



ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA DE LA YUCA PARA CONTENIDO DE CIANURO

**María Alejandra Ospina,
Anestis Gkanogiannis, Thierry Tran,
Luis Londoño, Xioafei Zhang,
Luis Augusto Becerra Lopez-Lavalle**

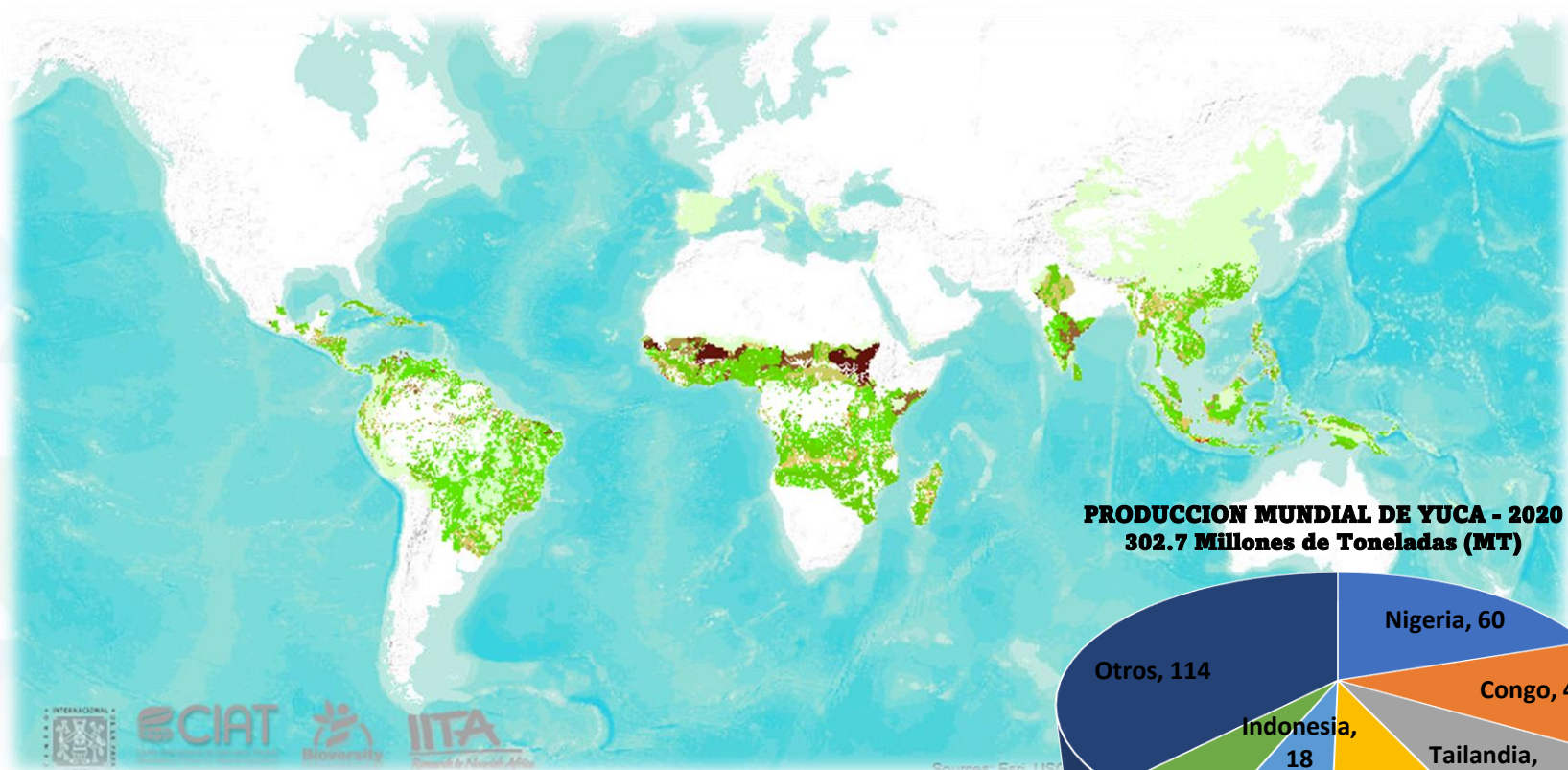
Octubre de 2022, Mérida - México

Alliance

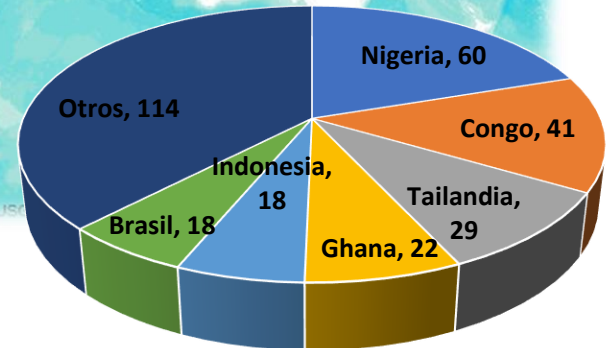


Introducción

La yuca (*Manihot esculenta Crantz*) es una especie de raíz amilácea que se cultiva en los trópicos, considerada de gran importancia por ser fuente de energía en la dieta alimentaria.



PRODUCCION MUNDIAL DE YUCA - 2020
302.7 Millones de Toneladas (MT)



Mapa de localización de los principales cultivos de yuca (RTB, 2020)

Comercialización de la Yuca

La yuca se usa comúnmente para consumo humano y animal



1. Consumo en fresco

Mercado locales
Supermercados



Curso de fortalecimiento en el uso y promoción de cultivos biofortificados para El Salvador, Guatemala y Honduras

2. Procesos tradicionales de yuca

Secado
Fermentación

Casabe
Gari
Farinha
Fufu
Ensilados alimentación Animal



3. Producción de Almidón y Harina





❖ Alimentación humana

El consumo de hojas de yuca se da principalmente en los países de África central y occidental donde se cultivan durante todo el año

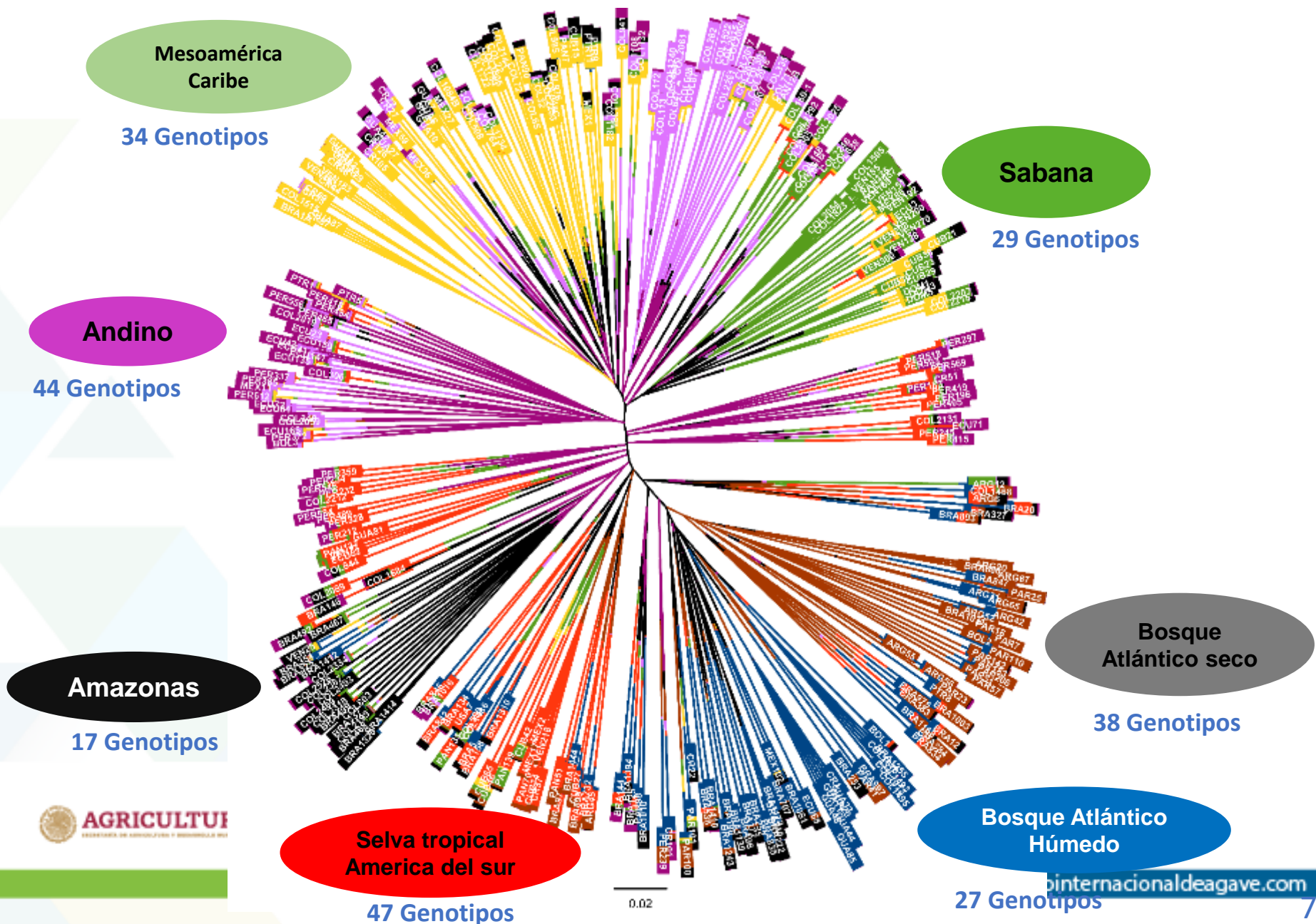
Las hojas de yuca se consumen como vegetales en al menos el 60% de los países del África subsahariana y algunos países asiáticos como Indonesia, Filipinas y Malasia

❖ Alimentación Animal


Las hojas se han utilizado para la alimentación de ganado, cabras, ovejas, aves de corral y peces en países como Vietnam, Brasil, Perú, Indonesia, Tailandia y Nigeria.

Las hojas de yuca han sido utilizada como una alternativa cuando no hay producción de otros forrajes, cereales o leguminosas por caso de sequía u otros eventos climáticos que limitarán la producción.


Zonas de domesticación o diversidad del género *Manihot*. Árbol filogenético (Becerra Lopez-Lavalle *et al.*, 2015).

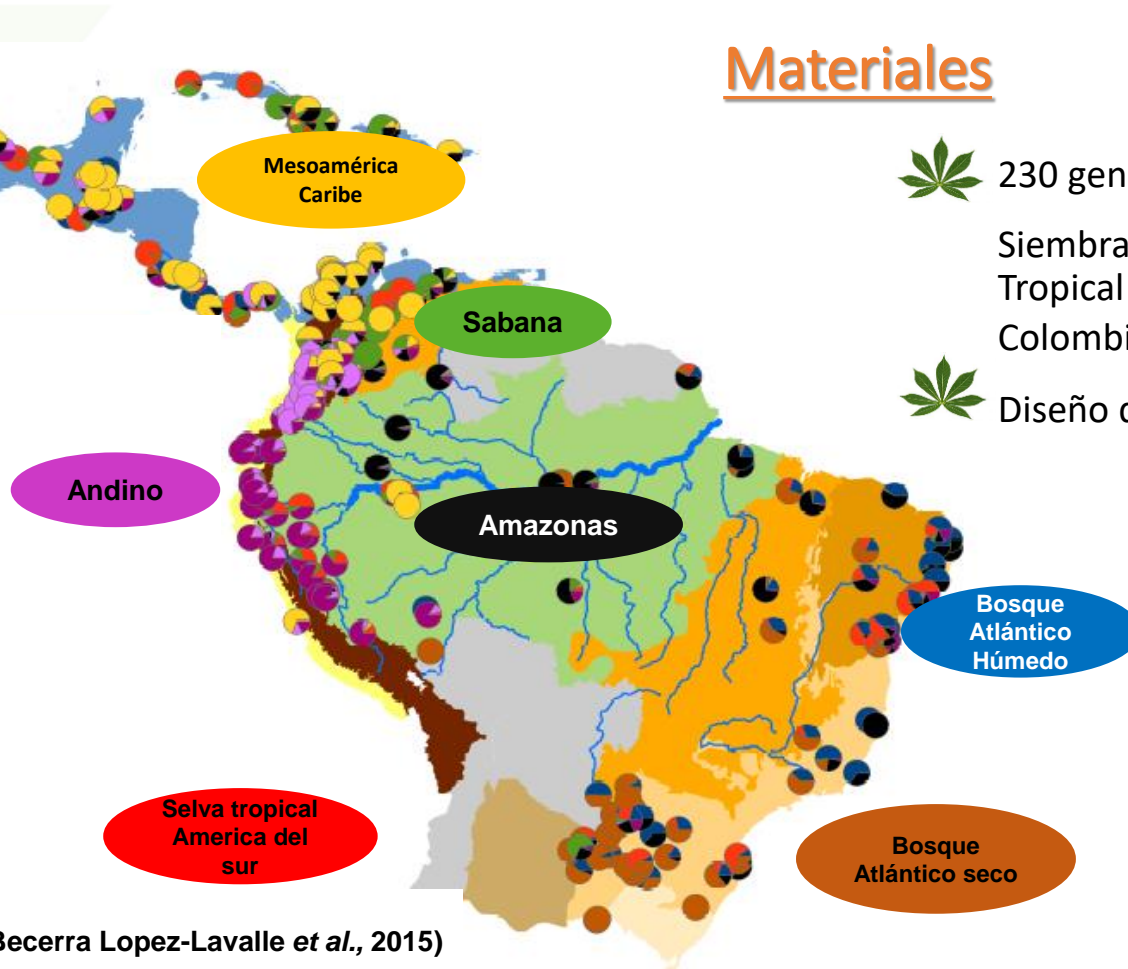
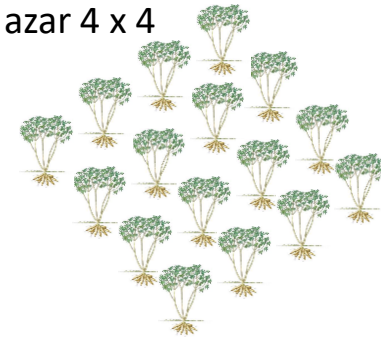


Materiales

 230 genotipos de yuca

Siembra: Centro Internacional de Agricultura Tropical localizado a 1100 m.s.n.m en Palmira, Colombia (03° 25'N; 76° 35'W)

 Diseño de bloque completo al azar 4 x 4

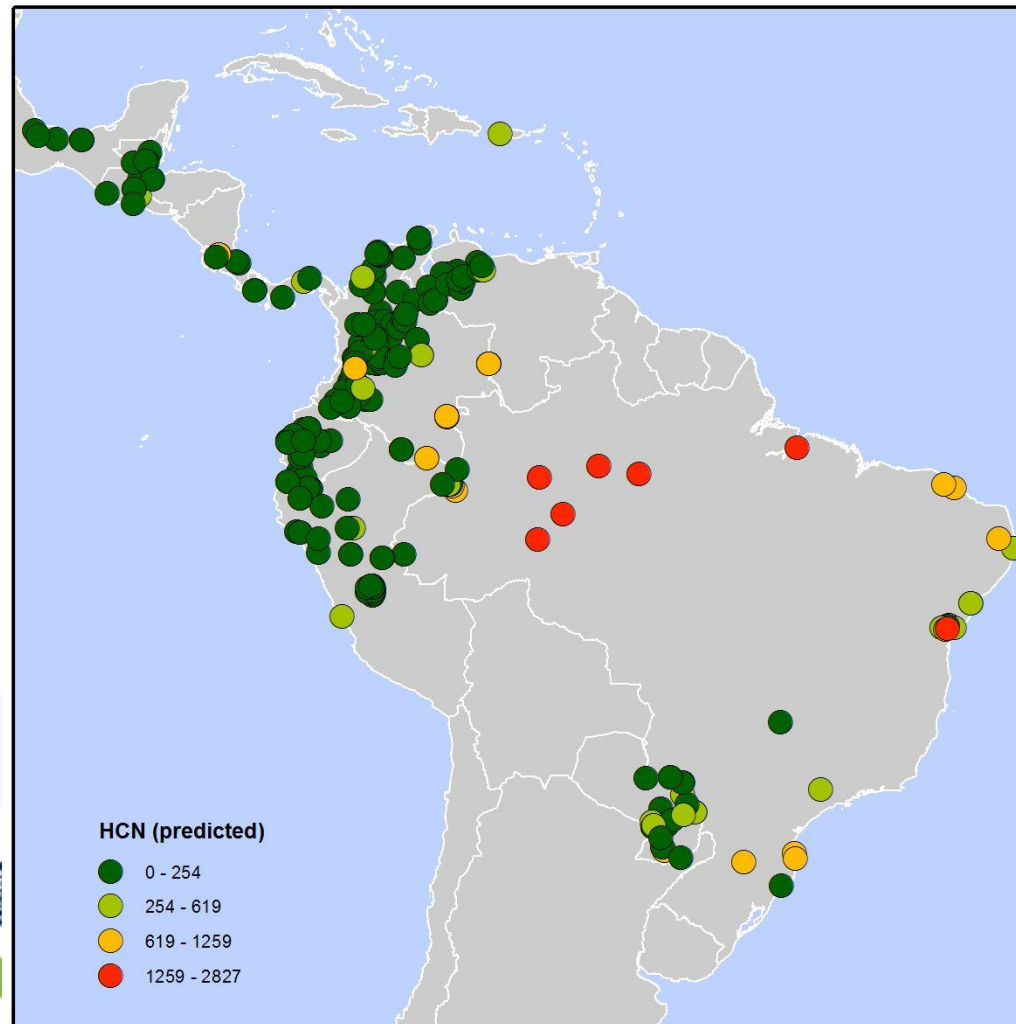


(Becerra Lopez-Lavalle et al., 2015)

1. FENOTIPADO : Contenido de HCN

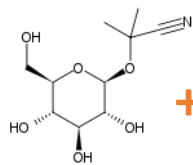
Colección de diversidad genética de yuca

230 genotipos evaluados

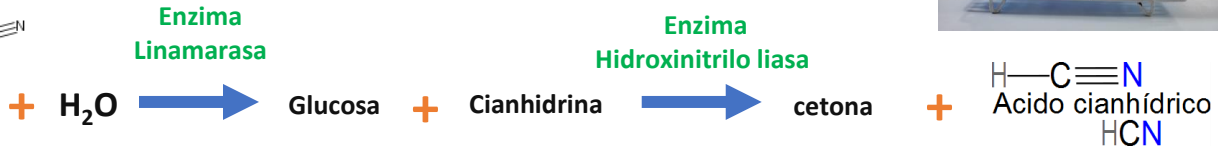


Contenido de cianuro

Metodología de Essers *et al.*, 1993



Linamarina



Contenido HCN permitido en raíces y hojas



< 180 ppm HCN en base seca

< 50 ppm HCN en base húmeda

Codex alimentario, 2009
OMS, 2007

Metodología del cianuro

Essers *et al.*, 1993

40 g Raíces de yuca
4 g Hojas de yuca

40 ml Solución
extractora

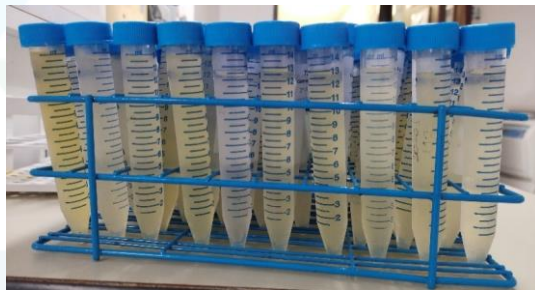
Agua
ácido ortofosfórico 85 %
Etanol al 96 %



Preparación del Extracto



Centrifugado 10 min a 3000 rpm a 25 °C
Filtrado del sobrenadante



Dilución

0,5 ml de la muestra
7 mL de la solución extractora



Hidrolisis Enzimática

0.1 mL de la muestra diluida
0.4 mL de sln fosfato 0.1 M pH 7
0.1 mL de linamarasa diluida
Incubacion 30°C /15 min



Neutralización

0.6 mL NaOH 0.2 M
2.8 mL sln fosfato 0.1 M pH
6.0.



Reacción Colorimétrica

0.1 mL de cloramina T
0.6 mL del reactivo color
Isonicotinato/ 1,3-dimetil
barbiturato

Ecuación

$$HCN \text{ (ppm)} = \frac{m_{HCN} \times (Fd_1) \times V_{sln \text{ ext}}}{m_{m. ps} \text{ (g)} \times 0.1}$$

Dónde:

m_{HCN} : μg HCN obtenidos de la curva.

Fd_1 : Factor de dilución 1 (volumen muestra diluida/volumen del extracto).

$V_{sln \text{ ext}}$: Volumen sln extractora

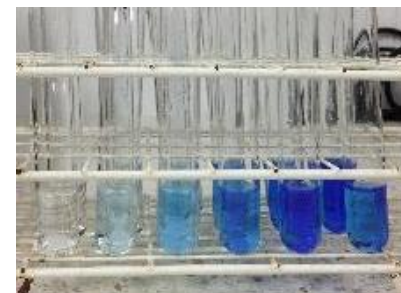
$m_{m. ps}$: Masa de la muestra

0.1= Volumen de muestra usado en la reacción



Espectrofotómetro

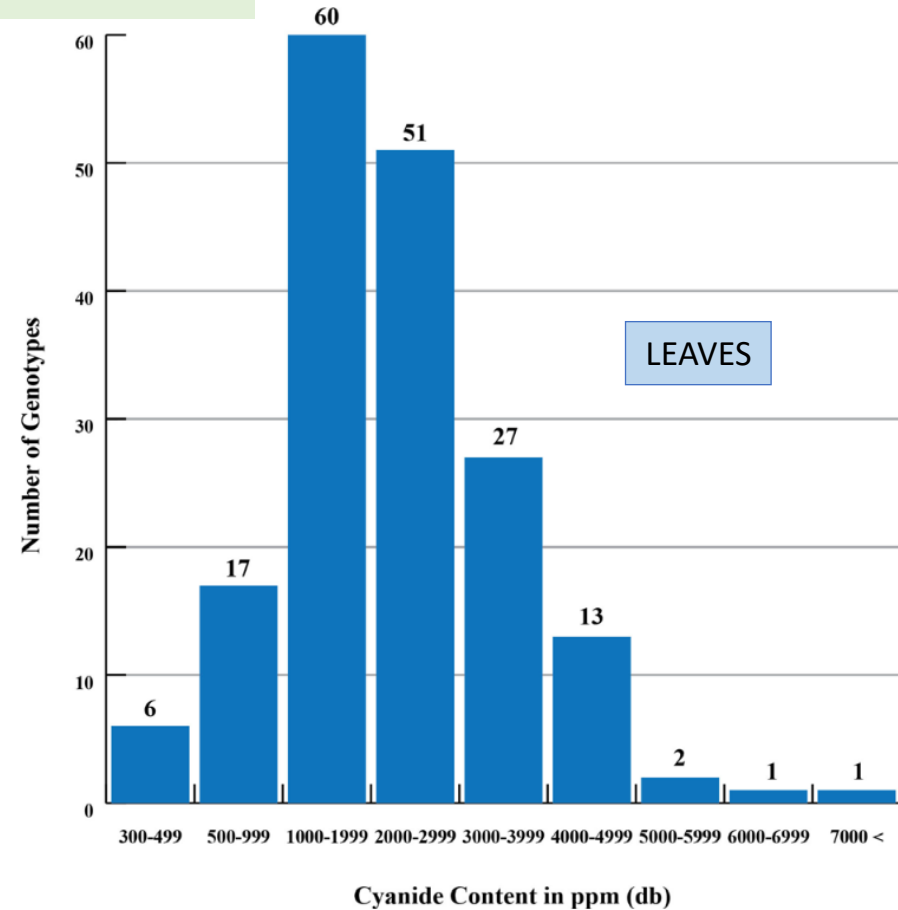
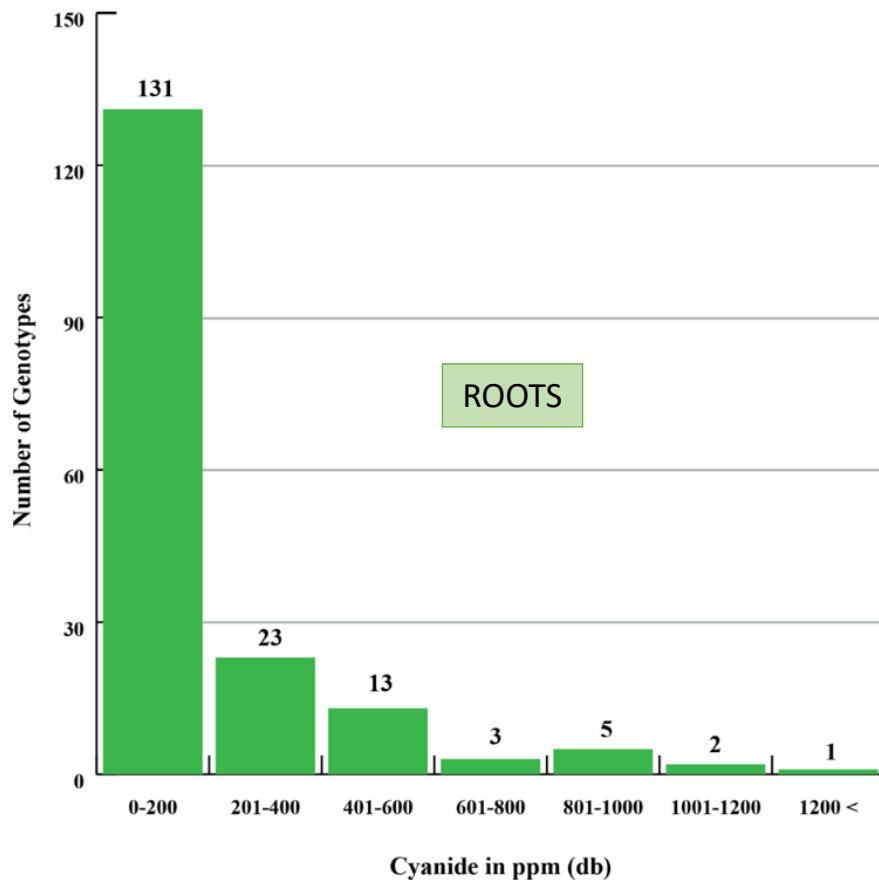
Absorbancias a 605 nm



Curva Standard

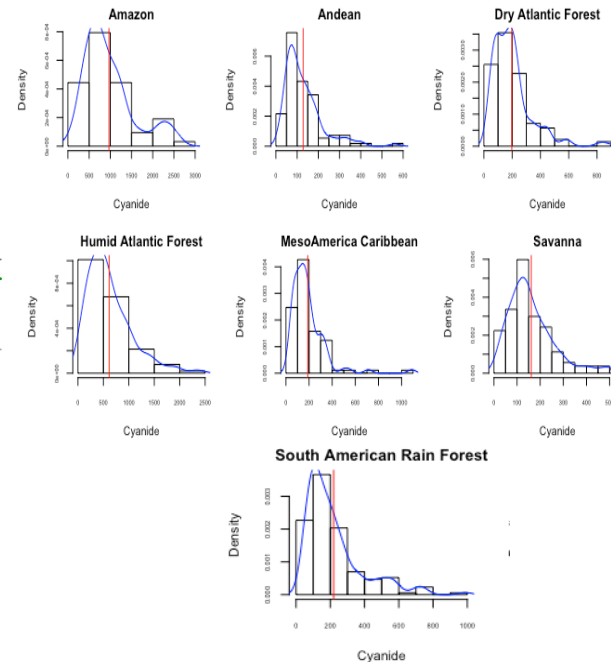
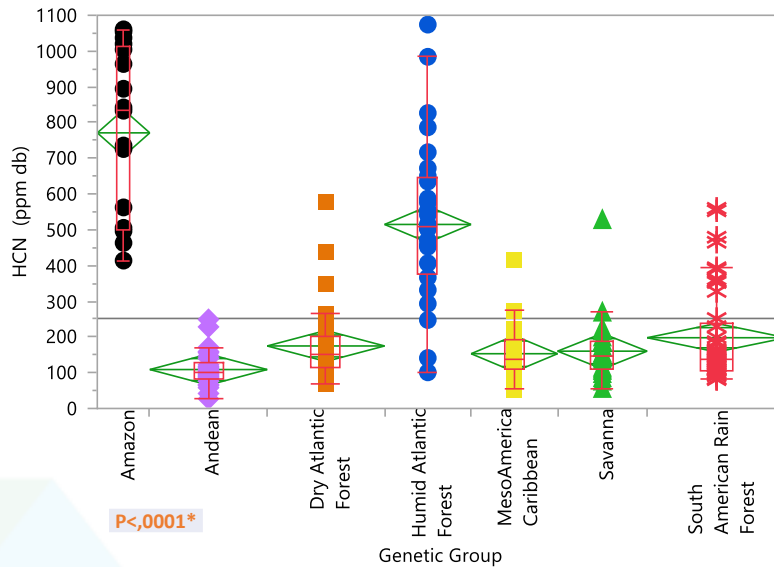
Solución estándar de $1\mu\text{g KCN/mL}$
en solución buffer fosfato pH 6.0

Distribution of HCN content in cassava roots and leaves



Cyanide content in Roots

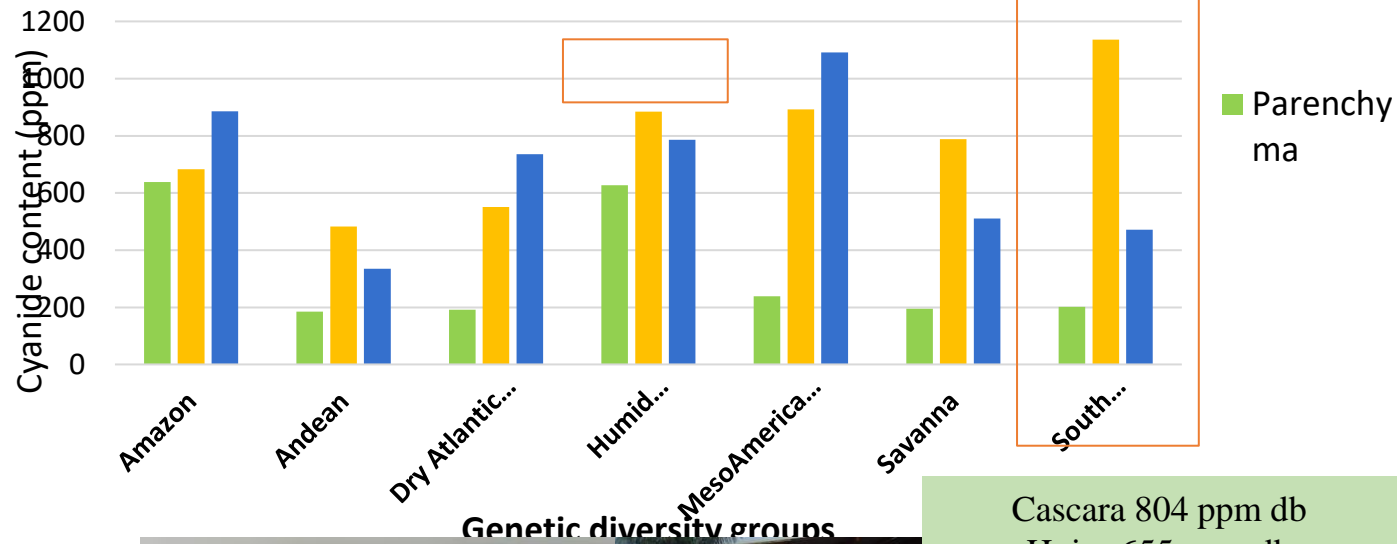
Low cyanide target < 200 ppm



Genetic Group	HCN (ppm) Average
Amazon	A 771
Humid Atlantic Forest	B 515
South American Rain Forest	C 198
Dry Atlantic Forest	C 175
Savanna	C 160
MesoAmerica Caribbean	C 153
Andean	C 109

The results of characterization of genetic diversity may reflect different selection criteria for different uses over centuries of cassava domestication

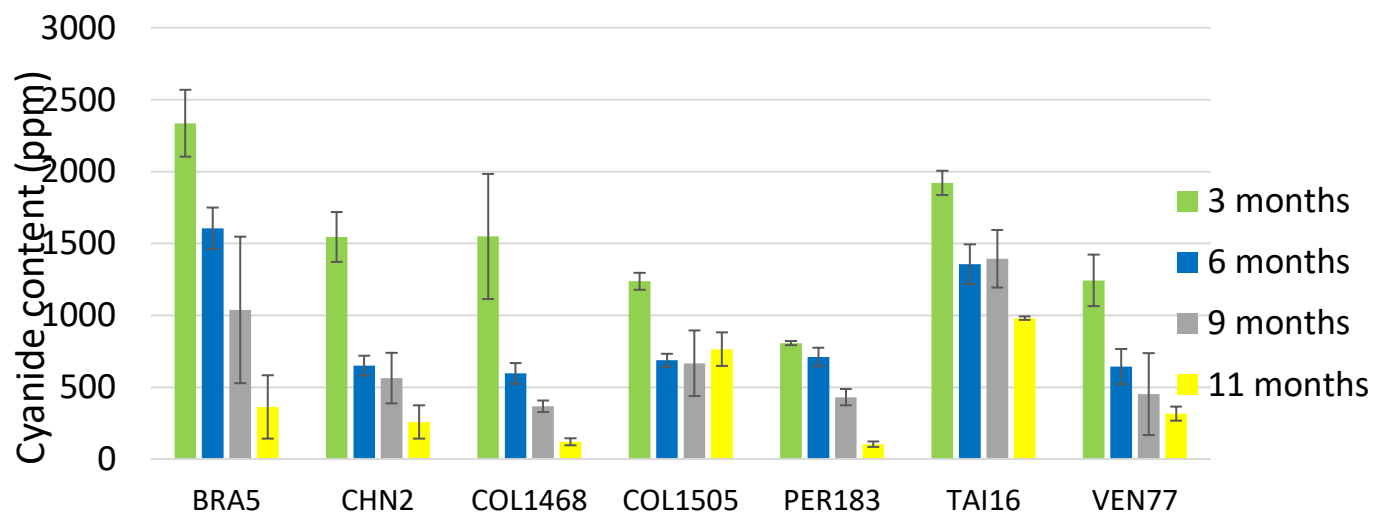
Contenido de Cianuro en diferentes partes de la planta

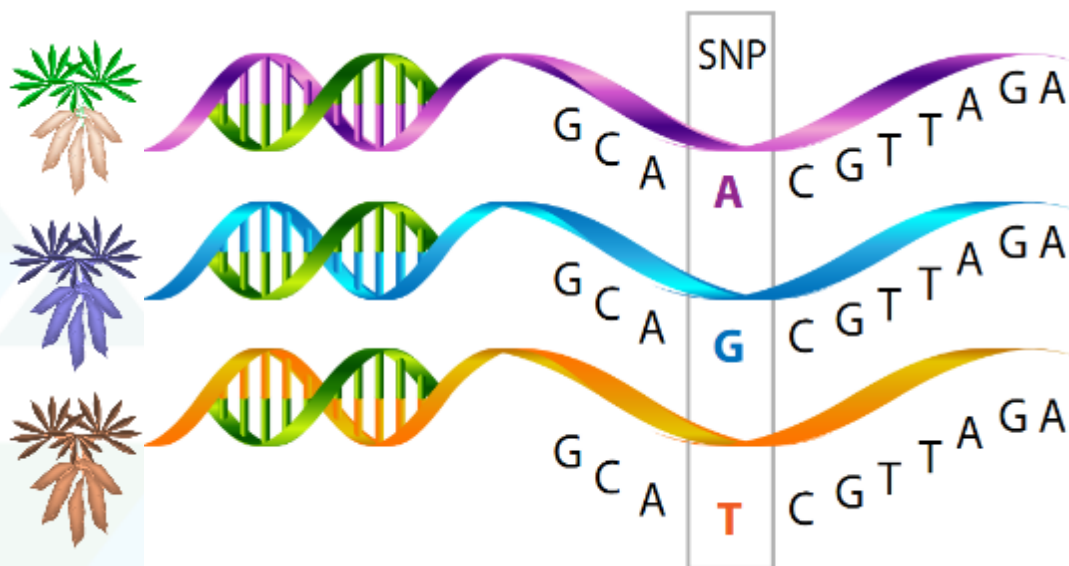


Cascara 804 ppm db
Hojas 655 ppm db
Parenquima 305 ppm db

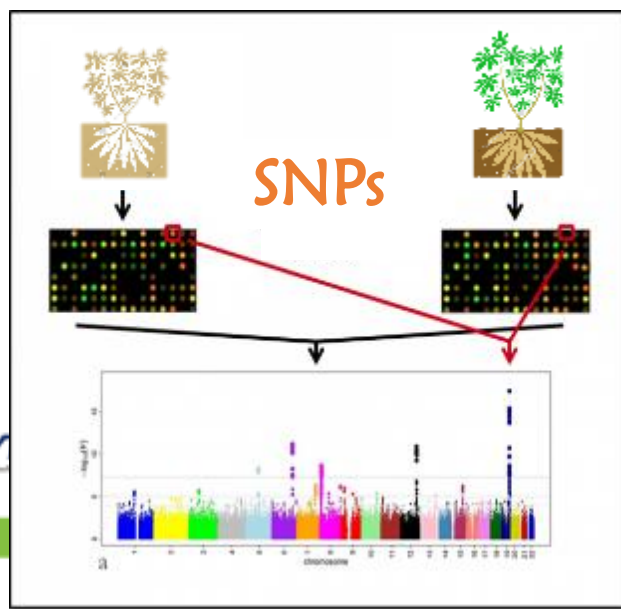


Contenido de cianuro a diferentes edades Fisiológicas





Los SNPs corresponden a una variación en una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) en una secuencia del genoma



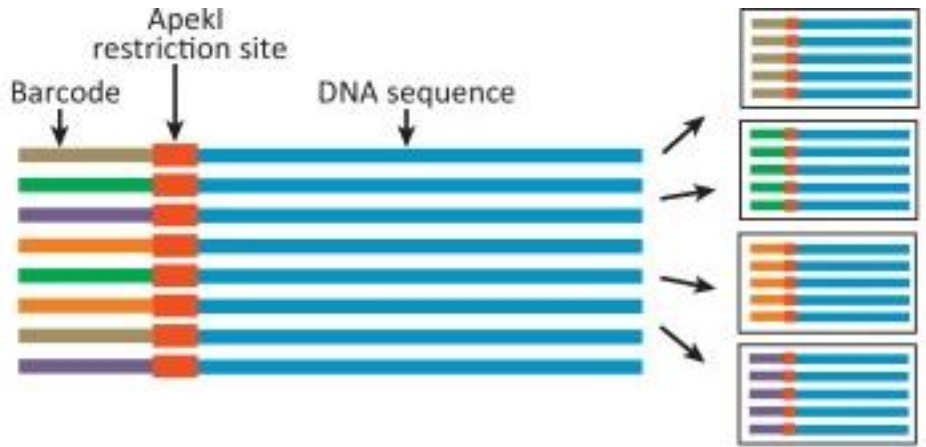
2. GENOTIPADO - IDENTIFICACIÓN DE SNPs

Extracción de ADN

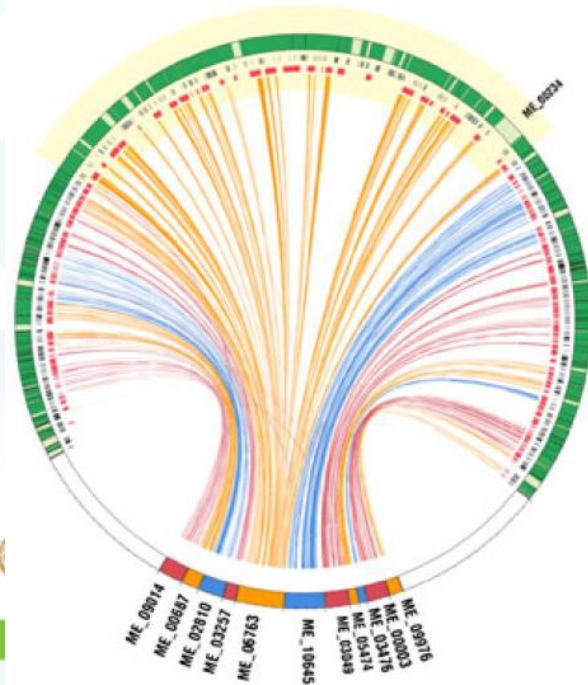
Secuenciación (GBS – RAD-Seq)

Beijin Genomic Institute (BGI)

Software TASSEL-GBS – 69.132 SNPs



Genoma de yuca: AM560-2



SNPs

- 1 TCGACTACTCTA . .
- 2 TCGACTGCTCTA . .
- 3 TCGACTACTCTA . .
- 4 TCGACTGCTCTA . .
- 5 TCGACTACTCTA . .
- 6 TCGACTACTCTA . .

A/G

69.132 SNPs

3. MODELO DE ASOCIACIÓN DE SNPs Y FENOTIPOS – GWAS

Software TASSEL

Modelo MLM (Modelo lineal mixto)



Buckler Lab para la genética y la diversidad del maíz.

Casa Bioinformática Publicaciones Gente Investigación Contáctenos

T TASSEL 5.0

TASSEL Version 5.0 *(Getting Started!)*
(Build: February 22, 2018 Requires: Java 1.8)

[Tassel 5 Mac OS](#)
[Tassel 5 Windows 64 Bit](#)
[Tassel 5 Windows 32 Bit](#)
[Tassel 5 UNIX](#)

TASSEL Version 5.0 Standalone
(GBS Pipeline V2 - Preferred Version)

[Using Git - Recommended!](#)
[Download \("Tags" are Versions\)](#)

Alignment Viewer

3. ASOCIACIÓN DE SNPs Y FENOTIPO – GWAS

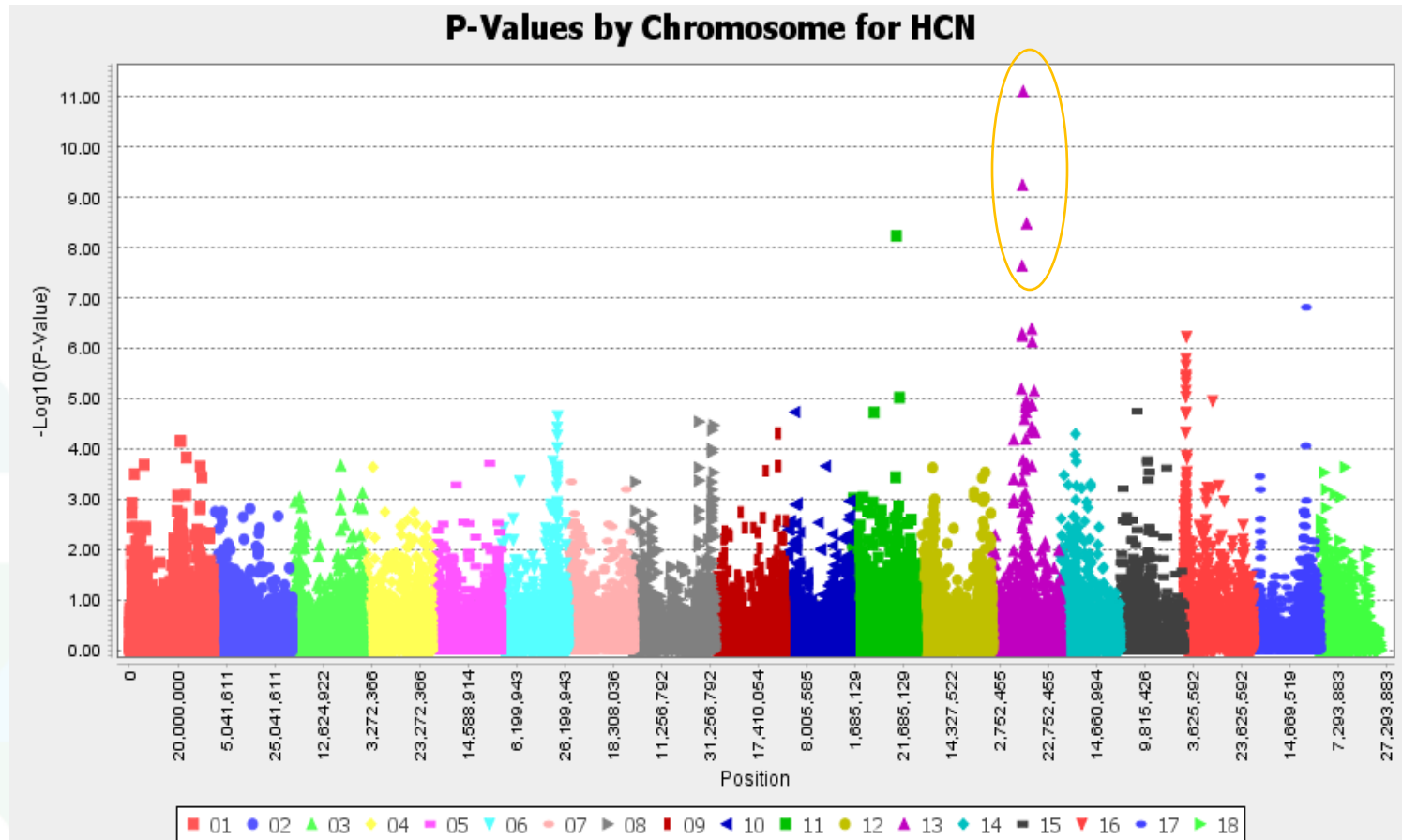


Gráfico de Manhattan para el diagnóstico genómico de las señales de asociación que se basan en predicciones lineales no sesgadas para el contenido total de HCN.

3. MODELO DE ASOCIACIÓN DE SNPs Y FENOTIPOS – GWAS

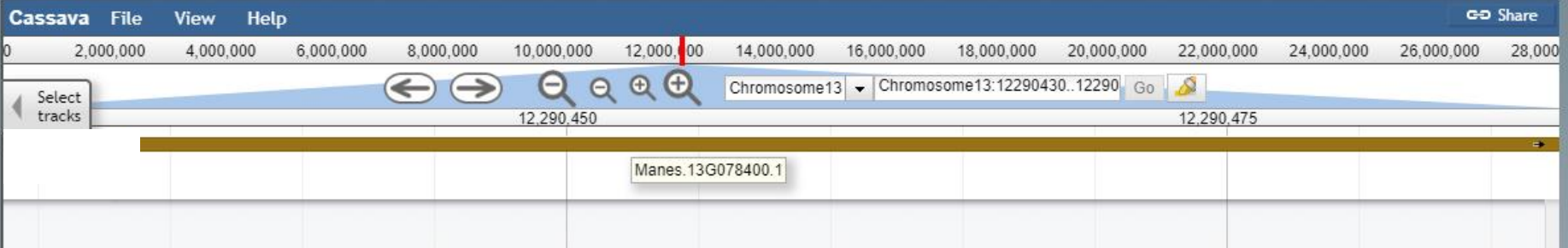
Cassava Genome Hub

genomics, transcriptomics, proteomics,
metabolomics, genetics
and breeding resources for cassava

Login

Home Organism Details **JBrowse** Tools SNPs Gene Expression Genetic Maps Metabolomics Pathogens And Pests Other Resources
Contact

JBrowse public



Cassava File View Help Share

0 2,000,000 4,000,000 6,000,000 8,000,000 10,000,000 12,000,000 14,000,000 16,000,000 18,000,000 20,000,000 22,000,000 24,000,000 26,000,000 28,000,000

Select tracks

Chromosome13 Chromosome13:12290430..12290475 Go

12,290,450 12,290,475

Manes.13G078400.1

[Cassava genome Hub](https://www.cassavagenome.org/), una plataforma en línea que produce y almacena más de 15 terabytes de datos genéticos de la yuca

4. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES

Lista de SNPs con significado de asociación al genoma de yuca para el contenido de HCN

SNP	Ch ^a	Posicion ^b	P (valor)	Gen	Anotación del gen ^d	Longitud	Locación
S13_12562917	13	12562917	7.86E-12	Manes.13G079400	uncharacterized protein At5g08430	15071 bp	[12,568,887 -> 12,585,057] (44.7 centisomes)
S13_12290459	13	12290459	5.66E-10	Manes.13G078400	Eukaryotic aspartyl protease family protein	1404 bp / 467 aa	[12,290,137 -> 12,291,540] (43.71 centisomes)
S13_13997583	13	13997583	3.27E-09	Manes.13G084300	actin-7 [Manihot esculenta (cassava)]	1392 bp / 463 aa	[13,968,804 -> 13,970,195] (49.68 centisomes)
S11_18989037	11	18989037	5.77E-09	Manes.11G104200	uncharacterized LOC110625851	502 bp	[18,990,096 -> 18,990,597] (69.39 centisomes)
S13_12118062	13	12118062	2.27E-08	Manes.11G104100	wall-associated receptor kinase 2-like [Manihot esculenta (cassava)]	3951 bp / 1316 aa	[18,985,862 -> 18,989,812] (69.37 centisomes)

^a Cromosoma

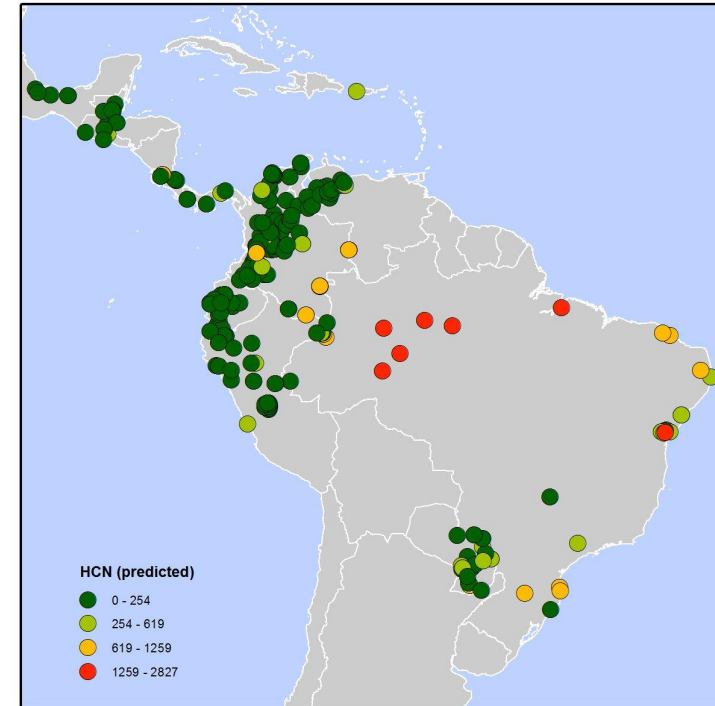
^b Ubicación del SNP en el cromosoma en la secuencia del genoma de la yuca

^c Proporción de la variación del rasgo genético explicada por los SNP

^d Anotación del gen usando búsqueda en BLAST en Cassava genome HUB

Conclusiones

- ✓ El uso de hojas de yuca en la alimentación puede contribuir a reducir la desnutrición humana y es una oportunidad para fuentes alternativas de alimentación animal de alta calidad.
- ✓ Los genotipos CUB29 y VEN309 del grupo Savana son genotipos prometedores para el mejoramiento de bajo potencial cianogénico en hojas
- ✓ El GWAS identificó 69.132 SNPs con respecto al genoma de referencia AM560-2 y relacionó las características genotípicas con las fenotípicas de 236 genotipos de yuca. Se obtuvo que cuatro SNPs están fuertemente asociados al contenido de HCN en la yuca, ubicado en las cercanías de 4 genes en los cromosomas 11 y 13



Referencias Bibliograficas

- ✓ Hillocks, R.J.; Tresh, J.M.; Bellotti, A.C. Production and Utilization. Cassava: Biology. CABI Publishing Oxon, UK and New York, USA. 2002. 1–16.
- ✓ FAOSTAT. (2021). Statistics of Organization of the United Nations for Agriculture. Production of cassava. On-line: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. (accessed 16 May 2021).
- ✓ Ospina, M.A.; Pizarro, M.; Tran, T.; Ricci, J.; Belalcazar, J.; Luna, J.L.; Londoño, L.F.; Salazar, S.; Ceballos, H.; Dufour, D.; Becerra Lopez-Lavalle, L.A. Cyanogenic, carotenoids and protein composition in leaves and roots across seven diverse population found in the world cassava germplasm collection at CIAT, Colombia. *International Journal of Food Science & Technology*. 2021. 56(3), 1343-1353.
- ✓ Achidi, A.U.; Ajayi, O.A.; Bokanga, M.; Maziya-Dixon, B. The use of cassava leaves as food from Africa. *Ecology of Food and Nutrition*. 2005. 44, 423-435.
- ✓ Bradbury, J. H.; Denton, I. C. Mild methods of processing cassava leaves to remove cyanogens and conserve key nutrients. *Food Chemistry*. 2011. 127(4), 1755–1759.
- ✓ Ngudi, D.; Kuo, Y.H.; Lambein, F. Cassava cyanogens and free amino acids in raw and cooked leaves. *Food and Chemical Toxicology*. 2003. 41, 1193–1197.
- ✓ Latif, S.; Müller, J. Potential of cassava leaves in human nutrition: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2015. 44 (2), 147–158.
- ✓ Becerra Lopez-Lavalle, L.A.; Perea, C.S.; Duitama, J.; Ruiz, M.; Parsa, S.; Ovalle, T.; Alzate, A.; Hershey C.; Dufour, D.; Aranzales, E.; Debouck, D.; Tohme, J. Cassava Digital Gene Bank. International Center of Tropical Agriculture (CIAT), Cassava program; Cali, Colombia. 2015. <https://ciat.cgiar.org/geneticresourcespublications/?type=program&titlepublication=Program%20files>. (accessed 17 May 2021).
- ✓ Essers, S.A.; Bosveld, M.; Van Der Grift, R. M.; Voragen, A. G. Studies on the quantification of specific cyanogens in cassava products and introduction of a new chromogen. *J. Sci. Food Agric*. 1993. 63, 287-296.
- ✓ Nambisan, B.; Sundaresan, S. Distribution of Linamarin and its Metabolising Enzymes in Cassava Tissues. *J Sci Food Agric*. 1994. 66, 503-507.
- ✓ FAO/WHO (2005). Codex Standard for Sweet Cassava. In: Codex Standard 238-2003 (edited by ORGANISATION, F. A. A., UNITED, W. H. O. O. T. & NATIONS, U.). Pp. 1-4. Rome. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B238-2003%252FCXS_238e.pdf. (Accessed on 3 May 2021).



GRACIAS!

E-mail: m.a.ospina@cgiar.org
Maria Alejandra Ospina