los Análisis de Simple Marcador (A.S.M), Análisis de Mapeo por Intervalo (A.M.I) y Análisis de Mapeo por Intervalo Compuesto (A.M.I.C). El ligamiento entre marcadores y QTLs fue determinado como significativo cuando el valor de probabilidad mínimo fue de 0.05. Los valores estadísticos “thresholds” usados en análisis de QTLs publicados han sido entre LOD score 2.0 y 3.0 para MAPMAKER/QTL; QGENE; MAPDISTO (Rector *et al*, 1998; Lin *et al*, 1998). Los análisis de simple marcador, por regresión simple, de la asociación entre los marcadores microsatélites polimórficos y el Contenido de Carotenos Totales revelaron que Loci de Características Cuantitativas (QTLs) mayores, controlan la característica Contenido de  $\beta$ -carotenos en las raíces de yuca los cuales se pueden observar en la tabla 3.2.

El análisis de regresión o de simple marcador mostró que los QTLs explican más del 26% de la varianza fenotípica observada en el contenido de carotenos en la raíces de yuca. Cinco QTLs fueron identificados en el grupo ligamiento D para las tres familias, sugiriendo posiblemente que QTLs mayores y que incrementan el contenido de  $\beta$ --caroteno residen en este grupo de ligamiento (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2** Asociación entre marcadores SSRs y el Contenido de  $\beta$ -caroteno en las familias GM708, GM734 y CM9816 revelada por el análisis de simple marcador (regresión simple).

Familia	Microsatélite	Correlación	Regresión	Grupos Ligamiento
GM708	SSRY-226	0.23	0.05	G
	NS-267	0.26	0.07	R
	SSRY-9	0.27	0.07	F
	SSRY-242	0.28	0.08	A
	SSRY-178	0.31	0.10	H
	SSRY-88	0.31	0.10	K
	NS-717	0.32	0.12	D
	SSRY-251	0.42	0.18	D
	SSRY-313	0.44	0.19	D
GM734	SSRY-66	0.27	0.08	
	SSRY-21	0.28	0.08	D
	SSRY-242	0.31	0.10	A
	SSRY-313	0.35	0.13	D
	NS-717	0.41	0.17	D
	SSRY-251	0.51	0.26	D
CM9816	SSRY-324	0.23	0.05	D
	SSRY-242	0.30	0.09	A
	SSRY-172	0.33	0.11	J
	SSRY-251	0.35	0.13	D
	SSRY-330	0.37	0.14	N/A
	NS-717	0.41	0.17	D
	SSRY-49	0.42	0.18	C
	SSRY-195	0.42	0.18	F
	NS-158	0.43	0.18	G
	SSRY-313	0.47	0.22	D

Por otra parte las familias GM708 y CM9816 también tuvieron QTLs en el grupo de ligamiento G (tabla 3.3), otros seis QTLs fueron únicos entre las tres familias. Los resultados obtenidos sugieren que estas regiones del genoma que controlan el contenido de  $\beta$ -caroteno en las raíces de yuca son comunes para diferentes fuentes que incrementan el contenido de  $\beta$ -caroteno, pero también son únicas con respecto a la fuente evaluada. La acción de los genes para todos los QTLs anteriormente mencionados son a través de efectos aditivos; sin embargo, esto

tiene que ser validado a través de estudios que involucren otras fuentes de segregación para la característica y en diferentes ambientes.

Estudios realizados por Marin (2002) habían detectado la presencia de dos QTLs en el grupo de ligamiento 3 con nueve marcadores SSRs asociados, los cuales explican SSRY313: 40.7%, SSRY251: 37%, NS9: 33.6%, SSRY66: 27.6%, NS717: 24.9%, SSRY9: 18.7%, NS980: 9%, SSRY92: 7.8% y SSRY60: 7% de la varianza fenotípica total.

Un segundo posible QTL para carotenos había sido reportado en el grupo de Ligamiento A del mapa genético de yuca (Fregene *et al.*, 1997), que explicaba un 7% de la varianza fenotípica observada. Lo anterior concuerda con los resultados encontrados en este estudio donde esta región está contribuyendo a la expresión de la característica. Se podría decir que existen dos regiones del genoma de yuca asociadas con el contenido de  $\beta$ - carotenos, ubicadas en el grupo 1 y 9 para la población S<sub>1</sub> y en el grupo A y D para el mapa F<sub>1</sub> de yuca.

Por otra parte en el estudio realizado por los análisis de regresión utilizando el programa QGENE, mapdisto y WinQTLcart, muestran cinco grupos de ligamiento los cuales presentan marcadores asociados con posibles QTLs para carotenos totales con efecto significativo ( $P=0.005$ ) con siete marcadores microsatélites: NS-980, SSRY-9, SSRY-66, NS-717, SSRY-313, SSRY-251, NS-109 ubicados en el grupo de ligamiento 1 del mapa genético para la característica contenido de carotenos, con una probabilidad de  $P<0.001$  los cuales explican desde 7.3% a 37.2% (tabla 3.3) respectivamente la variación fenotípica observada. Como se observa, tanto los resultados obtenidos en este estudio como los realizados por Marin (2002,2008) muestran claramente la presencia de loci de características cuantitativas controlado el contenido de carotenoides en las raíces de yuca.

Uno de los marcadores fuertemente asociado al contenido de  $\beta$ - caroteno fue SSRY-251, el cual explica el 37% de la varianza fenotípica, la segregación de este marcador mostró una alta correlación con el contenido de  $\beta$ - caroteno ( $r \geq 0.8$ ). Además se pudo observar que cuando la intensidad del color de la raíz tenía una calificación de 8 en la escala visual, estaba asociado con la homocigosidad del tamaño pequeño del alelo para el SSRY251. Lo cual lo convierte en un marcador candidato en un programa de selección asistida por marcadores encaminada hacia la identificación de genotipos con altos contenidos de carotenoides. (Marin, 2002).

**Tabla 3.3** Marcadores SSR asociados con carotenos totales (2008) por análisis de regresión simple con QGENE.

MARCADORES		G.L	P	V.E
SSRY313	1	1	0.0000	27.7%
SSRY251	2	1	0.0000	32.0%
NS109	3	1	0.0000	37.2%
SSRY66	4	1	0.0000	16.4%
NS717	5	1	0.0000	16.9%
SSRY9	6	1	0.0000	12.7%
NS980	7	1	0.001	7.3%
SSRY92	8	1	0.0031	6.5%
SSRY60	9	1	0.054	3.3%
SSRY95	10	6	0.0359	3.4%
SSRY223	11	11	0.0424	3.3%
SSRY177	12	11	0.0275	4.4%
SSRY272	13	18	0.0347	3.5%
SSRY242	14	24	0.0109	4.7%

G.L = Grupo de ligamiento; P = Valor de probabilidad; V.E = Varianza explicada. \*Significancia estadística a niveles  $\leq 0.01$ .

También evaluó el color de pulpa de la raíz como una característica altamente correlacionada con el contenido de carotenos en las raíces de yuca y encontró que

los mismos siete marcadores con una probabilidad de  $P < 0.001$  explican entre el 19.5 al 44.7% de la variación fenotípica total observada (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4** Marcadores microsatélites asociados con el color de pulpa de la raíz (2008) por análisis de regresión simple con QGENE. (Marin, 2008).

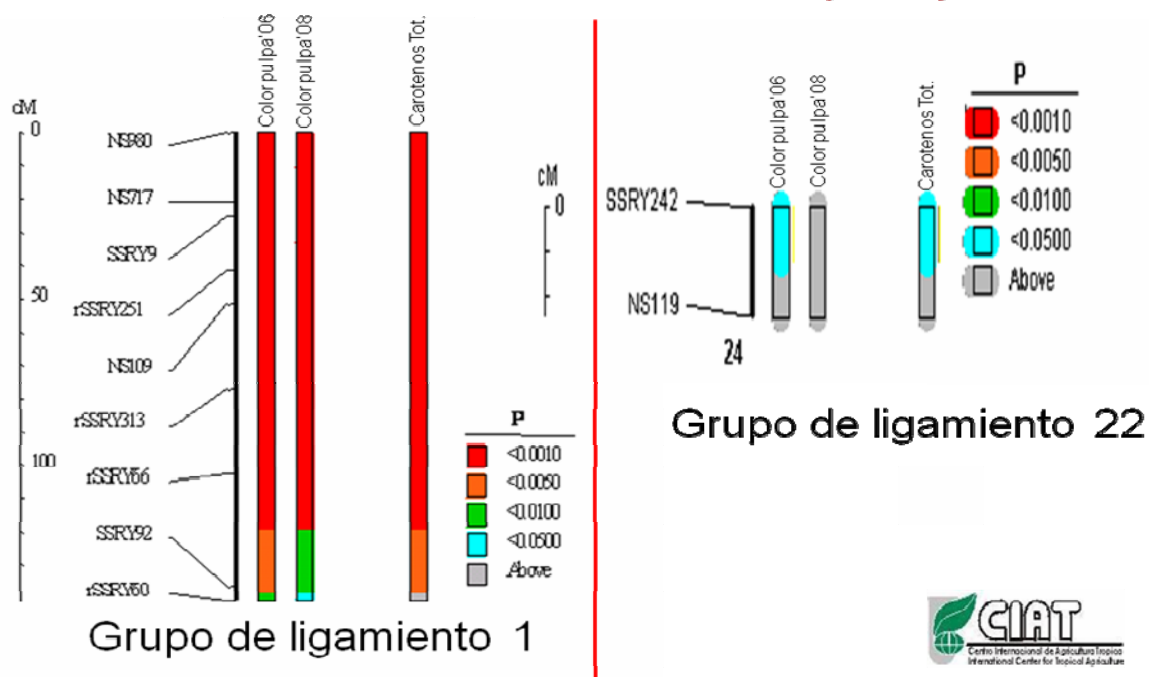
Microsatélite	Probabilidad	Varianza Explicada (%)
SSRY-313	0.0000	35.2
SSRY-251	0.0000	42.7
SSRY-66	0.0000	26.1
NS-717	0.0000	24.7
SSRY-9	0.0000	20.5
SSRY-242	0.0424	19.5

\*Significancia estadística a niveles  $\leq 0.01$ .

Todos los marcadores que se encuentran ubicados en el grupo de ligamiento 1 del mapa genético generado para la característica contenido de carotenos totales (Marin, 2008), correspondiente al grupo de ligamiento D del mapa de yuca (Fregene *et al.*, 1997) han mostrado en varios estudios que están controlando de una u otra manera tanto el contenido de carotenos totales como el color de la pulpa en las raíces de yuca, lo cual se puede observar claramente en la figura 3.1, donde cada color representa la probabilidad de que un marcador microsatélite esté o no ligado a un QTL.

También podemos observar en la figura 3.2 que los marcadores que tienen un color rojo como NS-717, SSRY-9, SSRY-251 y SSRY-313 tienen un efecto altamente significativo en el grupo de ligamiento 1 con una probabilidad de  $P < 0.001$ . En el grupo de ligamiento 22 encontramos el marcador SSRY-242, el cual también ha mostrado consistencia en cuanto a la evaluación del polimorfismo en diferentes poblaciones de yuca de raíces amarillas, este marcador hace un gran aporte a la variación contenida ( $P < 0.0500$ ) en este grupo de ligamiento (Figura 3.1).

## ANÁLISIS DE MARCADOR SIMPLE (A.S.M)



**Figura 3.1.** Marcadores microsatélites asociados a posibles QTLs para la característica contenido de carotenos totales (2008), color de pulpa de la raíz (2006-2008), análisis realizado con QGENE. Figura 3.1a. Grupo de ligamiento 1. Figura 3.1b. Grupo de ligamiento 22 (Marin, 2008).

Según los resultados obtenidos por el mapeo por intervalo en el cual se usó un LOD score  $\geq 3.0$  con múltiples regresiones lineales se obtuvo que los marcadores SSRY-313, SSRY-251, SSRY-66, SSRY-242, NS-717 y SSRY-9 explicaron entre el 20-40% de la variación fenotípica total observada con una probabilidad de  $P < 0.001$ . Por otra parte Marin (2008) encontró que para la característica contenido de carotenos totales estos mismos marcadores que están ubicados en el grupo de ligamiento 1 (SSRY-313, SSRY-251, SSRY-66, NS-717, SSRY-9) explican 27.7%, 32%, 37.2%, 16.4%, 16.4%, 16.9% y 12.7% respectivamente de la varianza fenotípica total observada. Por lo anterior estos marcadores están mostrando un comportamiento similar en la evaluación de la característica en diferentes tipos de poblaciones.

Los análisis de mapeo por intervalo se encontraron cinco posibles QTLs de primer orden los cuales se encuentran en los intervalos QCCT1 (SSRY60-SSRY66); QCCT2 (SSRY66-SSRY313), QCCT3 (SSRY313-NS109), QCCT4 (NS109-SSRY251), QCCT5 (SSRY251-NS717) y en el grupo de ligamiento 1 del mapa genético que se tiene para la característica; además, este tipo de análisis pone de manifiesto un efecto aditivo positivo sobre el incremento del contenido de carotenos en las raíces de yuca.

Para la característica color de pulpa de la raíz usando un LOD score mayor a 3.0, encontró 5 posibles QTLs ubicados en el grupo de ligamiento 1 entre los intervalos QCPR8-1 (SSRY60-SSRY66), QCPR8-2 (SSRY66-SSRY313), QCPR8-3 (SSRY313-NS109), QCPR8-4 (NS109-SSRY-251) y QCPR (SSRY251-NS717). Marin (2008).

Los análisis de mapeo de intervalo compuesto empleando 10.000 permutaciones muestran que 3 QTLs de primer orden que se ubican entre los intervalos QCCT1 (SSRY66-SSRY313), QCCT2 (SSRY313-NS109) y QCCT3 (NS109-SSRY251), están controlando el contenido de carotenos totales y que explican alrededor del 40% de la variación fenotípica observada. Para el color de pulpa de la raíz se han encontrado 4 QTLs de primer orden localizados en los intervalos QCPR8-1 (SSRY66-SSRY313), QCPR8-2 (SSRY313-NS109), QCPR8-3 (NS109-SSRY251), QCPR8-4 (SSRY251-NS717) y sobre el grupo de ligamiento 1 (Marin, 2008).

Los estudios de mapeo genético para el contenido de carotenos en raíces de yuca usando diferentes tipos de poblaciones han permitido la identificación y la localización de cuatro QTLs para el contenido de carotenos totales y cinco para el color de pulpa de la raíz (Marin, 2008), localizados en el mismo grupo de ligamiento y en los mismos intervalos, esto podría explicar los altos valores de correlación que existen entre las dos características ( $r^2 = 0.89$ ) o por la presencia de genes ligados presentes en esta región cromosómica.



Las interacciones producidas entre QTLs de primer y segundo orden pueden ser las responsables de las correlaciones altas y positivas que se presentan entre contenido de carotenos totales y color de pulpa de la raíz aunque también pueden ser explicadas por factores de epistáticos, ya que es posible que algunos QTLs puedan tener un efecto modificador y contribuir así a la variación genotípica (Marin, 2008).

Análisis de marcadores basados en QTLs han probado ser útiles en la estimación del número de loci mayores que afectan un carácter dado, en elucidar la evolución de las características fenotípicas y en proporcionar insignias dentro de la organización del genoma y facilitando el análisis de las ruta biosintéticas. Muestra de ello son la determinación de rutas usando QTLs en diferentes investigaciones, tales como: el estudio de los niveles de flavonoides y los loci que codifican enzimas de la ruta general del fenilpropanoides que afectan las concentraciones de seda, un factor de resistencia al gusano del grano (Byrne *et al.*, 1996, 1998; McMullen *et al.*, 1998); Actividades y concentraciones de enzimas claves del metabolismo de carbohidratos en maíz (Prioul *et al.*, 1999); Niveles de ácido erucico en *Brassica napus* (Fourmann *et al.*, 1998); Identificación de QTLs asociados con la acumulación de acil-azúcar en tomate silvestre (Blauth *et al.*, 1998) y el mapeo de genes estructurales clonados de la ruta biosintética de los carotenoides en pimentón (Thorup *et al.*, 2000).

QTLs asociados con productos de la ruta de los carotenoides, incluyendo el licopeno y los carotenos provitamina A, carotenos alfa y  $\beta$ -caroteno, fueron realizados en dos poblaciones F2 de zanahorias no relacionadas, derivadas de cruces entre naranjas cultivadas B493 y la blanca silvestre QAL (población 1) y naranjas cultivadas Brasilia y naranja cultivada oscura HCM (población 2). El mapeo de intervalo en la población 2 detectó cuatro, ocho, tres, uno y cinco QTLs putativos asociados con la acumulación de  $\beta$ -caroteno,  $\delta$ -caroteno y  $\alpha$ -caroteno,

licopeno y fitoeno, respectivamente. Entre estos, los QTLs mayores explicaron 13.0%, 10.2%, 13.0%, 7.2% y 10.2% de la variación fenotípica total. (Santos y Simón, 2002).

En la población 1 el análisis de simple marcador identificó loci que explicaban más de 13.8%, 6.8%, 19.3%, 5.7% y 17.5%, respectivamente de la variación fenotípica total de estos mismos carotenoides. Todos los análisis demostraron agrupamientos de estos QTLs asociados con la ruta de los carotenoides. Estos resultados sugieren que el agrupamiento de loci relacionados a la ruta es favorecido durante la evolución, además pares estrechamente ligados a la ruta no son fácilmente separados por recombinación y por lo tanto pueden ser fácilmente transmitidos a la progenie (Santos y Simón, 2002). Teniendo en cuenta lo anterior vemos que el contenido de carotenoides en diferentes especies vegetales es compleja y puede estar asociada con loci que codifican para características cuantitativas (QTLs) lo cual puede complicar los procesos de mejoramiento genético de esta característica.

El mapeo genético y análisis de QTLs utilizados para estudiar el contenido de carotenos totales y el color de pulpa en la raíz han sido fundamentales para entender la genética de esta característica, la interacción genotipo por ambiente, la heredabilidad y para identificar regiones del genoma asociadas mediante el uso de marcadores microsatélites y así contribuir el mejoramiento de la calidad nutricional de la yuca.

### **3.2.2 Validación de QTLs en Familias S1:**

En la tabla 3.5 se pueden observar los contenidos de carotenos totales y de  $\beta$ -carotenos que se obtuvieron al evaluar los parentales a partir de los cuales se originaron las familias S1, usando espectrofotometría y HPLC respectivamente. Los contenidos de carotenos totales de los parentales estuvieron comprendidos en

un rango entre 0 a 12 ug/gPF y el de  $\beta$ - caroteno entre 0-11 ug/gPF en donde claramente se pudo observar que del contenido total de carotenos hasta el 91% corresponde a  $\beta$ - caroteno.

**Tabla 3.5** Contenido de carotenos totales y de beta-carotenos con base en peso fresco (PF) para los parentales de las familias S1.

Genotipo	Total carotenos (ug/gPF)	Total $\beta$ -Caroteno (ug/g PF)	% $\beta$ -caroteno respecto al total
CM 9816-1	4,48	3,58	80,01
CM 9816-2	10,98	10,00	91,09
CM 9816-5	1,70	1,11	65,27
CM 9816-6	6,86	5,60	81,59
GM 708 - 20	0,43	0,26	60,88
GM 708 - 27	0,46	0,32	69,63
GM 708 - 37	10,57	7,69	72,78
GM 708 - 47	12,04	10,78	89,52
GM 708 - 50	10,29	6,78	65,95
GM 708 - 63	12,75	9,64	75,56
GM 893 - 4	6,68	5,92	88,74
GM 893 - 5	9,17	8,33	90,88
GM 893 - 8	6,80	5,33	78,33
GM 893 - 16	6,94	5,79	83,37
GM 893 - 18	2,62	2,08	79,40

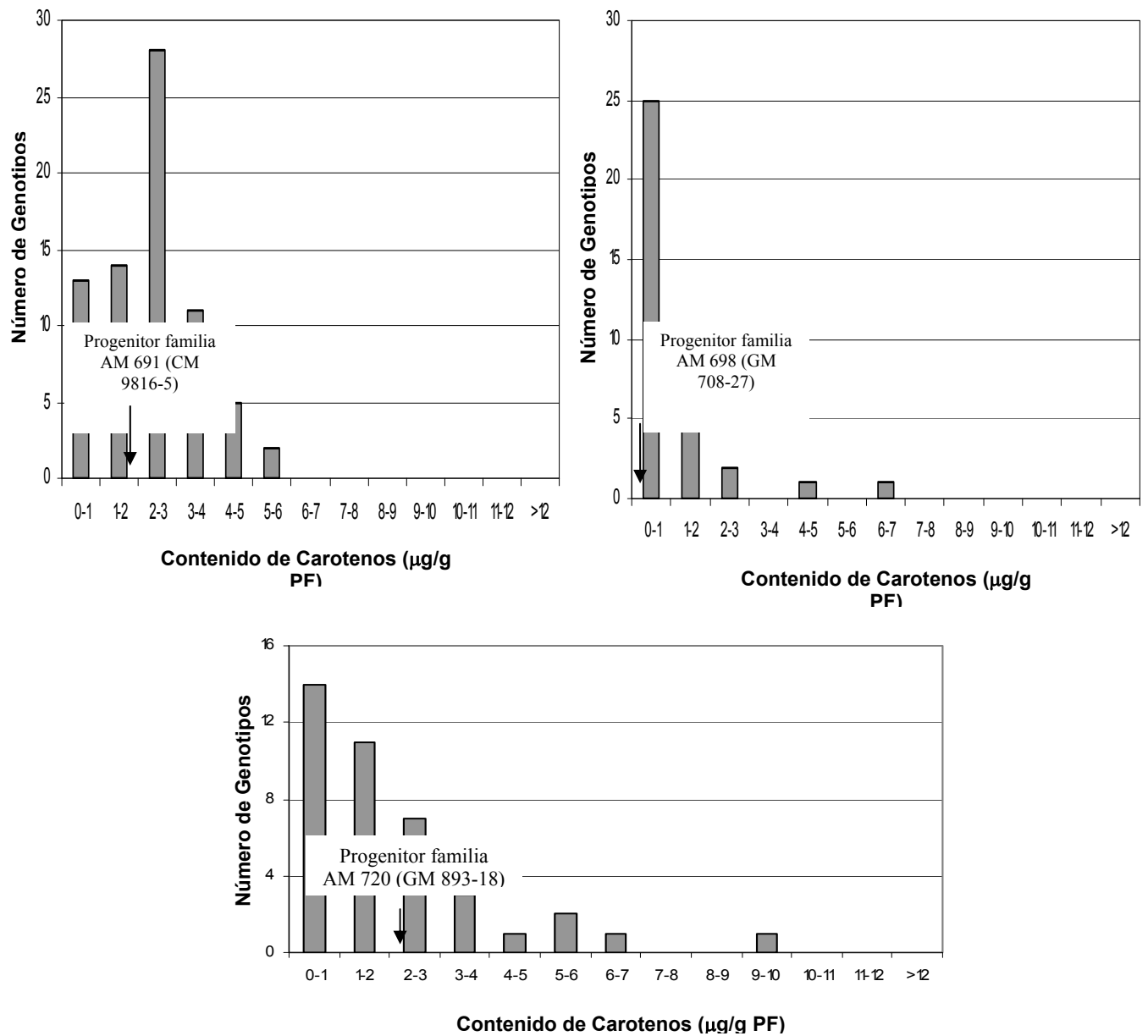
En la tabla 3.6 se presenta los valores del contenido de carotenos totales ( $\mu\text{g/g}$ ) con base en peso fresco de 12 familias S<sub>1</sub>. Estos resultados son presentados para mostrar como es el patrón de segregación del contenido de carotenos en estudios en los cuales se utilizan este tipo de poblaciones. En donde se puede observar el gran patrón de segregación de esta característica y por ende la diversidad genética en cuanto al contenido de carotenos totales se tienen en las Familias S1 evaluadas.

**Tabla 3.6** Segregación para el contenido de carotenos totales ( $\mu\text{g/g}$ ) con base en peso fresco en 12 familias S1.

Progenitor	Familia S1	Contenido Carotenos Totales ( $\mu\text{g/g}$ PF)			
		Media	Mínimo	Máximo	Desv.St
<b>CM 9816-1</b>	AM 689	4.73	0.46	11.37	2.69
<b>CM 9816-2</b>	AM 690	6.51	2.89	13.10	1.82
<b>CM 9816-5</b>	AM 691	2.34	0.40	5.89	1.18
<b>CM 9816-6</b>	AM 692	5.31	2.02	9.13	1.49
<b>GM 893-5</b>	AM 710	6.38	4.85	8.95	0.77
<b>GM 893-8</b>	AM 712	3.31	0.44	8.41	2.06
<b>GM 893-16</b>	AM 718	5.90	3.19	9.24	1.28
<b>GM 893-18</b>	AM 720	2.28	0.14	9.72	2.22
<b>GM 708 - 20</b>	AM 697	0.54	0.26	0.89	0.15
<b>GM 708 - 27</b>	AM 698	1.10	0.30	6.56	1.25
<b>GM 708 - 47</b>	AM 700	2.40	2.01	2.79	0.55
<b>GM 708 - 63</b>	AM 702	6.46	0.63	19.10	5.92

### 3.2.3 Análisis de Distribución de Frecuencias del contenido de carotenos totales en las familias S1:

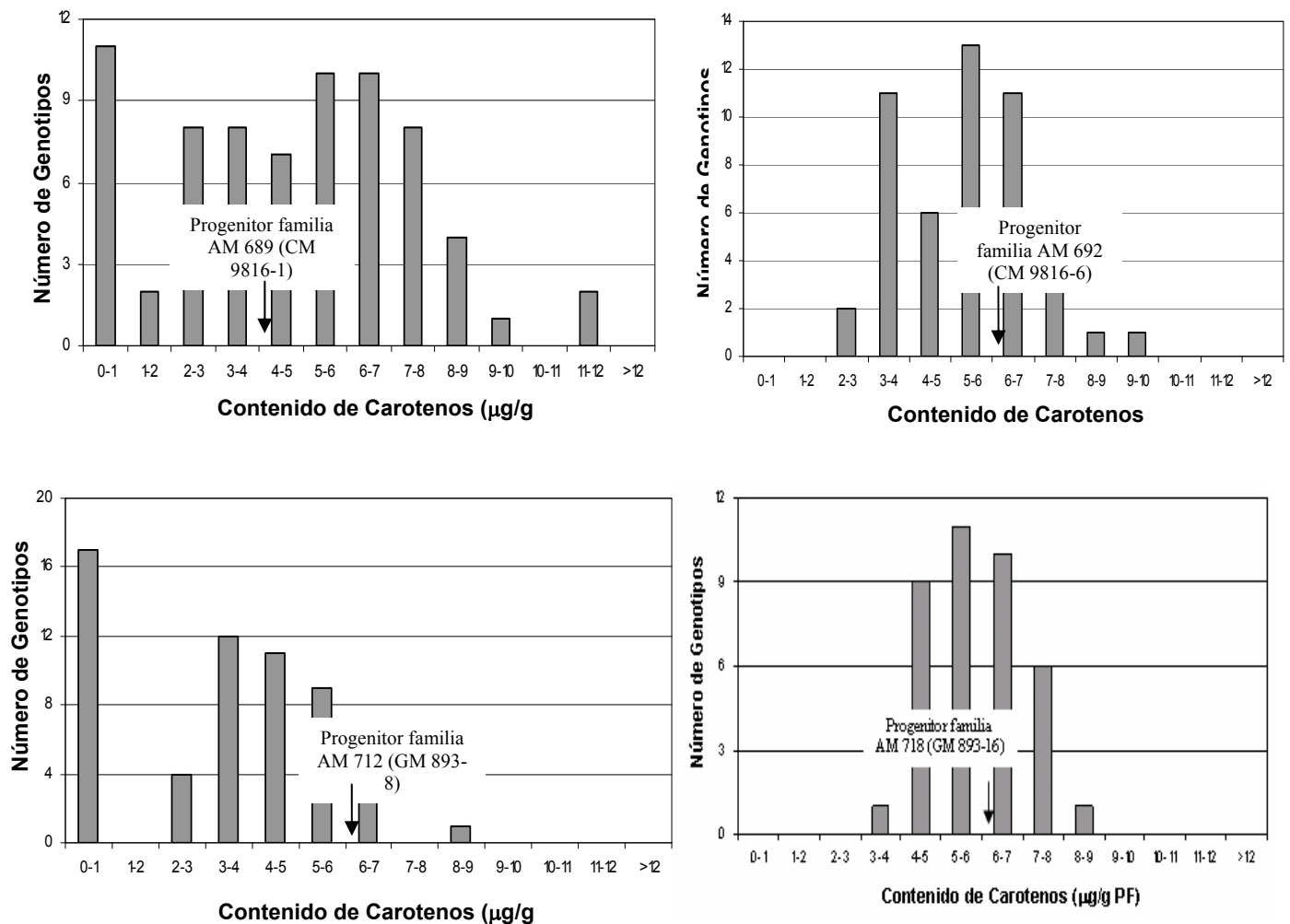
En general en los análisis de la frecuencia de distribución de los valores del contenido de carotenos totales en los individuos S1, provenientes de la autofecundación de los genotipos CM9816-1, CM9816-2, CM9816-5, CM9816-6, GM708-20, GM708-27, GM708-63, GM893-5, GM893-8, GM893-16 y GM893-18; se pudo observar que muchos genotipos S1 provenientes de progenitores con bajo contenido de carotenos totales muestran valores mas altos de carotenos totales que su respectivo progenitor. Esto se pudo observar principalmente en las familias AM-691, AM-697, AM-698 y AM-720 (Figura 3.2). Poniendo de manifiesto la naturaleza heterocigota de la yuca por lo cual muchos de los loci se encuentran en estado heterocigoto y por lo tanto segregan produciendo variabilidad en la característica evaluada.



**Figura 3.2.** Análisis de Distribución de Frecuencias del Contenido de Carotenos en las Familias S1: AM-691, AM-698 y AM-720.

En el caso de progenes provenientes de progenitores que presentaban contenidos intermedios de carotenos, se observaron distribuciones más simétricas (Figura 3.3). en donde la mayoría de los individuos presentan contenidos

intermedios de carotenos. Esto se pudo observar en las progenies que dieron origen a las familias: AM-689, AM-692, AM-712 Y AM-718.



**Figura 3.3.** Análisis de Distribución de Frecuencias del Contenido de Carotenos en las Familias S1: AM-689, AM-692 AM-712.y AM-718.

Similarmente, progenies de progenitores con altos valores tienden a estar a la izquierda del valor de su progenitor, en otras palabras, muchos de los genotipos S1 de progenitores presenta valores de contenido de carotenos totales mas bajos que los de su respectivo progenitor. En el caso de progenies de progenitores con valores intermedios de carotenos totales, las distribuciones tienden a ser más simétricas.

En cada caso hubo siempre progenies con valores más altos en contenido de carotenos totales que sus respectivos progenitores. Igualmente en el caso de progenies provenientes de progenitores con valores altos (familias AM 690, AM710 y AM 718) pocos genotipos tuvieron contenidos de carotenos totales más altos que sus respectivos progenitores. Estos resultados sugieren que la herencia de esta característica no es debida solo a un gen sino que pueden ser o dos o máximo tres genes, los que probablemente estén controlando la expresión del contenido de carotenos en las raíces de yuca, aunque también evidencia la buena capacidad que tienen los parentales para transmitir esas características a su progenie lo cual también es mas adelante corroborado por el valor de heredabilidad.

### 3.2.4 Concentración de $\beta$ -Caroteno en raíces de yuca en las familias S1

En el trabajo de investigación para determinar la herencia del contenido de carotenos de yuca, llevado a cabo por Morillo Y, (2009) se hizo la cuantificación de carotenoides individuales entre estos:  $\beta$ -caroteno, luteína,  $\alpha$ -caroteno y fitoeno en solo 93 genotipos en las doce familias S1 que están siendo evaluadas en este estudio. En la tabla 3.7 se puede observar la estadística descriptiva para la variable contenido de  $\beta$ -caroteno obtenido en los 93 genotipos S<sub>1</sub>.

**Tabla 3.7** Contenido de  $\beta$ -caroteno obtenido mediante el análisis HPLC para los progenitores y sus respectivas progenies S1 (Morillo Y. 2009).

Progenitor	Familia S <sub>1</sub>	n	Total $\beta$ -Caroteno (ug/g Peso fresco)			
			Promedio	Mínimo	Máximo	Desv.St
CM 9816-1(3,58)	AM 689	7	5.28	0.31	8.39	3.10
CM 9816-2 (10,00)	AM 690	11	7.29	2.50	11.67	2.63
CM 9816-5 (1,11)	AM 691	9	2.70	0.48	4.60	1.35
CM 9816-6 (5,60)	AM 692	10	5.12	1.36	7.18	1.68
GM 893 - 5 (8,33)	AM 710	7	5.84	4.58	8.11	1.18
GM 893 - 8 (5,33)	AM 712	9	4.39	0.29	7.49	1.98
GM 893 - 16 (5,79)	AM 718	7	5.78	2.20	8.11	2.08
GM 893 - 18 (2,08)	AM 720	6	5.33	2.37	8.63	2.26
GM 708 - 20 (0,26)	AM 697	7	0.21	0.14	0.27	0.05
GM 708 - 27 (0,32)	AM 698	9	1.51	0.41	5.62	1.77
GM 708- 47 (10,78)	AM 700	2	1.69	1.25	2.14	0.63
GM 708- 63 (9,64)	AM 702	9	9.15	1.75	12.75	3.69

Se encontró un amplio rango de variación en cuanto al contenido de  $\beta$ -caroteno en las raíces de las familias S1, encontrándose valores mínimos desde 0.14  $\mu\text{g/g}$  (base en peso fresco PF) en la familia AM697, hasta 12.75  $\mu\text{g/g}$  PF en la familia AM702. El genotipo identificado como AM 702-14 con un contenido de carotenos totales de 19.10  $\mu\text{g/g}$  PF, presentó el valor más alto del contenido de  $\beta$ -caroteno en raíces de 12.75  $\mu\text{g/g}$  PF (Tabla 3.7). En general se pudo observar que algunos genotipos superaron los contenidos de  $\beta$ -caroteno del progenitor, otros presentaron niveles más bajos, lo cual implica que hay factores genéticos que todavía no se han fijado completamente y que siguen segregando, por lo tanto es necesario seguir avanzando en las autofecundaciones para lograr así reunir los alelos favorables que incrementen este tipo de carotenoides con calidad nutricional.

En cuanto a los contenidos de luteína Morillo Y (2009) encontró desde concentraciones no detectables o cuantificables por el equipo HPLC hasta un valor máximo de 1.34  $\mu\text{g/g}$  PF en las familias AM702 (Tabla 3.8). Los resultados encontrados aquí concuerdan con los resultados de las investigaciones de Adewusy y Bradbury (1993) y Cárdenas (2003) quienes también concluyeron que las raíces de yuca no son muy eficientes en acumular luteína o que existen factores ambientales o genéticos que están direccionando la ruta biosintética hacia otros tipos de carotenoides como  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, fitoeno entre otros, es decir, una alta concentración de otros carotenoides a expensas de bajas concentraciones de luteína.



**Tabla 3.8** Contenido de Luteína obtenido mediante el análisis HPLC para los progenitores y sus respectivas progenies S<sub>1</sub> (Morillo Y, 2009).

Progenitor	Familia S <sub>1</sub>	n	Total Luteína (ug/g Peso fresco)			
			Promedio	Mínimo	Máximo	Desv.St
CM 9816-1(0.05)	AM 689	7	0.11	0.03	0.27	0.09
CM 9816-2 (0.05)	AM 690	11	0.07	0.02	0.18	0.05
CM 9816-5 (0.03)	AM 691	9	0.05	0.00	0.08	0.02
CM 9816-6 (0.06)	AM 692	10	0.10	0.01	0.20	0.06
GM 893 - 5 (0.02)	AM 710	7	0.06	0.00	0.13	0.04
GM 893 - 8 (0.09)	AM 712	9	0.06	0.00	0.16	0.05
GM 893 - 16 (0.08)	AM 718	7	0.06	0.00	0.11	0.04
GM 893 - 18 (0.05)	AM 720	6	0.07	0.01	0.17	0.07
GM 708 - 20 (0.00)	AM 697	7	0.02	0.00	0.03	0.01
GM 708 - 27 (0.01)	AM 698	9	0.00	0.00	0.00	0.00
GM 708- 47 (0.00)	AM 700	2	0.00	0.00	0.00	0.00
GM 708- 63 (0.26)	AM 702	9	0.40	0.02	1.34	0.41

Al igual que las concentraciones de luteína los de  $\alpha$ -caroteno en los 93 genotipos S<sub>1</sub> fue bajo, encontrándose desde valores no detectables o cuantificables por el equipo HPLC hasta 0.25  $\mu$ g/g PF para la familia AM 690 (Tabla 3.9). En los trabajos realizados por Cárdenas (2003) las concentraciones de  $\alpha$ -caroteno también fueron extremadamente bajas (entre 0 a 0.25 mg/100 g de materia seca). Teniendo en cuenta los resultados de estas investigaciones se puede observar que las raíces de yuca no son buenas acumuladoras de luteína y de  $\alpha$ -caroteno, además cuando se presentan bajas cantidades de este último pigmento carotenoide se produce por ende bajas concentraciones de luteína pues el  $\alpha$ -caroteno es el sustrato a partir del cual se forma la luteína.

**Tabla 3.9** Contenido de  $\alpha$ -caroteno obtenido mediante el análisis HPLC para los progenitores y sus respectivas progenies S1 (Morillo Y, 2009).

Progenitor	Familia S <sub>1</sub>	n	Contenido $\alpha$ -Caroteno (ug/g Peso fresco)			
			Promedio	Mínimo	Máximo	Desv.St
CM 9816-1(0.04)	AM 689	7	0.07	0.00	0.13	0.05
CM 9816-2 (0.05)	AM 690	11	0.09	0.00	0.25	0.06
CM 9816-5 (0.03)	AM 691	9	0.04	0.00	0.06	0.02
CM 9816-6 (0.08)	AM 692	10	0.07	0.03	0.15	0.04
GM 893 - 5 (0.03)	AM 710	7	0.06	0.00	0.11	0.03
GM 893 - 8 (0.06)	AM 712	9	0.04	0.00	0.06	0.02
GM 893 - 16 (0.09)	AM 718	7	0.08	0.03	0.15	0.04
GM 893 - 18 (0.03)	AM 720	6	0.07	0.00	0.09	0.03
GM 708 - 20 (0.00)	AM 697	7	0.00	0.00	0.00	0.00
GM 708 - 27 (0.00)	AM 698	9	0.00	0.00	0.00	0.00
GM 708- 47 (0.07)	AM 700	2	0.00	0.00	0.00	0.00
GM 708- 63 (0.15)	AM 702	9	0.04	0.00	0.09	0.03

### 3.2.5 Concentración de Fitoeno en raíces de yuca en las Familias S1

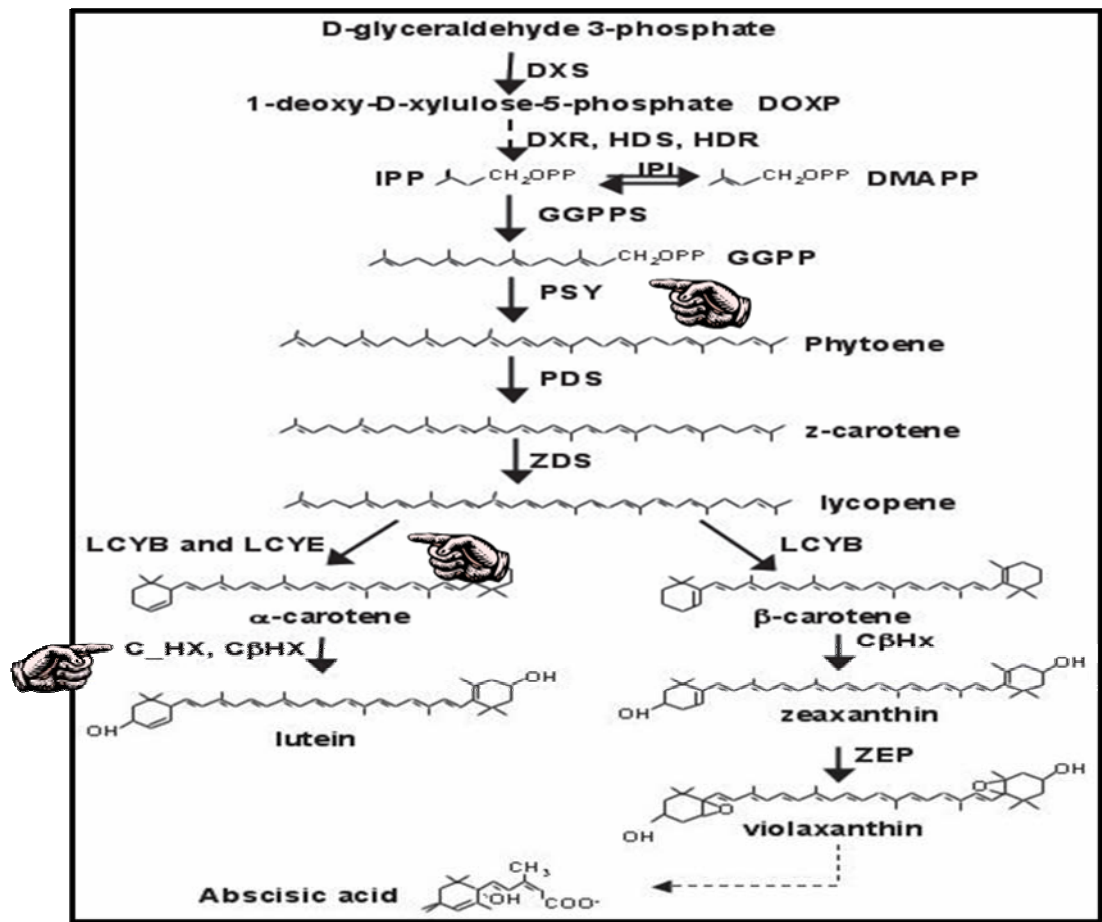
En general, se pudo observar una amplia variación del contenido de fitoeno en las raíces de yuca de los genotipos S1, desde valores comprendidos de 0 para la familia AM 697 hasta 4.19 ug/g PF para la familia AM710 (Tabla 3.10). En general se pudo observar que los genotipos S1 que poseen altos contenidos de carotenos totales presentan altos contenidos de  $\beta$ -caroteno y por ende de fitoeno, esto se pudo ver claramente con los análisis de correlación los cuales muestran una asociación positiva entre estas variables. Cabe anotar que el fitoeno es el primer pigmento incoloro que se forma en la ruta biosintética constituyendo así el sustrato a partir del cual se sintetizan la gran diversidad carotenoides presentes en la naturaleza. Por lo tanto genotipos que acumulen grandes cantidades de este pigmento podrán ser interesantes para estudios genético-moleculares que conduzcan al entendimiento de los complejos mecanismos que rigen la síntesis, el transporte y la acumulación de los carotenoides en vegetales.

Los análisis del contenido de fitoeno en las raíces de yuca de las familias S1 se muestran en la tabla 3.10.

**Tabla 3.10** Contenido de Fitoeno obtenido mediante el análisis HPLC para los progenitores y sus respectivas progenies S1. (Morillo Y, 2009).

Progenitor	Familia S <sub>1</sub>	n	Contenido Fitoeno (ug/g Peso fresco)			
			Promedio	Mínimo	Máximo	Desv.St
CM 9816-1(0.04)	AM 689	7	1.29	0.08	2.49	0.92
CM 9816-2 (0.58)	AM 690	11	2.39	0.17	4.18	1.11
CM 9816-5 (0.01)	AM 691	9	0.30	0.04	1.12	0.36
CM 9816-6 (0.09)	AM 692	10	0.82	0.12	2.99	0.93
GM 893 - 5 (3.47)	AM 710	7	2.80	0.99	4.19	1.23
GM 893 - 8 (1.04)	AM 712	9	0.98	0.03	2.89	0.97
GM 893 - 16 (1.27)	AM 718	7	1.61	0.57	1.18	0.60
GM 893 - 18 (0.24)	AM 720	6	1.23	0.40	1.74	0.59
GM 708 - 20 (0.06)	AM 697	7	0.04	0.00	0.03	0.02
GM 708 - 27 (0.03)	AM 698	9	0.27	0.01	1.64	0.54
GM 708- 47 (1.50)	AM 700	2	0.21	0.17	0.26	0.06
GM 708- 63 (1.21)	AM 702	9	0.82	0.15	1.29	0.36

Los anteriores resultados muestran en las raíces de yuca la ruta biosintética de los carotenoides es compleja y que los factores genéticos anteriormente identificados están actuando interrelacionados y que es necesario cuantificar la magnitud de su efecto para determinar cuales son los mecanismos que regulan el transporte, la acumulación y síntesis de los carotenoides y así poder direccionar la ruta biosintética hacia una mayor producción de carotenoides con actividad provitamina A ( $\beta$ -caroteno). Se tienen cuantificados los contenidos de fitoeno, luteína,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno ahora es necesario que volvamos sobre la ruta biosintética y tratemos de identificar los factores enzimáticos asociados para poder así mediante el uso de herramientas biotecnológicas mejorar los contenidos de carotenos y por ende la calidad nutricional de las raíces de yuca (Figura 3.4).

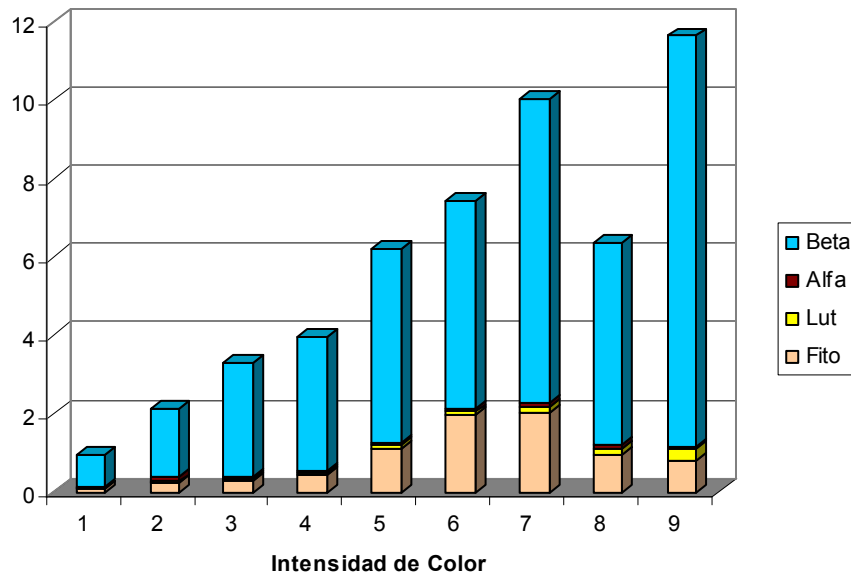


(Cunningham, 2002).

**Figura 3.4.** Ruta biosintética de los carotenoides (Cunningham, 2002) mostrando los factores genéticos claves.

En general en la figura 3.5 se puede observar la relación entre la intensidad del color de las raíces medida por una escala visual de colores (escala de 1 a 8) y el contenido promedio de los carotenoides individuales  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, Luteína y Fitoeno en las doce familias S1. Los individuos que presentan altos contenidos de carotenoides tienden a acumular también en altas cantidades fitoeno y en menor proporción pigmentos como luteína y  $\alpha$ -caroteno, poniendo de manifiesto que las raíces de yuca son potencialmente capaces de almacenar pigmentos con alta actividad provitamina A y que mediante un esquema de mejoramiento se podría aprovechar estas cualidades para encontrar genotipos que puedan llegar a acumular tanta cantidad de pigmento que sea suficiente para

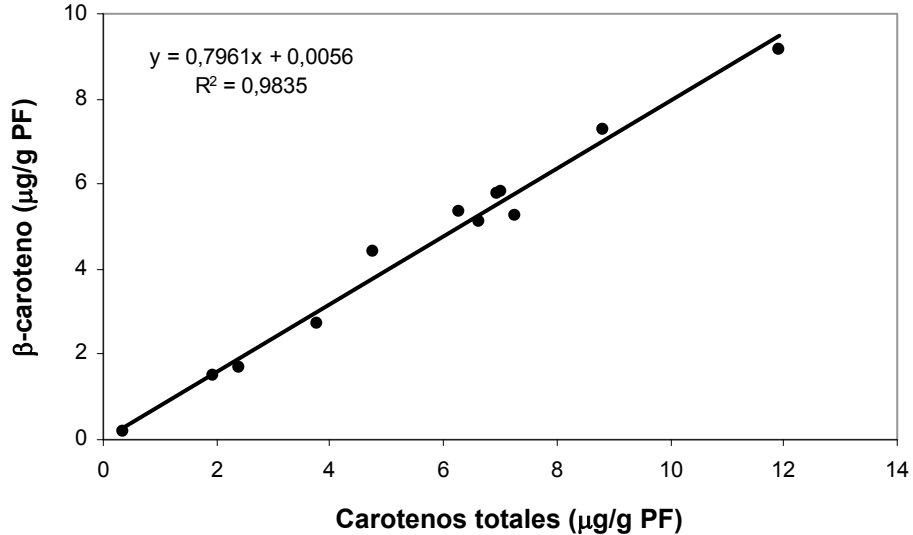
suplir las deficiencias de vitamina A en las regiones en donde la yuca es ampliamente cultivada y consumida.



**Figura 3.5.** Relación entre la intensidad de color en las raíces (basada en una escala visual de 1 a 8) y el promedio del contenido de Beta-caroteno, Alfa-caroteno, Luteína y Fitoeno en cada clase. (Morillo Y, 2009).

### 3.2.6 Correlación entre el contenido de carotenos totales y el contenido de Beta-caroteno en raíces de yuca de las familias S1.

El análisis de correlación entre el contenido de carotenos totales y el contenido de  $\beta$ -caroteno mostró una relación lineal y directa, lo cual muestra que a medida que aumenta la concentración de carotenos totales en las raíces de yuca también aumenta la concentración de  $\beta$ -caroteno. El coeficiente de correlación fue de 0.99 y un  $r^2$  de 0.98 (Figura 3.6). Lo anterior muestra que del total del contenido de carotenos en las raíces de yuca, la mayor parte corresponde a  $\beta$ -caroteno, mostrando así una tendencia de estos genotipos a acumular este pigmento carotenoide a expensas de mínimas cantidades de compuestos como luteína y  $\alpha$ -caroteno.



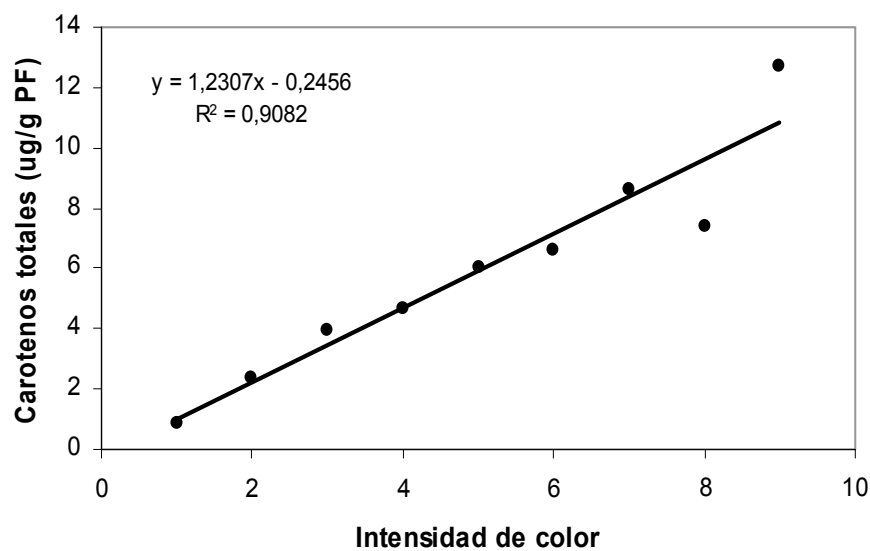
**Figura 3.6.** Relación entre el contenido de carotenos totales ( $\mu\text{g/g}$  con base en peso fresco) y el contenido de  $\beta$ -caroteno en 93 genotipos S1 analizados por el método HPLC. (Morillo Y, 2009).

La información suministrada en estos estudios muestra que los factores de acumulación de los carotenoides son complejos y que es necesario entender las relaciones que existen entre ellos para poder plantear esquemas de mejoramiento que conduzcan a incrementar sus concentraciones y por ende generen yucas con mejor calidad provitamina A.

### **3.2.7 Relación entre el Contenido de Carotenos y el color de raíz en las familias S<sub>1</sub>**

Se ha establecido que existe una buena correlación entre el contenido de carotenos y la intensidad del color de las raíces. La figura 3.7 ilustra la regresión del contenido total de carotenos y el color de intensidad de las raíces de las 12 familias S<sub>1</sub> evaluadas. Se encontró un alto grado de asociación entre estas dos variables de 0.95. Calculando el  $r^2$ , se determinó que el 91% de la variabilidad en el contenido de carotenos totales puede ser explicada por la variabilidad en el color del parénquima, en donde, cada incremento en la intensidad del color representa un incremento proporcional en la concentración de carotenos.

Estos resultados concuerdan con los encontrados por Echeverri (2001), Bolaños (2001), Marín (2008) entre otros, en donde se mantienen los altos valores de correlación entre estas dos variables lo cual implica en términos prácticos que el mejoramiento del contenido provitamina A se podría hacer por una selección visual de la intensidad de color de la raíz, pero tiene mayores alcances y mejora mucho la eficiencia del proceso selección cuando se hace una evaluación cuantitativa del contenido de carotenos (Iglesias *et al.*, 1997).

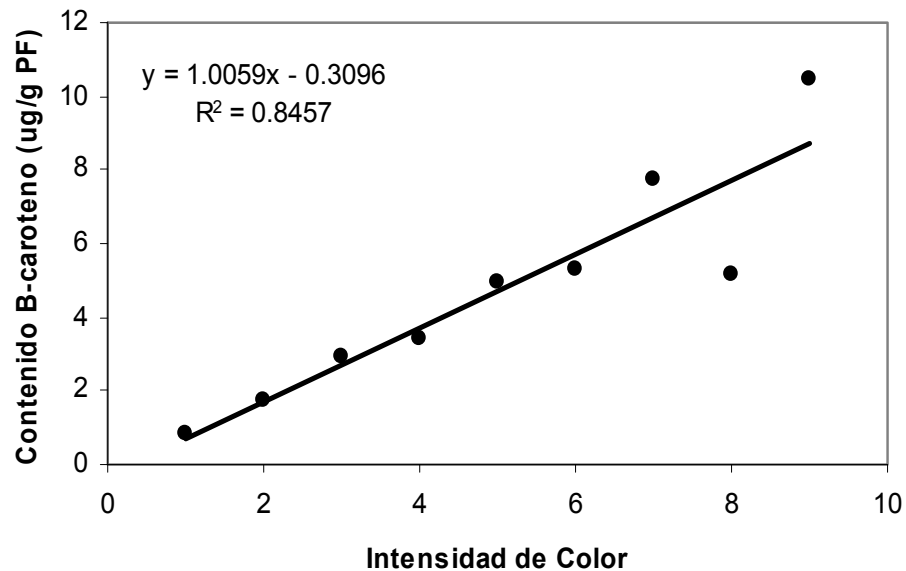


**Figura 3.7.** Relación entre la intensidad de color en las raíces (basada en una escala visual de 1 a 8) y el promedio del contenido de carotenos totales ( $\mu\text{g/g}$  con base en peso fresco) en cada clase. (Morillo Y, 2009).

### 3.2.8 Correlación entre el contenido de Beta caroteno y el color de raíz

Se hizo también la correlación entre el contenido de  $\beta$ -caroteno y el color de la raíz de los 93 genotipos  $S_1$  de yuca que fueron evaluados por HPLC. En la figura 3.8 se puede observar que existe una alta correlación entre estas dos variables, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.9196, es decir que cuando una variable aumenta la otra también lo hace. El valor de  $r^2$  encontrado fue de 0.8457, lo cual significa que el 84.57% de la variabilidad en el contenido de  $\beta$ -caroteno

puede ser explicada por la variabilidad en el color del parénquima, en donde, cada incremento en la intensidad del color representa un incremento proporcional en la concentración de  $\beta$ -caroteno.



**Figura 3.8.** Relación entre la intensidad de color en las raíces (basada en una escala visual de 1 a 8) y el promedio del contenido de beta caroteno ( $\mu\text{g/g}$  con base en peso fresco) en cada clase (Morillo Y, 2009).

En general los patrones de acumulación de estos pigmentos carotenoides en las raíces de yuca especialmente de  $\beta$ -caroteno muestra una amplia variación la cual puede estar ligada con la coloración de este órgano y que hasta el momento no ha sido posible demostrar alguna correlación entre el nivel de expresión transcripcional de los genes involucrados en la ruta (*GGPS*, *PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO* y *LCY- $\beta$* .) de síntesis, y los contenidos de  $\beta$ -caroteno en la raíz (Arango, 2006). Estos resultados generan diversas hipótesis sobre el punto regulador que favorece la acumulación diferencial de  $\beta$ -caroteno en yuca. En este sentido, una posible explicación a las diferencias en el contenido de  $\beta$ -caroteno entre variedades de yuca puede residir en su ruta de catabolismo (Maldonado, 2007).



Maldonado (2007) realizó un estudio para explicar las diferencias en la acumulación de  $\beta$ -caroteno entre raíces de yuca blancas (bajo contenido de  $\beta$ -caroteno) y amarillas (alto contenido de  $\beta$ -caroteno). Se aisló una secuencia putativa del gen *CCD1* en yuca (*MeCCD1*) para evaluar su expresión en hojas y raíces de las variedades de yuca CM3306-4 “blanca” y MBRA253 “amarilla”, a los tres y seis meses de edad. Al mismo tiempo en las mismas variedades se cuantificó  $\beta$ -ionona en hojas y raíces, con el fin de determinar si existía correlación entre su acumulación y la expresión de *MeCCD1*.

Los valores promedio del contenido de  $\beta$ -ionona permitieron observar diferencias estadísticamente significativas a través del tiempo en raíces y hojas de las variedades de yuca estudiadas. En raíces, la variedad CM3306-4 “blanca” tuvo mayor cantidad de  $\beta$ -ionona que la variedad MBRA 253 “amarilla”, en la cual, curiosamente, sólo fue detectable este volátil a los seis meses de edad.

En hojas, aunque las diferencias en el contenido de  $\beta$ -ionona mostradas entre las variedades no fueron significativas, se pudo establecer que la producción de este volátil en ambos genotipos es variable a través del tiempo, incrementándose entre los tres y seis meses de edad.

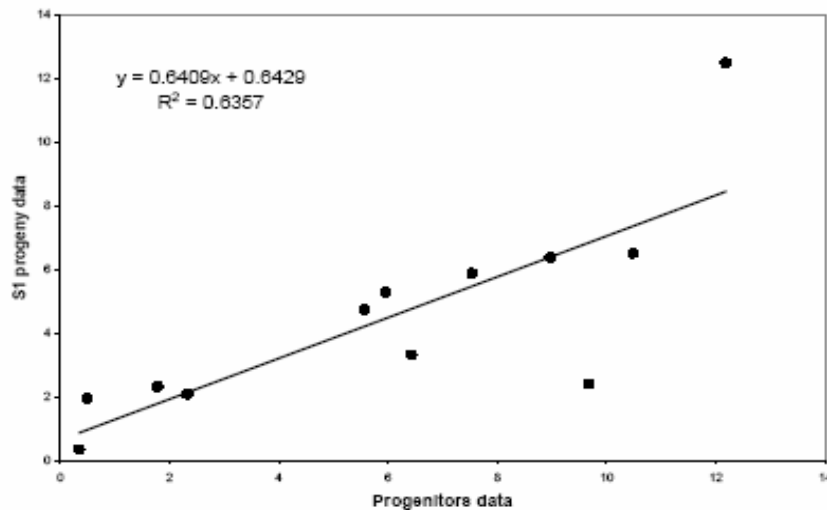
Los contenidos de  $\beta$ -ionona encontrados en las variedades de yuca estudiadas evidencian procesos de catabolismo de  $\beta$ -caroteno en la raíz. En raíces de la variedad CM 3306-4 “blanca” en plantas de tres y seis meses de edad, los niveles de  $\beta$ -ionona fueron estadísticamente superiores a los de la variedad MBRA 253 “amarilla”. Este comportamiento podría indicar que en raíces de la variedad CM 3306-4 el catabolismo de  $\beta$ -caroteno es más activo que en la variedad MBRA 253. En contraste, los niveles de  $\beta$ -caroteno son más altos en la variedad amarilla que en la blanca. Esto evidencia una relación inversa entre los contenidos de  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -ionona, explicando parcialmente las diferencias en la acumulación de  $\beta$ -caroteno en raíz de yuca (Arango, 2006).

El incremento del catabolismo del  $\beta$ -caroteno en la raíz blanca no se pudo explicar con los datos de expresión del gen putativo *MeCCD1*. Por esta razón es importante encaminar estudios posteriores en el análisis de la expresión de diferentes genes de la familia CCD, así como de otros genes que pudieran tener incidencia en el catabolismo de  $\beta$ -caroteno, con el fin de clarificar el factor molecular que favorece la acumulación de  $\beta$ -caroteno en la raíz de yuca (Maldonado, 2007).

Si bien en diferentes especies el catabolismo de  $\beta$ -caroteno ha sido atribuido principalmente a la actividad de CCD1, es importante considerar otras alternativas como el análisis de los genes *CCD7* y *CCD8*, no sólo por su actividad en la degradación de  $\beta$ -caroteno, recientemente descubierta, sino también porque a diferencia de CCD1, CCD7 y CCD8 son activas en los plastidios (Bouvier *et al.*, 2003; Auldridge 2006). Esta característica podría hacer más activos en el catabolismo del  $\beta$ -caroteno los genes *CCD7* y *CCD8* dado que los carotenos se acumulan en mayor proporción en estas estructuras (Maldonado, 2007).

### **3.2.9 Estudio de Heredabilidad del Contenido de Carotenoides en las Familias S1**

El contenido promedio de carotenos totales en progenies y progenitores puede ser útil en la determinación del valor de heredabilidad de la característica, mediante el análisis de regresión padre-progenie. En la figura 3.9 se ilustra esta relación la cual es preliminar y sugieren que el contenido de carotenos es una característica que posee una buena heredabilidad (> 50%). Los resultados sugieren un alto valor de heredabilidad para esta característica.



**Figura 3.9.** Relaciones entre el promedio de los valores de TCC para los progenitores (datos a partir del 2005 y 2007) y sus respectivas progenies S1 (Morillo Y, 2009).

Los altos valores de heredabilidad pueden ser explicados debido al gran efecto del componente aditivo a la variación fenotípica observada y a la correlación significativa entre el fenotipo y el genotipo, por lo tanto los procesos de selección de los genotipos superiores pueden ser más eficientes.

Teniendo en cuenta las diferentes investigaciones realizadas para elucidar los mecanismos de transmisión de la característica contenido de carotenoides de padres a hijos se puede inferir que la herencia del contenido de carotenoides en las raíces de yuca no es simple ni tampoco poligénica por el contrario es una característica que puede estar controlada por dos o tres genes lo cual se ve reflejado en su valor de heredabilidad y que es no es muy influenciada por el ambiente (Bolaños, 2006) sin embargo, hay factores genéticos aditivos determinando la expresión genética del contenido de carotenos en las raíces de yuca.

Se han reportado estudios de herencia de la concentración de  $\beta$ -caroteno en tomate (Lincoln y Porter, 1950; Stommel y Haynes, 1994) y zanahoria (Buishy y Gableman, 1979; Goldman y Breitbach, 1996) en los que se ha demostrado la presencia de un gen simple controlando la característica en ambos cultivos. Entre

los cereales, la herencia de los pigmentos amarillos en maíz está bien estudiada (Grogan *et al.*, 1963; Grogan y Blessin, 1968). Aunque ha habido pocos estudios en la herencia del  $\beta$ -caroteno relacionados a características como pigmentación de carotenoides y color semolina, no ha habido un reporte en la genética de la concentración de  $\beta$ -caroteno en el trigo *durum*.

Markley (1937) estudió la variabilidad en la concentración del pigmento carotenoide de plantas individuales de trigo común y *durum* y encontró evidencias de múltiples factores determinando el pigmento carotenoide en *durum*. Una herencia compleja de la concentración de carotenoides en trigo fue reportada por Braaten *et al.*, (1962). Konzak *et al.*, (1973), reportaron que la herencia para alta intensidad de color semolina fue compleja mostrando segregación transgresiva y concluyeron que el color amarillo brillante de la semolina podría ser dominante a la coloración clara de la semolina. Lee *et al.*, (1976), reportaron la ubicación de efectos significativos en la heredabilidad estimada de la concentración de pigmento macaroni en *durum*. Johnston *et al.*, (1983), reportaron que el color de la semolina fue altamente heredable y controlada principalmente por genes con efectos aditivos.

Por otra parte los estudios de herencia del contenido de  $\beta$ -caroteno en yuca se iniciaron con las investigaciones realizadas por Iglesias *et al.*, 1997 quienes estudiaron el rango de variabilidad para el contenido de caroteno en 630 materiales de yuca del banco de germoplasma de CIAT (con aproximadamente 5500 genotipos), y determinar la herencia de carotenos, así como su estabilidad en respuesta a diferentes metodologías de procesamiento.

Los resultados de este trabajo mostraron una amplia gama de concentraciones de carotenos en raíces frescas entre 0.1 a 2.4 mg de carotenos/100 g de raíces frescas (Chávez *et al.*, 2000). Se estableció la hipótesis de que dos genes con efectos epistáticos controlan el color en la raíz. Estos genes fueron nominados

como  $Y_1$  con dominancia completa, que permite el transporte de los productos de los precursores de las raíces; y  $Y_2$  con dominancia parcial, que es el responsable de los procesos bioquímicos que intervienen en la acumulación de carotenos. De acuerdo con la prueba de Chi cuadrado, la segregación observada tuvo una probabilidad entre el 80 y el 90% confirmando la hipótesis original (Iglesias *et al.*, 1997).

Hershey y Ocampo (1989) establecieron que el color de la raíz (blanco/crema/amarillo) estaba determinado por un gen parcialmente dominante, en la fase inicial de este estudio sobre marcadores genéticos, las observaciones del color del parénquima fueron divididas en dos clases: blanco y amarillo. Los datos de varios cruces fueron utilizados para establecer la hipótesis que un gen simple controla la característica, donde el amarillo es dominante sobre el blanco. Sin embargo, en algunas de las progenies segregantes, se observó una aparente segregación en tres clases distintivas: blanco, crema y amarillo intenso.

Los patrones de segregación sugirieron que el gen podría mostrar un efecto de dosis, donde el homocigoto dominante fue el responsable del color amarillo intenso, el heterocigoto del crema y el homocigoto recesivo del blanco. Los autores propusieron el nombre del locus "Y". Así, los fenotipos "YY", "Yy" y "yy" son amarillo intenso, crema y blanco, respectivamente. Si la genética de la concentración de la provitamina A sigue este patrón, será relativamente fácil manipularla dentro de las poblaciones segregantes, además, el conocimiento de la genética de esta característica podría ayudar grandemente a los fitomejoradores para la selección apropiada de parentales (Hershey y Ocampo, 1989).

Los estudios anteriores ponen de manifiesto que la característica contenido de carotenoides en las especies vegetales es compleja y que presenta diferente comportamiento dependiendo del tipo de estudio y población evaluada. En yuca numerosos esfuerzos han sido encaminados hacia el conocimiento de la herencia

de esta característica para poder hacer más eficiente el proceso de selección de los mejores genotipos en programas de mejoramiento que busquen incrementar los contenidos de carotenoides y así mejorar la calidad nutricional de este cultivo y en últimas contribuir a reducir los problemas de salud pública especialmente aquellos relacionados con las deficiencias de vitamina A.

### **3.2.10 Análisis de Marcadores Microsatélites en las familias S1**

En general los análisis de correlación y regresión del contenido de  $\beta$ -caroteno y los marcadores moleculares microsatélites que se habían asociado a la presencia de QTLs, en las familias S1 evaluadas lograron corroborar la presencia de Loci de herencia Cuantitativa (QTLs) a la vez que permitieron identificar marcadores microsatélites asociados a bajos, intermedios y altos contenidos de  $\beta$ -caroteno.

Así por ejemplo en las progenies que dieron origen a las familias S1, AM-691, AM-697, AM-698 y AM-720, provenientes de progenitores con contenidos bajos de  $\beta$ -caroteno, se encontraron marcadores microsatélites altamente correlacionados como el SSRY-49 , SSRY-88 y SSRY-178 ubicados en el mapa molecular de yuca en los grupos de ligamiento F, K y H. (Tabla 3.11). Estos marcadores son interesantes pues pueden ayudar a realizar una selección negativa del carácter contenido de  $\beta$ -caroteno en un programa de Selección Asistida por Marcadores (MAS) igualmente las regiones del genoma donde se encuentran deben ser saturadas y secuenciadas en la búsqueda de genes que pueden estar controlando los bajos contenidos de  $\beta$ -caroteno en las raíces de yuca.

**Tabla 3.11.** Análisis de correlación de los marcadores microsatélites asociados a Bajos contenidos de  $\beta$ -carotenos en las familias S1: AM-691, AM697, AM-698 y AM720 y su ubicación relativa en los Grupos de Ligamiento correspondientes al mapa genético-molecular de yuca (Fregene *et al.*, 1997).

Microsatélite	Fam. AM-691	Fam. AM-697	Fam. AM-698	Fam. AM-720	Grupo de Ligamiento
<b>NS-717</b>	0.32	-		0.36	D
<b>NS-158</b>	0.33	0.34	0.32	0.36	G
<b>SSRY-195</b>	0.33	-	-	-	F
<b>SSRY-324</b>	0.34	-	-	-	D
<b>SSRY-21</b>	0.36	-	-	0.36	D
<b>SSRY-330</b>	0.36	-	-		D
<b>SSRY-226</b>	-	0.37	0.33	0.34	G
<b>SSRY-172</b>	-	-	-	0.40	J
<b>SSRY-49</b>	0.45	0.44	0.49	-	F
<b>SSRY-88</b>	0.46	0.42	0.42	-	K
<b>SSRY-178</b>	0.48	0.45	0.44	0.36	H

Se encontraron regiones del genoma asociadas con contenidos intermedios de  $\beta$ -caroteno en las familias S1: AM-689, AM692, AM-712 y AM718, con los marcadores microsatélites SSRY-172, SSRY-195 y SSRY-49, los cuales se encuentran ubicados en los grupos de ligamiento J, F y F, respectivamente (Tabla 3.12). Estos marcadores pueden ser tenidos en cuenta en procesos de selección tendientes a la identificación y selección de aquellos genotipos que presenten contenidos de  $\beta$ -carotenos intermedios, sin embargo se deben probar en diferentes tipos de poblaciones y ver si realmente mantienen su polimorfismo.

**Tabla 3.12** Análisis de correlación de los marcadores microsatélites asociados a contenidos Intermedios de  $\beta$ -caroteno en las familias S1: AM-689, AM692, AM-712 y AM718 y su ubicación relativa en los grupos de ligamiento correspondiente al mapa genético-molecular de yuca (Fregene *et al.*, 1997).

<b>Microsatélite</b>	<b>Fam. AM-689</b>	<b>Fam.AM-692</b>	<b>Fam.AM-712</b>	<b>Fam. AM-718</b>	<b>Grupo de Ligamiento</b>
<b>SSRY-195</b>	0.34	0.46	0.35	0.33	F
<b>SSRY-9</b>	0.35	-	-	-	D
<b>SSRY-31</b>	-	-	0.35	-	F
<b>SSRY-172</b>	0.41	0.47	0.55	-	J
<b>SSRY-330</b>	0.44	0.37	-	-	D
<b>NS-158</b>	0.44	0.46	0.49	0.48	G
<b>SSRY-226</b>	-	-	0.45	0.49	G
<b>SSRY-49</b>	0.46	-	-	-	F
<b>SSRY-324</b>	0.47	0.34	-	-	D
<b>SSRY-242</b>	0.47	0.45	-	-	A
<b>NS-717</b>	0.48	0.40	0.54	0.51	D
<b>SSRY-313</b>	0.48	-	0.49	0.51	D
<b>SSRY-251</b>	0.48	-	-	-	D
<b>SSRY-21</b>	0.49	0.36	0.48	0.57	D

En general los análisis de regresión y correlación simple mostraron también regiones del genoma de yuca asociadas a altos contenidos de carotenos con los marcadores microsatélites SSRY-313, SSRY-251, NS717, SSRY-21, SSRY-242, NS-158, entre otros, los cuales se encuentran ubicados en el grupo de ligamiento D el cual ha mostrado consistencia en la evaluación del polimorfismo en diferentes tipos de poblaciones evaluadas especialmente con los marcadores SSRY-313 y SSRY-251 (Tabla 3.13). En la evaluación de las familias S1 también se pudo identificar que existen otras regiones del genoma de yuca asociadas con los altos contenidos de carotenoides con los marcadores SSRY-242 y NS-158 los cuales se ubican dentro del mapa de yuca en los grupos de ligamiento A y G respectivamente. Es importante considerar que el marcador NS-158 está fuertemente asociado con la resistencia al Mosaico Africano de la yuca (CMD) y



en las últimas evaluaciones ha mostrado también altas correlaciones con el contenido de carotenos totales.

**Tabla 3.13** Análisis de correlación de los marcadores microsatélites asociados con altos contenidos de carotenos en las familias S1: AM-690, AM710 y AM-702 y su ubicación relativa en los grupos de ligamiento correspondientes en el mapa genético-molecular de yuca (Fregene *et al.*, 1997).

<b>Microsatélite</b>	<b>Fam. AM-690</b>	<b>Fam.AM-702</b>	<b>Fam.AM-710</b>	<b>Grupo de Ligamiento</b>
<b>SSRY-31</b>	-	-	0.32	F
<b>NS-717</b>	0.34	0.47		D
<b>SSRY-21</b>	0.36	0.46	0.33	D
<b>SSRY-313</b>	0.38	-	-	D
<b>SSRY-178</b>	-	0.38	-	H
<b>SSRY-324</b>	0.38	-	-	D
<b>NS-158</b>	0.39	0.46	0.42	G
<b>SSRY-49</b>	0.39	0.37	-	F
<b>SSRY-313</b>	0.40	0.48	-	D
<b>SSRY-226</b>	-	-	0.40	G
<b>SSRY-251</b>	0.42	0.48	-	D
<b>SSRY-330</b>	0.43	-	0.46	D
<b>SSRY-195</b>	0.44	-	0.48	F
<b>SSRY-172</b>	0.47	-	0.45	J
<b>SSRY-242</b>	0.48	0.47	0.47	A

Lo anterior corrobora los resultados obtenidos hasta el momento poniendo de manifiesto que las fuentes que controlan la síntesis, el transporte y la acumulación en las raíces de yuca pueden ser comunes para algunas familias pero también únicas dependiendo de los genotipos o el tipo de familia evaluada. Por otro lado se confirma la presencia de Loci de Características Cuantitativas (QTLs) involucrados en los mecanismos de acción de los genes de la ruta biosintética de los carotenoides en las raíces de yuca. El control genético de la característica contenido de carotenos totales y de  $\beta$ - caroteno en las raíces de yuca es complejo ya que se han encontrado desde alelos múltiples interactuando con pocos genes dominantes y varios genes con efectos aditivos los cuales estarían

contribuyendo a incrementar los carotenoides hasta efectos epistáticos importantes entre los diferentes QTLs identificados. (Marin, 2008).

El conocimiento de la herencia y la acción de los genes de acumulación de  $\beta$ -caroteno en raíces de yuca pueden ser usados para guiar los procesos de mejoramiento y también combinar alelos favorables en múltiples loci que controlen el contenido de  $\beta$ -caroteno en yuca. Aunque varias estrategias basadas en estructuras de poblaciones diferentes existen, para entender las bases genéticas de características complejas, es todavía imposible predecir los fenotipos generados por estos genes en el germoplasma. Esto es debido a que la variación alélica de éstos loci que existe en el germoplasma. Típicamente en una población segregante (F<sub>2</sub>, retrocruces, líneas recombinantes, dobles haploides, etc) solamente dos alelos son segregados por locus. El mapeo de genes involucrados en un fenotipo deseable es capaz de hacer la predicción del fenotipo dentro de la misma población o dentro de poblaciones en las cuales los mismos alelos están segregando en cada locus. Para obtener un amplio poder predictivo, nosotros necesitamos ser capaces de todos los alelos en el locus de interés y así asignar valores fenotípicos a los diferentes alelos.

Eventualmente, el conocimiento de las posiciones en el mapa de todos los loci de interés agronómico, la variación alélica en estos loci y su contribución al fenotipo el mejorador debería ser capaz de diseñar los genotipos superiores que comprendan la combinación de alelos favorables en todos los loci. Porque las posiciones de todos los alelos de importancia son mapeados, los eventos de recombinación pueden ser seleccionados usando marcadores flanqueantes para tratar de unir los alelos favorables. Las herramientas de software deben ser capaces de determinar por el cruzamiento de líneas y usando marcadores, seleccionar los recombinantes específicos que eventualmente combinaran todos estos alelos.

En yuca el progreso en el mejoramiento genético se ha visto obstaculizado por las características biológicas del cultivo y el hecho que todavía hay un conocimiento limitado en la herencia de características agronómicas importantes en el cultivo. Entre los aspectos biológicos se incluyen un transfondo genético heterocigoto haciendo difícil la consolidación de la ganancia genética en los procesos de mejoramiento debido a la inherente inestabilidad del estado heterocigoto (CIAT, 2004), a un largo ciclo de crecimiento y un pobre conocimiento de la organización de la diversidad genética del cultivo (Fregene *et al.*, 2001). Sin embargo, el estado heterocigoto crea variación dentro del cultivo y facilita una selección direccional de genes aditivos hacia características deseables.

La mayoría de las características estudiadas en yuca como también en la mayoría de los cultivos son poligénicas (Hahn *et al.*, 1989). La detección de poligenes requiere más que un simple análisis genético en cruces específicos y un solo ambiente ya que este no es suficiente debido a diferencias del fenotipo por la interacción con el ambiente. Uno de los problemas más difíciles en el mejoramiento de plantas es la identificación de plantas o progenies con características deseables. Además, la efectividad de la selección puede ser limitada por la confiabilidad del método de evaluación para la característica que por algún otro factor. Así el mejoramiento de características cuantitativas como el contenido de  $\beta$ - carotenos requiere el uso de poblaciones que presenten amplio patrones de segregación y su evaluación en diferentes tipos de ambientes.

### 3.3 CONCLUSIONES

El análisis de regresión o de simple marcador mostró que los QTLs explican más del 26% de la varianza fenotípica observada en el contenido de carotenos en la raíces de yuca. Cinco QTLs fueron identificados en el grupo ligamiento D para todas las tres familias, sugiriendo posiblemente que QTLs mayores y que incrementan el contenido de  $\beta$ -caroteno residen en este grupo de ligamiento.

Por otra parte las familias GM708 y CM9816 también tuvieron QTLs en el grupo de ligamiento G, otros seis QTLs fueron únicos entre las tres familias. Los resultados obtenidos sugieren que estas regiones del genoma que controlan el contenido de  $\beta$ -caroteno en las raíces de yuca son comunes para diferentes fuentes que incrementan el contenido de  $\beta$ -caroteno, pero también son únicas con respecto a la fuente evaluada.

Los análisis de QTLs realizados reafirmaron la presencia de aproximadamente 3 QTLs controlando el contenido de carotenoides en las raíces de yuca y 4 QTLs el color de pulpa de la raíz los cuales están explicando gran parte de la variación fenotípica observada poniendo de manifiesto que la herencia de la característica no es simple.

Todos los marcadores que se encuentran ubicados en el grupo de ligamiento 1 del mapa genético generado para la característica contenido de carotenos totales (Marin, 2008), corresponden al grupo de ligamiento D del mapa de yuca (Fregene et al., 1997) y han mostrado en varios estudios que están controlando de una u otra manera tanto el contenido de carotenos totales como el color de la pulpa en las raíces de yuca, lo cual convierte a este grupo de ligamiento en una región potencial para estudios de secuenciación, clonación posicional o mapeo más fino.

QTLs identificados y ligados a carotenos totales y  $\beta$ -carotenos fueron identificados y validados en poblaciones S1, permitiendo la selección de marcadores microsatélites asociados a bajos, intermedios y altos contenidos, los cuales pueden ser de gran ayuda para incorporar un esquema de selección asistida por marcadores en el mejoramiento de características como la calidad nutricional de las raíces de yuca contribuyendo a identificar y seleccionar genotipos superiores con el fin de reducir costos y tiempo en la obtención de variedades mejoradas o con altos contenidos de carotenoides.

Las técnicas de biología molecular y los métodos de detección y localización de loci de características cuantitativas (QTL) utilizados en este estudio permitieron identificar regiones del genoma asociadas con los altos contenidos de carotenoides en raíces de yuca. Dichas regiones pueden ser estudiadas más detalladamente para poder llegar así a localizar finalmente los genes responsables de la síntesis, transporte y acumulación de estos pigmentos en las raíces de yuca.

Lo anterior corrobora los resultados obtenidos hasta el momento poniendo de manifiesto que las fuentes que controlan la síntesis, el transporte y la acumulación en las raíces de yuca esta controlando por loci que codifican para características cuantitativas (QTLs) y que el control genético de la característica contenido de carotenos totales y de  $\beta$ - caroteno en las raíces de yuca es complejo, pero que puede ser controlado por uno o hasta tres genes, que no es una característica muy cuantitativa dados los altos valores de heredabilidad y que según estudios de interacción genotipo por ambiente para esta característica muestran que el ambiente no afecta mucho su expresión (Bolaños, 2001). En general, el conocimiento de la herencia y la acción del gen de acumulación del  $\beta$ - caroteno en yuca puede ser usado para guiar los procesos de mejoramiento y también combinar los alelos favorables en múltiples loci que controlan el contenido de  $\beta$ - caroteno en yuca.

### 3.4 BIBLIOGRAFÍAS

1- ADEWUSI, S.R. y BRADBURY, J.H. 1992. Carotenoid profile y tannin content of some cassava cultivars. In: Proceeding of the first international meeting, cassava biotechnology network. CIAT, CBN y AARD. Cartagena, Colombia.

2- AULDRIDGE ME, BLOCK A, VOGEL JT, DABNEY-SMITH C, MILA I, BOUZAYEN M, MAGALLANES-LUNDBACK M, DELLAPENNA D, MCCARTY DR, KLEE HJ. Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. The Plant Journal (2006<sup>a,b</sup>) 45:982–993.

3- ARANGO, J. 2006. Análisis de la expresión de los genes GGPS, PSY, ZDS, PDS, CTRISO y LCY-b de la ruta biosintética de carotenos mediante PCR en tiempo real, y cuantificación de carotenos usando HPLC, en hojas y raíces de plantas de yuca de diferentes edades. Tesis de grado en Biología. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. 75 págs.

4- BLAUTH SL, CHURCHILL GA, MUTSCHLER MA. 1998. Identification of quantitative trait loci associated with acylsugar accumulation using intraspecific populations of the wild tomato, *Lycopersicon pennellii*. Theor Appl Genet 96:458–467.

5- BOLAÑOS, E.A. 2001. Caracterización de la diversidad genética en cuanto a contenido de carotenos de raíces y hojas de 682 genotipos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de la colección de CIAT y de 411 genotipos en cuanto a minerales. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

- 6- BOUVIER F, SUIRE C, MUTTERER J, CAMARA B (2003) Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD y CsZCD genes involved in crocus secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell* 15:47– 62.
- 7- BRAATEN, M.O., K.L. LEBSOCK y L.O. SIBBITT, 1962. Intergeneration relations of physical properties of dough y carotenoid pigment concentration in durum wheat. *Crop Sci* 2: 277–281.
- 8- BUISHY, J.G. y W.H. GABLEMAN, 1979. Investigations on the inheritance of colour y carotenoid concentration in phloem y xylem of carrot roots (*Daucus carota* L.). *Euphytica* 28: 611–632.
- 9- BYRNE, M; MURRELL, J.C; OWEN, J.V; KRIEDEMANN, P; WILLIAMS, E.R; MORAN, G.F.1996. Identification y mode of action of quantitative trait loci affecting seedling height y leaf area in *Eucalyptus nitens*. *Theor Appl Genet.* 94: 674-681.
- 10- BYRNE, P.F., M.D. MCMULLEN, B.R. WOSEMAN, M.E. SNOOK, T.A. MUSKET, J.M. THEURI, N.W. WIDSTROM Y E.H. COE. 1998. Maize silk masin concentration y corn earworm antibiosis: QTLs y genetic mechanisms. *Crop Science* 38: 461-471.
- 11- CÁRDENAS, C. 2003. Comparación de dos métodos de cuantificación de carotenos en raíces de 100 genotipos de yuca. Tesis de grado. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)-Universidad del Valle. Cali.
- 12- CERÓN-ROJAS, J.J. Y J. SAHAGÚN-CASTELLANOS. 2007. Estimating QTL biometrics parameters in F<sub>2</sub> populations: a new approach. *Agrociencia* 41:57-73.

13- CHÁVEZ, A.L., BEDOYA, A.J., SÁNCHEZ, T., IGLESIAS, C., CEBALLOS, H., y ROCA, W. 2000. Iron, carotene y ascorbic acid in cassava roots y leaves. *Food y Nutrition Bulletin* 21(4): 410-413.

14- CIAT. 2004. Output 1: Genetic base of Cassava y related *Manihot* species evaluated y available for Cassava improvement: higher nutritional quality. pp: 17-23. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report CIAT, 2004.

15- DARVASI A, SOLLER M: Advanced intercross lines, an experimental population for fine genetic mapping. *Genetics* 141: 1199–1207 (1995).

16- ECHEVERRI, J. 2001. Determinación del potencial genético en hojas y raíces de 500 genotipos con respecto al contenido de pro-vitamina A y vitamina C; y de 397 en cuanto al contenido de pro-vitamina A en raíces del Banco de Germoplasma de Yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de CIAT. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

17- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D., 1998. Inducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Embrapa. Brasilia, DF. Pp 221.

18- FOURMANN M, P. BARRET, M. RENARD, G. PELLETIER, R. DELOURME *et al.*, 1998. The two genes homologous to *Arabidopsis FAE1* co-segregate with the two loci governing erucic acid content in *Brassica napus*. *Theor Appl. Genet.* 96: 852-858.

19- FREGENE M., F. ANGEL., R. GOMEZ, F. RODRIGUEZ, P. CHAVARRIAGA, W. ROCA, J. TOHME, M. BONIERBALE. 1997. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet* 95; 431-441.



- 20- FREGENE M, E. OKOGBENIN, C. MBA, F. ANGEL, MARIA CHRISTINA SUAREZ, GUTIERREZ JANNETH, P. CHAVARRIAGA, W. ROCA, M. BONIERBALE y J. TOHME. 2001. Genome mapping in cassava improvement: Challenges, achievements y opportunities. *Euphytica* Vol: 120 pp: 159–165.
- 21- GOLDMAN, I.L Y BREITBACH., D.N. 1996. Inheritance of a Recessive Character Controlling Reduced Carotenoid Pigmentation in Carrot (*Daucus carota* L.). *The Journal of Heredity* 1996:87(5):380-382.
- 22- GROGAN, C.O. y C.W. BLESSIN, 1968. Characterization of major carotenoids in yellow maize lines differing in pigment concentration. *Crop Sci* 8: 730–732.
- 23- GROGAN, C.O., C.W. BLESSIN, R.J. DIMLER y C.M. CAMPBELL, 1963. Parental influence on xanthophylls y carotenes in corn. *Crop Sci* 3: 213–214.
- 24- HAHN, S.K., JOHN, C., ISOBA, G., y IKOUN, T. 1989. Resistance breeding in root y tuber crops at the International Institute for Tropical Agriculture (IITA), Ibadan Nigeria. *Crop Protection* 8, 147-168.
- 25- HALEY CS, KNOTT SA. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69: 315–324 (1992).
- 26- HALEY CS, KNOTT SA. Elsen JM: Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* 136: 1197–1207 (1994).
- 27- HERSHEY, C.H. y OCAMPO, C. 1989. Description of new genetic markers in cassava. *Cassava Newsletter* 13: 1–5.
- 28- IGLESIAS, C., MAYER, J., CHAVEZ, A.L., CALLE, F. 1997. Genetic potential y stability of carotene content in cassava roots. *Euphytica* 94: 367-373.

- 29- JOHNSTON, R.A., J.S. QUICK y J.J. HAMMOND, 1983. Inheritance of semolina color in six durum wheat crosses. *Crop Sci* 23: 607–610.
- 30- JORGE, V., FREGENE, M.A., DUQUE, M.C., BONIERBALE, M., TOHME, J. y VERDIER, V. 2000. Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease. *Theoretical y Applied Genetics* 101, 865-872.
- 31- KONZAK, C.F., R. HU, G.L. RUBENTHALER, M. SADAM y W.C. SHUEY, 1973. A rapid micro-screening method for semolina color applicable to early generation materials. In: *Proceedings of the Symposium on Genetics Breed, Durum wheat, Bari, Italy 14–18 May*, pp. 617–631.
- 32- LYER, E.S., Y D. BOTSTEIN. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 126: 735-742.
- 33- LEE, J., P.J. KALTSIKES y W. BUSHUK, 1976. The inheritance of lipoxydase activity y pigment concentration in durum wheat. *Theor.Appl.Genet* 47: 243–250.
- 34- LEE, M. 1995. DNA markers y plant breeding programs. *Adv. Agron.* 55:265–344.
- 35- LIN SY, SASAKI T, YANO M (1998). Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy y heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines. *Theor Appl Genet* 96: 997–1003.
- 36- LINCOLN R.,E., y J. W. PORTER 1950 Inheritance of beta-carotene in tomatoes. *Genetics* 35: 206-211.

- 37- MALDONADO, B. 2007. Expresión del gen CCD1 y cuantificación de  $\beta$ -Ionona en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.
- 38- MARKLEY, M.C., 1937. Variability in carotenoid pigment concentration of individual plants of *Triticum vulgare* y *Triticum durum*. *Cer Chem* 14: 400–409.
- 39- MARIN J. A. 2002. Mapeo genético y análisis asistido por marcadores “microsatélites” de la genética del rendimiento en una población F2 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Universidad del Tolima, Facultad de Ciencias, programa de biología. Tesis de Pregrado.
- 40- MARIN J.A. 2008. Carotenos en Yuca: Mapeo Genético y Análisis De QTLs en una población S1 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias, Área mejoramiento genético de plantas.
- 41- MARTÍNEZ-GÓMEZ, R, R. SÁNCHEZ-PÉREZ, M. RUBIO, F. DICENTA, T.M. GRADZIEL Y GO. SOZZI. 2005. Application of recent biotechnologies to Prunus tree crop genetic improvement. *Cien. Inv. Agr.* 32:73-96.
- 42- MCMULLEN MD, BYRNE PF, SNOOK ME, WISEMAN BR, LEE EA, WIDSTROM NW, COE EH. 1998. Quantitative trait loci y metabolic pathways. *Proc Natl Acad. Sci USA* 95:1996–2000.
- 43- MELCHINGUERA, A.E.; UTZA, H.F. y C.C. SCHON. 1998. Quantitative Trait Locus QTL Mapping Using Different Testers y Independent Population Samples in Maize Reveals Low Power of QTL Detection y Large Bias in Estimates of QTL Effects. *Genetics*, Vol. 149, 383 – 403.

- 44- MORILLO Y. 2009. Herencia del Contenido de carotenos en raíces de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis de grado Doctoral. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Resultados sin publicar.
- 45- NELSON, R.J. 1996. Marker-assited plant breeding. In: G.J. Perley (ed.) Biotechnology and integrated pest management. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 186-204.
- 46- OKOGBENIN, E. and FREGENE, M. 2002. Genetic analysis and QTL mapping of early root bulking in an F1 population of non-inbred parents in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Theor Appl Genet 106:58–66.
- 47- OKOGBENIN, E. and FREGENE, M. 2003. Genetic mapping of QTLs affecting productivity and plant architecture in a full-sib cross from non-inbred parents in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Theor Appl Genet 107:1452–1462.
- 48- ORTIZ, A. 2002. Deteccion de nuevos QTLs relacionados con la eficiencia en la toma de fosforo en una población segregante de maíz F<sub>2:3</sub> (*Zea mays* L) tolerante a suelos ácidos en la altillanura colombiana. Tesis de grado. Universidad Pontificia Javeriana. 125 p.
- 49- PATERSON, A.H; DAMON, S; HEWITT, J.D; ZAMIR, D; RABINOWITCH, H.D. et al. 1990. Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits in Tomato: Comparison Across Species, Generations, y Environments. Genetics. 127: 181-197.
- 50- PRIOUL JL, PELLESCI S, SENE M, THEVENOT C, CAUSSE M, DE VIENNE D, LEONARDI A. 1999. From QTLs for enzyme activity to cyidate genes in maize. J Exp Bot 50:1281–1288.

- 51- RECTOR, B.G., J.N. ALL, W.A. PAROTT, y H.R. BOERMA. 1998. Identification of molecular markers linked to quantitative trait loci for soybean resistance to corn earworm. *Theor Appl Genet* 96: 786–790.
- 52- SANTOS CAF, SIMON PW (2002) QTL analysis reveals clustered loci for accumulation of major provitamin A carotenes y lycopene in carrot roots. *Mol Gen Genomics* 268:122–129.
- 53- STEPHEN E. LINCOLN, MARK J. DALY, Y ERIC S. Lyer MapMaker/EXP 3.0 Constructing Genetic Linkage Maps with MAPMAKER/EXP Version 3.0: A Tutorial y Reference Manual.1993.
- 54- STOMMEL J. R., Y HAYNES K. G.1994. Inheritance of Beta Carotene Content in the Wild Tomato Species *Lycopersicon cheesmanii*. *The Journal of Heredity* 1994:85(5):401-404.
- 55- TERAN, HENRY. 1999. Análisis de QTLs para un solo marcador. Seminario II. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Escuela de posgrados. Área de Fitomejoramiento. Diciembre 2. 25 p.
- 56- THORUP TA, TANANDOLAC B, LIVINGSTONE KD, POPOVSKY S, PARAN I, JAHN M. 2000. Cyidate gene analysis of organ pigmentation loci in the Solanaceae. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11192–11197.
- 57- ZENG, Z.-B. 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 10972-10976.

**PARTE IV**  
**ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL CARÁCTER**  
**CAROTENOS TOTALES EN EL GERMOPLASMA DE YUCA, *Manihot***  
***esculenta* Crantz**

## INTRODUCCIÓN

Se entiende como variabilidad genética a la variación del contenido genético dentro de cada especie de una población, representa la variación heredable dentro y entre poblaciones de organismos. Esencialmente, depende de las variaciones en la sucesión de los cuatro pares fundamentales con que se constituyen el código genético, teniendo en cuenta que, sólo una pequeña parte (frecuentemente menos de 1%) del material genético se expresa exteriormente en la forma y en el funcionamiento del organismo. (Flavell R.B. 1991).

La frecuencia de genes dentro de la población total es la resultante de la selección natural, es la determinante de la evolución de la población. La importancia de la variación genética se resume diciendo: permite los cambios evolutivos sobre la base de una reproducción selectiva. Su importancia se aprecia en la domesticación. Los agricultores y mejoradores de plantas y animales seleccionan de esa diversidad las características genéticas que les permiten obtener las mejores cosechas y crías. En síntesis el mantenimiento de la diversidad importa: en el uso actual y potencial de los elementos de la diversidad biológica como recursos biológicos, en el mantenimiento de la biosfera en un estado que sostiene a la vida humana, en el mantenimiento de la diversidad biológica en sí, en particular de todas las especies que viven actualmente. (Flavell R.B. 1991).

En campo de la genética y la conservación es muy importante entender el nivel y la distribución de la variabilidad genética como también los procesos que conducen a esta diversidad. Procesos como la mutación, la deriva genética, la migración y la selección natural influyen la composición y la diversidad genética en las poblaciones (Hartl y Clark, 1997). Factores como el efecto fundador pueden ocurrir con la introgresión de yuca dentro de otros continentes por lo que

la diversidad genética podría disminuir. Factores tales como el flujo de genes entre poblaciones de yuca que ocurre a través de la semilla, polen o por el intercambio de plantas por los agricultores entre localidades, podría incrementar la diversidad genética en las poblaciones. Los marcadores moleculares son reconocidos como herramientas para orientar el manejo y conservación de los recursos genéticos de las plantas, proporcionando una medida mucho más exacta de la estimación de la diversidad y estructura genética para las especies de interés (Hamrick y Godt, 1997).

Un prerequisite para cualquier programa de mejoramiento genético de cualquier especie es el conocimiento de la variación genética existente entre los cultivares y las distancias entre esta y las especies relacionadas con las cuales se pueden producir híbridos. En un cultivo donde los cultivares han sido generalmente seleccionados y distribuidos por los agricultores y en donde diferentes cultivares pueden poseer frecuentemente el mismo nombre, algún método adecuado de clasificación y medida de la variabilidad genética es requerido.

Los marcadores moleculares han sido usados eficientemente en los análisis de diversidad genética y organización del germoplasma, *Arachis* (Lanham *et al.*, 1992), *Brassica* (dos Santos *et al.*, 1994; Thormann *et al.*, 1994), *Vaccinium* (Novy *et al.*, 1994); en la estimación de la similaridad genética como predicción del comportamiento del híbrido (Bernardo, 1994; Melchinger *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990); en la construcción de mapas genéticos para la localización de loci condicionando características heredadas de forma simple, por ejemplo el locus *Pto* para la resistencia a *Pseudomonas syringae* pathovar tomato (*Pst*) (Carly y Staskawicz, 1993); el gene *H1* para la resistencia a *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens en papa (Gebhardt *et al.*, 1993); *er-1* para la resistencia al oidium en arvejas (*Pisum sativum* L.) (Timmerman *et al.*, 1994); resistencia al mildew en lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Paran y Michelmore, 1993); gen de la sensibilidad al



fotoperíodo en arroz (Mackill *et al.*, 1993); y análisis de QTLs (Edwards *et al.*, 1987).

Los marcadores también proporcionan el potencial para la clonación basada en el mapeo de genes específicos (Tanksley *et al.*, 1995). Aunque las evaluaciones teóricas de MAS han mostrado que este podría ser útil en el mejoramiento de plantas, la aplicación de MAS no ha sido rigurosamente evaluada en muchas especies cultivadas (Lye y Thompson, 1990). Hasta la fecha ningún cultivar desarrollado a través de MAS ha sido liberado.

Los SSR en particular, son capaces de detectar variabilidad aún entre individuos muy relacionados, permitiendo así la diferenciación de clones mediante las técnicas denominadas “DNA fingerprinting”. Ambos tipos de marcadores proporcionan por lo tanto, gran cantidad de datos discretos que pueden ser sujetos a análisis estadísticos robustos. Entre las estimaciones más frecuentemente efectuadas se encuentra el índice de similitud genética, que se basa en la proporción de bandas que comparten dos individuos (Marcucci Poltri *et al.*, 2003). En términos de conservación de diversidad, la cuantificación de las variantes alélicas obtenidas mediante SSR, en una población es sumamente útil. El estimador utilizado, se lo denomina riqueza alélica y proporciona una estimación directa de la diversidad presente en una muestra. Cuando por alguna razón la diversidad disminuye, la riqueza alélica se ve directamente afectada.

Los marcadores de secuencia simple repetida (SSR) son particularmente atractivos para estudiar la variabilidad genética, porque ellos son abundantes en los genomas de plantas y animales, tienen altos niveles de polimorfismo y son susceptibles a la automatización (Donini *et al.*, 1998). En yuca, los marcadores SSR han sido útiles para buscar duplicados en la colección core de CIAT (Chavarriaga-Aguirre *et al.*, 1999) y para analizar la variación en poblaciones naturales de progenitores putativos de yuca (Olsen y Schaal, 2001). Estos

marcadores han sido usados para estudiar la diversidad y su diferenciación en landraces de yuca, una especie propagada vegetativamente, con el fin de conservar y mejorar el germoplasma de yuca y contribuir así a la elucidación de las fuerzas que muestran diferenciación genética en una especie alógama propagada vegetativamente.

En las últimas tres décadas la diversidad molecular esta siendo estudiada en plantas. La variación en la frecuencia de los alelos en la mayoría de los loci no ligados es la forma preferida para los ensayos de la diversidad genética y la diferenciación para estimar la relación de las fuerzas que dan origen a la diversidad (Nei, 1973; Wu y Tanksley, 1993). Muchos trabajos han sido publicados en diversidad genética con el uso de marcadores de ADN en yuca. La diversidad genética de la yuca en África fue evaluada usando Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) (Beeching *et al.*, 1993), marcadores de ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD) (Marmey *et al.*, 1994) y marcadores de Secuencia Simple Repetida (SSR) (Fregene *et al.*, 2003).

Estudios de diversidad genética en las variedades de los agricultores son complejos y puede algunas veces requerir un estudio antropológico para entender mejor los métodos de cultivo de los agricultores y como esto afecta la diversidad de la yuca y su producción. Un gran hallazgo en uno de los estudios de diversidad genética fue que la diversidad en un campo particular en la comunidad de Amerindia de Makuski en el Sur de la Guyana mostró ser igual a la que presentan 38 accesiones de la colección Core que está representada por la colección mundial de yuca en CIAT (Elias *et al.*, 2000). Esto podría mostrar una subestimación de la diversidad genética encontrada en los campos de los agricultores y que esta podría ser mucho más grande de lo que se conoce. Sin embargo, la mayoría de los trabajos en diversidad realizados en yuca han elucidado la organización de la diversidad genética y diferenciación de yuca a partir de su centro de origen en América Latina, a áreas donde ésta ha sido

introducida, por ejemplo en África. Los análisis del patrón geográfico de variación para los cultivos ayudan en la selección de áreas para la exploración de plantas y la unión del germoplasma para los programas de mejoramiento. La caracterización molecular de las variedades de los agricultores puede también ayudar a los agricultores en términos de mejorar sus cultivos y tener en cuenta sus necesidades y preferencias.

El manejo de los agricultores influencia la diversidad genética de la yuca. Por ejemplo, el intercambio de variedades es muy común entre las comunidades de agricultores en Uganda y otros países Africanos, promoviendo la migración y así efectuando el flujo de genes dentro y fuera de sus fincas. En Sur América el intercambio de germoplasma ha sido documentado por distancias mas largas que los 300 kilómetros (Chernela, 1987). También se ha encontrado que cuando hay escasez de material se siembra los agricultores generan su propio material a partir de estacas de plantas de yuca en bosques o campos o en plantas de origen sexual. Después los agricultores siembran estos materiales y esto resulta en un proceso de selección natural. Esta incorporación incrementará la diversidad genética en los campos y la diversidad dentro de la próxima generación de semillas de yuca dentro del campo. Los agricultores tienden a seleccionar por vigor entre plántulas espontáneas, por lo tanto, ellos podrían indirectamente seleccionar para genotipos heterocigotos.

Pocos agricultores tuvieron que interactuar con la distribución gubernamental y no gubernamental y los programas de mitigación del material de siembra de yuca. Así, es típico encontrar en campos de pequeños agricultores una mezcla de variedades locales, las cuales han crecido continuamente por al menos una generación en el área (Berthaud *et al.*, 2001), y/o variedades locales o mejoradas, las cuales pueden ser dulces, amargas o ambas. Como en Ghana (Manu-Adueña *et al.*, 2005) la mayoría de las variedades en Uganda que se encuentran en las fincas de pequeña escala son variedades viejas o locales, las cuales son

genéticamente heterogéneas y un resultado de la dinámica de evolución involucrada tanto en la selección natural y humana (Jarvis y Hodgkin, 1999). La interacción que se presenta entre las fuerzas modificadoras y las características ecológicas particulares de las especies, ha llevado a ensamblajes espaciales definidos, que originan una diversidad de modelos demográficos y genéticos. Tanto, la dispersión, como los sistemas de reproducción, son considerados dos factores ecológicos de vital relevancia en la formación de estructuras genéticas particulares (Hedrick *et al.*, 1976).

La relación entre dispersión de genes y los niveles de variabilidad genética dentro de las especies de plantas o sus poblaciones puede ser mostrada al examinar el efecto de los sistemas de reproducción de las plantas y los mecanismos de dispersión de polen. Es muy probable encontrar altos niveles de variabilidad genética entre poblaciones de plantas que se reproducen por alogamia, mientras que por el contrario, aquellas poblaciones que presentan un sistema de reproducción endogámico amplio tienen los niveles más bajos de variabilidad. Lo anterior está asociado igualmente con los diferentes mecanismos de dispersión de polen (polinización por el viento, por aves, entomófila, por murciélagos), los cuales operan a diferentes escalas espacio-temporales. Por ende, el movimiento de polen puede ser considerado en algunos casos un evento de flujo genético que podría reducir la heterogeneidad entre poblaciones (Hedrick 1983).

De esta forma, los niveles de variabilidad genética (descritos por parámetros tales como el número de alelos por locus polimórfico, y el índice de diversidad genética o heterocigosidad) están influenciados principalmente por el sistema de reproducción de las especies y por su sistema de dispersión, tanto de polen como de semillas. Existen también múltiples factores, como el predominio de un sistema de reproducción exogámico, la morfología floral, el tipo de reproducción sexual y la duración del ciclo de vida, que pueden estar influyendo de una forma mayor a la formación de una estructura genética particular. No obstante, la dispersión de

semillas y polen evaluadas a diferentes escalas espacio-temporales ha sido el principal componente para confirmar tales planteamientos. (Hedrick 1983).

El objetivo principal de esta cuarta y última parte de esta investigación fue el de determinar la variabilidad genética del contenido de carotenos existente en las accesiones de yuca y establecer el grado de similaridad o disimilaridad genética entre ellas.

## 4.1 MATERIALES Y METODOS

### 4.1.1 ANALISIS DE LA DIVERSIDAD GENETICA:

Para caracterizar la variabilidad genética del contenido de carotenos totales se utilizaron 140 marcadores microsatélites y un total de 67 materiales de yuca que se encontraban disponibles en campo con raíces blancas, cremas y amarillas, provenientes de diferentes fuentes (autopolinizaciones, cruzamientos dirigidos o mezclas de semillas) y de diferentes regiones geográficas, Brasil (MBRA), Perú, (MPER), Cuba, Argentina (MARG) y Colombia (MCOL).

El análisis molecular de los 67 materiales de yuca disponibles usando 140 marcadores microsatélites se realizó utilizando la metodología descrita en materiales y métodos del capítulo 3.

#### 4.1.1.1 Similitud en término de marcadores moleculares: Coeficiente de Similitud de Nei-Li.

Para estudiar el grado de similitud entre los individuos utilizando marcadores moleculares microsatélites se partió de la definición de similitud de Nei-Li (1979) (Leung *et al.*, 1993), también conocida como similitud de DICE (Sneath y Sokal, 1973) o de Sorensen (1948), cuya fórmula es:

$$S_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Donde:

$S_{ij}$  = Similitud entre el individuo  $i$  y el  $j$ .

$a$  = Número de bandas presentes simultáneamente en los individuos  $i$  y  $j$ .

$b$  = Número de bandas presentes en  $i$  y ausentes en  $j$ .

$c$  = Número de bandas presentes en  $j$  y ausentes en  $i$ .

El coeficiente de DICE omite la consideración de pares negativos (0-0) y da doble peso a los pares positivos (1-1) (Sneath y Sokal, 1973) lo que hace útil en términos de similaridad del ADN, en el que la ausencia compartida de una banda no es necesariamente una indicación de similaridad entre dos individuos.

#### **4.1.1.2 Matriz de variable Binaria**

Se construyó una matriz de variables binarias, ceros (ausencia de bandas) y unos (presencia de bandas) en la cual las accesiones forman las filas y las columnas las bandas evaluadas en cada uno de ellos.

#### **4.1.1.3 Método de clasificación**

La matriz de similaridad se construyó con el programa SIMQUAL del paquete "Numerical Taxonomy System for Personal Computer" (NTSYS- pc versión 1.8). El método utilizado fue el de distancia (o similitud) media UPGMA (del inglés UnWeighted pair-Grupp Arithmetic mean) que es el más usado y el que produce menor distorsión al ser comparada con la matriz original de similaridad. A partir de esta matriz, se construyó un dendrograma con el Programa TREE de NTSYS- pc (NTSYS-pc versión 2.02).

#### **4.1.1.4 Análisis Boot Strip**

Los dendrogramas se construyeron con base en los grados de similaridad entre individuos. Sin embargo, la confianza de los agrupamientos que se producen, no son generalmente sensibles a los procedimientos estadísticos usuales de computación. Por lo tanto, Felsenstein (1985) propuso usar Bootstrapping (Efron, 1979) como camino para obtener una apreciación no paramétrica de los límites de

confianza (Henríquez, 2000). Para establecer los índices de similitud de Nei-Li para los grupos seleccionados del dendrograma se establecieron intervalos de confianza del 95%, utilizando el programa WINBOOT (Yap y Nelson, 1997) para ejecutar el análisis Bootstrap a partir de una matriz binaria, donde 1 es para “carácter de banda presente” y 0 para “carácter de banda ausente”.

#### **4.1.1.5 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)**

Este método fue usado para probar si existen diferencias entre los distintos sitios geográficos donde fueron colectados los materiales, y también, para determinar cual de ellos aporta mayores diferencias. Las accesiones fueron distribuidas en grupos con base en el análisis del dendrograma obtenido por el programa NTSYS-pc versión 2.02 y con un nivel de similaridad del 68%; para efectuar el AMOVA se asumió que cada grupo formado es una población separada. Se utilizó el programa AMOVA-PREP (Excoffier *et al.*, 1992), para generar matrices de distancia con base en el coeficiente de DICE y para crear archivos de distancia entre los grupos analizados. Este programa fue diseñado para automatizar los procesos de preparación de archivos que van a ser usados por AMOVA (Análisis de Varianza Molecular) (M.P Miller, 1998).

#### **4.1.1.6 Diversidad genética**

Para estimar los parámetros de Heterocigocidad promedio (H) y el porcentaje de loci polimórficos se utilizó la fórmula no sesgada de Nei (1978).

#### **4.1.1.7 Heterocigocidad Esperada**

Es la medida más generalizada de diversidad genética, consiste en la probabilidad de muestrear dos genes que sean diferentes dentro de una o más poblaciones, usualmente se denomina  $H_e$ , o simplemente H. Se calcula mediante la fórmula:



$$H = 1 - \sum_{i=1}^q X_i^2$$

Donde:

$X_i$  = Frecuencia en la población del alelo  $i$  y  $q$  es el número de alelos

$H$  = Probabilidad de que dos individuos tomados al azar tengan diferente patrón; es el valor o dato con que se presenta la diversidad de la población.

La diversidad para subgrupos de cualquier naturaleza se calculan mediante la siguiente fórmula, con la cual se pondera la  $H_S$  por el número de individuos:

$$H_T = H_S + H_{ST}$$

$$H_{ST} = \frac{(n_1 H_1 + n_2 H_2 + \dots + n_J H_J)}{(n_1 + n_2 + \dots + n_J)}$$

Donde :

$n$  = Número de individuos totales

$H_T$  = Diversidad Total

$H_S$  = Diversidad dentro de cada subgrupo o subpoblación

$H_{ST}$  = Diversidad entre subgrupos o subpoblaciones

Luego, se calcula el  $F_{ST}$  coeficiente de diferenciación genética, para estimar la mayor diversidad posible en cada subgrupo:  $F_{ST} = H_{ST} / H_T$

Wright (1978), clasifica la diferenciación genética de acuerdo al  $F_{ST}$ :

a)  $0-0.05$  = Poca diferenciación genética

b)  $0.05-0.15$  = Moderada diferenciación genética

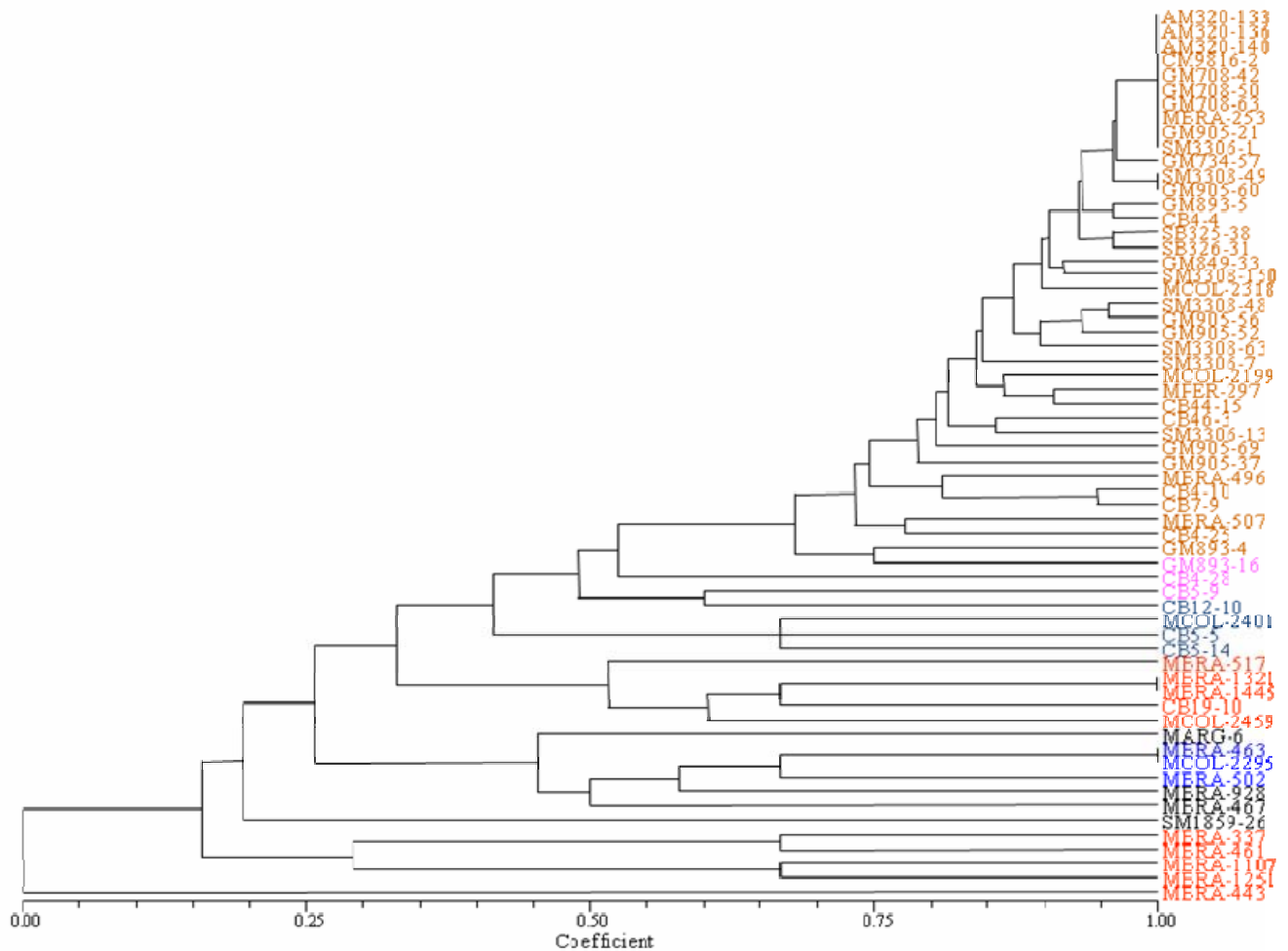
c) Mayor  $0.25$  = Gran diferenciación genética

La variación en la frecuencia alélica de las accesiones analizadas se obtuvo utilizando el paquete estadístico TFPGA (Tools For Population Genetic Analyses, versión 1.3, 2000) además se determinó el  $f$  estadístico insesgado con un intervalo de confianza del 95%.

## **4.2 RESULTADOS Y DISCUSION**

### **4.2.1 Análisis de la Variabilidad del Carácter Contenido de Carotenos Totales**

En la evaluación de la diversidad genética de las 67 accesiones de yuca se utilizaron 140 marcadores microsatélites los cuales mostraron el mayor polimorfismo y buena resolución de las bandas (Marin, 2008). El número de alelo en cada locus en todo el grupo de datos estuvo comprendido en un rango de 2 hasta 5. Tres o más alelos fueron encontrados en un 70% de los 140 marcadores y el número promedio de alelos por locus fue de 2.5. Las relaciones genéticas entre las accesiones evaluadas pueden ser visualizadas en el dendrograma de la Figura 4.1, que se basa en un coeficiente de similaridad de Nei-Li de 0.68. Se formaron seis grupos, en los cuales se puede observar claramente una tendencia agruparse según su procedencia, autopolinización, cruzamiento dirigido o selección masal o por el sitio geográfico donde estas fueron colectados. Sin embargo, hay algunos materiales que no obedecen a ningún patrón de agrupamiento y se encuentran clasificadas dentro de diferentes grupos poniendo de manifiesto las diferentes relaciones que se pueden presentar entre las especies.



**Figura 4.1.** Dendrograma de la estructura genética de las 67 accesiones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), con los 140 marcadores microsatélites seleccionados. Basado en el Coeficiente de Similaridad de Nei-Li de 0.68, se obtuvieron 6 grupos.

A pesar de que la yuca es una especie que se propaga vegetativamente, en los análisis moleculares se observa que hay una gran variabilidad genética, y especialmente en las poblaciones silvestres, que no han sido seleccionadas ni multiplicadas por el hombre, sino que su dispersión opera a nivel natural. La diversidad genética de las poblaciones que se reproducen clonalmente puede deberse a diferentes factores tales como la diseminación de la semilla, el nivel de alogamia de la especie, el manejo de los agricultores como la sanidad, tamaño de

fruto, resistencia a enfermedades, sabor, etc, que encontrarlos en el campo los introducen a sus cultivos contribuyendo a la variación genética total.

En la evaluación de éstos 67 materiales con los 140 loci microsatélites, se encontró que promedio de loci polimórficos fue de 94% considerando todos los grupos formados. Los valores de heterocigosidad encontrados fueron altos en un rango de 0.557 a 0.592 con un promedio de 0.56. Esto implica que la probabilidad de que dos alelos seleccionados al azar sean diferentes en más del 50%.

En con estudios de diversidad genética en yuca donde usando marcadores aloenzimáticos (Lefevre y Charrier1993; Resende *et al.*, 2000) la proporción de heterocigotos observada es menor y tres veces más grande cuando se usan marcadores microsatélites. En accesiones domesticadas la proporción de heterocigotos observados encontrada fue de dos a tres veces más grande para loci microsatélites que para aloenzimas (Tang y Knapp, 2003) y en “landraces” de sorgo fue veinte veces mas grande para microsatélites que para aloenzimas (Dje *et al.*, 1999). En general la alta proporción de heterocigotos observados en evaluaciones con marcadores microsatélites es esperada debido a su alto polimorfismo y buena cobertura del genoma.

La heterocigosidad promedio total observada en todos los loci evaluados y considerando todos los grupos formados es alta  $H_t=0.559$  al igual que la heterocigosidad promedio esperada ( $H_t = 0.532$ ), lo cual puede estar asociado a la probable naturaleza alógama de la especie, la cual tiende a favorecer la conservación del alto porcentaje de heterocigotos, así como a la presencia de algunas accesiones que pudieron ser colectadas en estado silvestre.

Por otra parte solamente una pequeña fracción de la heterocigosidad observada fue debida a la diferenciación entre los grupos formados ( $G_{st} = 0.034$ ) mientras que la mayor parte de la diversidad fue encontrada dentro de los grupos ( $H_s =$

0.543), esto indica un alto flujo de genes entre los diversos grupos, este flujo de genes es probablemente mediado por el intercambio de materiales que se pueden presentar entre diferentes zonas agroecológicas, como también la extensiva distribución de los materiales.

Por el contrario en un estudio realizado por Kizito, *et al.*, 2006b sobre diversidad y variabilidad genética de yuca en pequeñas fincas en Uganda, encontraron que la mayor parte de la diversidad genética total ( $F_{IT} = 0.236$ ) estaba entre variedades ( $F_{ST} = 0.250$ ) comparada a la diversidad dentro ( $F_{IS} = -0.021$ ), mostrando así, que las variedades fueron diferenciadas unas de otras por diferentes factores genéticos y ambientales.

En el estudio del efecto de la introgresión en el gene pool de yuca y la diferenciación genética entre América Latina y el Este y Oeste de África, Kizito (2007). Los cálculos de diferenciación genética entre los diferentes grupos ( $F_{ST}$ ) mostraron una pequeña diferenciación entre las variedades en Uganda y Tanzania (Este de África) y Nigeria (Oeste de África), con un  $F_{ST}$  promedio de 0.048. Sorprendentemente una gran diferenciación genética fue encontrada entre las variedades de yuca de Uganda y Nigeria y entre variedades de Tanzania y Nigeria, que entre variedades entre América Latina y los países africanos ( $F_{ST}$  promedio = 0.067). Lo anterior pone de manifiesto el efecto de la introgresión en la diversidad genética de una especie.

En estudios de diversidad genética en Uganda los valores más pequeños de heterocigosidad promedio esperada (corregida por el tamaño pequeño de la muestra, Nei, 1978) se presentó en agroecosistemas del Norte (0.487) mientras que los agroecosistemas de montaña tuvieron los más altos valores (0.594). Resaltando el hecho que en los ecosistemas en donde la acción antrópica es mínima existe una alta variabilidad.

Los resultados encontrados muestran una considerable variación genética tanto entre como dentro de grupos conformados, aunque la variación fue más grande dentro de los grupos evaluados. La gran variación presente puede ser el resultado de la selección por parte de los agricultores de plántulas producidas por recombinación sexual espontánea.

La variación intravarietal, la gran diferenciación genética encontrada en general muestra la capacidad de los agricultores para mantener y diferenciar sus variedades. Sin embargo, la gran similaridad encontrada entre algunas accesiones evaluadas sugiere la ocurrencia de intercambio de material entre agricultores de fincas cercanas.

Teniendo en cuenta los valores de heterocigosidad y de diferenciación genética encontrados en este estudio se puede afirmar que existe una suficiente diversidad genética entre las accesiones evaluadas la cual puede estar asociado a la probable naturaleza alógama de la especie, migración, flujo de genes, transferencia de materiales entre una región y otra, presencia de accesiones silvestres, entre otros factores. Por lo tanto existen materiales a partir de los cuales se puedan diseñar esquemas de mejoramiento tendientes a la obtención de una mejor calidad nutricional.

Existen además múltiples factores como el predominio de un sistema de reproducción exogámico, la morfología floral, el tipo de reproducción sexual y la duración del ciclo de vida que pueden estar influenciando de una mayor forma a la formación de una estructura genética particular. No obstante, la dispersión de las semillas y polen evaluadas a diferentes escalas espacio-temporales ha sido el principal componente para confirmar tales planteamientos (Hedrick, 1983). En general el conocimiento sobre la estructura de la diversidad genética entre y dentro de áreas yuqueras es importante para el desarrollo de estrategias para la

conservación del germoplasma y programas de mejoramiento participativo de diferentes características de importancia económica.

En diferentes estudios se ha encontrado una considerable variación genética tanto entre como dentro de variedades de yuca, aunque la variación fue más grande entre variedades. La gran variación genética dentro de las variedades podría ser el resultado de la selección voluntaria de los agricultores de plántulas producidas por recombinación sexual espontánea y por lo tanto de origen desconocido. Gran variación genética dentro de variedades también ha sido encontrado en las comunidades de agricultores de pequeña escala en Guyana (Elias *et al.*, 2001a) y Brasil (Second *et al.*, 1997; Sambatti, Martins y Ando, 2001). Se ha encontrado que algunos loci muestran una extensa variación dentro de variedades podría indicar que éstos loci no están ligados a ninguna característica de interés para los agricultores mientras que los loci que muestran menos variación y loci predominantes dentro de las variedades pueden estar ligados a características de interés. También variedades cultivadas por pequeños agricultores en Guyana mostraron diferentes niveles de variación dentro de ellos, algunos, fueron monomórficos y otros tuvieron una alta variación intravarietal (Elias *et al.*, 2001b).

Una gran diversidad de la yuca silvestre y sus clones indígenas fue encontrada en Brasil, su centro de origen. Los recursos genéticos de *Manihot* han sido colectados, evaluados y manipulados desde 1970 (Nassar, 1999). La diversidad genética de las especies silvestres encontrada por la evolución y selección natural combinada con la selección a través de miles de años ha permitido el desarrollo de recursos genéticos muy diversos. Estos clones indígenas han permitido la selección de clones con alto contenido de  $\beta$ -caroteno, como también ricos en licopeno combinados con una alta palatabilidad (Nassar *et al.*, 2005). Estos clones han sido propagados y distribuidos por los agricultores en el Distrito Federal y



Estados adyacentes. Una campaña esta en desarrollo para educar a los agricultores y enseñarles sobre el valor nutritivo de estos clones.

Especies silvestres de yuca también están siendo manipuladas, por ejemplo, cruces de *Manihot oligantha*, una fuente de alto contenido de proteína, con yuca cultivada produjeron un cultivar con 4% de proteína, ambos con niveles normales (Nassar y Dorea, 1982). Este híbrido tiene muy alto contenido de proteína en la hoja alcanzando 9000 mg/kg comparado a 700 mg/kg de los cultivares comunes. Clones altamente productivos están siendo obtenidos a través de hibridaciones interespecíficas entre especies silvestres, llamadas *M. glaziovii*, *M.pseudoglaziovii* y *M. cearulescens*, resultando en un incremento en la producción de las raíces con rendimientos de tres a cuatro veces mas altos que los cultivares comunes incluyendo incrementos en el crecimiento vegetativo (Nassar, 2006).

En conclusión, diferentes investigaciones han mostrado una gran diferenciación genética entre variedades de yuca. Sin embargo, la variación genética y morfológica también ha sido encontrada dentro las variedades locales, introducidas y mejoradas. Esto muestra la complejidad de la variedad definida por los agricultores y la importancia de la combinación de análisis genéticos con la denominación de los agricultores en la determinación de la composición de sus variedades y el entendimiento del papel de los agricultores en el manejo en la diversidad genética de yuca. Los mejoradores pueden afectar la composición de las variedades de los agricultores, lo cual se manifiesta en una pérdida de las variedades locales y en una reducción de la diversidad genética. Sin embargo, como los sistemas tradicionales, los cuales son caracterizados por ambientes inestables y diversas necesidades de los agricultores, se beneficiarían grandemente a partir del mantenimiento de una alta diversidad genética dentro de sus cultivos para la seguridad alimentaria esto es de gran importancia para la pérdida de la diversidad genética en el campo de los agricultores.

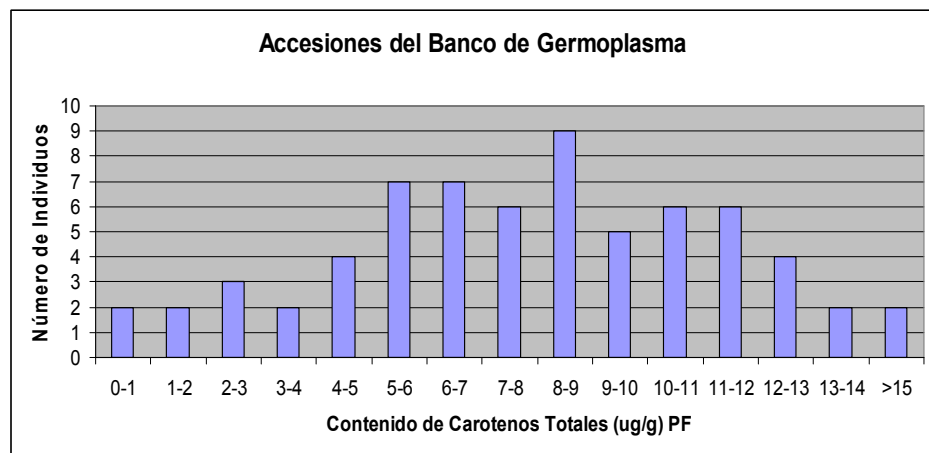
#### 4.2.2 Análisis del Contenido de Carotenos Totales y Marcadores Microsatélites asociados.

El análisis de espectrofotometría para determinar el contenido de carotenos totales en las 67 accesiones del banco de germoplasma evaluadas mostró valores comprendidos en un rango entre 0.95 a 18.25 ug/g en base a peso fresco para los genotipos CB5-5 y CB7-9, respectivamente (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1** Contenido de Carotenos Totales en 67 accesiones del banco de germoplasma

Genotipo	Total carotenos ug/g FW	Genotipo	Total carotenos ug/g FW
AM 320- 133	8,1	MCOL 2401	4,93
AM 320- 136	8,3	MCOL 2436	8,31
AM 320- 140	10,1	MCOL 2459	6,6
CM 9816- 2	10,98	MCOL 2489	5,13
GM 708- 42	8,18	MPER 297	7,7
GM 708- 50	10,29	CB 4- 4	7,68
GM 708- 63	12,75	CB 4- 10	8,24
GM 734- 57	8,45	CB 4- 25	8,91
GM 849- 33	8,45	CB 4- 28	6,75
GM 893- 4	6,68	CB 5- 5	0,95
GM 893- 5	9,17	CB 5- 6	7,84
GM 893- 16	6,94	CB 5- 9	5,45
SM 1859- 26	2,61	CB 5- 14	4,7
MARG 6	4,81	CB 7- 9	18,25
MBRA 1A	5,2	CB 12- 10	5,78
MBRA 253	11,73	CB 19- 10	5,49
MBRA 337	5,3	CB 44- 15	11,29
MBRA 443	5,51	CB 46- 3	10,51
MBRA 461	3,5	SB 325- 38	13,36
MBRA 463	1,8	SB 326- 31	16,48
MBRA 467	0,97	SM 3306- 1	9,59
MBRA 496	7,9	SM 3306- 7	11,94
MBRA 502	4,46	SM 3306- 13	12,68
MBRA 507	8,8	SM 3308- 49	12,14
MBRA 517	6,22	SM 3308- 48	11,26
MBRA 928	1,68	SM 3308- 63	10,38
MBRA 1107	3,21	SM 3308- 150	11,61
MBRA 1251	2,54	GM 905- 3	9,65
MBRA 1321	6,29	GM 905- 21	11,71
MBRA 1445	4,8	GM 905- 37	9,83
MCOL 2199	7,1	GM 905- 52	13,79
MCOL 2295	3,0	GM 905- 56	9,73
MCOL 2318	7,7	GM 905- 60	10,78
		GM 905- 69	12,57

En la figura 4.2 se puede observar el patrón de distribución del contenido de carotenos totales en las accesiones evaluadas y en donde las clases más numerosas corresponden a los individuos que presentan contenidos entre 7-11 ug/g en peso fresco, por lo cual constituyen materiales interesantes para ser evaluados con los marcadores microsatélites polimórficos seleccionados anteriormente y que están evidenciando la presencia de loci que codifican para características cuantitativas o QTLs.



**Figura 4.2.** Distribución de Frecuencia del Contenido de Carotenos Totales en las 67 accesiones de del banco de germoplasma de yuca.

El análisis de correlación y regresión simple con marcadores microsatélites que habían sido identificados previamente como polimórficos y que a la vez han ubicado loci que codifican para características cuantitativas (QTLs) mostró valores de correlación entre 0.45 a 0.62 y de regresión entre 0.19-0.38 para los marcadores SSRY-178 y SSRY-324, y ubicados en los grupos de ligamiento H y D, respectivamente. (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2** Análisis de Correlación y Regresión de marcadores microsatélites polimórficos en las 67 accesiones del banco de germoplasma con su respectiva ubicación en los grupos de ligamiento en el mapa genético molecular de yuca (Fregene et al., 1997).

Microsatélite	Correlación	R-Regresión	Grupo Ligamiento
SSRY-178	0.43	0.19	H
SSRY-226	0.45	0.21	G
SSRY-330	0.46	0.22	D
SSRY-49	0.46	0.22	F
SSRY-88	0.47	0.23	K
SSRY-313	0.52	0.28	D
SSRY-242	0.55	0.31	A
NS-717	0.56	0.32	D
SSRY-31	0.57	0.33	F
SSRY-251	0.61	0.37	D
SSRY-324	0.62	0.38	D

En comparación con los estudios anteriores en los cuales se habían evaluado estos mismos marcadores pero en poblaciones segregantes F1 provenientes del cruzamiento entre raíces blancas por blancas, amarillas por amarillas y blancas por amarillas y en las familias S1, al evaluar estas accesiones se encontraron valores de correlación y regresión mucho más altos y una vez más los marcadores que explican en mayor proporción la variación fenotípica observada para la característica contenido de carotenoides se encuentran ubicados en el grupo de ligamiento D. Por otra parte los marcadores que habían mostrado estar altamente correlacionados con los bajos contenidos de carotenos en las familias S1, en estas evaluaciones presentaron bajos valores de correlación como el marcador SSRY-178 y SSRY-49 (AM691, AM697, AM698).

Estos marcadores pueden ser tenidos en cuenta en procesos de selección negativa para la característica, pues permitirían la identificación temprana de aquellos genotipos que poseen muy bajos contenidos de carotenoides. Así las regiones del genoma que habían sido identificadas anteriormente a bajos, intermedios y altos contenidos de  $\beta$ -caroteno, están mostrando el mismo comportamiento en otras poblaciones y en otras condiciones.

### 4.3 CONCLUSIONES

En la evaluación de la diversidad genética del contenido de carotenos totales en las raíces de yuca utilizando 140 marcadores microsatélites muestra que el número de alelo en cada locus en todo el grupo de datos estuvo comprendido en un rango de 2 hasta 5. Tres o más alelos fueron encontrados en un 70% de los 140 marcadores y el número promedio de alelos por locus fue de 2.5.

Con un coeficiente de similaridad de Nei-Li 0.68 se conformaron seis grupos en donde se puede observar claramente una tendencia de los materiales a agruparse según su procedencia, autopolinización, cruzamiento dirigido o selección masal o por el sitio geográfico donde estas fueron colectadas. Sin embargo hay algunos materiales que no obedecen a ningún patrón de agrupamiento y se encuentran clasificados dentro de diferentes grupos poniendo de manifiesto las diferentes relaciones que se pueden presentar entre las especies.

Los valores de heterocigosidad promedio encontrados en este estudio ( $H_t = 0.532$ ) son altos poniendo de manifiesto la existencia de alta variabilidad genética lo cual puede estar asociado a la probable naturaleza alógama de la especie, la cual tiende a favorecer la conservación del alto porcentaje de heterocigotos, así como a la presencia de algunas accesiones que pudieron ser colectadas en estado silvestre. Por lo anterior existe suficiente variabilidad genética sobre la cual procesos de selección y recombinación pueden llevar a la consecución de genotipos con altos contenidos de carotenoides de importancia nutricional.

Los análisis de correlación y regresión entre el contenido de carotenos totales y los marcadores microsatélites en las 67 accesiones del banco de germoplasma evaluadas, mostraron una vez más que los marcadores que se encuentran correlacionados con los altos contenidos se encuentran en el grupo de ligamiento D.

#### 4.4 BIBLIOGRAFIAS

- 1- BEECHING, J.R., P. MARMEY, M.C. CAVALDA, M. NOIROT, H.R. HAYSON, M.A. HUGHES y A. CHARRIER, 1993. An assessment of genetic diversity within a collection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm using molecular markers. *Ann Bot* 72: 515–520.
  
- 2- BERNARDO R 1994. Prediction of maize single-cross performance using RFLPs and information from related hybrids. *Crop Sci.* 34 : 20-25.
  
- 3- BERTHAUD, J., CLEMENT, J.C., EMPERAIRE, L. LOUETTE, D., PINTON, F., SANOU, J. y SECOND, G. 2001. The role of local-level gene flow in enhancing y maintaining genetic diversity. In: *Broadening the Genetic Base of Crop Production*. (Eds. H.D. Cooper, C. Spillane y T. Hodgkin). CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp 81-103.
  
- 4- CARLY FM, STASKAWICZ BJ. 1993. Genetic characterization of the Pto locus of tomato: semi-dominance y cosegregation of resistance to *Pseudomonas syringae* pathovar tomato y sensitivity to the insecticide Fenthion. *Mol Gen Genet.* 1993 May; 239. (1-2):17–27.
  
- 5- CHAVARRIAGA, P. AGUIRRE, M. M. MAYA, M.W. BONIERBALE. S. KRESOVICH. M.A. FREGENE. J. THOME. G. KOCHERT. Microsatellites in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) discovery, inheritance and variability. *Theor Appl Genet* (1999) 97: 493-501.

- 6- CHERNELA, J. M. 1987. Os cultivares de myioca na área do Uaupés (Tukano). Pages. 151–158. in B. Ribeiro, ed., SUMA: Etnológica Brasileira, 1, Etnobiologia. Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Petrópolis, RJ.
- 7- DJ'E, Y., D. FORCIOLI, M. ATER, LEF'EBVRE y X. VEKEMANS, 1999. Assessing population genetic structure of sorghum landraces from North-western Morocco using allozyme y microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 99: 157–163.
- 8- DONINI, P., P. STEPHENSON, G.J. BRYAN y R.M.D. KOEBNER, 1998. The potential of microsatellite for high throughput genetic diversity assessment in wheat y barley. *Genetic resources y Crop evolution* 45: 415–421
- 9- DOS SANTOS, JB, NIENHUIS J, SKROCH P, TIVANG J Y SLOCUM MK. 1994. Comparison of RAPD y RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theoretical y Applied Genetics* 87:909-915.
- 10- EDWARDS, M.D., STUBER, C.S., WENDEL., J.F. 1987. Molecular marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution y types of gene action. *Genetics*. 116: 113-125.
- 11- ELIAS M, PANAUD O Y ROBERT T (2000) Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. *Heredity* 85:219-230.
- 12- ELIAS, M., D. MCKEY, O. PANAUD, M.C. ANSTETT y R. THIERRY, 2001a. Traditional management of cassava morphological y gene diversity by the Makushi Amerindians (Guyana, South America): Perspectives for on-farm conservation of crop genetic resources. *Euphytica* 120: 143–157.



- 13- ELIAS, M., L. PENET, P. VINDRY, D. MCKEY, O. PANAUD y T. ROBERT, 2001b. Unmanaged sexual reproduction y the dynamics of genetic diversity of a vegetatively propagated crop plant, cassava (*Manihot esculenta* Crantz), in a traditional farming system. *Mol. Ecol* 10: 1895–1907.
- 14- EFRON, B. 1979. Bootstrap methods another look at the jackknife. *Ann. Stat.* 7: 1 – 12.
- 15- EXCOFFIER, L. 1992. AMOVA (Analysis of Molecular Variance) 156. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland.
- 16- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.
- 17- FLAVELL RB. 1991. Molecular biology y genetic conservation programmes. *Biological Journal of the Linnean Society* 43: 73-80.
- 18- FREGENE M., F. ANGEL., R. GOMEZ, F. RODRIGUEZ, P. CHAVARRIAGA, W. ROCA, J. TOHME, M. BONIERBALE. 1997. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet* 95; 431-441.
- 19- FREGENE M, SUAREZ M, MKUMBIRA J, KULEMBEKA H, NDEDYA E, KULAYA A, MITCHEL S, GULLBERG U, ROSLING H, DIXON A y et al. (2003) Simple sequence repeat marker diversity in cassava landraces: Genetic diversity y differentiation in an asexually propagated crop. *Theor Appl Genet* 107:1083-1093.
- 20- GEBHARD C., D. MUGNIERY, E. RITTER, F. SALAMINI y E. BONNEL. 1993. *Theor. Appl. Genet.* 85, 541.

- 21- HAMRICK J. L. Y M. J. W. GODT, 1997. Allozyme diversity in cultivated crops. *Crop Sci.* 37: 26-30.
- 22- HARTL, D.L. Y CLARK, A.G. 1997. *Principles of population genetics*. 3rd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- 23- HEDRICK, P.W., M.E. GINEVAN y E.P. EWING. 1976. Genetic polymorphism in heterogeneous environments. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 7:1-32.
- 24- HEDRICK, P.W. 1983. *Genetics of populations*. Boston, Ma: Science Books International, Inc.
- 25- HENRIQUEZ, María Antonia. 2000. Diversidad genética de *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc) Ferraris, utilizando marcadores moleculares. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. 101 p.
- 26- JARVIS, D.I. y HODGKIN, T. 1999. Wild relatives y crop cultivars: detecting natural introgression y farmer selection of new genetic combinations in agroecosystems. *Molecular Ecology* 8, S159-S173.
- 27- KIZITO, E. CHIWONA L. EGWANG, T. FREGENE, M y WESTERBERG, A. 2006. Genetic diversity y variety composition of cassava on small-scale farms in Uganda: an interdisciplinary study using genetic markers y farmer interviews. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.
- 28- KISITO, E.B; RÖNNBERG-WÄSTLJUNG, A.C; EGWANG, T; GULLBERG, U. et al. 2007. Quantitative trait loci controlling cyanogenic glucoside y dry matter content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. *Hereditas.* 144: 129-136.

- 29- LANHAM PG, FENNELL S, MOSS JP Y POWELL W (1992) Detection of polymorphic loci in *Arachis* germplasm using random amplified polymorphic DNAs. *Genome* 35:885-889.
- 30- LEFEVRE, F. y CHARRIER, A. 1993a. Isozyme diversity within African *Manihot* germplasm. *Euphytica* 66, 73-80.
- 31- LEFEVRE, F. y CHARRIER, A. 1993b. Heredity of seventeen isozyme loci in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* 66, 73-80.
- 32- LEUNG, H.; NELSON, R.H.; LEACH, J.E.1993. Population structure of Plant pathogenic fungi y bacteria. *Advances in Plant Pathology* 10, 157 – 205.
- 33- LYE, R. Y THOMPSON, R. (1990). Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, 124: 743–756.
- 34- MACKILL, D.J., M.M. AMANTE, B.S. VERGARA, Y S. SARKARUNG. 1993. Improved semidwarf rice lines with tolerance to submergence of seedlings. *Crop Sci.* 33:749–753.
- 35- MANU-ADUENING, J.A., LAMBOLL, R.I., DANKYI, A.A. y GIBSON R.W. 2005. Cassava diversity in Ghanaian farming sytems. *Euphytica* 144, 331-340.
- 36- MARCUCCI POLTRI, S.N., ZELENER, N., RODRÍGUEZ TRAVERSO, J., GELID P., HOPP, H.E. 2003. Selection of a seed orchard of *Eucalyptus dunnii* based on genetic diversity criteria calculated using molecular markers. *Tree Physiology* 23:625-632.
- 37- MARIN J.A. 2008. Carotenos en Yuca: Mapeo Genético y Análisis De QTLs en una población S1 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Universidad Nacional de

Colombia, Sede Palmira. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias, Área mejoramiento genético de plantas.

38- MARMEY, P., J. BEECHING, S. HAMON y A. CHARRIER, 1994. Evaluation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collections using RAPD markers. *Euphytica* 74: 203–209.

39- MELCHINGER AE, LEE M, LAMKEY KR y WOODMAN WL. (1990) Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms: relation to estimated genetic effects in maize inbreds. *Crop Sci* 30: 1033–1040.

40- MILLER, M.P. 1998. AMOVA- PREP 1.01. A program for the preparation of AMOVA input files from dominant-market raw data. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ. USA: <http://herb.bio.nau.edu/miller/amovaprp.htm> ).

41- NASSAR, N.M.A. (1982). Collecting wild cassava in Brazil. *Indian J. Genet.* 42: 405-411.

42- NASSAR, N.M.A., VIZZOTTO, C.A., DA SILVA, H.L., SCHWARTZ, C.A. Y PIRES JUNIOR, O.R. 2005. Gene conserve [www.geneconserve.pro.br](http://www.geneconserve.pro.br) articles.15:267-283.

43- NASSAR, N.M.A. 1999. Cassava, *Manihot esculenta* Crantz genetic resources: Their collection, evaluation y manipulation. *Advances in Agronomy* 69:179-230.

44- NASSAR, N. M. A. 2006. Chromosome doubling induces apomixis in a cassava x *Manihot anomala* hybrid. *Hereditas* (Lund), v. 143, p. 01-03, 2006.

45- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70:3321-3323.

- 46- NEI, M.; LI, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasa. *Proc nat Acad Sci* 79: 5267 – 5273.
- 47- NOVY, R. G., C. KOBAK. (1994). RAPDs identify varietal misclassification y regional divergence in cranberry (*Vaccinium macrocarpon* (Ait.) Pursh). *Theoretical y Applied Genetics* 88(8): 1004-1010. Blueberry Cranberry Res. Cent., Rutgers Univ, Chatsworth, NJ 08019, USA.
- 48- OLSEN, K.M. Y B.A. SCHAAL (2001). Microsatellite variation in cassava y its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. *American Journal of Botany* 88: 131-142.
- 49- PARAN, I. Y MICHELMORE, R. W. (1993). Identification of reliable PCR-based markers linked to disease resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet*, 85: 985–993.
- 50- RESENDE, A.G., P.S.V. FILHO y M.P.S. MACHADO, 2000. Isozyme diversity in cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). *Biochem Genet* 38: 203–216.
- 51- SAMBATTI, J. B M., P. S. MARTINS, Y A. ANDO. 2001. Folk taxonomy y evolutionary dynamics of cassava: a case study in Ubatuba, Brazil. *Economic Botany* 55:93–105.
- 52- SECOND, G., ALLEM, A. C., MENDES, R. A., CARVALHO, L. J. C. B., EMPERAIRE, L., INGRAM, C. *et al* (1997). Molecular marker (AFLP)-based *Manihot* y cassava numerical taxonomy y genetic structure analysis in progress: implications for their dynamic conservation y genetic mapping. *Afr J Root Tuber Crops*, 2: 140–147.

- 53- SMITH, O. S., J. S. C. SMITH, S. L. BOWEN, R. A. TENBORG, Y S. J. WALL, 1990: Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F1 grain yield, heterosis, y RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 80, 833D840.
- 54- SNEATH, P.H.A., y SOKAL, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy: The Principles y Practice of Numerical Classification.* W.H. Freeman y Co., San Francisco. 573 p.
- 55- SORENSEN, T . 1948. A method of establishing groups of equal amplitude in plant society based on similarity of species content . *K . Danske Vidensk. Selsk . 5* :1-34.
- 56- TANG, S. y S.J. KNAPP, 2003. Microsatellites uncover extraordinary diversity in native American landraces y wild populations of cultivated sunflower. *Theor Appl Genet* 106: 990–1003.
- 57- TANKSLEY SD, GANALMW, MARTIN GB.:1995.Chromosomal lying: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet* 11: 63–68 (1995).
- 58- THORMANN CE, FERREIRA ME, CAMARGO LEA, TIVANG JG Y OSBORN TC (1994) Comparison of RFLP y RAPD markers to estimating genetic relationships within y among cruciferous species. *Theor Appl Genet* 88:973-980.
- 59- TIMMERMAN GM, FREW TJ, WEEDEN NF, MILLER AL, GOULDEN DS. 1994. Linkage analysis of er-1 a recessive *Pisum sativum* gene for resistance to powdery mildew fungus (*Erysiphe pisi* DC). *Theor Appl Genet* 88:1050-1055.
- 60- WRIGHT, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations, Vol 4.* University of Chicago.

61- WU, K. S. Y S. D. TANKSLEY, 1993. Abundance, polymorphism y genetic mapping of microsatellites in rice. Mol. Gen. Genet. 241: 225-35.

62- YAP I.V. y NELSON R.J. (1996) WinBoot: A Program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine the Confidence Limits of UPGMA-based Dendrograms. International Rice Research Institute (IRRI), Manila, Philippines.

## 5.0 DISCUSION GENERAL

Los carotenoides son un grupo de pigmentos lipofílicos con gran diversidad de actividades biológicas. En las plantas, son parte del complejo de la antena colectora, involucrados en la protección foto-oxidativa. Sirven como precursores de la hormona del ácido abscísico y proveen el color en flores y frutos para atraer los polinizadores ayudando a dispersar el polen y las semillas (Hirschberg, 2001; DellaPenna y Pogson, 2006). En humanos, han sido asociados con la reducción del riesgo de cáncer, disminución de las enfermedades cardiovasculares, reducción del riesgo de cataratas y la degeneración macular relacionada con la edad e incrementa la absorción de hierro (García-Casal, 2006; Van den Berg *et al.*, 2000; Mares-Perlman *et al.*, 2002). Sin embargo, la actividad mejor conocida de los carotenoides, es la de ser precursores de vitamina A (retinol).  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina considerados componentes provitamina A siendo el  $\beta$ -caroteno el de más alta actividad, además una sola molécula puede potencialmente ser transformada en dos moléculas de retinol.

La deficiencia de vitamina A, afecta aproximadamente a 250 millones de personas pobres en la región semiárida de África y Asia; es la principal causa de ceguera, incremento de mortalidad en niños y mujeres embarazadas y la susceptibilidad a la malaria y enfermedades diarreicas (ACC/SCN, 2000). Diferentes estrategias se han planteado para solventar dichas deficiencias entre ellas el suministro de vitaminas y minerales a mujeres embarazadas y niños pequeños; la fortificación de alimentos con esos nutrientes mediante procesos que se aplican en poscosecha. . No obstante, la fortificación y el suministro de suplementos de carácter comercial tienen sus limitaciones. Es posible que los alimentos fortificados no lleguen a gran parte de la gente que más los necesita porque la infraestructura de mercados es insuficiente. Asimismo, el suministro de suplementos depende de una



infraestructura de salud altamente funcional, que raras veces se encuentra en los países en desarrollo. Se necesitan, por tanto, nuevos enfoques para complementar lo que se está haciendo.

Las estrategias basadas en alimentos básicos enriquecidos nutricionalmente ofrecen oportunidades claras de hacer esto en forma sostenible (Biofortificación). El sistema agrícola, hoy en día proporciona el sustento que mantiene a una población mundial de alrededor de 7.500 millones de habitantes. Lo importante es encontrar formas de hacer que este sistema proporcione las cantidades trazas de yodo, hierro,  $\beta$  caroteno (Pro-Vitamina A), así como el de otros microelementos y vitaminas, a todas las personas, particularmente aquellas que viven en las condiciones más difíciles (Combs *et al.*, 1996). Se Emplea técnicas de fitomejoramiento que aprovechan la variabilidad existente en las diferentes variedades de las especies cultivadas respecto a su contenido de micronutrientes, para aumentar ese contenido en los cultivos en cuestión y que actualmente está implementado el uso de herramientas biotecnológicas que aceleren los procesos de selección y obtención de materiales con mayores contenidos de carotenoides con calidad provitamina A (Welch, 2002; Gregorio, 2002).

La yuca ha sido identificada como una de las especies que genera mayores perspectivas para la biofortificación de su raíz con  $\beta$ -caroteno, precursor de Vitamina A en humanos, debido a que su cultivo representa la fuente alimenticia y de sustento económico más importante para más de 600 millones de personas en África, Asia y Latinoamérica (FAO, 2002). Por lo tanto, el incremento en el contenido de carotenoides en yuca tendría un gran impacto en la salud de personas pobres en el mundo.

Los estudios iniciales del mejoramiento de esta característica tuvieron como objetivos determinar el rango de variación en el contenido de carotenoides en

accesiones de banco de germoplasma de yuca y clones élite del programa de mejoramiento de CIAT, establecer su importancia relativa, medir el grado de asociación entre el color de la raíz y el contenido de carotenoides en yuca para finalmente explorar alternativas para mejorar aún más la concentración de los carotenoides ya encontrados. (Safo-Katanka *et al* 1983; Pepping *et al* 1988; Ortega 1991; Bedoya 1999; Bolaños 2001; Chávez *et al.*, 2005;). Con estas investigaciones se concluyó que existe suficiente variabilidad genética para el contenido de carotenoides en raíces de yuca y hay buenas oportunidades para incrementarlo por mejoramiento tradicional y no tradicional, las raíces de yuca amarilla tienden a tener un menor deterioro post-cosecha y que el color de las raíces es un buen indicador del contenido de carotenos en las raíces de yuca.

Dentro de este contexto la primera parte de este trabajo se encamino hacia la caracterización bioquímica de los niveles de carotenos totales en 756 individuos de yucas blancas, cremas y amarillas, pertenecientes a 32 familias que permitió la selección de tres familias, las cuales presentaron un amplio patrón de segregación en cuanto a la característica contenido de carotenos y que fueron autopolinizadas para las producir progenies S1 (para fijar la variación encontrada en esta etapa) para elucidar la herencia del contenido de carotenos en raíces de yuca. Se pudo observar que existe una alta correlación entre el contenido de carotenos totales y el color de pulpa de la raíz sin embargo dentro de cada intensidad de color considerada existe variación de sus contenidos; evidenciando que características como el contenido de carotenos y color de pulpa de la raíz tienen un control genético mas complejo.

Las raíces de yuca tienen la capacidad básica para sintetizar  $\beta$ -caroteno como muestra la identificación de cultivares son raíces amarillas con carotenos. La amplia variación en el contenido de  $\beta$ -caroteno en las raíces de yuca, muestra que es posible que la modificación genética mejore el contenido de carotenoides aumentando el valor nutricional de la raíz (Fregene y Puonti-Kaerlas, 2002). La

caracterización de los niveles de expresión de genes de carotenos en yuca, podría contribuir al conocimiento de la vía metabólica y comprender mejor la forma de regulación de la ruta biosintética del  $\beta$ -caroteno.

Los estudios moleculares de las tres familias (GM708, GM734 y CM9816) permitieron la identificación de marcadores moleculares microsatélites asociados con los altos contenidos de carotenoides y junto con los estudios de mapeo genético se llegó a establecer regiones dentro del genoma de la yuca asociadas con esta característica. Con el fin de cuantificar los efectos de estos marcadores se hicieron los análisis de identificación y validación de QTLs, en los cuales se encontró que aproximadamente 5 QTLs están controlando la expresión del contenido de  $\beta$ -caroteno y cuatro el color de Pulpa de la raíz. De ahí la importancia de este tipo de investigaciones en los esquemas de mejoramiento convencional.

Por ingeniería genética se podría mejorar los puntos débiles de la ruta y así poder obtener nuevos cultivares con calidad nutricional mejorada. Varios estudios han demostrado que los niveles de ARN mensajero (ARNm) de los genes que se expresan en la ruta de biosíntesis son fuertemente regulados en tejidos tales como flores y frutos, indicando que los pasos transcripcionales y postranscripcionales son blancos potenciales para la regulación de la biosíntesis de carotenoides (DellaPena, 1999).

Para lograr generar variedades de yuca con mayores niveles de  $\beta$ -caroteno en la raíz, se debe conocer en detalle el funcionamiento de la ruta biosíntesis de carotenos en este órgano. Este fue el objetivo del trabajo de investigación realizado por Arango (2006) titulado “análisis de expresión de los genes de la ruta biosintética de carotenos y cuantificación de carotenos en hojas y raíces de plantas de yuca a diferentes edades. En donde tres variedades de yuca con diferencias evidentes en coloración de la raíz fueron sometidas a análisis de expresión de los genes involucrados en la ruta biosintética de los carotenos

(MeGGPS, MePSY, MePDS, MeZDS y MeLCYB) usando PCR en tiempo real, y cuantificación de carotenos totales y  $\beta$ -caroteno por HPLC. Los resultados de expresión génica no mostraron diferencias de expresión en los genes evaluados para que soporte esta relación a nivel molecular.

En la revista *Plant Molecular Biology*, en Noviembre de 2004, publicó un artículo donde los principales grupos de investigación en transformación genética de yuca en el mundo y reseñaron el estado del arte de sus investigaciones y de la transformación de yuca en general. Se puso de manifiesto que la capacidad de integrar transgenes en yuca está establecida y además está siendo utilizada para generar plantas que expresan características de interés agronómico. Los sistemas de cultivo de tejidos de transferencia de genes que se emplean actualmente para producir estas variedades de yuca transgénicas han mejorado significativamente en los últimos cinco años (Taylor *et al.*, 2004).

A pesar de que se han hecho reportes sobre la regulación de la ruta biosintética de carotenos en plantas, los mecanismos empleados por éstas para determinar qué carotenoides, y en qué cantidad, son acumulados en cada tejido específico, son todavía fuente de estudio.

Al parecer los mecanismos de regulación de la producción y de la acumulación de carotenos son específicos para cada tejido, y en algunos casos para cada planta; esto explica por qué frecuentemente los eventos regulatorios encontrados en un órgano específico de una planta determinada no se pueden confirmar en otra.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio concernientes a los patrones de expresión de los genes estudiados en las raíces de yuca, se proponen otros niveles de estudio que potencialmente estén influenciando, bien sea en la producción o en la acumulación de carotenos en las raíces de la yuca. Las perspectivas apuntan a regulaciones postranscripcionales como la regulación del

nivel proteico, degradación de carotenos o el almacenamiento de los carotenos sintetizados.

Una de las principales estrategias de mejoramiento de un cultivo como la yuca es el conocimiento detallado del genoma de la planta y con ello la posibilidad de manipular con precisión los genes de interés, acortando el tiempo y los costos que ello requiere. Por esto es necesario construir mapas de ligamiento genético utilizando marcadores polimórficos altamente confiables e informativos que permitan identificar y marcar áreas específicas del genoma, con el fin de asistir la selección de genotipos superiores desde el punto de vista agronómico, como los caracteres de herencia cuantitativa (QTL), resistencia a enfermedades, calidad, producción, entre otros.

El mapeo por posición e identificación de los genes en el cultivo de yuca y en general para cualquier cultivo de interés, va tener un gran impacto; especialmente en lo que respecta a la velocidad y la eficiencia en el proceso de mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares (MAS), puesto que el éxito de la selección artificial que hacen los mejoradores depende fundamentalmente de la habilidad de estos para distinguir entre los efectos genéticos y ambientales.

Entre las aplicaciones prácticas mas importantes que se pueden mencionar, derivadas a mediano plazo del mapa genético de ligamiento, además de la ubicación cartográfica de genes simples de interés y de QTLs, está también la posibilidad de identificación de fragmentos de introgresión que se generan durante los cruzamientos inter-específicos para el mejoramiento convencional en los que se precisa de la eliminación de tramos cromosómicos indeseables ligados al gen de interés provenientes del par donante, al mismo tiempo conservando sistemáticamente aquellos fragmentos que contienen los genes de importancia.

La cartografía de un mapa genético de alta densidad ofrece la posibilidad de elegir múltiples marcadores estrechamente ligados a un carácter de interés, lo cual es

fundamental para un programa de selección asistida por marcadores, así como también abre la posibilidad de realizar técnicas de clonación por posicionamiento y por comparación con otros genomas relacionados evolutivamente, en lo que se conoce como mapeo comparativo.

Quizás la utilidad más evidente de un mapa genético es el análisis y predicción de la herencia conjunta de varios genes (Mather, K.1938). Cuando un carácter está controlado por un solo gen, la cartografía de éste, es decir, su ubicación en el mapa de ligamiento, permite predecir las proporciones con que aparecerá en combinación con otros genes de interés en la descendencia determinados cruzamientos.

En aras de mejorar la informatividad del mapa de ligamiento en especies como yuca, es altamente recomendable la evaluación de marcadores AFLPs para adicionar al mapa basado en microsatélites, con miras a lograr ubicar regiones que más probablemente correspondan a los centrómeros. También es necesario utilizar la citogenética con el fin de asignar orden a los grupos de ligamiento y de esta manera definir el cariotipo de yuca y poderlo correlacionar con los datos moleculares de marcadores físicamente asignados, que permitirá en el futuro hacer análisis comparativos con otros mapas.

El estudio de mapeo genético y análisis de QTLs para el contenido de carotenos y el color de la raíz fueron fundamentales para entender la genética de esta característica, la interacción genotipo por ambiente, la heredabilidad y para encontrar regiones del genoma de yuca asociados con marcadores SSR que pueden ser luego usados para selección asistida por marcadores. Las poblaciones S1 se convierten en pieza clave para la fijación de los caracteres contenido de carotenos totales y color pulpa de raíz, llegando a seleccionar de esta, fenotipos ideales para futuros cruces y evaluaciones de estabilidad y fidelidad con marcadores de tipo SSR.

Esta población S1 hace parte de una nueva estrategia de mejoramiento empleada en yuca, en la cual se usa la endogamia para ir fijando caracteres, y de esta manera llegar a producir poblaciones un poco más estables (homocigotos) al cabo de varias generaciones de autofecundación.

Las regiones cromosómicas portadoras de los QTLs identificados mediante marcadores moleculares son demasiado grandes para aislar, clonar y manipular el DNA informativo del QTL por sí mismo. Por lo tanto la estrategia que se sugiere es seleccionar individuos portadores de marcadores con QTLs favorables y asistir o ayudar en la selección cuando se empleen los métodos convencionales de mejoramiento; por ejemplo en la selección genealógica, en la selección con base en "test-crosses", o en la selección en retrocruzamientos, etc. El método es sencillo, seguir la pista del gen marcador asociado al QTL favorable a través de las sucesivas generaciones de selección.

Los genes relacionados con la biosíntesis de carotenos en las raíces de yuca, es posible que se expresen en forma de familias génicas, clusters o agrupaciones dependiendo de las necesidades de la planta, también se manifiestan dichos genes dependiendo del lugar específico en donde se estén sintetizando (fruto, flor, hojas, raíces), es decir los genes que intervienen en esta ruta sufren de expresión por compartimentalización. Así por ejemplo, el gen fitoeno sintasa, el cual explica el 30% de la varianza fenotípica, se ubicó en un grupo de ligamiento diferente al grupo 1, en donde se ubicaron los posibles QTLs asociados con los marcadores SSR de cDNA establecidos en este estudio. Sugiriendo que existen otros genes que actúan sobre el color amarillo y necesitan ser clonados para entender completamente la herencia del contenido de  $\beta$ -caroteno en yuca.

El uso efectivo de los marcadores moleculares ligados a los QTLs identificados, requerirá primero una validación de los marcadores probándolos en poblaciones más grandes y en muchos ambientes y así se podrá tener una idea del

comportamiento de los QTLs en los diferentes ambientes y así hacer un proceso de MAS mucho mas eficiente dentro de programas de mejoramiento tendientes a mejorar la calidad nutricional de las raíces de yuca.

Una de las aplicaciones útiles, con el conocimiento de los marcadores ligados al contenido de carotenos en un programa de mejoramiento de yuca podría ser en la identificación de genotipos que presentan esta característica. Hay QTLs identificados para resistencia a CMD y al lorito verde la yuca y alelos favorables que están presentes en diferentes poblaciones mejoradas. Estrategias de mejoramiento pueden ser aplicadas en la obtención de genotipos que combinen alelos favorables en todos los loci. Cuando las poblaciones que posean las características deseadas se hayan puesto juntas, la selección puede ser basada solamente en la valoración molecular la cual es determinada por los genotipos en todos estos loci estimados indirectamente por los marcadores ligados a estos loci. Comenzando a partir de cruces entre dos parentales contrastantes luego la evaluación de la población con los marcadores deseables. Los mejores de estas selecciones pueden luego ser cruzados con las líneas élite de un pool apropiado para capturar más genes de adaptación o producción. Los híbridos resultantes podrían seleccionarse con marcadores para eliminar esa progenie que no tiene los alelos deseables dejando solamente un pequeño número de progenes para ser evaluadas a través de un programa de mejoramiento regular, el cual busque mejorar los contenidos de carotenoides.

Usar una estrategia de mapeo fino de un QTL de una pequeña región cromosómica involucra la identificación de recombinantes únicos que difieran en la composición del genoma en sitios cercanos al QTL y la evaluación fenotípica de numerosas progenes a partir de estos recombinantes para obtener una medida mucho más confiable del verdadero genotipo QTL. Análisis de alto rendimiento, combinado con marcadores moleculares altamente informativos, tales como SSR o SNPs, y el manejo de poblaciones con miles de plantas deberán ser usados en



estrategias de mapeo fino de características cuantitativas como el contenido de  $\beta$ -caroteno.

Los estudios de herencia y de heredabilidad del contenido de carotenos en las raíces de yuca han sido escasos. El conocimiento de los mecanismos que gobiernan la síntesis y la acumulación de carotenos en las raíces son importantes para sentar las bases para el mejoramiento genético de este cultivo, con miras a obtener nuevos cultivares con alta calidad nutricional con altos niveles de carotenos y otros pigmentos en las raíces, que suplan las necesidades alimenticias diarias de aquellas regiones que presentan índices de desnutrición y, por consiguiente, problemas de salud por deficiencia de vitamina A.

## 5.1 BIBLIOGRAFÍAS

- 1- ACC/SCN.2000. Fourth Report on the World Nutrition Situation. ACC/SCN in collaboration with IFPRI Geneva, Switzerland.
- 2- ARANGO, J. 2006. Análisis de expresión de los genes de la ruta biosintética de carotenos, y cuantificación de carotenos en hojas y raíces de plantas de yuca a diferentes edades. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana.
- 3- BEDOYA, J.M. 1999. Determinación del potencial genético con respecto al contenido de Pro-vitamina A y vitamina C en la colección núcleo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), de CIAT. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.
- 4- BOLAÑOS E.A. 2001. Caracterización de la diversidad genética en cuanto a contenido de carotenos de raíces y hojas de 682 genotipos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de la colección de CIAT y de 411 genotipos en cuanto a minerales. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.
- 5- CHÁVEZ, A.L., SÁNCHEZ, T., JARAMILLO, G., BEDOYA, J.M., BOLAÑOS, E.A., CEBALLOS, H y IGLESIAS, C. A. 2005. Variation of quality traits in cassava roots evaluated in landraces y improved clones. *Euphytica* 143: 125-133.
- 6- COMBS, G.F., R.M. WELCH, J.M DUXBURY, N.T UPHOFF y M.C. NESHEIM. 1996. Food-based approaches to preventing micronutrient malnutrition: an international research agenda. Ithaca, New York, Cornell International Institute for Food, Agriculture and Development (CIIFAD). 68p.

- 7- DELLAPENNA D. 1999 Nutritional Genomics: Manipulating Plant Micronutrients to improve Human Health. *Science* 258: 375-379.
- 8- DELLAPENNA, D Y POGSON BJ (2006) Vitamin Synthesis in plants: Tocopherols y Carotenoids. *Ann. Rev. Plant. Biol.* 57:711-738.
- 9- FAO/FIDA, 2000. La economía mundial de la yuca. Hechos, tendencias y perspectivas. Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.
- 10- FREGENE, M. y J. PUONTI-KAERLAS. 2002. Cassava Biotechnology. Cap 10 pags 179-207 en: R.J. Hillocks., J.M. Thresh y A.C. Belloti (ed). *Cassava Biology, production y utilization*. CABI Publishing.
- 11- GARCIA-CASAL MN (2006) Carotenoids increase iron absorption from cereal-based food in the human. *Nutrition Res.* 26:340–344.
- 12- HIRSCHBERG J (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* 4:210–218.
- 13- MARES-PERLMAN. 2002. The Body of Evidence to Support a Protective Role for Lutein y Zeaxanthin in Delaying Chronic Disease. *J. Nutr.* 2002; 132:518S-524.
- 14- MATHER K (1938) Crossing-over. *Biol Rev Camb Philos Soc* 13: 252–292.
- 15- ORTEGA-FLORES, C.I., 1991. Carotenóides com atividade próvitamínica A e teores de cianeto em diferentes cultivares de myioca no Estado de Sao Paulo. (Carotenes with pro-vitamin A activity y levels of cyanide in different cultivars from the State of Sao Paulo). M.S. Thesis. Universidade de Sao Paulo. Sao Paulo, Brazil. 77 p.

16- PEPPING, F., M.J. VENCKEN y C.E. WEST. 1988. Retinol y Carotene content of foods consumed in East Africa determined by Alto Performance Liquid Chromatography. *Journal of the Science of Food y Agriculture*. 45 (4): 359-371.

17- SAFO-KATANGA, O., ABOAGYE, P., AMARTEY, S.A y OLDHAM, J.H. 1983. Studies on the nutrient content of yellow-pigmented Cassava. In: Proceedings of the second triennial symposium of the international society for tropical roots crops. August 14-19. Dovala, Cameron. International Development Research Centre. 103-104 .Production y Uses in Africa. IDRC, Ottawa, Canada. pp.103-104.

18- TAYLOR N., CHAVARRIAGA P., RAEMARKERS K., SIRITUNGA D. y ZHANG P.2004. Development y application of transgenic technologies in cassava. *Plant Molecular Biology* 56: 671-688.

19- VAN DEN BERG. H. VAN DEN BERG, R. FAULKS, H.F. GRANADO, J. HIRSCHBERG, B. OLMEDILLA, G. SYMANN, S. SOUTHON Y W. STAHL. 2000. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods y the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food y Agriculture* 80 (2000), pp. 880–912.

20- WELCH, R.M.2002.The impact of mineral nutrients in food crops on global human health, *Plant y Soil* 247 (2002), pp. 83–90.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

**Anexo A** Protocolo de Miniextracción de ADN a partir de hojas jóvenes de yuca (Dellaporta S.L, et al. 1983, A plant ADN minipreparation version II. Plant Molecular Biology Reporter 1(14):19-21.) Modificado por el Programa de Genética de Yuca.

1. Colectar, 1 hoja o cogollo ó la mitad de una hoja madura; aproximadamente entre 0.15 – 0.2 gramos de tejido.
2. Macerar en un mortero con nitrógeno líquido.
3. Transferir a un tubo eppendorf, de 1.5ml frío, con ayuda de una espátula fría.
4. Adicionar 800µl de buffer de extracción, precalentado a 65oC, y 50µl de 20% SDS.
5. Agitar vigorosamente el tejido para homogenizar bien con el buffer, continuar mezclando por alrededor de 1 minuto.
6. Incubar en baño de agua a 65 oC, y mezclar por inversión 5-6 veces, durante 15 minutos.
7. Retirar los tubos del baño y dejar enfriar a temperatura ambiente, aproximadamente durante 2 minutos.
8. Adicionar 250µl de Acetato de Potasio 5M frío, mezclar por inversión suave 5-6 veces.
9. Incubar en hielo durante 20 minutos.
10. Centrifugar a 12.000 rpm en una centrifuga eppendorf durante 10 minutos.
11. Adicionar un volumen de Iso-propanol frío (approx. 700µl), y mezclar por inversión suave 8-10 veces.
12. Incubar a -80 oC durante 60 minutos y centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos.
13. Eliminar el sobrenadante y remover el exceso de isopropanol invirtiendo los tubos sobre una toalla de papel.
14. Resuspender el precipitado en 500µl de T.E 50:10 (50mM Tris-HCl/10Mm EDTA), incubar a 65 oC preferiblemente durante 10 a 15 minutos con agitación suave y constante.
15. Adicionar un volumen de iso-propanol frío (500µl) y mezclar por inversión suave 8-10 veces.
16. Incubar a -80 oC durante 60 minutos, y centrifugar a 12.000 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
17. Eliminar el sobrenadante, y remover el exceso de isopropanol invirtiendo los tubos sobre una toalla de papel. Dejar los tubos sobre la toalla de papel durante 60 minutos para que el precipitado quede bien seco.

18. Adicionar 100-200ul de T.E. 10:1 (10mM Tris-HCl/1Mm EDTA, que contiene 10mg/ml RNAsa, dependiendo del tamaño del precipitado). Guardar los tubos a 4 oC toda la noche o bien disolver el precipitado en baño de agua a una de temperatura 65 oC.

19. Transferir a tubos eppendorf y correr 2uL de muestra en un gel para ver la calidad.

20. Medir la concentración en el Flourómetro. Guardar el DNA a -20 oC para almacenar a largo plazo o a 4 oC si se va a almacenar durante 1 o 2 días.

### **BUFFER DE EXTRACCION PARA YUCA**

TRIS-HCL	pH 8
EDTA	
SDS	20%
$\beta$ -Mercaptoetanol	0.07%
PVP	1%



## ANEXO B

### Anexo B Lista de los 800 marcadores SSR usados en este estudio.

Descripción de la fuente donde fueron obtenidos los SSR:

SSRs Chikelu (1-186) GENOMICOS  
 SSRs Tania (187-343) cDNA  
 SSRs NS Angela (344-449) GENOMICOS  
 SSRs NS Liliana (500-639) GENOMICOS  
 EST-SSRs Wilson (640-817) ESTs

New Name	Primer Izq.	Primer Derecho	Temperatura(°C)
SSRY1	GCAGCTGCCGCTAATAGTTT	CCAAGAGATTGCACTAGCGA	45
SSRY2	CGCCTACCACTGCCATAAAC	TGATGAAATTCAAAGCACCA	55
SSRY3	TTAGCCAGGCCACTGTTCTT	GCGAGGTTCAAATATGCGAT	55
SSRY4	ATAGAGCAGAAGTGCAGGCG	CTAACGCACACGACTACGGA	45
SSRY5	TGATGAAATTCAAAGCACCA	CGCCTACCACTGCCATAAAC	55
SSRY6	TTTGTTCGTTTTAGAAAGGTGA	AACAAATCATTACGATCCATTTGA	45
SSRY7	TGCCTAAGGAAAATTCATTCAT	TGCTAAGCTGGTCATGCACT	45
SSRY8	AGTGGTTTGAGAAGACTGGTGA	TTTCCAAAATGGAAC TTCAAA	45
SSRY9	ACAATTCATCATGAGTCATCAACT	CCGTTATTGTTCTGGTCTCT	55
SSRY10	CGTTTGTCTTTCTGATGTTCT	TGCAATGCAGTGAACCATCT	55
SSRY11	TGTAACAAGGCAAATGGCAG	TTCTTGTGTCGTGCAACCAT	55
SSRY12	AACTGTCAAACCATTCTACTTGC	GCCAGCAAAGTTTGCTACAT	55
SSRY13	GCAAGAATTCACCAGGAAG	CAATGATGGTAAGATGGTGCAG	55
SSRY14	TTTGCATCGATTCCATCATC	TTGACCTTAGCACATTTAAGGATTC	55
SSRY15	TGAAAGCCTGCATTCAAAACA	TGATGCAGGTAGCAAGGATG	55
SSRY16	GCACTGCAAAAATATCATCTTGA	CTGGAAAGATGGGACGTGTT	55
SSRY17	CTTAGAAAAGAAATTGCATGTGAG	TGTCTGATCAAGCTGGTGACA	55
SSRY18	GTGCTGCAAGGCGATTAAGT	GCTACAAGTATAGTTGCATGCTT	55
SSRY19	TGTAAGGCATTCCAAGAATTATCA	TCTCCTGTGAAAAGTGCATGA	55
SSRY20	CATTGGACTTCCTACAAATATGAAT	TGATGGAAAAGTGGTTATGTCCTT	55
SSRY21	CCTGCCACAATATTGAAATGG	CAACAATTGGACTAAGCAGCA	55
SSRY22	CTTGCCACTAGAACAGCCAC	GGCGTGGACTAACCTGTTCT	45
SSRY23	GCGAGGTTCAAATATGCGAT	TTAGCCAGGCCACTGTTCTT	45
SSRY24	CTTTCACATGATTGCAGCGT	GGATTATCCAATTCTCCAAATGTT	45
SSRY25	TGGCTACATGATAGCAACATCAA	CGCATGGTTTGTCTCGTTTA	55
SSRY26	TGCTAATTGCAGGAAATAGGAT	GCAGCTTTT TAGCATAACAATCAA	55
SSRY27	CCATGATTGTTTAAGTGGCG	CCATTGGAGAACTTGGCAAC	55
SSRY28	TTGACATGAGTGATATTTTCTTGAG	GCTGCGTGCAAAAAC TAAAAT	55
SSRY29	TGGTAGCTTTTGAATATCTGATGG	TGCCAACCAAACCAT TATAGAC	55
SSRY30	CCATCCACTAGAACTTTAAAAGCA	CAACTCAGCGGAGCTTTTTC	55
SSRY31	CTTCATCACGTGTTAATACCAATC	ATTGTTGTGGTTGCAGGACA	55
SSRY32	CAAATTTGCAACAATAGAGAACA	TCCACAAAGTCGTCCATTACA	55
SSRY33	AACTCTTTGACTGAAGATGCTGA	CATGATTACCGCCAAGGCT	55
SSRY34	TTCCAGACCTGTTCCACCAT	ATTGCAGGATTATTGCTCG	55
SSRY35	GCAGTAAAACCATTCTCCAA	CTGATCAGCAGGATGCATGT	55
SSRY36	CAACTGTTTCAACCAACAGACA	ATTCTCGTGAAGTCTTGGC	55

SSRY37	ATGGCAAAGATCGAGCAAC	GGCCAGTAATTCCTCAAGGC	55
SSRY38	GGCTGTTCTGATCCTTATTAAC	GTAGTTGAGAAAACCTTTCATGAG	55
SSRY39	TCAATGCATAGGATTTTGAAGTA	AATGAAATGTCAGCTCATGCT	55
SSRY40	TGCATCATGGTCCACTCACT	CATTCTTTTCGGCATTCCAT	55
SSRY41	TATCACAATCGAAACCGACG	TTTTCCAACAATCTGATACTCGT	55
SSRY42	TTCCTCAAAGTTATCTAGAACCA	CAATCCTTGTAGTAGCCAGTCTCA	55
SSRY43	TCAGACGTTGATACCTCACTTCA	CCAGAGCATGGTCTTTCTGA	55
SSRY44	GGTTCAAGCATTACCTTGC	GACTATTTGTGATGAAGGCTTGC	55
SSRY45	TGAAACTGTTTGCAAATTACGA	TCCAGTTCACATGTAGTTGGCT	55
SSRY46	TCAGGAACAATACTCCATCGAA	CGCTAAAGAAGCTGTGCGAGC	55
SSRY47	GGAGCACCTTTTGCTGAGTT	TTGGAACAAAGCAGCATCAC	55
SSRY48	AGCTGCCATGTCAATTGTTG	TCATAAAGCTCGTGATTTCCA	55
SSRY49	TGAAAATCTCACTGGCATTATT	TGCAACCATAGTGCCAAGC	55
SSRY50	CCGCTTAACTCCTTGCTGTC	CAAGTGGATGAGCTACGCAA	55
SSRY51	AGGTTGGATGCTTGAAGGAA	GGATGCAGGAGTGCTCAACT	55
SSRY52	GCCAGCAAGTTTGCTACAT	AACTGTCAAACCATTCTACTTGC	55
SSRY53	CCATGCAGTAGTGCCATCTTT	ATTTTACCAACCGCAACTC	55
SSRY54	GCGACTTCTGGATGGATTC	TGCAAATGACAAATAACCATCTC	55
SSRY55	GCAATTTGCAAAGACATACCA	TGTGGAGCTTGATTTTGCAG	55
SSRY56	AACTCTAATGGCTAAAATTATTGATG	TTTTAGTTTGTAGTTAGTTGCGCT	55
SSRY57	TGTCATTGTCTGTTGACCATT	TAACCTGCCAAGAACAAGGC	55
SSRY58	GAAGGACAAGCAAAGAAGCAA	TGGAATCCAATATTGATGACTAAGA	55
SSRY59	GCAATGCAGTGAACCATCTTT	CGTTTGTCTTTCTGATGTTT	55
SSRY60	CGGCCACCAACTCAAATAAC	TTGCAATGATATCAACGGCT	55
SSRY61	GGCTGCTTTACCTTCTACTCAGA	CAAGAACGCCAATATGCTGA	55
SSRY62	CATTCTCCAGGAAAGTCATTTTG	AGCTCATGCCATACAAGCAA	55
SSRY63	TCAGAATCATCTACCTTGGCA	AAGACAATCATTTTGTGCTCCA	55
SSRY64	CGACAAGTCGTATATGTAGTATTCAG	GCAGAGGTGGCTAACGAGAC	55
SSRY65	CATCGCCAAATCGTCAAGTA	TGATGCCATGCATTTCACTT	55
SSRY66	ATCTCAGCTTCCAACCTTTTCACT	CGAAATGCTTGGAGACAGGTATAG	55
SSRY67	AGTTTGCACCACCTTTTCC	TGTCAGTGATGAGCTGCTG	55
SSRY68	GCTGCAGAATTTGAAAGATGG	CAGCTGGAGGACCAAAAATG	55
SSRY69	CGATCTCAGTCGATACCCAAG	CACTCCGTTGCAGGCATTA	55
SSRY70	CGCTATTAGAATTGCCAGCAC	CGCTTGTGTATCCATTGGC	55
SSRY71	TGATGCAGGTAGCAAGGATG	TGAAAGCCTGCATTCAAACA	55
SSRY72	AAGCATCAGTGGCTATCAACA	TTTTGCTGTGCTATTTCTGAGC	55
SSRY73	AAGTTGATGGTTCTGAATCTGGA	ACAGTGATTGAGCGAGGCTT	55
SSRY74	TTGCTCGAATTCACACAAT	GGTCAGGTGAGTAATAAAGAACAGTG	55
SSRY75	TCTGGTAAACCTACTAGTCTCCA	TTTATGCACGTCCTGATACA	55
SSRY76	AAAGGAAGCAACCTTCAGCA	CATGATTTGGATTTTGAATGA	55
SSRY77	CAGGAGGTGGCAGATTTTGT	GCATGTTCCACCTGCATAAG	55
SSRY78	TGCACACGTTCTGTTTCCAT	ATGCCTCCACGTCCAGATAC	55
SSRY79	CAAACCAATGGTCATGCTGT	CAGCATCAGAAAGACAAAACAA	55
SSRY80	TTCCTGGAAATGTCCTTAGATG	TGGCACATGCAACAATTAGC	55
SSRY81	GGCGATTTTCATGTCATGCTT	TGATTTTCTGCGTGATGAGC	55
SSRY82	TGTGACAATTTTCAGATAGCTTCA	CACCATCGGCATTAACCTTTG	55
SSRY83	TGGCTAGATGGTGATTATTGCTT	TGCTTACTCTTTGATTCCACG	55
SSRY84	TTCCTTTTCATTCATCCTGGC	AGAACTTCATGCACACAAGTTAAT	55
SSRY85	AAGGTGGCAGCACTTTTCTG	AAGAATACTATACGGACTACATGCCA	55

SSRY86	GACACCTGCTGATTCCGAG	TTGCCACATAGCAGAATCCTT	55
SSRY87	CTCATCTCATGAAGAACTTGTGC	AGAGCACGCATTGTGCATT	55
SSRY88	CCAAGTCTCACCTCCAAAG	CCTTGATGTGGCCAAAGTG	55
SSRY89	AGTTGAGAAAACCTTGCCATGAG	GGCTGTTTCGTGATCCTTATTAAC	55
SSRY90	AGGTTATGGCGGTGGCAG	GCGATTTTGCGAATTACCAC	55
SSRY91	GTCTGCATGGCTCGATGAT	TGCCTGCTTCATATGTTTTTG	55
SSRY92	CCAATGCTCAGTTTGACAACCTC	TCGGCTTAAGGTATGAACGC	55
SSRY93	TTTGTTGCTCACATGAAAACG	CAGATTTCTTGTGGTGCCTG	55
SSRY94	AGGATGGACTTGGAGATGGA	GGTGGAAAGTAAGGCTGTTAGTG	55
SSRY95	CATGATTTGGATTTTGAATGA	CAAAAGAAGCAACCTTCAGCA	55
SSRY96	CTTTACCTGCATGCCATTGA	CTCCATGTTATCCAAGGTTGC	55
SSRY97	GAGCAATCAAATTC AACAGCA	AAGCCGAAGCTTATGAAGGA	55
SSRY98	ACCAATCCAAGCTGCAAATC	GTGATTGGTAGTGGTGGCCT	55
SSRY99	ATCAAGGCGCAAAAGTCAAT	CTTGCTTTGGTTCCAATTATTTA	55
SSRY100	ATCCTTGCCTGACATTTTGC	TTCGCAGAGTCCAATTGTTG	55
SSRY101	GGAGAATACCACCGACAGGA	ACAGCAGCAATCACCATTTC	55
SSRY102	TTGGCTGCTTTCCTAATGC	TTGAACACGTTGAACAACCA	55
SSRY103	TGAGAAGGAACTGCTTGCAC	CAGCAAGACCATCACCAGTTT	55
SSRY104	AGGCCATGGCAATTACTGAA	TTCTTGATATGCGCAACAGC	55
SSRY105	CAACATCTGCACTTTTGGC	TCGAGTGGCTTCTGGTCTTC	55
SSRY106	GGAACTGCTTGACAAAAGA	CAGCAAGACCATCACCAGTTT	55
SSRY107	CCATTTTCTCTTGCTTCTGTCA	TGGTTTGAAGTCCTATAAAATCCTT	45
SSRY108	ACGCTATGATGTCCAAAGGC	CATGCCACATAGTTCGTGCT	55
SSRY109	TGCTAATTGCAGGAAATAGGAT	GCAGCTTTTTAGCATAACAATCAA	55
SSRY110	TTGAGTGGTGAATGCGAAAG	AGTGCCACCTTGAAAGAGCA	55
SSRY111	GCATCTTACATCCAGAATACTGCT	GAAGGAATGCCTGGCTTAAA	55
SSRY112	CGCAAGGTAATCGGAGCTA	ACAATCAAAGGAGTCGTGTAATC	55
SSRY113	TTTGCTGACCTGCCACAATA	TCAACAATTGACTAAGCAGC	45
SSRY114	AACAGGAAGGAAAATCAAGCC	TCAACTGCAGATTCATTCAAGA	55
SSRY115	CAACCGCTTTCGATGGTATT	TGCCATACAATTTTGCCTA	55
SSRY116	CGTTTTCTGTAAATCTTGCAT	TAGAGCAGCTGCAAAGCAA	55
SSRY117	TAAAGTTTGGCATGCCTGTG	GCAAATGTGTTTTCAATATAAGGC	55
SSRY118	TAGAGCAGCTGCAAAGCAA	TCGTTTTCTGTTGAAATCTTG	55
SSRY119	AACATAGGCATTAAGTTTGGCA	GCAAATGTGTTTTCAATATAAGGC	55
SSRY120	TCACCGTTAATTGTAGTCTGCG	GCGAGGTTCAAATATGCGAT	55
SSRY121	CCAGAACTGAAATGCATCG	TGGAATTGTTGTCTGGATCG	45
SSRY122	AAGCCAATTGTTGTGAGTTGC	GGTGCTTGGTTTATGCCTGT	45
SSRY123	AGCAGATCCAAATCACTGAAA	TTCAACAATAAAGCTCAGAAAGAG	55
SSRY124	CTGCTGGACGGAGGATTCTA	TGGCATCAATTTTTGCTTCA	55
SSRY125	CAGGACATGACGCAATTCTG	GCATGTTAGAAGTTTTTGCAATTT	55
SSRY126	AATGGATCATGTTCAATGTCTTC	TTGAAATACGGCTCAAGCTC	55
SSRY127	CTTCGGCTCTACAAAAGGA	GCTGAACTGCTTTGCCAACT	45
SSRY128	CAGGACATGACGCAATTCTG	GCATGTAGAAGTCTTTGCAATTATG	45
SSRY129	CTTTTTGCCAGTCTTCTGCTG	AATGGATCATGTTCAATGTCTTC	55
SSRY130	GGTCCCTGATAGTTGATAATGGAT	CTTTTTGCCAGTCTTCTGCTG	55
SSRY131	CATTGTTTACAGCAAACTGGA	GCGAGAGATGTTGCTATTGCT	45
SSRY132	CTTTTTGCCAGTCTTCTGCTG	TGTCCAATGTCTTCTTTCTCTT	55
SSRY133	AGCATGTCATTGCACCAAAC	CGACTGCATCAGAACAATGC	45
SSRY134	TCCACAAAGATAAGCTAAGCG	GCAAGTTCAAAGGAGCAGC	55

SSRY135	CCAGAACTGAAATGCATCG	AACATGTGCGACAGTGATTG	45
SSRY136	CGACTGCATCAGAACAATGC	AGCATGTCATTGCACCAAAC	55
SSRY137	TAGTTAGCTCGGTTCTGTCG	TTTTGATAGATCAAGAGATTTTTGAA	55
SSRY138	AGAATGTCTCTTTATTCTTGACAATTT	TTCAGGAAACATGCACAAACA	55
SSRY139	AAAAAGTGACAGAGTTCCGCTC	CAGATTCTTCAAGCCAAATGTC	55
SSRY140	CAGTGAGCAGAACTAAAAACATTG	GGCACTTTGGAAAGGAAGAG	55
SSRY141	TCCAAAATCTTGGTCATTTTGA	TGCTGTGATTAAGGAACCAACTT	55
SSRY142	CTTTTTGCCAGTCTTCCTGC	AATGGATCATGTTCAATGTCTTC	55
SSRY143	GCTCATGAACTGAGCCTTCA	AGCAGATCCAAATCACTGAAA	55
SSRY144	TAATGTCATCGTCGGCTTCG	GCTGATAGCACAGAACACAG	55
SSRY145	GATTCTCTAGCAGTTAAGC	CGATGATGCTCTTCGGAGGG	55
SSRY146	TTCCCTCGCTAGAACTTGTC	CTATTTGACCGTCTTCGCCG	45
SSRY147	GTACATCACCACCAACGGGC	AGAGCGGTGGGGCGAAGAGC	45
SSRY148	GGCTTCATCATGGAAAAACC	CAATGCTTTACGGAAGAGCC	45
SSRY149	AGCAGAGCATTACAGCAAGG	TGTGGAGTTAAAGGTGTGAATG	55
SSRY150	CAATGCAGGTGAAGTGAATACC	AGGGTGCTCTTCAGAGAAAGG	45
SSRY151	AGTGAAATAAGCCATGTGATG	CCCATAATTGATGCCAGGTT	45
SSRY152	CTCTAGCTATGGATTAGATCT	GTAGCTTCGAGTCGTGGGAGA	55
SSRY153	TTCCAGAAAGACTTCCGTTCA	CTCAACTACTGCACTGCACTC	45
SSRY154	ACAATGTCCCAATTGGAGGA	ACCATGGATAGAGCTCACCG	45
SSRY155	CGTTGATAAAGTGAAAGAGCA	ACTCCACTCCCGATGCTCGC	55
SSRY156	TTCAAGGAAGCCTTCAGCTC	GAGCCACATCTACTCGACACC	55
SSRY157	TGTTCTTGATCTTCTGCTGCA	TGATTGTGGACGTGGGTAGA	45
SSRY158	CCTTACTTGTGTTTCTTACTGACAAG	CCAAGTCTCACCTCCAAAG	55
SSRY159	CTTATCCTGTCCCCTCCACC	GACAATTGCATAGGAAGCACA	45
SSRY160	CTGGCTCTTCAGACACCTT	GGCAAGAGAAGCCATAAAGC	55
SSRY161	AAGGAACACCTCTCCTAGAATCA	CCAGCTGTATGTTGAGTGAGC	55
SSRY162	TTTAGTTAGTTGCGCTAGCTTCC	AACTCTTAATGGCTAAAATTATTGATG	55
SSRY163	TCATGATGCTATTCCAAGTGTG	AGGCCTCCAACAATTAGCCT	55
SSRY164	TCAAACAAGAATTAGCAGAACTGG	TGAGATTTGTAATATTCATTTCACTT	45
SSRY165	AAATGAGTTGCAAAGGCCAA	GGTAAACAAATGATGTGGTGTTT	55
SSRY166	AATAACAACAAGAGTTGTGGAAAA	TATCCATGACTGTGATGCGG	55
SSRY167	AAAATTGGATGGGACCGTTT	AAGGAAAGGGAGAAATCAAAGA	55
SSRY168	ACAGCCACACTTGTCTCCA	CTGCAATCTCCAACAGCAAC	45
SSRY169	ACAGCTCTAAAACTGCAGCC	AACGTAGGCCCTAACTAACCC	55
SSRY170	TCTCGATTTGGTTTGGTTCA	TCATCCTTGTGTCAGCGTTA	55
SSRY171	ACTGTGCCAAAATAGCCAAATAGT	TCATGAGTGTGGGATGTTTTATG	55
SSRY172	TCCAACCTGGCTTAACTTGAGG	TTTAGTTTTTGAACAATGATGAAA	55
SSRY173	TGTAAATATGCAAAGAAGCACGA	TACCTTTGGTGGAGTTTGCC	55
SSRY174	AACAAAACCATTTTCATGTTGA	TTGCATACTCATCTCCATCTTCA	55
SSRY175	TGACTAGCAGACACGGTTTCA	GCTAACAGTCCAATAACGATAAGG	55
SSRY176	TGGCTAAATTATTGATGTTTATGTT	TTTTTCAAATAGAGGGACCAA	55
SSRY177	ACCACAAACATAGGCACGAG	CACCCAATTCACCAATTACCA	45
SSRY178	GGCCCCTAAGGTTTACAGAG	CTGCAAAAACACGATCCCTT	55
SSRY179	CAGGCTCAGGTGAAGTAAAGG	GCGAAAGTAAGTCTACAACCTTTCTAA	55
SSRY180	CCTTGGCAGAGATGAATTAGAG	GGGGCATTCTACATGATCAATAA	55
SSRY181	GGTAGATCTGGATCGAGGAGG	CAATCGAAACCGACGATACA	55
SSRY182	GGAATTCCTTGCTTATGATGCC	TTCCTTTACAATTCTGGACGC	55
SSRY183	TGCTGTGATTAAGGAACCAACTT	TTAACTTTTTCCAGTTCTACCCA	55

SSRY184	TCATCCCAAAAATACCTCTAACA	CTCCGACAAGCATGTGAATG	55
SSRY185	GAAGAAGACGGTTAAAGCAAGTT	ATGCCAGTTTGCTATCCAGG	55
SSRY186	GCTTTGTGTAACAACCTCGC	AATGACCATGCCAACACAAG	55
SSRY 187	TGGGTCATCTGCCATAACT (20)	CCAGGAAGTTACGAGCTTGG (20)	55
SSRY 188	GCCTCGAATTAGGCTCCACT (20)	AGCCAATGCCGACATACAGT (20)	55
SSRY 189	GATGACTGGTCTCAAGTGGTGA (22)	AAGAAGAGCTCCTCCTGCAA (20)	55
SSRY 190	TGGCAGGGTTACCTTTGTGT (20)	AACCAGTTAAGGTTGGCTCAAA (22)	55
SSRY 191	TTTCATGAACAACCTTTCTGGGTA (24)	TGTTGGCTGAGAAAACAAGA (20)	55
SSRY 192	GCCAATGCTCCATTTTCAAT (20)	TTTCCAATCCACCATTTGCT (20)	55
SSRY 193	CGAAGCTCCGCCTCAGTAT (19)	TGGAATCGGTTACCAGAAGTG (21)	55
SSRY 194	CTGGTAACCGATTCCACACC (20)	GCAAGCTCTCCAATGACCTT (20)	55
SSRY 195	CGCTTACAACACCACCTTCA (20)	GCTTGATCTCAGCCATGTCA (20)	55
SSRY 196	CCACACTACCAGCCAAAAT (20)	CTTTTGCCATGACCTGGTTT (20)	55
SSRY 197	TGCCATTACCAAGTGATGATCT (22)	CACAAAGCCACTCAATCCA (20)	55
SSRY 198	AATCCCGGGATATCGTC (18)	CGCAAACCTCTCTTTTCACTCC (22)	55
SSRY 199	TCTCCATATCCTTGGATTCTG (21)	GCCGACCATAAACTGGAAA (20)	55
SSRY 200	CCAACCTCACCTTTCAACCAGA (21)	GAAGCCAACCCATCATCTTC (20)	55
SSRY 201	CCAAGGTGGAGGTCAAGAAA (20)	CTCCACATTACAGCCAACCTGA (21)	55
SSRY 202	CGATTTATTTGGGATGTGG (20)	TTTAGAGCTGGGACCTCCTG (20)	55
SSRY 203	AGGAAGCTGTCCCCTATTCA (20)	TACCAGCAAGACCATCACCA (20)	45
SSRY 204	TCTTTGCTGGTGAGTTTGC (20)	GAATGCCTCCCAAACATCTC (20)	45
SSRY 205	CTGTCTTGATTCCGGCAACT (20)	GCAAGTCGTTGCCTACCTTG (20)	45
SSRY 206	AAGGACGGAGTTGTCTCCTG (20)	CCAAACGAGCAATATTAGGTGA (22)	45
SSRY 207	TGCCCTTACCAGCTAGTTT (20)	ACAATTCCTTTGCCTTGAA (20)	45
SSRY 208	AGGACGAGGATGACGATGAA (20)	TCACCATTCTCTTCTGGTTCAA (22)	45
SSRY 209	ACGAGGATGAAGACGGTGAA (20)	TCCTCTCAATAGAGCCTCAACC (22)	45
SSRY 210	TTGCCGGCTTTTCTGATTAC (20)	GACCAGTTGCTGTTTCGTCAA (20)	45
SSRY 211	TTCACCTCTGCTTCGAGTGA (20)	CATGCTTTTGGTTCCAGTGA (20)	45
SSRY 212	GACCTGCTGATGCTTCGATT (20)	ATCACCAACACCACCATCAC (20)	45
SSRY 213	GGGTAGCTTAGCCTGCTCAC (20)	GCACTAACTGCCCTTTGCAT (20)	45
SSRY 214	ATTCGCGTACGCAGATTCTT (20)	GCCACAGGCTAAGGAAACAA (20)	45
SSRY 215	GTTGATGAGCTGTGGCATTG (20)	CCTAGACGAAGTGGGTCGAA (20)	45
SSRY 216	CTGAACAGGAGCTCCCTCAC (20)	CCATCTCCCTCGACAATCTC (20)	45
SSRY 217	ATGAAGAAGTCCAGCGGAGA (20)	CCTGCAATGCACATACATGA (20)	45
SSRY 218	ATAGCTTTTTCCAGCCCTTG (20)	CAGAATCCTGAAATGCTTAGCC (22)	45
SSRY 219	CGAGAACAACAGGGTTCTACA	GCTCTCTTGGGGAGGTGTCT	45
SSRY 220	TGCTCTCTGATCTTGCACTAGC	GTTGCATCAATGCCTTCAGT	45
SSRY 221	TGGATAGAGGGGGTTTTGTTT	GCAAAGCCCATTAAATACG	45
SSRY 222	TAAGGCAACGGGAAACAGAG	GCAATATTCTTCCAGCGAAT	45
SSRY 223	GCATCTGTTTCCTGATTGTTG	CGGGGTTTGAAATCAGTAA	45
SSRY 224	TCCCCTCAAACCTATCTTT	CCCCAATAAATTTAACCTCAA	45
SSRY 225	GAAAATTGCAGAGGCTGCT	TTGCACCTGAGTTCCATCAG	45
SSRY 226	AACTGGAGTAGAGAACTGGAGGA	AACGTTTTGCGCGATTACAAG	45
SSRY 227	CCCATCAATGGAAACCTCAC	CCAAGTTGTTGGGTAAGGA	45
SSRY 228	TTTCTTATCCTCCGCTATCCA	TGGCAGAGATTTTGAGACGA	45
SSRY 229	AGTCCAGCCTCTTCCTTCGT	TGATCAGCGAAATCGTGGTA	45
SSRY 230	CCATCTCTCTCCCTCTGCAA	AAATGGCAGGAGATTGATGC	45
SSRY 231	GGGCGCCTATACTGTGAAA	CCACAGAAGAACACCAAACCTG	45
SSRY 232	TGACTCTTCTCTTCCTTTCG	GCGGTGTATAGACCCCATCT	45

SSRY 233	CGAAACGATCGAAGTTCCAC	TGTGGCCATCACACTCATT	45
SSRY 234	TTGCCAGAACCCTAGGAGTAA	TGCCCCTAGGAAGGTTGCTG	45
SSRY 235	CAGCTTTGCCATCCAATTTT	CAGCAAATGACATGAGTGTATCTC	45
SSRY 236	TGAAAACGTTCCCTTCCCTTT	CCGTATCCTATGGCAACACC	45
SSRY 237	AAAGGAAAGGAAACCATTCTCA	TTCTTCATGCAAGCAATTTCA	45
SSRY 238	GGCCTTAAGCCACCATTCTA	GCTTCTGCGAATTCGTTTCT	45
SSRY 239	TGCATTTCCCTGGGTGTAAG	TTTCTCAATAGACAGACGAGCA	45
SSRY 240	TCGGCTTTAACATCCTTCG	AGCTAGGAGCAACGCAGTTC	45
SSRY 241	GTAGGGCAATGGTGATTGGT	ACCCAGCCATACACTAGCAA	45
SSRY 242	TGGGTCGAAAACAGCAAAC	TAATGCCTGGAGGGTAATGG	45
SSRY 243	GAGAGAGTACGTCACAGAGATCG	TCCAGCAGGATAAACATCCA	45
SSRY 244	TGAGTTTTGCCAGGCTATCTTT	TGCAGCAAGGATGAACAAGA	45
SSRY 245	CTTGTTTCATCCTTGCTGCAT	CACTTGATTTGCAGCCTCTG	45
SSRY 246	TGTAGGGCTGAGCAAGTTCC	TCCCCTCAGATGCTCAAGAC	45
SSRY 247	CCAGATCCAAACACCCTGTA	AAACAGCTCACATGGCCTTC	45
SSRY 248	TGTTTGCTGAGTGCAGTCCT	CCTCGTACAGAAAACCAAGCA	45
SSRY 249	TGAAATTGTCTTCGAGAAT	TGTGCATGCTTTTTCTTGG	45
SSRY 250	GATCGGATGTCTGAGGAGGA	AATTGGAAGGGAAAGCCAAA	45
SSRY 251	AGTCTCTACAGCCAAGTAGCATCT	GCGTTGACGACGTCCATAAT	45
SSRY 252	GACGCGAGAAGTACAAGTTT	CCCACCTCCGAAATCACTAA	45
SSRY 253	GCTGATGGAGGAGTAGCAGTG	TCCAGAGGGAGAGATCTGACA	45
SSRY 254	TGTCAGATCTCTCCCTCTGGA	GACGCATCTCCTGCACAATA	45
SSRY 255	ACCAGCACTGTTGTGCCAG	GAAGAGATGCGACGATGGTT	45
SSRY 256	GGTGGTGGAGTCTGATTA	AGAACAAGGGCTCCATTCA	45
SSRY 257	CATGAATGGAGCCCTTTGTT	CTTGGCTGAGGCCTTTTCAT	45
SSRY 258	TCCTGCAACTCTGTTTTCCA	TTCTCGGGGAGTTTCAAAG	45
SSRY 259	GCATTCTCTTTTCTCCTTTCTCA	CGGAGAAGTTGGATTTTAC	45
SSRY 260	CGGATTCCCGGATATCGTC	GCAATGGAATCAATCCCTGA	45
SSRY 261	CAGAGACTTCTCCGCTGTT	TCAAAAGAGAGACGCACAGGT	45
SSRY 262	TTCAGTTTCAGGAGACAGAAAGG	CTCGACATTCCCTTCACTTTG	45
SSRY 263	CAAAGTGAAGGGAATGTCGAG	TTCCAGGAATGTAAGTGCACAA	45
SSRY 264	AACAACGAAAGGTGGCAGAT	TTGGATCAGAGGAGCCAATC	45
SSRY 265	CTGCTCCACGCTGTTTATCA	GCTGCTGGTCAAAGAGTCC	45
SSRY 266	TCTGGTTTTCCACAGGGAAC	TCGTTAGGCCCAATTCGTAG	45
SSRY 267	TGCTTCCAATCACTCCCTTC	ACTTTTTGGTGGGTGGTGTG	45
SSRY 268	GCAATATCTTCTGGAGTTCAATTCT	CCAATATAAGCGGCGTCATT	45
SSRY 269	AATAGTTTCAGGCAAGGGTGA	TCAATCACAAGCCAGACACA	45
SSRY 270	CGAAGCTCCGCCTCAGTAT	CCAGAAGTGGACCAAGTGAGA	45
SSRY 271	CTGGTAACCGATTCCACACC	GCAAGCTCTCCAATGACCTT	45
SSRY 272	ACTCGTGGGATCTTCCCTTT	CTGGAACCTCTGGCTCTCAC	45
SSRY 273	TCCTCCATCAATTCAGACCA	TCCTAAATCCATAATACCCAGT	45
SSRY 274	TTCTTCCCGTTTACGAAT	TCAGCGACATCTCTCTTCCA	45
SSRY 275	AGGCTGTGGTGGACAAGTTC	TTCCATCTTACGCTTGCTT	45
SSRY 276	TGAACACTTTCCACCACCT	ATAGAATCCGGACCCAAACC	45
SSRY 277	GGTTTGGGTCCGATTCTAT	CTGAGTGGTGATTCCGCTAA	45
SSRY 278	GTGCATGGAAGCTCTCAACA	CTTTCTCCAGCTCGTTCAC	45
SSRY 279	ACGCGTGGGTTTTATGCTT	GGTCTGCCTTGCACTGTAT	45
SSRY 280	TGTGCATGGAGAGATTGACAG	AAGTCGTTTATTGCCGATGC	45
SSRY 281	TCTCGCTTTATTCCCAATC	CTTGACGAGCATCCCCATT	45

SSRY 282	CCATCCCCAACAAACAAGAT	TCCAACACTACGCTGTGTTTCT	45
SSRY 283	AAAAGCGTGGGCTTTTGA	TGGAAGCTCAGTGAAGCGATG	45
SSRY 284	TCCTTCCAAAGCCAGACTTG	GGAACATTTTAGCGGTCAGG	45
SSRY 285	CCATCCAATAAAGCGTCGTT	TCAATAGTTGCTGCCACAT	45
SSRY 286	ATCCACAATCCTCCCTACCC	TGGGCCAGAGATAGAGTGT	45
SSRY 287	GGCTTTGTTGTGGTTGTTGA	CATGAATTAGAAACCAAGGGAAG	45
SSRY 288	TGGTTAAGGTTTGGGCGTA	TCAGGCATCCCTAATATTTCTTTC	45
SSRY 289	AACACCCAACAGCAACATCA	ATCTTCTTGGTGGGTCATGG	45
SSRY 290	AAAGGCCTTCGTTGGAGTTA	ATGCCGATGCTTTCAGGTAT	45
SSRY 291	AAAGGACCCTCCCTCTTTCC	TGGGTTCTGGATTTGTTCAAG	45
SSRY 292	CTTCTGTAAGTATCCGTTCACTAAT	GAGCTCCATGCGAACAGATT	45
SSRY 293	TCCATCTCCAGGCTCTCCT	GTCCCATGCCCTGTTAGAGA	45
SSRY 294	TGCCAAAAGAGAAAGCCAAG	CACCCATTCTTTGATGCTC	45
SSRY 295	GCTTAGCTTATCCTTGGACCTTG	AGACAAGCACCCACCAGAAT	45
SSRY 296	TCAATTTGTTTTCCCTGCTG	TTTTCTGAGGCTGGTGCCT	45
SSRY 297	CCCAGGCACAGGTACTCTCA	TTGTGCTCCAATGAAATGG	45
SSRY 298	GCCTTGTCTGATCCATGCT	TGCCTGAATCAGTGTCTTCAA	45
SSRY 299	TCTTTTTACAGAACCAACTGAA	ATGCGAAACAGAGAGGAGGA	45
SSRY 300	ATAGAAGGGCCCCGAGACTGT	CCATTTCCAGGCATTTTCATC	45
SSRY 301	GAACGCTTCAACGGCATAAT	CCAATGCCAACAACTTCTT	45
SSRY 302	CAAACCCAACCCAGAGCTA	CGCTTGCCTTCTCTTCTCT	45
SSRY 303	GCATCATCACCATTTTTCTTTG	TGGAAGGTGTTAGCAACTGTG	45
SSRY 304	GACGCGTGGGCTCAGTTA	TTAGCCACGGAGTCTGGTTC	45
SSRY 305	AAAACACAATCAAATCCCTCA	AAGCTTGGCTAAGGTTCTGC	45
SSRY 306	GGACAGCCTCGTCAATTCAC	CGGAGTGCTCCTCTCCATTA	45
SSRY 307	AGGGTTACCACTCGCCATTA	ACCATGAAAGCCACCAATA	45
SSRY 308	TTCGGCTCGTTAAGTCTCGT	CGAATTTTATCGAATTTAGTTTCA	45
SSRY 309	TCCTCCTCCCTCTCAGATTC	GCCACAGGCTAAGGAAACAA	45
SSRY 310	GACGCGTGGGCTTCAACT	TCAAGGGGAGCAACAGTAGTC	45
SSRY 311	GCCAACAGGAATCCTTCTGTA	GAAACCAATGCAGTTTCACAA	45
SSRY 312	TGATTGCAGCAGAAAGCAAG	ATGGAAGGCTTGAAGTGGTG	45
SSRY 313	ATAGCACCCCACCACCTGTA	GCGAACTTTCAGCTATTGA	55
SSRY 314	CAAACATTGGCAAAGCTTCA	GCTCTCTCAAGCGCAGATTT	55
SSRY 315	TGAGAAACATAAACCGTTTTCAA	CAGCATGGAAGCAAAATCAA	55
SSRY 316	GAGCTTTACGGTCTCTGTCTCTG	ACATCGTGAGGTCCAAGAGG	55
SSRY 317	CCTCTGCTACTGGCTATTTTCA	CGAAGAAGCCTCATTCTCTGA	55
SSRY 318	CACGCGTCCGTCTACATCT	GTAATGGAGGGCGGTACTCA	55
SSRY 319	CCAATCCATCCTTCCCTCTCA	AGGAAGCAAAGACGACCTGA	55
SSRY 320	GTTGATGAGCTGTGGCATTG	CCTAGACGAAGTGGGTCGAA	55
SSRY 321	TTTTCTTCTCCAAGTCCA	CGACAACCTTCTCCTCATT	55
SSRY 322	GTCTGCGCTGAGCAGTCTC	GAGTGAGACGACGAAACGTG	55
SSRY 323	GCTTGCTCAGCCTTGAGTATT	TTGCCATGGCTACAAAAGAA	55
SSRY 324	CGCTTACAACACCACCTTCA	GCTTGATCTCAGCCATGTCA	55
SSRY 325	AGCCAAAAACCATACCACACA	GCTATTGCTGTGTGGTCCAG	55
SSRY 326	GTCAGGCGGTCACCAAAC	ATCAGGAGGAGCTTGACAGC	55
SSRY 327	CCCGTCTTAATCCTCCATCA	CATCTTCGAGAAATGGACTCG	55
SSRY 328	GCCCAATTACCAAAGCTGA	CTGCTGCCACCACTCTGATA	55
SSRY 329	CACCCATTTCAATTCGATT	GTGCGTTTCTGCTTTTTGT	55
SSRY 330	CCACCATCATCATCGTCATC	TTCTTCTTCTTCCCATTGC	55

SSRY 331	TCAGATCCCTCGTTCTCAG	TGCTTTGCTTCTCAAGTCCA	55
SSRY 332	CAGGCTCGAGGTCTTCTTTG	CCACCCCATCTTCAACATTT	55
SSRY 333	TACTTTGGGCCTTCCTTTCA	GGTTGGAGGAGCCATAGGTT	55
SSRY 334	GGACGCGTGGGAAGAAAT	GGGGATACACCATGAAGCAG	55
SSRY 335	ATGGTGCACAGATTGACAGG	CCACTCCTCAAACCCACAAA	55
SSRY 336	CAGTCTCTAACGATCCCCTCA	CATTTTCAGCAGCCTTTTCC	55
SSRY 337	TCGCTCACAAAAACAATCCA	AGATCTTTGCACGTTACCA	55
SSRY 338	CTCTACTCGGCATGGATTGG	AGTCCGCTAAAACACATGC	55
SSRY 339	CGCACCAACCTCATTATCC	GGCTTCACAGCCGTAAGT	55
SSRY 340	AAGAAAACGCAACCCCTTCT	ACAGCTTCCCTCAGTTTCC	55
SSRY 341	CTTTAGCCTCTGCCTCCTCA	CATGAACTGAGCCTTCGACA	55
SSRY 342	TCTGCTTTTGGCTGGAATTT	GGTTCGAAGCATTCTATGGTTA	55
SSRY 343	CACTCTTGTCAGAACTTTGCT	CTCAATCCGCTCCATCTCTC	55
NS6	TTCCATCCAAGCTCCTTCAG	GCTCGCATATTCCCATCAAT	55
NS9	AAGACTTTCCATCTTCAATTATTTT	ATGGCATTCTGCAGCTCTT	55
NS10	GTCATTACGGCGAATCTGCT	CGATTTTGCGAATTACCACC	55
NS16	GAGCATTCAACCTCTCTGGG	ACGTCGATAATGGCAAGACC	50
NS22	CAGCCAAATCAACATCCCTT	CAAGCCCCATCATCATTTTC	55
NS23	CCATAAGGGAAGGAACACCTC	CCGCTATGGGAGCAGACTAT	50
NS30	AGCTGACTCCCACCACTGTC	CACAAGACAAAGCAAGGCAA	55
NS33	TCACCTCACAGCCAAGAGAA	GAGCTTGCTCACC GGACTTA	55
NS36	GACCATCCAACTAGCACATCA	GCACCAGAACTAGGGATGGA	55
NS37	TGAGTGCGATGAGAACGTAA	GTGCATCCTTACCAATCCTG	55
NS40	GCTGTTACGGCCAGAGTAGA	GATGTCTGAAATCCCTCTCTTT	55
NS51	CGCATTGGACTTCTACAAA	TGTGGAATTGTGAGCGGATA	45
NS53	CCAACGTATGGAATGTGCTG	CCTAAGTTGTTAGCCAGTGATTAGA	55
NS57	ACCAAATCTCCACACCCTG	CAACAATTGACTAAGCAGCA	55
NS59	CTCCTGCCAAAATTGACCAC	CATGAGCATATCCCTCCTCA	55
NS69	TGTGGATGCCATGACTGATT	TGTGGAATTGTGAGCGGATA	55
NS72	TGTAACAGGTGGAAGTGCGA	TCAGGACCAATATTACCTACACCA	55
NS73	CAGATAGGCGTCCCAATA	TTCAAAGTTAATGCCGATGG	55
NS74	TCGCTGTATGCAATACTTCGTT	TAGTGTGGGGACTCTTTCCG	55
NS76	ATGCAGTCAACTGTCCAACG	TGCCTCTGCAATATGAGCTG	55
NS77	GGACGCACAGTATTCTCCAC	GATAATGGCAAGACCGGA	55
NS78	AGCAATGCCTTGATCTTGAG	AAGATGGCAATCAAGCAAG	55
NS80	GTGTGAAGCCACGCTGTAAG	ATCAGGTCCATTGTTTGCCT	55
NS82	AATTGAATTTTTCTCAGCACTGT	TGTCGCCCACTTACATTCA	55
NS92	ACTTCATTGGTGCTGGTGCT	AGCGTTTAGCACGTGAGAGC	55
NS97	TTAAAAGCACCTGTGGGTCC	GATACCCACAAGCCCAAAGA	55
NS109	AACTGCAAACAAAGCCGAAG	TCCTTGGCATAGCCAAAATC	55
NS119	GGGAAGTGAGCAGAGACTGG	GATGGTGGTGATGATGATGC	55
NS124	CCCACGCTTCTGCTCTTTTA	AGGCATACCGCCATGATTAG	55
NS128	AAAGGACAGCGCTACCAGAA	GATCGTTCACCTTCTCAG	55
NS136	GACTATTTGTGATGAAGGCTTGC	GGTTCAAGCATTACCTTGC	55
NS142	TCACTCAGCAGCTCTACCCA	CCACCTCCACCTTACTATCCA	50
NS144	GTAGATTTTCGGAGCGCCTTC	GCACCGTTAGAAGCGAAGTT	50
NS147	GCTGATGTCTATTGCACACGA	CAACGTTCTCTCGTAAATGGTG	50
NS149	TCTTGCTCAAGGGCTCAAAT	TTTGATTCCACGAAATCTAGAGAA	55
NS158	GTGCGAAATGGAATCAATG	TGAAATAGTGATACATGCAAAGGA	55



NS159	TATGGAGCAAAGTCAGCCCT	GTCCATGCACATGCCACTAC	55
NS160	CAATAAGAGTATAACCATTACCTGTG	ATGCATCTTCCTGGTTTTGT	55
NS162	ATTATTATTGTGAAGCAATGTCA	CCAGTAAGCCTAAGCACGAT	55
NS166	ACAAAAGCAATCAGGCAAGC	TTGTGCACCATGAAACCATT	55
NS169	GTGCGAAATGAAATCAATG	GCCTTCTCAGCATATGGAGC	55
NS170	TCCTTTACAATTCTGGACGC	AGTCGGGAGTTGGAACCTCT	55
NS174	TTAGGAGGTGTGTCCCATCC	CTCAATTCATTAAGCGCGG	55
NS176	TGTGATACAGGGTGCTTTGC	AACTAGGGAAAGTTCTGAAAGTAGAGA	55
NS178	TTACAGGTGCCCGATGTGTA	CGTTCGAGTTGCATTCAATC	55
NS185	AGTTAAGGGCCAATTCCTGC	CCTTTCTGATGTTCTCTGTCAT	55
NS186	CCACAATCCTTGTAGTAGCCAG	TGCAGTATTCCTCCAAAGTTATC	55
NS189	TGGGCTGTTTCGTGATCCTTA	CATGAGTTTAAAAATTATCACATCCG	55
NS190	CCAAGCAACCATCATTGAGA	TTCATGTGTGGGTTTCTCA	55
NS192	GACTTCCAGACGGGATGTGT	ATCATGTTACACAACAATATCAGC	55
NS193	TTGGGGGCTTTAAGTTGTTG	AAAGCCCATCCCCTCTATGT	55
NS194	TGGTAAGGTTCTTATTTTTGAG	TCCTTCATTTGAGCAATCTT	55
NS197	TGAAAAATTTAAGACTTTCCATCTTCA	ATGGCATTCTGCAGCTCTT	50
NS198	TGCAGCATATCAGGCATTTT	TGGAAGCATGCATCAAATGT	55
NS207	AGTCGGGAGTTGGAACCTCT	TCCTTTACAATTCTGGACGC	55
NS208	TCCTGGTTTTGCCTTGTGT	GCGTGGGCTAACCAATAAGA	45
NS210	AAAGGGAGATTTGCAGAGCA	TGGCTTTGGTTGTATGTGGA	55
NS216	TTTTGAACAGAACCCATCCC	CCCCTCAGGTCGCTACTAA	55
NS217	TCAGCTGTATGTTGAGTGAGCA	AGGGAAGGAACACCTCTCCTA	55
NS231	ATAAGAAAGCAAGGCGCAGA	GTGGAGACCGAGCAAAACAT	50
NS235	CCAAAACATAGGGAGCGAAA	AATTATGGGCAGGAGAAGCC	55
NS242	ACGCCTTAAGTCGGAAGTCA	GCACTAATCAATATTCACACCA	45
NS248	TCAGAAGTGCTCTAGCTTGTC	CATTTGATAGGCAACGCTCA	50
NS254	TTGCTTCAAGGGTGGAAAAG	CAAGGAGAGACATGCCTGGT	50
NS255	TCAAGAGGATCCGTAGACCC	CGCGTGGACTACAAGAACAA	50
NS260	TCAGCTGTATGTTGAGTGAGCA	AGGGAAGGAACACCTCTCCTA	50
NS265	CTCCATTGCCGTGGATTAAC	GCACAATACGCGAATCTTCA	55
NS267	ACACGCAACAAATCAACCAA	CCGCTCCAGGTGCTTTTAC	55
NS270	ATCAGGCAGAGGAGAGACGA	GAACAGAGAGAGAAATGATAGTCTAGT	55
NS271	AAACCACCAATCAGTCCAGC	ATGTCTAATTGAAGGAGAGGATTC	55
NS272	TGAAAAATTTAAGACTTTCCATCTTCA	ATGGCATTCTGCAGCTCTT	55
NS287	GGACCCAAGTCATCATCAGG	TTAGCCCTATGTCATCCGGT	55
NS290	CCAAGCAACCATCATTGAGA	TCATAAAGCTCGTGATTTCCA	45
NS294	CGAAAGTCCTGAAGCAACA	CAATTAAGGCAGACGGAGGA	55
NS295	TGAAAAATTTAAGACTTTCCATCTTCA	AATACCCCTGACATCCCCTC	45
NS300	TGAGAATTGTTGATTCCCAAGTT	GCCAGGCTTTCCTGTGATAG	55
NS301	TGGGCTGTTTCGTGATCCTTA	CATGAGTTTAAAAATTATCACATCCG	45
NS306	AAGACCCACCAGAAAGCTGA	CAATTTCCAATGTGGTCTCAAA	55
NS307	GCGCGTGGACTAACCATTA	GCATGCATCTTCCTGGTTTT	45
NS308	GGAAATTGGTTATGTCCTTTCC	CGCATTGGACTTCTACAAA	55
NS313	TGCTGGGGAAGTGTGGT	GCAACTTCAAAGGCTGAAGG	55
NS315	GTGTGCGGGCATGCAG	CCATATGCACAGGCCCTACT	55
NS319	TTCTAAAGGTTGATTAAGCTCTGTG	AGGGAAGGAACACCTCTCCTA	55
NS323	CCTGGCAGAGAAGTGGAGAC	ATGGTGCATGCTCAAATGTC	55
NS327	TCAGCTGTATGTTGAGTGAGCA	AGGGAAGGAACACCTCTCCTA	55

NS340	GCCAGCAAGGTTTGCTACAT	TTGCTAAAAATCCCTGGACC	55
NS341	TCTTTGATGAGACCAAGCCA	GCACAGACAAACAACCAAGC	55
NS342	TCAGCTGTATGTTGAGTGAGCA	TGCAGGTGACTCTAGAGGAT	45
NS346	CTGCAAAGTCGATGCCTACA	TCTCCATCAGCAGTGCAAAC	55
NS347	AAAGGGAGATTTGCAGAGCA	TGGCTTTGGTTGTATGTGGA	55
NS349	CACTGCGTACAAGCAACACC	GCAAAAGTGAAAAGGACGGA	55
NS350	TCTGGAGCATCAAAGTCTG	GGTGTGCTTGACGCAGTG	55
NS356	CAATAGTATTACATGCCTGCATACG	CGCATTTTGCTTGCAGATTA	50
NS371	CCAGAGCTATGTGCAGGCTT	TGTAAAAATTAAGACTTTCCATCTTCA	50
NS376	TCAAGACCCTTGCTTTGGTT	GGACTATCAAGGCGCAAAAG	55
NS379	TTTTGCCTTCTCTTAGCCA	TGATCCCAAGGATCTTCCAG	50
NS381	TGTAAAAATTAAGACTTTCCATCTTCA	GCGTGGACTAACAAGCCCTC	50
NS384	CATGAGTTTAAAAATTATCACATCCG	TGGGCTGTTCGTGATCCTTA	55
NS391	TCTCAACCTCAGAATGTTCCAA	ATTTCTGCACCCGGATAA	55
NS395	GAAACTGCAGGGAAGTGTCC	GGTTTCAACCCCCAGAGAGT	55
NS562	TGTGACTGAGGTTGGATGGA	AACACCAGCAAATTCACACA	45
NS568	CCTGCCTACTGTTACCTCA	CGCATGCACCTGACCAATTA	55
NS576	ATGAGTGAGAAATCTGCCGC	GAGAGGAAGGAAGTTAGAAATCCA	55
NS584	TTTTATATGCGAGCGTATACGTG	CAGATAGGCGTTCCCAATA	50
NS587	GAAATGCTTCTGTTAAGCAACATG	AATGGACTTCTCACGCTGCT	50
NS602	AGTGGATGATTTGTGTTTTG	GCCTTTGTCCAGTCCATAGG	55
NS615	TGCTTGGGCCATCTCTACTC	CGCGTGGACTAACAGTTTTG	50
NS619	TGTAAGCTGAACGGCTTTCAT	TCAAATGAAGGTGAACTACTCT	55
NS622	TAAGTCGCGCAAATCCTTCT	AGCCCAACAACACTGTGTGA	55
NS644	AACGTGGAAGGCCAGTAGAA	TGTCCTCCAAACTCCCAGAC	55
NS656	AAGAACCCAACGCATTTGTC	TGCCTCTAAGAAGATTGGAAGC	55
NS658	CATGATGGCCGAAGATAGT	TCGTTGGAGCCATTACATTTT	55
NS664	GGGTGCCAAACTCTCATTGT	GGTGAGAGCCTAACCTGTGC	50
NS667	GAATGCATAACATGAAAACAGG	TGGAGGTGGAGCTTAGGAGA	55
NS689	AGGATGATGATGAGACAAGAAGA	CAGACTGGACTTGAACCTTCACT	55
NS693	GCCTATTTGTGACCACGCTT	TTATTAGGCGACTTGCTCTGG	55
NS701	TCTCTTGTTCAATTTGTTGCGTT	TCCATTTGAGCCAAAATTTTATT	55
NS713	ATGGCATTCTGCAGCTCTT	GGCGCGTGGACTACAAGTAT	50
NS717	GCCAAATCGCCAAGGTAATA	GGTGAGTGATAAGGTTACGGC	55
NS720	CCATTACTTACACATTGGACTTCCCT	GGAAATGGTTATGTCCTTTCC	55
NS725	AAAACGAAAATCATGCCAG	TGCTATTCCAAGTGTGTTGCC	55
NS733	TCTAGTGGTATCAGTGGAATGG	AAGGACTGGCAACGTGAAAT	50
NS743	GGCCAATTTTTTCTATATATATGTTTT	CGTGCGCACACAATTGGC	50
NS772	CCACACCTGGTCTTTCCTGT	AATCACATAATGAGTATAAATAAATG	55
NS774	AACCCGCAGAGAATCATGG	TCTCTTGCTTCTGTCAACAG	55
NS780	TTCTTGCTAAAGATACATACATGC	TGCAAATAAGATGAAGAATGTTTGA	50
NS781	CACCCAATTCACCAATTACCA	GAAGACGACGATGGATAGCTG	50
NS847	CAAACCTAAACTCCGTCGCG	TTGGCCTGTAAGGTTCCATC	55
NS882	GCGTAAAGAAACTGATGAAGGA	GGGAGGAACTGGCTTTCTC	55
NS890	TAAATTGGGGGTTCTTGCTC	TGCTTACTCTTTGATTCCACG	55
NS898	GCATCTTCTGGTTTTGTCC	CAATAAGAGTATAACCATTACCTGTG	50
NS899	AATGACCATGCCAACACAAG	CACCGTCAAGAGGATTTGGT	55
NS905	CAAACCTAAACTCCGTCGCG	TTGGCCTGTAAGGTTCCATC	55
NS909	GCCAGGCTTTCCTGTGATAG	TGTGATACAGGGTGCTTTGC	55

NS911	TGTTGTTTCAGACGATGTCCAA	TTGAAGCAGTTATGAACCGT	50
NS912	GAGAACTCAACCCCATACC	AAGGGACACGACTTGGTCAC	55
NS917	TCAGGGCCATTGAAAAATGT	CCTGTGCAGTATTGAGCGTG	55
NS928	GATACCCACAAGCCCAAAGA	GACCCACCCATCCACTAGAA	55
NS933	TGCTACATAACAGTCATTATTCA	TGCCTTCTCTGTCAAGCCT	55
NS945	GCAAGGCTCCATTAAGTCC	TGTTTGAATAGTGTGCTTCTTGA	55
NS946	GCAAGGCTCCATTAAGTCC	TTGTATGCTTGGCTGACTGGAG	55
NS948	TTTTGCCTTCTCTTAGCCA	TGATCCCAAGGATCTTCCAG	55
NS955	AGCTGCGTGCCTACAAGTG	TTGAAAGTGTGCTGTTGAAGTC	55
NS960	AAAGCCCGCATTCAAACAC	TGATGCAGGTAGCAAGGATG	55
NS963	TTTTTGTCTGCTGCATATGTTT	GAAGAAACCACCCAAGTGGA	55
NS964	AAGGGACACGACTTGGTCAC	TGGTTAAAATTTCTTTTGTGAAGT	55
NS977	TTCCTCGCATGGCAGAAG	GACCCTTTGCCGTTACTCAT	55
NS978	TGTTGGCCATATTTCCCAT	TTGAACACACTTGGCCAGAA	55
NS980	TGATCCCAAGGATCTTCCAG	TTTTGCCTTCTCTTAGCCA	50
NS982	AGGTGTGTCCCATCCCTTC	TGTGCATATTGAAATCTCAGACTC	50
NS983	GCTTCAAACATCAAACCCTAAC	TCTGCAGATGCAACAAATCC	55
NS995	CATGAGTTTAAAAATTATCACATCCG	GGGCTGTTGCTGATCCATA	55
NS1002	GACGGTTGTCGCCCTTGT	AAACCAATCAAACCTTGAACC	50
OS22	TGTGACAATTTTCAGATAGCTTCA	TTTGTGGGAAAAGACGAGC	55
OS112	TGGGTGCCATTTGTAGTTGA	TCCTCGCATTATGTCACACAC	55
OS312	TCTGCGCTGTTTCAATCAATC	TGCTGGGAGGAAGTAGGAGA	50
NS1003	TGCAATTGTAAGGGC CAAAT	AATTTGGAGCTCAAGCGATG	52
NS1004	ACAGATGTTGAGGGGATGCT	TGAAAAATGATG TTGAAGCGA	52
NS1005	ATG CTAATTAATGGCGGA	TGTTTATGAAGCATATCAAAAT	-
NS1006	AACTTGCGTCCCAAAGTGT	TCCTATACAGTGCTGTCCGC	55
NS1007	AGCACCTTGGGCAGCTTCT	TCTCCTAATGGTGCGTTCAA	55
NS1008	AAATGGCCTAGAAATCCATGA	AACCCACTCAAGTGTCTCCG	52
NS1009	CGTTCACCAAGAAAATGGT	TTGCATGAATCAGAAGCAATG	-
NS1010	TAGCGATTGCATTTTACCCC	ACTGCAAAGCCCTTGAGAGA	55
NS1011	AGGCTGTTCAAGTCAACCTGG	ACTAATGCCTCTGCTTTCC	40
NS1012	TGTTGATACAATCTAAATGTAGCCTTC	TGTTGAATCCCACATTGGTG	55
NS1013	CATGTTACCTTGCAGCGTGT	GAGACACACGCATCCTCAGA	40
NS1014	TTTTCCAATTGCTTTGGTGA	TCCCTCTATTTTGACGATCCA	52
NS1015	CCCTTTCTTTGGTTTGGTT	ATGATATCGGCTCGGTTGAG	40
NS1016	CTGAAAGGGAATTTTCATGCC	TGGACTTCGTAATTTTCTGCAC	55
NS1017	TTGGATTCCAGTGATAGCCC	TTCTCATTTTGAGCCATGACC	52
NS1018	GTGCCATGGCTTTGCTATCT	AGAACATTTCCAGCACACCC	45
NS1019	CTGGAGAAGACCACCCAGAA	AAGCAGTGGCTCAGTTTGGT	60
NS1020	TCCAAGCCTCAAAACTTGCT	GAGAAAGACTCAGGTTCCGC	55
NS1021	TCACAATGAAGCCCAGTGAA	TTGTATCTGAGCCTTGCGTG	55
NS1022	GCTTAGGTGGACCCATTTGA	AATCATTATAAGGCGTGGCG	40
NS1023	ATTTAATGCACCCCCAACG	TCCTCTCTCAAGCTCCACT	45
NS1024	CGCATTGTCATGAGACCTAC	GCTGGAGTATCATGTCCCCT	-
NS1025	TGGATGTTTACGGACTCAAAA	AGCACTCAAACAAGACCAAA	40
NS1026	ATGGCCAGCTTGTGAGCTAT	CTGCGTGCATCAATCAGACT	45
NS1027	GTTATATTATAGTAGTGAACCTTA	CGATCAGATCTAAATACAGCC	-
NS1028	GGGGATGGAGTAAATACGCA	TTCCCCAAATATCACTTCTGC	55
NS1029	GATTTGCACAGAGGCAGTGA	TTTCTGTTTTGGGTCAAGGG	55

NS1030	AAAGCATTGGCCACTTGGTA	ACCAGATGTAGTGTCCCTT	55
NS1031	TCATTGTTGGTGCTGATGGT	CAACCCCATTTGTATTGGT	40
NS1032	TGGATTATTTCTTTCCACCA	CTTTCTCTAGGGAACGCGA	40
NS1033	GGGGTTCCAACCAGAGTTTT	GTCGATGCCCTGTACTGT	45
NS1034	GCCAGCGTCAACCTCTTTAC	GGTGCCAGATGAGACAACCT	45
NS1035	TTCCTTGCTTCTCAAGGCAT	TGCTCCTGCTGACTGGTTG	60
NS1037	TTGGAAGTCAGGCTCCTTGT	TATCCCGTCAATGCAATCAA	45
NS1038	TCATGGTGAATGCCAGAGTAG	TACCACATGGTGGCAGCAC	40
NS1039	TATTCAAGAACC GG G CAGAC	CGGTCGCAATAACGAAAAC	45
NS1040	CGCCTCTCAACCCAATAAGA	TAGAAATCTGAGCCACCGCT	45
NS1041	TTGGATGATGATTAGGCTCG	TCGATCTACTTTGTTTTGATTGG	52
NS1042	CCGGGTCGCTCTATACCTATC	AAAAATTGAAACGAATGGAAAAAG	40
NS1043	CTCACCATGGCTCATTCTCA	AAAGCCTGCAAAGAAAACCA	55
NS1044	TCTCCCAGAATGGCAGAAAC	TTGGAGCTTTGAGTTCAAGA	52
NS1045	GTGTTGTGCCCTTGCTTAG	AAAAGGGTGGCGGATAATG	55
NS1046	CCTTCTACCCATCAAGCCT	AATAAATTGGTGATGGCTGAA	52
NS1047	TATGCACATTGCCTCAAAA	AACTCAACCCCTCCCATTTT	55
NS1048	ATGGTTGTTGGGTGATCCAT	AAAGCCAATGAGCAGAAAC	45
NS1049	TCTTGCCATTTGGAAAATC	CCTTCTGGCAAATTGAAA	45
NS1050	TATGAACCAGCGACAGCAAC	GACACATTATCCAGGTCCGC	45
NS1051	TCCAGATTTCCAACAAAGGC	GGAGCTGAGCTGATACATTGG	40
NS1052	GAGTGTGTCCGGCAGTTT	CCATTCCATGGGTTTTGTTT	55
NS1053	TGATGCTCATGTTACAGCTCC	TTTTGAAAGGATGCCAGCTT	52
NS1054	CTGGTGATGGTGGGAAAAT	ACCCAACCATGAGAAGCAAC	55
NS1055	CTAGAAGGTTCCGACATCCG	TTGGGAATAGTGATTGTTAGAATTG	52
NS1056	GCTTAAACTCATTGGGCTGC	TTCTTTGGCTCTCCCTGTA	53
NS1057	TTCTTTGGCTCTCCCTGTA	CTCAACCCTGAAGGACCAAA	53
NS1058	GGGTACACACAAAAGAACG	TCTCAAATGTGGAGACCCC	40
NS1059	TGAACCCTACGGACCCTAAA	TCAGGGTATTGATCCACCACT	45
NS1060	GGTGAGCTACAAGAGCCCAG	GCCAAATTTGACAGAGGGA	53
NS1061	ATGCTTTTGCAAGCCACATT	GAAATGGGCGAGCTTTTCT	53
NS1062	CCTTGCAATTTCCACCTTG	CGTACTGCCAGGAAATAGC	52
NS1063	TGCATACAAAAGTCCCTCA	AAGTTTGGGAATGCAAAGT	56
NS1064	TGTTTGATTTGCTGGGTTGA	GGCCAGAAATTAAGGGCTTC	52
NS1065	TCGGGCCTCACTGATGTAGT	ATATGTGCCTTGTCGCATGA	52
NS1066	AAAGCAATACACGCCAAAGG	GGCCAAAAGTACACAAAGGG	53
NS1067	GGCGATGAATTTGTGTGAGA	TGATGATTCTCCCTTGGTTCT	53
NS1068	TCAAGATCCTATTCTTGCTCCC	AAGGGAATAACCCCTTAATTG	40
NS1069	TCCACTCTAGATTTTCTCCC	TGGCATAGTAGATGGGGCTT	53
NS1070	GGTCTGTAATCAAGTTTAGTTTG	TCATGGCTTTGACTAACATCTTC	53
NS1071	CCCTGGAGGAAGTTATGGT	TGTCGCTCATATTGTTTCGG	-
NS1072	GCCTATTCAAATTGCATCCC	GGCATTGAAGAATGGAGGA	52
NS1073	ACAGGGTGATTTGGTGGTGT	TTCGGGTCGTACAATACAA	40
NS1074	TTGGCTTGAATTGAGGACTTTT	AAAAAAAATTAAGCCAGCAT	53
NS1075	AAGGGCGATGAGGAACTGTA	TTTCTCAAAAATTTATTGCATTC	40
NS1076	GCTAGGGCATGTCCATGAGT	TACATTGCAAGGGCAAATGA	53
NS1077	TGCCTTTGAGTTAACTTCTATTTCG	CCTTGGCTACTTTTCTGTCACC	55
NS1078	CTCTGTTTTTGGGTGTGCAA	GACGCCATTCTTTTCTCAGC	52
NS1079	GATCAAGCGCTTACCACCAT	ACCTCCCAACATCCAAC	53

NS1080	ATTGCTTACCCACCATCACC	TGGATGGGAAAATGGTTCAT	55
NS1081	TCATTGTTGGTGCTGATGGT	CGGGTTTTTCAGACAGGTCAT	53
NS1082	AAGGCTTCCCAAGAATTAACC	AGAGGACACAATGGAGGTGA	52
NS1083	TTCCGTACCAGGGTTTGAG	TGATTCAAAGCGAAGGGGTA	45
NS1084	GAACCTGGTTTCTGCCAAAG	TGGAGCTTGGAGGATCTACG	52
NS1085	CCGCCGTCTCGATTCTATTA	GACAGTGCACGAGCAAGAGA	52
NS1086	AGACCTCAGGAACCCATCCT	GGCAGAAACTCAGCTCCAAC	52
NS1087	GTTCCACAGCATGGGCTACT	TGGGCATCAAAGTTTACATCA	52
NS1088	GCCCCTGGCACTATGTAAGA	GAGGGGTGAGCTAAAAGCC	52
NS1089	ATGTTGCATGCATGGGTAGA	TCATCCTAAACTAGATCCCGAA	52
NS1090	TTCTCAAGCATATAGGGGCA	ATTTTCGGGCAAAGGTGAA	52
NS1091	CCAGTTCAGGATTTGAAGC	ATCCATGCTCCTGTTTTGCT	40
NS1092	CACACCTCCCGCAGTCTAAT	GGATCTGTCAATGCTTCACTCCT	40
NS1093	CCAAAACACAAACAGCGAGA	GCTTTCGTTTTATGCTTGCTT	40
NS1094	GCAATGAGCTTAAGATCGGC	GGCAGCGTCAGATCAGTACA	40
NS1095	CCTCAAAGAGGGAGCAGAG	GTCTTTACGATCGTGGGCAT	52
NS1096	CCCGATAGCACATCAGTGAA	ACTGGGCTGAATTCAGTGT	40
NS1097	TCGCTTTTAGCTTCCCTTTTC	TTAGTTGCACGGCTTACGTG	55
NS1098	CTACTAATAATAATTATCAGCACA	AGAATGAACTTAATCATCAGAA	40
NS1099	GAGTTCGAGAATGTGCGTGA	ATTTCTTTCTGCGCAAGCAT	55
NS1100	AGGGGGCTCCTATGAAAGAA	TGGTGGTTCCACAGGACTTT	55
NS1101	CAATTGATACCTTATCGCACTTT	CGGCTTAATCCATGCTTTTT	55
NS1102	ATTTTCCGGGTGGGAATAAC	ATCTTAAGGCGCTGTTTGGA	40
NS1103	TTGCTTTGCTTTTTGCATGA	TCATGTTTAATTTCTTAATTTAATGT	40
NS1104	AAAGAATGGGGTGGGTTTTTC	TATGGTTTTACGACCATGC	-
NS1105	TAACCATCCTAACCCACCA	ATGATGAAGCTCGACAGCCT	45
NS1106	GGACGTGCGAACGAAGTTAT	GCAGAAGCATAAGCAGAAGTAGAA	45
NS1107	CATGGAGAACCCCAATGAAT	CCAAAGAAAACGTCTCCTCCC	55
NS1108	CGATTTTCGGGTCGTTACAA	AAGCCTAACCAAAATTAATAGATGA	52
NS1109	TGTGCATGGTACGAGGGTTA	CACACGCAATTCAATCCATC	55
NS1110	GACATACTTAACAGTACATTG	TTGGATATCCTTATAAGGTGGT	-
NS1111	ATATGTGCCTGTGGTGGGTT	TCAAATTCGATACCTCGCAA	40
NS1112	GTGTCGCGTCTTAATCAGCA	CCAAGTTAATGTGGACGTAGC	45
NS1113	ACCATTCCATTCTGGGCATA	GGTGGGACTGCTATTCTGA	55
NS1114	TATCCTCTGGATGGACCTGC	AGCGAGTTTTTCTCCCCATT	40
NS1115	CAAGGAATGATCAACTCGCA	ACGTTCTGGCACTTTGGAAT	55
NS1116	AAACATGCATTCTACCCCA	TGGCCAGCCACTATAAAAGG	55
NS1117	TGGAAATTTGGAATGTGGGT	ATGGATGGAAATTCGAGTGC	55
NS1118	GAACATGTGTTAAAAGGATTACCA	AATGTTTGTGTTATGGCGCA	52
NS1119	CTCCACTCCTGCCACGTATT	GGGACAGTGATGGTCTTCGT	45
NS1120	CGAATCCAACCAAGGTCCTA	AATGACCTCAACTAGCACACA	45
NS1121	TTTTGCTCCCTCACATGAAA	TGCTGTTGAGGAGCTGTTGT	55
NS1122	AAACATGCATTCTACCCCA	AGCCCACCTATACAGGGTCC	52
NS1123	CTCACTGATGCTCATTGCT	ACAGAGAAAATCCGCCATTG	45
NS1124	TTCCTCCTCCTTTTCCTCGT	GAAACCCAGCTCCAAAAGA	40
NS1125	GCAGCATGCAAGCTTTACAA	AGATCTTTTCGCAAGTCGGAG	52
NS1126	CTCCAGAGAGTGTCTTGAGC	TTTAGCCATCCATTCCAAGC	40
NS1127	CAATTCTTAAGCCAGCCTGC	TTCATGTCTTTCTCAAGGTGA	40
NS1128	CCAGGATCTTATGGACCCAA	TGATCTCGGTGCAGAATGAG	40

NS1129	TGGCTCATTGACGAGATCAG	CAGAATTACAGCAGGCCGAT	40
NS1130	TGTGGCACCATATTTCTCTGA	CAGAGCAAAGGTTTTAGGCCA	52
NS1131	TGGCAGAAACTCAGCTCCTT	TGAGCAAGTTTTGGGAGCTT	52
NS1132	AAACCACCCTGGTAGCCTCT	TCAAAAATAAAGGGATAAAATTAAGG	-
NS1133	CCGAACCTGGTTTCTACCAA	CAAGCTCTCCCAACTTCGAG	52
NS1134	CGTGAATTGCAGTAAAGCTCC	TGTATACTTGCCCCACTTGC	52
NS1135	ACTTCAATGTGAACCCTGCC	AAACCCTAACCAGGGAATG	52
NS1136	TAGCGAAGGACCTCAGCATT	CCCGAGTGAAGATGTGGAGT	55
NS1137	CAGAAGCTTGGCTCCCTATG	CAAGCTCTCCCAACTTCGAG	52
NS1138	CCTCAACCTACCCTCAACCA	TGAGAAGGGTGAAGAGGTGG	52
NS1139	ACCCATTTGATGGCAACTGT	CCGAGCTCCCTCCATAGAAT	52
NS1140	CCCCTGGCACTATGACAGAT	TGCCTTCACTCTAGCCGATT	52
NS1141	CTGATGATTGCAAGGTGTGG	TTGGTGCATAAAGGGGAGAG	52
NS1142	ATCACACGAGTCTTACGCC	ATGCTCAAGAAGCAGGCAAT	60
NS1143	GGCTTTGGTCCGTATYYGAA	ATGGTGTCTCCTTCCACGT	52
(ESTs)SSRY1	CCAATTTTGGCACCTGGTAA	CAAACCAGTGAATGCAAAAA	55
(ESTs)SSRY2	AAAACCATGACTGCCGAGAC	TGCTTTGCTTTGACCTACCA	52
(ESTs)SSRY3	CGATGATCATTATGGCGATG	TGGCGAACTCGTTACTTTT	55
(ESTs)SSRY4	GGCTGTCCAAATGCAAGAT	ACGAACTCGAAATCGTCGTC	55
(ESTs)SSRY5	AATGCAATTTGCTGCTTCT	CCAAGGGAAGTCCAGAAGAA	55
(ESTs)SSRY6	TCTCTCCAGCAGACGAAACA	GTACCCTCAAGCCCATCAGA	55
(ESTs)SSRY7	GGACAAGCTCACCGAGAAAA	TGCAGCTCAATTCCTTCTCC	55
(ESTs)SSRY8	GAAGAAGCCTGGTCTGTTGG	GGGACTGTGGTGTCTCTTC	55
(ESTs)SSRY9	AACGGTCCAAATCGTCAAC	CTCGATGTCAGCAACGAGAG	55
(ESTs)SSRY10	ACCAGCTCCTGTGACAAC	CAGCACCATTTCTTCCCTA	55
(ESTs)SSRY11	AAGAGCTTTAGGCGGTCACA	TTGGGGTTCTCCCTTAATCC	55
(ESTs)SSRY12	AAAAATGATCCAACATCTAGCAA	TTGGGGCCCGATAATAAGAT	55
(ESTs)SSRY13	AGCATAGGAACCTGCGTCTC	TCCAGCTGTAGCTGTTGTGG(	55
(ESTs)SSRY14	TCGATGCCCTTATTGGTAGG	GGCAGAGCTGGATTCAATCA	55
(ESTs)SSRY15	GAGCAATTTCCACCACCATC	CGGAATGGTCAATACCCTTG	55
(ESTs)SSRY16	TCGAAGCATTCTGTGTGCC	TCATCCATAAGATCATCTCTGTTACTG	55
(ESTs)SSRY17	GGCCATGCTCGTTTTAGAAG	CACCCATTGTTCTTTGACA	55
(ESTs)SSRY18	AGTAGGTTTTCGCGGTCTCC	ACCTCCAGAAGGTGCTCGT	55
(ESTs)SSRY19	GAGAAGTGTTGGGGTTTCA	TCAAGAGCTGGACTTGAGGAA	55
(ESTs)SSRY20	CGTCAGCCCATGAAATCTCT	GCAAAGACAAAGAGGCATCC	55
(ESTs)SSRY21	CAAAGCATAACCGCAATTT	AGTGCCCGATTATTGGAGTG	55
(ESTs)SSRY22	CCAACCCACAACCTTCTGAT	AATCCAATCCCCTTGACTC	55
(ESTs)SSRY23	GCGGTGAAGATCTTGGTTTT	ATGCTCGTCTTCTCGTT	55
(ESTs)SSRY24	AGGAAAAAGAGGCTGGAGGA	ACCTACGGAATCCCAGAAGC	55
(ESTs)SSRY25	CATTTTCTTCACTTAACCCAAC	CAAGCCCTGAATAGTGACCA	55
(ESTs)SSRY26	AAATCTCAAACGCCACCAC	AGTCAACGAACAGCGGAAAC	55
(ESTs)SSRY27	TTGGATGTATAAAACGCAGAA	GAATATCATCCCAGGCTTCG	55
(ESTs)SSRY28	ACAGCCACTTGCCTCATCTT	GACACGATCGTTGCGAGATA	55

(ESTs)SSRY29	AGCACCCCTTCCACTTTATGC	CTGAGGAGCAGAGCCGTTAC	55
(ESTs)SSRY30	CTCTTCTTGTCCTCACTCC	TGGCTAAGGTCTCGACTGT	55
(ESTs)SSRY31	TCGAAGCATTCTGTGTGCC	AATTAATTAAGCGACATGAACAAGA	55
(ESTs)SSRY32	TCAGGCTCAATCACAAGCAC	TGCATGCTCTGTTCTGCTTT	55
(ESTs)SSRY33	ATAATTGCTGCGACCACCAT	GCTGCTCAGCCATGGATATT	55
(ESTs)SSRY34	TCTTCCTCGTCTTCCAGTGAA	ATTTCTTCATCGCCGTCATC	55
(ESTs)SSRY35	CACTGCTTCCCCCTTCTGTA	GCCACGCCCATTTCTTATATC	55
(ESTs)SSRY36	TTCAGCAAAGCTGCAGAAGA	GATCCCAGAAAATGGCAAGA	55
(ESTs)SSRY37	GAGGGAGTCTGCTTCTGCTT	AAGCTCAGAATACAACGGAAAAA	55
(ESTs)SSRY38	GACTCTGCGTCGCATTGTTA	CCCACAAAACCACTCCATC	55
(ESTs)SSRY39	CAGTCCAAATCCAGCCATTT	TGGAGCTTGCTCATCAGAGA	55
(ESTs)SSRY40	GAAGCCTCGATGCCCTTATC	ATCATCCCCTTGGCTAGGAC	55
(ESTs)SSRY41	CAGCGTCTCTGCGTCAATAA	AGTCGACGATGAGGAAGACG	55
(ESTs)SSRY42	TTAGTCCTCAAGCAGCAGCA	GTCTTCTGAAATCGGCAGGA	55
(ESTs)SSRY43	CAGCAGAGCTTTCCTAACC	AACAAGCACCCAACCCAATA	55
(ESTs)SSRY44	CATAAACGCGGTCCAAAAAT	ACGAAAATGCGGATTACAGC	55
(ESTs)SSRY45	GCCGGTAAACGGTAAAATCA	AATCAAAGAGACGGCGAAGA	55
(ESTs)SSRY46	AAGAGGAAGGGTCTCTCATTC	AGGCAAGAGTGGTGGATGAT	55
(ESTs)SSRY47	GTGTCGCTGCTAGATCTTGACT	TCATCAGATCACCACCATCAA	55
(ESTs)SSRY48	GCCCCATAAAAATCACCAT	GAGAGCAAACAACCAAAGTTGA	55
(ESTs)SSRY49	GACCACGTCTCGTCGTTTTA	TGCCACGACATCTTCTTCTG	55
(ESTs)SSRY50	TCTCCCCACACTCTCTCTC	GGACCGTATCCAAGCTCATC	55
(ESTs)SSRY51	CCTGAGGAACGTGAAGCAAT	TGAAGATGAGGAGAATGTAAAAGG	55
(ESTs)SSRY52	GTCTCCCTCCCTCTCTCTC	TACGCAATTGCAAATGATCC	55
(ESTs)SSRY53	GGTGCTGCAGAAGAAGTGCT	CCCCTTTCTTCCACTTTCT	52
(ESTs)SSRY54	GCAAATTGGGGGAATGTTTT	AAGACACGAAGACGGTTGCT	55
(ESTs)SSRY55	TGCCCTCAAATTTTCTCCAT	TTGGAAGATTCTTTTCCATAGAC	55
(ESTs)SSRY56	TCGCAGCGCTATTACCGTAT	CGAGGAATGGGAATCAAAT	52
(ESTs)SSRY57	GGGTCCTAAGCGACCATCTA	AATTC AAGTTCAGGCGTGGT	55
(ESTs)SSRY58	AGCCATCCAATCCAATCTGA	TATGCGAGGATAGCAGCACA	55
(ESTs)SSRY59	GCGGGGATAGTTGAGTAGCA	TACGGTGACGTTGTCGAAGA	55
(ESTs)SSRY60	CGACGGCTAAAATTGCATCT	GCCTTTTGGCAGTTTAGACC	55
(ESTs)SSRY61	TTCAATGATGGCTGAGCAAG	TCGCAGCACTAAACATCTCG	55
(ESTs)SSRY62	CCATGGCACAATAACATTGG	TGGGCGTAGGACAGTAAGAGA	55
(ESTs)SSRY63	CCCTTCCCGAGCAAGAAC	CCTGTATCCAAGCTGCCATAA	55
(ESTs)SSRY64	CCAACATGCTTCACCAATCA	CATTCAGACAACGCAATGTG	55

(ESTs)SSRY65	GCACCAGTCAACATTCCTGA	CATCATTACAACCCCATGA	55
(ESTs)SSRY66	CGCTTACAACACCACCTTCA	TGACGTCCTTAGCCATCCTC	55
(ESTs)SSRY67	TCTCCATATCCTTGGATTCGT	GCCGACCATAAATCTGGAAA	55
(ESTs)SSRY68	TCTCCAGGTTAAGGGGGAAG	CCTCCCTTCCATCCTCCTAC	55
(ESTs)SSRY69	GAACCGCTTCTTCTTCTCTCTT	TAAGAATGGCAGGGAAAAGG	55
(ESTs)SSRY70	GCCAATTTTGCTGGGTTTAC	GCTGATGAACCC TTCACGTT	55
(ESTs)SSRY71	TGCTTCTAACAGAGGCAGAGG	GGAGCAAAGGCAGGAAACT	55
(ESTs)SSRY72	CGAACTCGATCAGATTCCTACT	TACGGCCTATCCTCTGATGG	55
(ESTs)SSRY73	GTCAGAGCGGACACAACAAC	AGGAGTCCACCGAGGAAGTT	52
(ESTs)SSRY74	GGCAGTGATGCAAGAAATGA	ATCGTTTTCCCTTCCAGAT	55
(ESTs)SSRY75	TGCGCTTCTCAGGGACTATT	TTCCCCGATTGTTTGTAGGA	55
(ESTs)SSRY76	GAAACGCTCGATCCTACTCG	AGCAAGGAGGGTAACGACAA	55
(ESTs)SSRY77	ATCTCAGGGTGGTCGACAGA	TGCCAAAGGAGGAGAAAATG	55
(ESTs)SSRY78	AAGCCAAGGAAGAAGCACTG	CCCTCTTCAAGGCCAAAAT	55
(ESTs)SSRY79	CCACCACCTTGATCCCACT	TCTTTGCCATCAACCCTTTC	55
(ESTs)SSRY80	TGGTAATGGTCTTTTTGTTGTTAAA	CACCTTGTGCCTCTACCAGGAG	55
(ESTs)SSRY81	CCCACATGTACTTGGAAGAGA	GTTGGTGGACTCGTGGATCT	55
(ESTs)SSRY82	GAAGGCCAGACCCAACAATA	TCGAAGGGCTATGGTGCTAT	55
(ESTs)SSRY83	TGGACCTGTTTTCTTTCTCTG	GCACCCACCACTGAAGTACA	52
(ESTs)SSRY84	GTGGCAGAGTCTGTCTGCTTT	TTTCTACTCTCCGGGCATTG	55
(ESTs)SSRY85	CGTGGATTCTGGGGATAAAG	GCAAATCATAGCCGCTCATT	55
(ESTs)SSRY86	GAGCGTGGATTCCCTTAAAA	CATGGGTTCAACTCTGACGA	55
(ESTs)SSRY87	CAATTGCGAAGACTGCAAAG	ACAGCACAGGTTGAAGGAGA	55
(ESTs)SSRY88	CACGCAGCCTCTTCTCTCAC	TCAAGAGATCGTTGTGACAA	55
(ESTs)SSRY89	GCCATTGATTATGCATAGGATG	GCCTAGGCCTGTATGGAACA	55
(ESTs)SSRY90	GAGCCGGAAAAGTTCACAAA	GAGTTTCTGGGGGAGGAAAG	55
(ESTs)SSRY91	TGGAGAGGCCATTGCTAGTC	ATGCACAAAAGAAATTTCCAA	55
(ESTs)SSRY92	GGAAATTTCAATTCAGACAGG	ACGGCGGCACACTAAATATC	55
(ESTs)SSRY93	CAGGAAACCCGTGACTTCAT	GCAATGCACATGATTTTGCT	55
(ESTs)SSRY94	TCTGCTTTTGGCTGGAATTT	TTTCCACAAGCATTCCAACA	55
(ESTs)SSRY95	CCAACATGCTTCACCAATCA	CATTGACACAACGCAATGTG	55
(ESTs)SSRY96	GCATTCTTCCATGACGTTGTT	CCTCCGTAAACTCAAAGCAA	55
(ESTs)SSRY97	GAGACATTTTGGTGGGTGCT	CACCTTTGTTTTCCAGCTT	55
(ESTs)SSRY98	CCTCAAGCAAAGCAAAGGAC	CGGAGTGCTCCTCTCCATTA	55
(ESTs)SSRY99	TGCCCTTTTGGCAAACCTAAC	TCCTCCTGGCTGATGAGTCT	55
(ESTs)SSRY100	GCGCTTACAGGCGTTTTTA	GGTCTTTGCTCCGTCGTTAC	55



(ESTs)SSRY101	AACTCGCGCCAAATACAAAC	CTGCTCTCTCACCCCAGAGT	55
(ESTs)SSRY102	GCTTGCTCAGCCTTGAGTATT	TTGCCATGGCTACAAAAGAA	55
(ESTs)SSRY103	GCAGCATGGAAATTTTAAGCA	GAAATCGGCAGGAGATTGAA	55
(ESTs)SSRY104	ATATGCAAGGGCAAGCAAAG	AGCTAGACAAAGCAGCTCGT	55
(ESTs)SSRY105	CCAAAATTATCTGCCATTGCT	TCATTTCAGATGCACTCAACTCT	55
(ESTs)SSRY106	TGTGGTCGATGAACAAGATA	GGAAGCTTCTAAACTGGTCA	55
(ESTs)SSRY107	TCGTATGAAAGAGACACGAA	TGCTTGATCAACTGAATGTC	55
(ESTs)SSRY108	GGAACTCTTTTCGCTATCTGA	CGCTACTTTCTGTCTCAACC	52
(ESTs)SSRY109	TCAGCTTGCAATGTATGAAG	AAGTGGGTGGACATTAGAAA	55
(ESTs)SSRY110	CGAGAGAAGTGGTACAGAGG	AAGATCTCGAGTCTGACGAA	55
(ESTs)SSRY111	GCAGAAGCAATCTACTCTGG	GCCTCAAACATGGGTAATA	55
(ESTs)SSRY112	TCTTCTCTTCCAAAGTCTGC	TAGAAGGGGAATCAAGAACA	55
(ESTs)SSRY113	CCAGTTTGTAATCCCAAAG	GCAGCTTCAAATGTCTCC	55
(ESTs)SSRY114	AGTATCAGCGAAAACCCATA	GTGCTCATTCTTTCTGGTTC	55
(ESTs)SSRY115	AGCACAGTTTCATGCTAAT	TGGACTIONGAGGAAGAGACAT	55
(ESTs)SSRY116	CTGAAGTGCACAGTCAAGAA	CTGAAGTGCACAGTCAAGAA	55
(ESTs)SSRY117	CAGAGAGAGAGCCTGAAAGA	CAGAGCTCCGTAGCTTATGT	55
(ESTs)SSRY154	CTTGCTTCAAAGGGTCAATA	CTTCTGCTGAGAACATCTCC	55
(ESTs)SSRY179	CCTTTCCACTTCCATTAACA	CAAGATcttTGTTGGTCAT	55
(ESTs)SSRY190	TCTAACGTACGGAGTCGTTT	TGAAGAGAAAGCCAAAGAAG	55
(ESTs)SSRY194	CTCTGCCTTTTTCTCTCAAG	CCCCATACTGTAACTCTTGG	55
(ESTs)SSRY209	GCAATGGAAGAAGTTGAGAG	GAGTCAAGTCTCTTTCATGATTAGG	55
(ESTs)SSRY227	CATACAGAAACGGAGAGGTC	CCTGACTTTCATCAAAAAC	55
(ESTs)SSRY230	ACGCAGAATTCATACTTTCG	CTTCGGCTATTTCTACCAGA	55
(ESTs)SSRY232	TCTCTCTTTCTTCCCTCAA	ATCCTTCTCATTCTCAAGCA	55
(ESTs)SSRY235	TCCTCTAACGAGTCGAGAAG	CACAAATGGTGAAGACACAG	55
(ESTs)SSRY236	ACAAGGTAGACAAAGGCAGA	TAATCACCATACCCACCTTC	55
(ESTs)SSRY237	GAATCCTCCATCAATTCAG	ACCATTGACATCAACCTTGT	55
(ESTs)SSRY238	GAGCAACAATTTCTCTGAGG	GAATTGCCATTATCTCTTGC	55
(ESTs)SSRY239	GCAACACCTCTCAAGAAAGA	TAGGCGAAGCCTAAAAGTAG	55
(ESTs)SSRY244	AATGAACGGTCAGAATCTTG	ATTTCTCCAGTTCCTTCAG	55
(ESTs)SSRY245	TTACTGTTGAGGGATTTGCT	ATGGTTTGaCATCCAttagC	55
(ESTs)SSRY247	ACATCCATGGAAGCAGATAG	GCCCAATAGAAACAACAGA	55
(ESTs)SSRY249	AGGAGAAAGGGAAGCGTA	TTTCGAGGAAAGTAACGAAG	55
(ESTs)SSRY250	ACAGCAACAGCGTTTAATTC	CTTCTCCTCCACCTCTCTCTT	55
(ESTs)SSRY253	GGTTTTGACTTTTGAGGTGA	GCTTGTGTTCCACCTGTAGT	55

(ESTs)SSRY258	CTTAATTGCGGACTTTTCAG	ACCCTCCGAAGTTACATAAA	55
(ESTs)SSRY259	GAAGCTTCCTTCAAATAGCA	TGTC AAGATTGTAGGCAATG	55
(ESTs)SSRY260	TTGACATCCCCTGTTTCTAC	GGAAAGAAATGGGAATTAGC	55
(ESTs)SSRY262	AAGAAATACAAGCAGGGTCA	TGCATCAAATGGTACAGAGA	55
(ESTs)SSRY264	TCCACTTCAAATCTTCTGCT	CTCTTTGGTTCTGGAAAATG	55
(ESTs)SSRY265	GCTCGTTCATTATCTCACT	TTAACTGTGAATGCCCTTCT	55
(ESTs)SSRY266	CACGATCATCTAAACCAACC	GTCATCAGAATCCTCCTCTG	55
(ESTs)SSRY267	GAGCTGCTTCCCAAGATAAT	TCTCCTTCAAAGCAGGTAAG	52
(ESTs)SSRY268	AAGCAACTTGTTGGAGACAG	ACATTCAGACAACGCAATG	55
(ESTs)SSRY269	AAAGAAGAAGAAAGGGAAGC	TTAAATGCTCTTCTCCAAGC	55
(ESTs)SSRY270	CAACAACAAAGCTCTTCTCC	TGATTCCTCGACTTTGCTAT	52
(ESTs)SSRY271	GTGGTCTTGTTACTGCCATT	CCGATCAAATCACTCGTT	55
(ESTs)SSRY272	CACTCCTTTTCCACAAAACA	TGTATACCGAGCCTTTGACT	55
(ESTs)SSRY273	GGCAATACAGAAGAGGACAC	CACAAAACCGAACACCATA	55
(ESTs)SSRY274	CTGAGCTTCTCCTCCTCTTT	AGTACGACAACCCACATCTC	55
(ESTs)SSRY275	GCATAGCAGAGAGAAGAAGG	CGAAGTGGATTTATGGGTAA	55
(ESTs)SSRY276	AATGAGAGTGGGGTCTTTCT	CATTTCTATGGAGGGTCAA	55
(ESTs)SSRY277	ATTGAATGGTGAGGATGTGT	GAGTTTGACATTGCAGGTCT	55
(ESTs)SSRY278	CTTTCTTTCTCTCTTTGTAGAGC	GAAATCGGGGAAGAGGAG	55
(ESTs)SSRY279	TACTCTCAAATGGGTTTTCC	GAGACCAGTGATTGTGGTTT	55
(ESTs)SSRY280	GGTGAATTTTGGGGTTAGAT	AGAAGCGGATTGTAAGATCA	55
(ESTs)SSRY281	ATGTGGTGGTGATGGTACT	AAGAACCTGTGGTTCCTTTT	55
(ESTs)SSRY282	TGCTACCTCACCAAAGTTCT	ACCTTctcAGTTTTctgACG	55
(ESTs)SSRY283	GTCGCTGCTAGATCTTGACT	ATCATCAGATCACCACCATC	55
(ESTs)SSRY284	GAGAAGTTTTGCCACCATAG	CTTTCCAAGCAAACCTGGTAG	55

## ANEXO C

**Anexo C** Preparación del gel de poliacrilamida y corrida de la electroforesis para la detección de los patrones de los SSR.

### 1. Vidrio.

- a. Usar un par de guantes nuevos.
- b. Luego de retirar el vidrio del tanque de hidróxido de sodio (10 N), remover la acrilamida con la espátula plástica (Los desechos de acrilamida deben descartarse en la basura del cuarto para que no se tapone el vertedero) y enjuagar con agua normal (NO deionizada).
- c. Lavar el vidrio con jabón líquido usando una gasa nueva, enjuagar con agua normal (NO deionizada).
- d. Dejar secar el vidrio o secarlo con toallas de papel.
- e. Limpiar el vidrio con ETOH industrial al 70% , usando un Kimwipes.
- f. Preparar la solución de adhesión<sup>1</sup> colocando 1  $\mu$ l de Bind-Silane en el fondo de un tubo eppendorf y adicionar cuidadosamente 1,5 ml de ácido acético-ETOH (5:95).
- g. Adicionar la solución de adhesión sobre el vidrio y dispersarla homogéneamente utilizando un Kimwipes describiendo líneas frontales, transversales y terminar con movimientos circulares.
- h. Dejar evaporar durante 15 minutos.

### 2. Vidrio de la Cámara o Vidrio con pestaña

- a. Usar un par de guantes nuevo.
- b. Lavar la cámara con jabón líquido y con una gasa nueva.
- c. Dejar secar el vidrio de la cámara o secarlo con toallas de papel.
- d. Luego hacer una limpieza con un kimwipes humedecido con etanol al 70%.(repetir este paso si ha habido contaminación con el vidrio).
- e. Adicionar 300  $\mu$ l de Sigmacote o Repel silane<sup>2</sup> sobre la superficie del vidrio de la cámara y dispersarlo con un Kimwipes describiendo líneas frontales, transversales y terminar con movimientos circulares.
- f. Dejar evaporar durante 5 min.

### 3. Preparación del Gel de Poliacrilamida

- a. Armar la cámara colocando dos separadores del mismo color (rojo/transparente) a lado y lado de la misma.
- b. Colocar sobre los separadores el vidrio con el bin silane. Alinear los separadores, el vidrio y la cámara en la parte inferior.
- c. Ensamblar los brazos ajustándolos cuidadosamente y colocar el servidor en la parte inferior de la cámara.
- d. Colocar la cámara armada con los electrodos hacia abajo, sobre una superficie horizontal y ajustar el nivel.
- e. Medir en una probeta 90 ml de acrilamida (4%) a 4°C.
- f. Colocar la acrilamida en un beaker de 250ml, adicionar 600ul de persulfato de amonio (10%) y 120ul de TEMED. Mezclar la solución agitando cuidadosamente.
- g. Retirar el émbolo de la jeringa, ajustar la manguera en la punta de la jeringa y dispensar la solución de acrilamida dentro en la jeringa. Colocar el émbolo cuidadosamente y retirar todas las burbujas de la solución.
- h. Conectar la manguera al servidor de la cámara y dispensar la solución cuidadosamente evitando la formación de burbujas.
- i. Cuando la acrilamida alcance la parte superior de la cámara, insertar el peine con la parte lisa hacia adentro del gel evitando la formación de burbujas para hacer el frente de corrida.
- j. Ajustar el peine a los vidrios distribuyendo tres ganchos a lo largo.
- k. Dejar polimerizar mínimo 40 minutos.

#### **4. Electroforesis**

- a. Retirar el servidor y los ganchos de la cámara. Lavar los restos de acrilamida y montar el gel sobre la base.
- b. Adicionar TBE 1X ; 400 ml a la base y 1200 ml a la cámara.
- c. Retirar el peine del gel y limpiar el exceso de urea y acrilamida del frente de corrida con una jeringa.
- d. Colocar en los extremos y en el centro del frente de corrida 3ul de buffer de carga (formamida) para facilitar la colocación del peine.
- e. Introducir el peine con el borde dentado en el gel teniendo cuidado de no deformar el frente de corrida.

- f. Pre-correr el gel durante 25 minutos. NO usar TBE 1X precalentado en el micro-ondas para evitar el deterioro de las cámaras.
- g. Detener la corrida del gel y lavar los pozos con jeringa para remover el exceso de urea (hacerlo cada vez que se requiera sembrar más muestras).
- h. Adicionar al producto de PCR 5ul/8ul(para 15/25ul del amplificado) de buffer de carga. Denaturar las muestras durante 3 minutos a 96°C. Colocarlas en hielo.
- i. Sembrar 3ul de cada muestra denaturada en el gel.
- j. Correr el gel a 100W constantes.
- k. El tiempo de corrida depende del tamaño del amplificado (ej. Dejar correr durante 30 minutos un producto de 100pb y 75 minutos un producto de 300pb).

### **Reactivos usados en la preparación de geles de poliacrilamida.**

#### **Reactivos:**

6% acrilamida:bis (19:1)  
 0.5% Acido acético en 95% etanol  
 10% Persulfato de Amonio  
 TEMED  
 Bind-silane  
 Sigmacote  
 Búfer carga

### **3- TINCION CON NITRATO DE PLATA**

Las cantidades están descritas para un volumen de 3.5 litros

#### **Revelador**

Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ )	105 g
Formaldehído	4.5 ml
Tiosulfato de sodio (10 mg/ ml)	650 ul
H <sub>2</sub> O bidestilada	3500 ml

#### **Tinción**

Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ )	3.5 g
Formaldehído 37% ( $\text{H}_2\text{CO}$ )	4.5 ml
H <sub>2</sub> O bidestilada	3500 ml

#### **Fijador/parada (Ácido acético 10%)**

Ácido acético glacial	350 ml
H <sub>2</sub> O bidestilada	3150 ml

#### **Buffer de carga**

NaOH	10 mM
Formamida	95%

Azul de bromofenol	0.05%
Xylene Cyanol	0.05%

Para preparar 100 ml

**Buffer TBE 10x**

Tris base	107.8 g
EDTA, Sal dihidratada	7.44 g
Ácido bórico	55 g

Completar el volumen a 1 litro con agua demonizada.