

Diversidad genética y contenido de carotenos totales en accesiones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

Genetic diversity and total carotene content in accessions of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

Ana Cruz Morillo C.^{1*}, Yacenia Morillo C.¹, Martín Fregene², Hernando Ramírez¹, Alba Lucía Chávez², Teresa Sánchez², Nelson Morante², y Hernán Ceballos L.²

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. A.A 237. Palmira, Valle del Cauca, Colombia.

²Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Colombia.

*Autor para correspondencia: anacruzmorillo@yahoo.es

Rec.: 31.05.11 Acep.: 02.09.11

Resumen

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un arbusto perenne cultivado en África, América Latina y el Sureste asiático, cuya raíz constituye una fuente importante de energía en la dieta humana en países tropicales. Los carotenoides son pigmentos naturales que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se reconoce que aproximadamente cincuenta de ellos tienen actividad provitamina A, siendo β -caroteno el de mayor eficiencia para su conversión en vitamina A. El estudio de la variabilidad genética es un procedimiento útil para fortificar, enriquecer o incrementar el contenido de nutrientes de los alimentos o cultivos, entre ellos los carotenos en raíz de yuca mediante procesos de selección y recombinación en programas de mejoramiento que permitan identificar genotipos superiores. En el presente estudio, a partir de la evaluación de la diversidad genética, se generó un dendrograma de accesiones de yuca en el cual se formaron seis grupos con 68% de similitud. La heterocigosidad promedio observada fue de $Ht = 0.559$. Los análisis de regresión y correlación entre el contenido de carotenos totales y los datos moleculares mostraron que los marcadores que se encuentran correlacionados con altos contenidos de carotenos pertenecen al grupo de ligamiento *D* del mapa molecular de yuca.

Palabras clave: Calidad proteica, carotenoides, *Manihot esculenta*, microsatélites, valor nutritivo, variación genética, yuca.

Abstract

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a perennial shrub cultivated in Africa, Latin America and Southeast Asia. It is an important dietary source for humans in tropical countries. Carotenoids are natural pigments that are widely distributed in the nature, where about 50 of them have provitamin A activity, β -carotene has been the most efficient. Among the procedures to fortify (enrich or increase the nutritional content of foods or crops) cassava varieties, the study of genetic variability of the content of carotenoids in the root is one of the most common to carried out processes of selection and recombination in the breeding program which will allow the identification of superior genotypes. In this study, the evaluation of genetic diversity produced a dendrogram with six groups of 68% similarity. The average observed heterozygosity was $Ht = 0.559$. Regression and correlation analysis between content of total carotenoids and microsatellites markers showed that they were highly correlated with high levels of carotenoids and were found in linkage of the group D of the molecular and genetic cassava map.

Key words: Carotenoids, cassava, genetic variation, *Manihot esculenta*, microsatellite, nutritional value, quality protein.

Introducción

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un cultivo que se desarrolla bien, aun en condiciones marginales, donde pocos cultivos pueden sobrevivir. La mayoría de las variedades de yuca son tolerantes a la sequía, pueden producir en condiciones de suelos degradados y son resistentes a las plagas y enfermedades más importantes. El cultivo es naturalmente tolerante a suelos ácidos y su época para cosecha es flexible cuando los agricultores lo requieran; por tanto, ofrece grandes posibilidades por su alto rendimiento y capacidad de adaptación (Ceballos y De la Cruz, 2002).

La vitamina A se presenta principalmente como vitamina A propiamente dicha, que se halla en productos lácteos y otras fuentes de origen animal, y en forma de provitamina A (β -caroteno) que se convierte en vitamina A en el organismo y se encuentra en alimentos de origen vegetal. Un incremento de esta última forma en la yuca aseguraría una mejor salud visual y en general mejor calidad de vida para las personas que viven en las regiones más pobres del mundo, donde es ampliamente cultivada y consumida.

La deficiencia de vitamina A es un problema importante de salud pública en países en vía de desarrollo, ya que cada año su deficiencia causa ceguera en más de 100,000 niños y mujeres embarazadas (FAO, 2006). Las principales fuentes de esta vitamina aparecen en alimentos que no hacen parte de la dieta o están más allá del alcance económico de los más pobres, por tanto, estas personas tienen alta dependencia de los carotenoides presentes en los alimentos vegetales que pueden ser convertidos a vitamina A (carotenoides provitamina A). Los carotenoides están relacionados con la intensificación de la función inmunológica en el tratamiento y prevención de enfermedades y en la reducción de la morbilidad y mortalidad (Adewusi y Bradbury, 1993).

Grupos de investigación como Harvest Plus (1998) trabajan en el mejoramiento del contenido de vitamina A en los alimentos que hacen parte de la dieta básica humana, mediante el mejoramiento convencional y la identificación de genotipos deseables para

uso en procesos de selección y recombinación. Igualmente, con el uso de herramientas biotecnológicas se han insertado genes que codifican enzimas de la ruta de biosíntesis para obtener variedades con mayores niveles de carotenos, incluido, el β -caroteno, en especies como arroz, canola, papa y tomate (Sandmann, 2001; Decreux *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2000).

El conocimiento de la variabilidad genética asociada con el contenido de carotenos es requisito esencial para los programas que buscan mejorar la calidad nutritiva de las raíces de yuca, además es el punto de partida para las investigaciones tendientes a conocer el funcionamiento de los mecanismos de síntesis, transporte y acumulación de estos pigmentos en la ruta de biosíntesis de carotenoides. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la variabilidad genética en 67 accesiones existentes en el Banco de Germoplasma de Yuca en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y evaluar marcadores microsatélites asociados a QTL's reportados en trabajos anteriores y que han permitido encontrar regiones del genoma de yuca asociadas con altos contenidos de β -caroteno (Marín, 2008; Morillo, 2009).

Materiales y métodos

La investigación se realizó con la coordinación del Proyecto de Mejoramiento y Genética de Yuca, en los laboratorios de Bioquímica y Marcadores Moleculares de la Unidad de Biotecnología del CIAT, Palmira (Colombia). Para caracterizar la variabilidad genética se utilizaron 67 materiales de yuca disponibles en campo en el CIAT, provenientes de distintas fuentes, entre ellas, autopolinizaciones, cruzamientos dirigidos o mezcla de semillas, y de regiones geográficas de Brasil (MBRA), Perú, (MPER), Cuba, Argentina (MARG) y Colombia (MCO) (M = *Manihot*).

La extracción de ADN genómico se realizó mediante el protocolo descrito por Dellaporta *et al.* (1983), modificado para miniextracción en el Laboratorio de Genética de Yuca del CIAT. Para la cuantificación se utilizó un fluorómetro de ADN modelo DYNA Quant 200 Hoefer, empleando como estándar de calibración ADN Lambda a 100 ng/ μ l.

Se seleccionaron 140 marcadores microsatélites que presentaron patrones electroforéticos consistentes y apropiados para los análisis moleculares, los cuales han sido usados en estudios de mapeo y de variabilidad genética en yuca (Marín, 2008; Kizito *et al.*, 2007; Chavarriaga-Aguirre *et al.*, 1998). Estos marcadores fueron desarrollados en estudios previos por Mba *et al.* (2001).

Las temperaturas de hibridación para los microsatélites se mantuvieron entre 45 °C y 55 °C. La amplificación se realizó en un termociclador MJ research PTC-100™ Programmable Thermal Controller Hot Bonnet (MJ Research, Inc – EE.UU.). El cóctel para desarrollar las reacciones de amplificación contenía Buffer Tampón Taq 1X, MgCl₂, 2mM, dNTPs 200 uM, Primer F 0.2 uM, Primer R 0.2 uM, Taq Polimerasa 1 unidad, ADN 10 ng/μl, Agua HPLC (15 μl), para un volumen final de la reacción de 25 μl. Se utilizaron las condiciones térmicas descritas por Mba *et al.* (2001), con las modificaciones siguientes: desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por un min, 45-55°C por un min, 72°C por 2 min y una extensión final de 72 °C por 5 min.

La detección y visualización de los productos amplificados se hizo mediante electroforesis de tipo vertical en geles de poliacrilamida al 4% con un espesor de 0.4 mm (McCouch *et al.*, 1997), preparados en un equipo de secuenciación Sequi-Gen GT de Bio-Rad y corridos a 100 W/cm³ durante 90 min. Para la visualización se utilizó tinción con sales de plata, como se describe en el protocolo estándar.

Análisis de resultados

Para el análisis de la variabilidad genética se construyó una matriz de presencias (1) o ausencias (0) para evaluar cada uno de los alelos encontrados, en la cual las accesiones forman las filas y las columnas las bandas evaluadas en cada uno de ellos.

Para estudiar el grado de similitud entre los individuos se empleó el índice de similitud de Nei y Li (1979) (Leung *et al.*, 1993), también conocido como similitud de DICE (Sneath y Sokal, 1973) o de Sorensen (1948), con la fórmula:

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

donde, S_{ij} = Similitud entre el individuo i y el j , a = Número de bandas presentes simultáneamente en los individuos i, 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 es útil en términos de similitud del ADN, donde la ausencia compartida de una banda no es, necesariamente, una indicación de similitud entre dos individuos.

Método de clasificación

La matriz de similitud se construyó con el programa SIMQUAL del software Numerical Taxonomy System for Personal Computer (NTSYS- pc versión 1.8) (Sneath y Sokal, 1973). El método utilizado fue el de distancia (o similitud) UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) el cual produce una menor distorsión al ser comparada con la matriz original de similitud. A partir de esta matriz se construyó un dendrograma con el Programa TREE de NTSYS- pc (NTSYS- pc versión 2.02). Finalmente, se realizó un bootstrap de 100,000 repeticiones para verificar la validez de los resultados obtenidos (Felsenstein, 1985; Efron, 1979).

Análisis de varianza molecular (Amova)

Este análisis fue utilizado para probar si existían diferencias entre los distintos sitios geográficos donde fueron recolectados los materiales, además, para determinar cuál de ellos aporta mayores diferencias. Las accesiones fueron distribuidas en grupos con base en el análisis del dendrograma y un nivel de similitud del 68%. Para efectuar el Amova se asumió que cada grupo formado era una población separada. Se utilizó el programa Amova-Prep (Miller, 1998) 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 utilizados en el Amova (Excoffier, 1992).

Diversidad genética

Para estimar los parámetros de heterocigocidad promedio (H) y el porcentaje de loci polimórficos se utilizó la fórmula no sesgada de Nei y Li (1979). La heterocigocidad esperada (H_e) es la medida más generalizada de diversidad genética y consiste en la probabilidad de muestrear dos genes que sean diferentes, dentro de una o más poblaciones. Se calcula mediante la fórmula:

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

donde, x_i es la frecuencia en la población del alelo i , y q es el número de alelos. H es la 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.

Para estimar la mayor diversidad posible en cada subgrupo, se calculó el coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}), según lo propuesto por Wright (1978) mediante el programa TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis, versión 1.3) (Miller, 1997). Wright (1978) clasifica la diferenciación genética de acuerdo con el F_{ST} de la forma siguiente: (1) 0 - 0.05 = poca diferenciación genética, (2) 0.05 - 0.15 = moderada diferenciación genética, y (3) > 0.25 = gran diferenciación genética.

La variación en la frecuencia alélica de las accesiones analizadas se obtuvo utilizando el paquete estadístico TFPGA, además, se determinó el 'f' estadístico insesgado con un intervalo de confianza de 95%.

Determinación del contenido de carotenos totales

La extracción y cuantificación del contenido de carotenos en raíces de yuca se desarrolló siguiendo la metodología empleada por Safokatanga *et al.* (1984), modificado por Bedoya (1999) y descrita por Chávez *et al.* (2005). El contenido de carotenos totales fue determinado por el método de absorción espectrofotométrica. La detección se hizo 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.

El contenido de carotenos totales se analizó por estadística descriptiva (medidas de tendencia central, de variación, desviación, correlación y regresión) mediante el programa Microsoft Excel (2003) y SAS (2005). Se construyeron histogramas de frecuencia y gráficas de dispersión.

Resultados y discusión

Caracterización molecular

El número de alelos en cada locus en todo el grupo de datos estuvo comprendido en un rango desde 2 hasta 5. En 70% de los 140 marcadores se encontraron tres o más alelos y el número, promedio, de alelos por locus fue de 2.5. Las relaciones genéticas entre las accesiones evaluadas se observan en el dendrograma de la Figura 1. Se formaron seis grupos con un nivel de similitud de 0.68 en los cuales se puede observar claramente una tendencia a agruparse según su procedencia, autopolinización, cruzamiento dirigido o selección masal. No obstante, existen algunos materiales que no obedecen a un patrón de agrupamiento y se encuentran clasificados dentro de distintos grupos, lo que indica las relaciones que se pueden presentar entre las accesiones evaluadas. En el dendrograma se observa que la mayor cantidad de materiales de yuca evaluados se encuentra en el grupo A, que tienen diferente origen geográfico y proceden de distintas fuentes –autopolinizaciones o cruzamientos dirigidos, entre otros– lo que contribuye a la variabilidad genética total observada en todos los grupos evaluados.

No obstante que la yuca es una planta que se propaga vegetativamente, el análisis molecular mostró una gran variabilidad genética, especialmente en las poblaciones silvestres (MBRA 443 y CB 1910, entre otras) que no han sido seleccionadas ni multiplicadas por el hombre, sino que su dispersión ocurre naturalmente. La diversidad genética de las poblaciones que se reproducen clonalmente puede ser debida a diferentes factores, tales como diseminación por semillas, el nivel de alogamia de la especie, el manejo de los agricultores y su proceso empírico de selección basado en sanidad, tamaño de fruto, resistencia a enfermedades y palatabilidad.

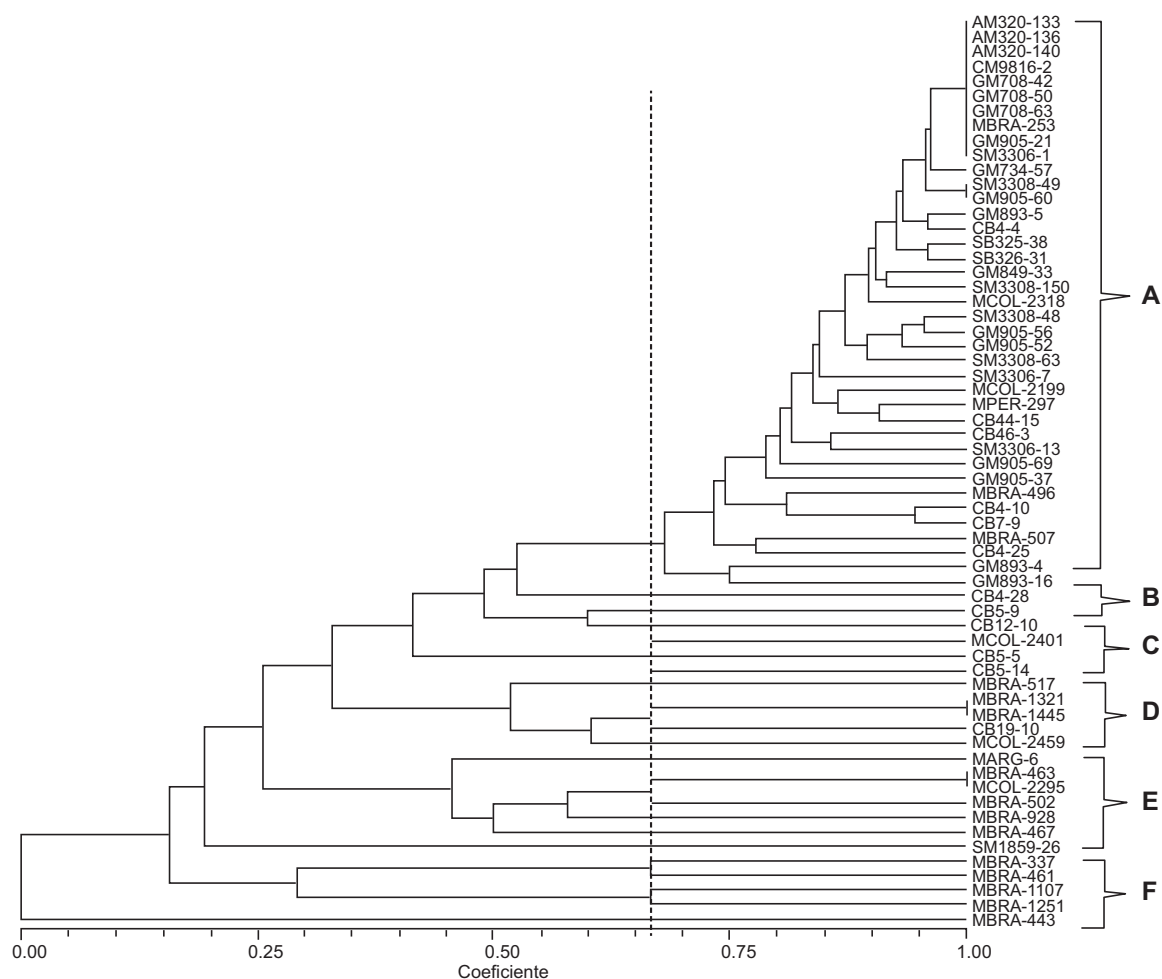


Figura 1. Dendrograma de la estructura genética de 67 accesiones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) existentes en el Banco de Germoplasma en el CIAT, con 140 marcadores microsatélites seleccionados. A un nivel de similitud de 0.68, se formaron 6 grupos (A, B, C, D, E y F).

Algunos de estos materiales son recolectados en campo e introducidos en cultivos por los campesinos, para contribuir así a la variación genética total.

Considerando los seis grupos formados anteriormente mediante el análisis de similitud (0.68), el porcentaje de loci polimórficos fue de 94%. Los valores de heterocigosidad encontrados fueron altos y variaron en un rango entre 0.557 y 0.592, con un promedio de 0.56. Esto implica que la probabilidad de que dos alelos seleccionados al azar sean diferentes es mayor que 50%. El grupo A presentó el valor más alto de heterocigosidad (0.592), lo cual puede ser explicado por el número de muestras que lo componen, la naturaleza alógama de la especie, el origen geográfico (materiales procedentes de Cuba, Colombia) o la fuente de donde proviene el material (autopoliniza-

ciones y cruzamientos), entre otros factores, que contribuyen a aumentar la variabilidad genética en estas poblaciones.

En estudios de diversidad genética en yuca con utilización de marcadores aloenzimáticos (Lefevre y Charrier, 1993a,b; Resende *et al.*, 2000) la proporción de heterocigotos observada fue tres veces menor que cuando se usaron marcadores microsatélites. Se debe tener presente que las isoenzimas miden la diversidad genética que se expresa o la de tipo selectivo, mientras que los microsatélites miden la diversidad genética total o no-selectiva. Los microsatélites son regiones en tandem informativas, repetitivas, no-codificantes y por tanto con una mayor cobertura del genoma.

En accesiones domesticadas de girasol, la proporción de heterocigotos observados fue dos a tres veces más grande para loci

microsatélites que para aloenzimas (Tang y Knapp, 2003) y en landraces de sorgo fue 20 veces más grande para microsatélites que para aloenzimas (Djè *et al.*, 1999). En general, la alta proporción de heterocigotos observados en evaluaciones con marcadores microsatélites es esperada debido a su alto polimorfismo y a las características propias de estos marcadores mencionadas anteriormente. Lo anterior corrobora las ventajas de los marcadores microsatélites en la estimación e identificación de la variabilidad genética en poblaciones naturales, lo que a la vez asegura la confiabilidad de la información obtenida en este estudio. Los marcadores microsatélites han sido muy utilizados en la evaluación de la variabilidad genética de yuca para el mapeo de regiones del genoma asociadas con características de interés como carotenos (Marín, 2008), contenido de proteínas (Sheffield *et al.*, 2006) materia seca (Kawano *et al.*, 1987), deterioro fisiológico (Rosero-Alpala *et al.*, 2010), entre otras.

La heterocigosidad promedio total observada en los loci evaluados y al considerar todos los grupos formados fue de $H_t = 0.559$, al igual que la heterocigosidad promedio esperada ($H_e = 0.532$), lo cual puede estar asociado con la probable naturaleza alógama de la especie, y favorece la conservación del alto porcentaje de heterocigotos, así como la presencia de algunas accesiones que pudieron ser recolectadas en estado silvestre. Además, estos pequeños desvíos entre lo observado y lo esperado pueden ser indicio de equilibrio Hardy-Weinberg (HW) para los marcadores usados, no obstante la prueba de equilibrio mostró lo contrario. Esta prueba de equilibrio para los 140 marcadores microsatélites utilizados en este estudio y realizada mediante la prueba de ji-cuadrada (X^2) para las desviaciones de las frecuencias génicas con respecto a lo esperado con el supuesto de Hardy-Weinberg, mostraron que ninguno de los marcadores utilizados se encontraba en equilibrio, resultado importante para la continuidad de los análisis de diversidad genética y estructura poblacional de los materiales evaluados.

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 se encontró dentro de los grupos ($H_s = 0.543$), lo que indica la necesidad de hacer muestreos más precisos al evaluar la diversidad genética presente en poblaciones naturales de yuca, o sea, estudios microgeográficos que permitan explorar mucho más el potencial genético de estos materiales. Por el contrario, Kizito *et al.* (2006) en un estudio 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 con la diversidad dentro de ellas ($F_{IS} = -0.021$), demostrando así que las variedades fueron diferenciadas unas de otras por factores genéticos y ambientales. Lo anterior muestra que los estudios de variabilidad están influenciados por factores tanto genéticos como ambientales y que para su estimación es necesario hacer un buen muestreo, con una variabilidad representativa de la especie en estudio y de las condiciones ambientales que influyen en su desarrollo.

En un estudio del efecto de la introgresión en el acervo genético de la yuca y la diferenciación genética entre América Latina y el Este y Oeste de África, Kizito *et al.*, (2007) encontraron que los cálculos de diferenciación genética entre los grupos (F_{st}), mostraron una pequeña variación entre las variedades en Uganda y Tanzania (Este de África) y Nigeria (Oeste de África), con un F_{st} , promedio de 0.048. Sorprendentemente se encontró una gran diferenciación genética entre las variedades de yuca de Uganda y Nigeria y entre variedades de Tanzania y Nigeria, lo que no ocurrió entre variedades de 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 y, tal como se encontró en este estudio, la variabilidad puede estar asociada con el efecto del muestreo o la genética misma de los materiales, que al interactuar en diferentes ambientes manifiestan todo su potencial.

En estudios de diversidad genética en Uganda, los valores más pequeños del promedio de heterocigosidad esperada y corre-

gida por el tamaño pequeño de la muestra, se presentaron en agroecosistemas del Norte (0.487), mientras que los agroecosistemas de montaña tuvieron los más altos valores (0.594) (Nei y Li, 1979). Es necesario resaltar que en los ecosistemas donde la acción antrópica es mínima, hay una alta variabilidad. Esto confirma los hallazgos en este estudio en relación con las accesiones silvestres, no domesticadas y no intervenidas por el hombre, que ayudaron a aumentar la variabilidad genética total hallada en los grupos evaluados ($Ht = 0.532$).

Los resultados muestran una considerable variación genética, tanto entre como dentro de grupos conformados, aunque la variación fue más grande en este último caso. Sin embargo, la gran similitud encontrada entre algunas accesiones evaluadas sugiere la ocurrencia de intercambio de material entre agricultores de fincas cercanas o intercambio de germoplasma entre los productores e investigadores de diferentes países.

Teniendo en cuenta los valores de heterocigosidad ($Ht = 0.559$) y de diferenciación genética ($Gst = 0.034$) observados en este estudio, se puede afirmar que hay suficiente diversidad genética entre las accesiones evaluadas, la cual puede estar asociada con la probable naturaleza alógama de la especie, migración, flujo de genes, transferencia de materiales entre regiones, presencia de accesiones silvestres, entre otros factores. Por lo tanto, existen materiales a partir de los cuales se pueden diseñar esquemas de mejoramiento tendientes a la obtención de una mejor calidad nutritiva de la yuca.

En Brasil, centro de origen de la planta, se encontró una alta diversidad de la yuca silvestre y sus clones indígenas. Los recursos genéticos de *Manihot* han sido recolectados, evaluados y manipulados desde 1970 (Nassar, 1999). La diversidad genética de las especies silvestres 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 tolerado la selección de otros clones con alto contenido de β -caroteno, como también ricos en licopeno combinados con una alta palatabilidad (Nassar *et al.*, 2005),

los cuales han sido propagados y distribuidos por los agricultores en el Distrito Federal y Estados adyacentes en Brasil.

En este estudio, los materiales silvestres hallados en los grupos B y F aportaron significativamente a la variabilidad genética total del grupo por las características mencionadas anteriormente, en consecuencia se hace necesario el planteamiento de estrategias de conservación de este germoplasma.

Los resultados de este estudio muestran el potencial de las especies silvestres en el incremento de características de importancia nutritiva como el contenido de proteínas; por tanto existe la posibilidad de explotar esa variabilidad en la búsqueda de materiales con buenos contenidos de carotenoides pro-vitamina A. Los resultados muestran la existencia de variabilidad genética, la cual representa un potencial que puede ser útil cuando se incorpore dentro de los programas de mejoramiento de la productividad, la calidad, la resistencia a factores bióticos y abióticos del germoplasma de yuca y, finalmente, la conservación de la fuente de genes que se encuentra en los materiales recolectados en estado silvestre.

Contenido de carotenos totales y marcadores microsatélites asociados

El contenido de carotenos totales en las 67 accesiones evaluadas mostró valores entre 0.95 y 18.25 $\mu\text{g/g}$, con base en el peso fresco, para los genotipos CB5-5 y CB7-9, respectivamente (Cuadro 1).

El patrón de distribución del contenido de carotenos totales en las accesiones evaluadas (Figura 2) mostró que las clases más numerosas corresponden a los individuos que presentan contenidos entre 5 y 12 $\mu\text{g/g}$ en peso fresco, por tanto constituyen materiales promisorios para ser evaluados con los marcadores microsatélites polimórficos seleccionados anteriormente y evidencian la presencia de loci que codifican para características cuantitativas o QTL's.

Los análisis entre los contenidos de carotenos totales y los marcadores microsatélites identificados previamente como polimórficos, y con loci que codifica para características cuantitativas (QTLs) (Marín, 2008), muestra-

Cuadro 1. Contenido de carotenos totales en 67 accesiones del banco de germoplasma de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) existente en el CIAT.

Genotipo	Total carotenos (ug/g) FW	Genotipo	Total carotenos (ug/g) FW
AM 320- 133	8.10	MCOL 2401	4.93
AM 320- 136	8.30	MCOL 2436	8.31
AM 320- 140	10.10	MCOL 2459	6.60
CM 9816- 2	10.98	MCOL 2489	5.13
GM 708- 42	8.18	MPER 297	7.70
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	4.70
MARG 6	4.81	CB 7- 9	18.25
MBRA 1A	5.20	CB 12- 10	5.78
MBRA 253	11.73	CB 19- 10	5.49
MBRA 337	5.30	CB 44- 15	11.29
MBRA 443	5.51	CB 46- 3	10.51
MBRA 461	3.50	SB 325- 38	13.36
MBRA 463	1.80	SB 326- 31	16.48
MBRA 467	0.97	SM 3306- 1	9.59
MBRA 496	7.90	SM 3306- 7	11.94
MBRA 502	4.46	SM 3306- 13	12.68
MBRA 507	8.80	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	4.80	GM 905- 37	9.83
MCOL 2199	7.10	GM 905- 52	13.79
MCOL 2295	3.00	GM 905- 56	9.73
MCOL 2318	7.70	GM 905- 60	10.78
		GM 905- 69	12.57

ron valores de correlación entre 0.45 y 0.62 y de regresión entre 0.19 y 0.38, para los marcadores SSRY-178 y SSRY-324 que se encuentran en los grupos de ligamiento H y D, respectivamente (Cuadro 2).

En estudios anteriores, en los cuales fueron evaluados estos mismos marcadores, pero en poblaciones segregantes F1 provenientes del cruzamiento entre raíces blancas y amarillas entre sí mismas y blancas x amarillas y en las familias S1, se encontraron valores de correlación y regresión mucho más altos.

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 mostraron alta correlación 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

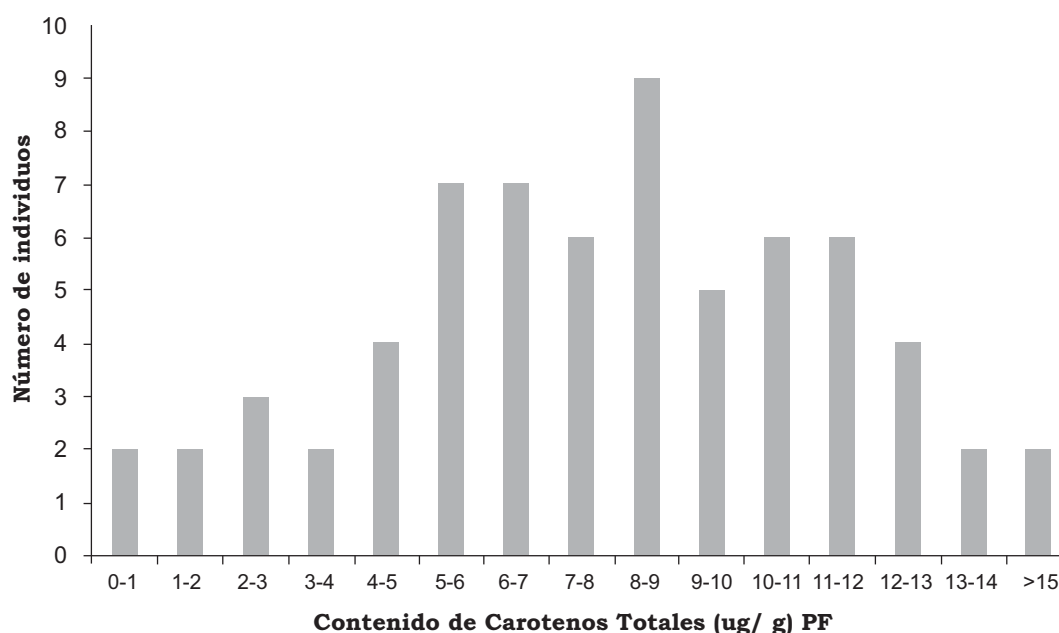


Figura 2. Distribución de frecuencias del contenido de carotenos totales en las 67 accesiones del Banco de Germoplasma de yuca existente en el CIAT.

Cuadro 2. Análisis de correlación y regresión de marcadores microsatélites polimórficos en 67 accesiones del Banco de Germoplasma en el CIAT.

Microsatélite	Correlación	R-regresión	Grupo ligamiento ^a
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

a. Con su respectiva ubicación en los grupos de ligamiento en el mapa genético molecular de yuca (Fregene *et al.*, 1997).

negativa para la característica, ya que permitirían la identificación temprana de aquellos genotipos que poseen muy bajos contenidos de carotenoides. Así, las regiones del genoma que habían sido identificadas anteriormente con bajos, intermedios y altos contenidos de β -caroteno, presentan el mismo comportamiento en otras poblaciones y en otras condiciones, lo cual es bueno en los programas de Mejoramiento Asistido por Marcadores (MAS) que busquen incrementar los contenidos de estos pigmentos en las raíces de yuca.

Conclusiones

- El presente estudio pone de manifiesto la existencia de variabilidad genética en yuca, la cual puede ser utilizada en los procesos de selección y recombinación, que conduzcan a la identificación de genotipos con altos contenidos de carotenoides de importancia nutritiva.
- Los análisis de regresión y correlación entre los contenidos de carotenos totales y los marcadores microsatélites en las 67

accesiones del Banco de Germoplasma de Yuca del CIAT evaluadas, mostraron que los marcadores que se encuentran correlacionados con los altos contenidos se localizan en el grupo de ligamiento D del mapa molecular de yuca.

Agradecimientos

Al personal del Programa de Mejoramiento y Genética de Yuca, al Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Raíces y al Laboratorio de Marcadores Moleculares del CIAT, por su apoyo en la realización del presente trabajo.

Referencias

- Adewusi, S. R. y Bradbury, J. H. 1993. Carotenoids in Cassava: Comparison of open column and HPLC method of analysis. *J. Sci. Food Agric.* 62:375 - 383.
- 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) del CIAT. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 120 p.
- Caujapé-Castells, J. 2006. Brújula para botánicos desorientados en la genética de poblaciones. Exegen Ediciones. Las Palmas de Gran Canaria. España. 132 p.
- Ceballos, H. y De La Cruz, G. 2002. Taxonomía y morfología de la Yuca. En: Ospina y Ceballos (eds.). La yuca en el tercer milenio, sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Publicación CIAT. Cali, Colombia. Cap 2, p. 17 - 33.
- Chavarriga-Aguirre, P.; Maya, M. M.; Bonierbale, M. W.; Kresovich, S.; Fregene, M. A.; Thome, J.; y Kochert, G. 1998. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): Discovery, inheritance and variability. *Theor. Appl. Genet.* 97:493 - 501.
- Chávez, A. L.; Sánchez, T.; Jaramillo, G.; Bedoya, J. M.; Bolaños, E. A.; Ceballos, H.; e Iglesias, C. A. 2005. Variation of quality traits in cassava roots evaluated in landraces y improved clones. *Euphytica* 143:125 - 133.
- Decreux, L.; Morris, W.; Hedley, P.; Shepherd, T.; Davies, M. S.; y Taylor, M. 2004. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of β -carotene and lutein. *J. Exp. Bot.* 409:81 - 89.
- Dellaporta, S. I.; Wood, J.; y Hicks, J. R. 1983. A plant DNA miniprep: versión II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19 - 21.
- Djè, Y.; Forcioli, D.; Ater, M.; Lefèbvre, C.; y Veke-mans, X. 1999. Assessing population genetic structure of sorghum landraces from North-western Morocco using allozyme and microsatellite markers. *Theor Appl. Genet.* 99:157 - 163.
- Efron, B. 1979. Bootstrap methods another look at the jackknife. *Ann. Stat.* 7:1 - 12.
- Excoffier, L. 1992. AMOVA (Analysis of Molecular Variance) 156. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Suiza.
- FAO. 2006. Base de estadísticas de cultivos: raíces y tubérculos. FAOSTAT database. Disponible en: www.fao.org (Marzo 23 de 2007)
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783 - 791.
- Fregene, M.; Angel, F.; Gómez, R.; Rodríguez, F.; Chavarriga, P.; Roca, W.; Tohme, J.; y Bonierbale, M. 1997. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor. Appl. Gene.* 95:431 - 441.
- Harvest Plus. 1998. Breeding crops for better nutrition. Provitamin A Cassava. Disponible en: http://www.dfid.gov.uk/r4d/PDF/Outputs/Misc_Crop/HarvstPlus_Cassava_Strategy.pdf. (15 de abril de 2007).
- Kawano, K.; Fukuda, W. M.; y Cenpukdee, U. 1987. Genetic and environmental effects on dry matter content of cassava root. *Crop Sci.* 27:69 - 74.
- Kizito, E.; Chiwona, L.; Egwang, T.; Fregene, M.; y Westerberg, A. 2006. Genetic diversity and variety composition of cassava on small-scale farms in Uganda: an interdisciplinary study using genetic markers and farmer interviews. Doctoral Thesis, Swedish Univ. Agric. Sci. 95 p.
- Kizito, E.; Rönnberg-Wästljung, A. C.; Egwang, T.; y Gullberg, U. 2007. Quantitative trait loci controlling cyanogenic glucoside and dry matter content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. *Hereditas* 144:129 - 136.
- Lefevre, F. y Charrier, A. 1993a. Isozyme diversity within African *Manihot* germplasm. *Euphytica* 66:73 - 80.
- Lefevre, F. y Charrier, A. 1993b. Heredity of seventeen isozyme loci in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* 66:73 - 80.
- Leung, H.; Nelson, R. H.; y Leach, J. E. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi y bacteria. *Adv. Plant Path.* 10:157 - 205.
- Marín, 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. 120 p.

- Mba, R. E.; Stephenson, P.; Edwards, K.; Melzer, S.; Mkumbira, J.; Gullberg, U.; Apel, K.; Gale, M.; Tohme, J.; y Fregene, M. 2001. Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. *Theor. Appl. Genet.* 102:21 - 31.
- McCouch, 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 and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.* 35:89 - 99.
- Miller, M. P. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.
- 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. Disponible en: <http://herb.bio.nau.edu/miller/amovaprp.htm> (23 de mayo de 2008).
- Morillo, A. 2009. Identificación de regiones del genoma asociadas con el contenido de β -caroteno en yuca, *Manihot esculenta* Crantz. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 225 p.
- Nassar, N. M. 1982. Collecting wild cassava in Brazil. *Indian J. Genet.* 42:405 - 411.
- Nassar, N. M. 1999. Cassava, *Manihot esculenta* Crantz genetic resources: Their collection, evaluation y manipulation. *Adv. Agron.* 69:179 - 230.
- Nassar, N. M. 2006. Chromosome doubling induces apomixis in a cassava x *Manihot anomala* hybrid. *Hereditas (Lund.)* 143:246 - 248.
- Nassar, N. M.; Vizzotto, C. A.; Da Silva, H. L.; Schwartz, C. A.; y Pires Jr., O. R. 2005. Potentiality of cassava cultivars as a source of carotene. Disponible en: [Gene conserve www.geneconserve.pro.br/articles.15:267-283](http://www.geneconserve.pro.br/articles.15:267-283). (Agosto 10 de 2007)
- Nei, M.; y Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasa. *E.U. Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:5267 - 5273.
- Resende, A. G.; Filho, P. S.; y Machado, M. P. 2000. Isozyme diversity in cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). *Biochem. Genet.* 38:203 - 216.
- Rosero-Alpala, E. A.; Cuambe, C.; Egesi, Ch.; Sánchez, T.; Morante, N.; Ceballos, H.; Fregene, M.; y Morales-Osorio, J. G. 2010. Introgression in cassava of the physiological postharvest deterioration resistance. *Acta Agronómica* 59 (2):180 - 187.
- Safo-Katanga; Aboagye, P.; Amartey, S. A.; y Oldham, J. H. 1984. Studies on the content of yellow-pigment cassava. En: Terry, E. R. et al. (eds.). *Tropical roots crops production and uses in Africa*. IDRC, Ottawa, Canada. p.103 - 104.
- Sandmann, G. 2001. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *arch. Biochem. Biophys.* 385(1):4 - 12.
- SAS. Institute Inc. 2005. SASA OnlineDoc® 9.13. Cary, NC: SAS Institute Inc; Disponible en <http://support.sas.com/onlinedoc/913/docMainpage.jsp>. (1 de Noviembre, 2008)
- Sheffield, J; Taylor, N.; Fauquet, C. y Chen, S. 2006. The cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root proteome: protein identification and differential expression. *Proteomics* 6:1588 - 1598.
- Sneath, P. H. y Sokal, R. R. 1973. Numerical taxonomy system: The principles y practice of numerical classification. W.H. Freeman and Co., San Francisco. 573 p.
- 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.
- Tang, S. Y Knapp, S.J. 2003. Microsatellites uncover extraordinary diversity in native American land races and wild populations of cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 106 (6):990 - 1003.
- Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations, University of Chicago. vol. 4.
- Ye, X.; Al-Babili, S.; Klöti, A.; Zhang, J.; Lucca, P.; Beyer, P.; y Potrykus, I. 2000. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid- free) rice endosperm. *Sci.* 287:303 - 305.