

Selección fenotípica de progenies endocriadas de germoplasma irradiado de yuca (*manihot esculenta crantz*) para análisis Tilling

Adriana Tofiño^{1,2}, Diana Cabal³, Hernán Ceballos^{4,5}, Teresa Sánchez⁵, Juan Carlos Pérez⁵ y Bradley Till⁶

¹Recursos genéticos y Biotecnología, CORPOICA Estación Experimental Motilonia. Codazzi, Colombia.

²Universidad de Santander, Vicerrectoría académica. Valledupar, Colombia.

³Universidad Popular del Cesar, Facultad de Ingeniería. Valledupar, Colombia.

⁴Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Postgrado. Palmira, Colombia.

⁵Programa de mejoramiento de yuca, CIAT. Palmira, Colombia.

⁶Department of Biology, University of Washington, USA.

E-mail: atofino@corpoica.org.co

Resumen

La tendencia creciente en yuca, es su utilización agroindustrial, lo que explica en gran medida el salto en la investigación del cultivo, hacia el aprovechamiento de su potencial biotecnológico. El TILLING, es una aproximación no transgénica de genética reversa que se acopla a la mutagénesis para detectar polimorfismos en genes de interés. Actualmente, el método utilizado para detectar los productos de corte es la electroforesis en acrilamida, acoplada a una plataforma de genotipado de alto rendimiento. Se ha buscado simplificar la detección convencional de los productos de corte de CEL I en geles de agarosa para hacer la técnica más accesible a investigadores, con acceso limitado a equipos. Semillas botánicas de cinco familias de yuca se irradiaron con rayos gamma y neutrones rápidos. Las plantas derivadas (M1), se autopolinizaron para producir una generación M2, conformada por 1.500 líneas. Se seleccionó un subgrupo de 150 líneas mutantes probables, identificadas mediante evaluación fenotípica para incrementar la probabilidad de detección de polimorfismos en una muestra pequeña para el análisis por TILLING convencional y, con la modificación metodológica a validar, utilizando nueve genes objetivo. El cuello de botella de la técnica TILLING se acentúa debido al desconocimiento de la arquitectura genómica completa del cultivo pues se requieren técnicas adicionales de evaluación de calidad de productos de amplificación de cebadores y la aplicación de la metodología convencional para la evaluación de SNPs por TILLING en yuca.

Palabras clave: microscopía óptica, polimorfismo en nucleótidos individuales (SNPs), mutación inducida, caracterización morfológica.

Phenotypic Selection of Inbred Irradiated Cassava (*manihot esculenta crantz*) Germplasm Progeny for Tilling Analysis

Abstract

The growing trend in cassava cultivation is its utilization as an industrial crop that largely explains the jump that has emerged in cassava research takes advantage its biotechnological potential. TILLING is an approximation of non-transgenic genetic reverse that is coupled to mutagenesis to identify polymorphisms in genes of interest. Currently, the common method used to detect cleaved products is by polyacrylamide gel electrophoresis using a high-throughput genotyping platform. We have sought to simplify the detection of CEL I-cleaved products in conventional agarose gels to make the technique more accessible to researchers where access to instrumentation is limited. Botanical seed from five different cassava families were irradiated with α rays and fast neutrons. Plants M1, self-pollinated to produce the M2 generation comprising 1.500 lines. A subset of 150 mutant lines identified by phenotypical screening to increase the detection probability of polymorphisms in a small sample for analysis by conventional TILLING and methodological changes to validate, using nine target genes. The bottleneck of the TILLING technique is accentuated in cassava due to lack of complete genomic architecture that still persists and requires additional techniques to evaluate quality amplification products of primers and the application of the conventional methodology for the evaluation of SNPs by TILLING in cassava.

Key words: Light microscope, single polymorphism nucleotide (SNPs), induced mutations, morphological description.

Introducción.

En los países ubicados en el trópico y subtrópico, las raíces y tubérculos constituyen los recursos amiláceos de mayor disponibilidad [15]. La yuca, *Manihot esculenta* Crantz, es un cultivo tropical que se siembra en tierras bajas de Asia, África y Sudamérica por sus raíces ricas en almidón cuyo contenido fluctúa entre 73,7 y 84,9% del peso seco total [7].

Actualmente, se ha diversificado el uso de la yuca, pues además del consumo fresco, alimentación animal, comidas procesadas y producción de bioetanol, las raíces han ingresado en el mercado global del almidón y sus derivados. Las industrias que producen almidón de yuca en Colombia y otras regiones del mundo, requieren almidones novedosos con propiedades diferentes a las normales como mayor o menor proporción de amilosa, cambios en el tamaño y forma de los gránulos de almidón, cambios en la composición química del almidón, para mejorar la com-

petitividad y disminuir el impacto ambiental de los procesos industriales [27].

Las variedades actuales de yuca, si bien presentan altos niveles de productividad, carecen de variabilidad genética para características del almidón, que ofrezcan propiedades diferentes al del almidón normal. Adicionalmente, se desconoce la variabilidad genética del germoplasma de yuca con respecto a las características del almidón, ya que la alta heterocigosidad de la especie, dificulta la identificación de variantes alélicas de interés [6, 7]. Una estrategia que se ha implementado recientemente, es la inclusión de generaciones de endocría en el mejoramiento genético para la identificación de alelos recesivos de interés como el genotipo Waxy [8] y se han descrito los efectos de la endogamia sobre las características productivas de la yuca [19].

El avance en la comprensión de la estructuración genética del cultivo mediante mapas de alta densidad, el desarrollo de bibliotecas BAC (cromosoma bacterial artificial)

y secuencias expresables TAGs de alta saturación, identificación de QTLs y la secuenciación completa de la yuca, posibilitará el análisis genético de rasgos complejos en cultivares y silvestres relacionadas y su posterior introgresión en variedades comerciales mediante ingeniería genética, mutagénesis y mejoramiento convencional [27, 17]. Los avances recientes en las tecnologías de secuenciación económica, han ampliado las aplicaciones biotecnológicas de las colecciones de EST, especialmente acopladas a estrategias de genética reversa como TILLING [3].

La técnica de análisis molecular TILLING, *Targeting Induced Local Lesions in Genomes*, es un método que aprovecha la inducción y posterior identificación de mutaciones en genes específicos. Este método se ha empleado profusamente en el estudio de series alélicas de mutaciones puntuales inducidas en genes de interés, en diferentes especies animales y vegetales [23, 28, 10]. Generalmente, en TILLING se utilizan mutagénicos como etilmetanosulfonato (EMS). Sin embargo, se han registrado también, trabajos con radiaciones ionizantes como Gamma y neutrones rápidos, que producen sustituciones de un solo nucleótido, deleciones de 2-4 pb y, deleciones de más de 6Mb no transmisibles a la progenie [31].

El TILLING y ECOTILLING, acoplados con otros recursos genómicos se utilizan como herramientas de haplotipado en mejoramiento genético, para la identificación de variación alélica en genes de expresión correlacionable con fenotipos y el establecimiento de series alélicas en loci de los rasgos de interés en germoplasma o mutante inducido [28, 29, 2, 10].

En la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) dentro de una población mediante TILLING, se generan mezclas de ADN en las que el locus blanco se amplifica mediante PCR y se somete a la formación de heteroduplex, seguido por el corte de *CELI* [12, 29]. Actualmente, la identificación de productos de digestión, es mediante electroforesis en gel de poliacrilamida acoplada a plataformas de genotipado de alta resolución como Li-Cor. El uso masivo de esta técnica en los países en vías de desarrollo, depende de la adecuación de la técnica para la detección de los productos de digestión en gel de agarosa sin el requerimiento del Li-Cor o cebadores fluorescentes [18].

El Programa de mejoramiento de yuca de CIAT, planteó un proyecto de mejoramiento genético basado mutagénesis inducida, con el objetivo de producir e identificar variables de interés en la calidad de raíces, especialmente en las características del almidón. Uno de los aspectos más relevantes en la caracterización fenotípica, lo constituye el

uso de microscopía óptica y tinción por yodo, en la identificación de mutantes del gránulo del almidón. La tinción por yodo ha sido útil en la identificación de mutantes naturales en yuca como Sugary y Waxy al igual que el mutante inducido de gránulo pequeño. La observación preliminar de los resultados de esta técnica, se ratificaron con análisis bioquímicos y moleculares [4, 8, 9].

El objetivo del presente trabajo, es validar la utilización de técnicas sencillas y baratas en la detección de posibles mutantes del almidón para reducir el número de individuos a evaluar molecularmente, mediante un protocolo de TILLING modificado, como propuesta de trabajo eficiente para los países productores del cultivo, en la identificación de mutantes comercialmente útiles, de genes de la ruta de síntesis del almidón.

Metodología

Material vegetal

En 2003 se inició un proyecto por el Programa de mejoramiento de yuca de CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) y la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira en sociedad con la agencia Internacional de Energía Atómica de Austria (IAEA), en el que se indujeron mutaciones en semillas botánicas provenientes de 5 familias de yuca. Se irradiaron con rayos α de 200 Gy (*a partir de cobalto 60*) cerca de 1400 semillas de familias de hermanos completos y medios hermanos. Las plántulas M1, primer estado de la mutagénesis se trasplantaron al campo. Se realizó autopolinización de las plantas M1 que florecieron para obtener semillas M2, segundo estado en el proceso de mejoramiento por mutación. Las plántulas M2 se trasplantaron al campo en y se cosecharon en 2006.

Evaluación plantas M2 para la selección del subgrupo para análisis TILLING

Se realizaron evaluaciones morfológicas de la población en campo con el fin de identificar posibles mutantes a partir de la identificación en M2 de quimeras observadas en M1 y, esta información se complementó con microscopía óptica para identificar cambios en la forma y tamaño del gránulo. Adicionalmente, se realizaron en todos los individuos pruebas de tinción con yodo para identificar cambios importantes en el contenido de amilosa. A partir de los resultados, se identificaron 150 genotipos para análisis TILLING modificado, por presentar características inusuales en variables de calidad de raíces, con respecto a valores máximos y mínimos registrados en análisis del banco

de germoplasma de yuca, que incluyen los parentales no irradiados [11].

Determinación de la morfología de los gránulos de almidón mediante microscopía óptica y electrónica

Se realizaron cortes transversales en las raíces de yuca y se tomó un trozo que se frotó suavemente sobre un porta objetos en el que posteriormente se vertió una gota de solución de yodo al 0,2%. La mezcla se observó a través del microscopio de luz (Olympus CX41) con lentes de magnificación de 40X. Los individuos con anomalías en el gránulo se evaluaron por microscopía electrónica. Los gránulos de almidón deshidratado se espolvorearon en una cinta adhesiva doble montada sobre un trozo de aluminio circular, cubierto con 35 nm de oro-aluminio que se fotografiaron y midieron en un *Scanning Electron Microscope* (JSM 820 Jeol, Tokyo, Japan) con voltaje de aceleración de 20 kV.

Contenido de amilosa mediante tinción por yodo de las raíces de yuca

Este análisis se realizó en todos los individuos que tubarizaron en la evaluación de plantas individuales M2. Las raíces recién cosechadas se cortaron en secciones transversales, una de las cuales se roció con solución de yoduro 2% (2g KI y 0,2g I₂ en 100cm³ de agua destilada).

Extracción de ADN y diseño de cebadores

Se extrajo el ADN de este subgrupo M2, al igual que los parentales M1, algunos individuos no irradiados de las familias evaluadas y genotipos control como TAI 8, en el que se han evaluado un gran número de marcadores SSRs [13]. Paralelamente a la caracterización fenotípica de la población M2, se diseñaron y sintetizaron cebadores de las enzimas con mayor control metabólico en la ruta biosintética del almidón [25]. Los cebadores se diseñaron para este estudio, a partir de secuencias disponibles de 9 de las principales enzimas relacionadas con la biosíntesis del almidón de diferentes especies vegetales en el Genebank de la *Web*.

Posteriormente, se comparó la similitud entre las diversas secuencias de las enzimas conocidas con las secuencias expresadas ESTs de la genoteca de yuca, disponibles en el sitio *Web* de CIAT y de otros Institutos Internacionales de Investigación, como *Institute of Chinese Academy of Tropical Agricultural Science*.

Una vez identificadas las secuencias ortólogas del gen de interés en las plantas consideradas, con mayor homología con los fragmentos ESTs de yuca, se diseñaron cebadores de los genes de interés en el germoplasma mutante, con el apoyo del programa Coddle y Primer3 [20]. Para la extracción de ADN, se utilizó tejido foliar y el método de mini extracción Dellaporta, modificado. La calidad de ADN se verificó en geles de agarosa al 3% y se cuantificó la concentración mediante fluorómetro.

Técnica TILLING modificada

Las reacciones de PCR se desarrollaron en un volumen de 20 consistente en dH₂O, 1× PCR buffer (Promega Corp, Madison, WI), 1,5 mM-3 mM MgC₂ (Promega Corp.), 0,2 mM dNTPs (Promega Corp.), 0,0625 U *Taq* polymerase (Promega Corp), 0,2 iM de primers forward and reverse sin marcar con fluorescencia (Operon Biotechnologies, Inc., Huntsville, AL), 3,125 mg/mL PVP, 0,125 mg/ mL BSA (New England BioLabs, Ipswich, MA), y 0,875– 1,25 ng de ADN. Las condiciones del termociclador fueron 95°C por cinco minutos para la denaturalización inicial, seguido de 40 ciclos de 95°C por un minuto, 63–69°C por un minuto, 72°C por un minuto, un ciclo de 72°C por diez minutos y 4°C de temperatura.

Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 3% con tinción con bromuro de etidio. Los productos de PCR se calentaron y enfriaron en el termociclador para formar heteroduplex a través de un ciclo de 99°C por diez minutos para inactivar la *Taq* polimerasa, seguido por 70 ciclos de 20 s a partir de 70°C disminuyendo 0,3°C. Una vez que se forman los heteroduplex, los productos de PCR se trataron con *CELI* (Transgenomic, Inc. Omaha, NE); se adicionó un paso de limpieza para evitar el exceso de primer/dimer con polietilenglicol y etanol 250 iL. Los productos de digestión, se incubaron a 42°C por 20 minutos para la digestión de las secuencias de baja alineación en los bucles. Una vez se completa la digestión, se aplicó una solución de parada. Los productos de digestión se visualizaron en geles de agarosa de 1,5 y 3%.

Análisis complementarios del ADN, cebadores productos de amplificación y técnica TILLING convencional

Treinta (30) genotipos del grupo de mutantes putativos identificados fenotípicamente, se enviaron a IAEA para ensayos de calidad del ADN extraído en CIAT, diseño de cebadores y productos de amplificación, al igual que análisis de la secuencia de amplificaciones [10] y validación de la obten-

ción de los productos de digestión mediante visualización por Li-Cor en el protocolo convencional de TILLING [26].

Resultados y discusión

Después de dos años de trabajo intenso, se identificó en la población M2, mediante caracterización fenotípica, mutantes de características del almidón como gránulo pequeño [9]. También, la caracterización fenotípica de M2, permitió identificar individuos con otras anomalías del gránulo y por tanto, con probabilidad elevada de polimorfismo en genes del almidón. A partir de este grupo, se evaluó el sistema TILLING modificado pues, la probabilidad de formación de bucles detectables por *CEL I* podría ser mayor.

Se han identificado en las poblaciones mutantes gran cantidad de distorsiones morfológicas y variaciones en las características del almidón como deleciones completas en el locus *Waxy* [14], disminución del tamaño del gránulo de *Oriza sativa* con modificación en la acumulación y estructura de la amilopectina [21]; series de mutaciones puntuales en el gen *Waxy* de *Solanum tuberosum* con contenidos elevados de amilopectina [16].

Las técnicas microscópicas [30, 8]; tinción de raíces con yodo [4] y la descripción morfológica [30, 22], se han utilizado con éxito en la caracterización de la variabilidad e identificación de mutantes del almidón en diferentes cultivos. Sin embargo, la tinción con yodo sólo permite una discriminación gruesa de genotipos extremos pues, la tinción café rojiza es típica de almidones libres de amilosa, mientras que el contenido bajo de almidón o contenido alto de azúcar no ocasionan cambios visibles en la coloración inicial de la solución.

El almidón con contenido entre 16,6 a 23,6 % de amilosa tiñe la raíz con color azul oscuro [8]. El alcance de una discriminación más fina requiere la cuantificación de amilosa por espectrofotometría o *Differential scanning calorimeter* (DSC) [9]. La tinción por yodo es adecuada para el presente estudio para la identificación de individuos por fuera de los límites identificados en yuca en las características del almidón. A partir de este análisis, se identificó un individuo sin cambios apreciables en la coloración inicial de la solución que podría asociarse con raíces azucaradas (GM155N35-1).

De igual forma, la microscopía óptica permitió la identificación de genotipos M2 de gránulos pequeños, en los que predominan diámetros de 5-8 μm (C4G160-13, C4G160-16,

C4G160-18, SM3015-1); huecos (C4N83-9, GM155G28-9, C4G28-10) y gránulos fracturados (GM155G75-1) (FIG.1). La combinación de ambas técnicas, permitió la identificación de individuos con poco almidón (C4G190-11, C4N14-5, C4N14-14, CM9331G67-36) sin cambio en la coloración de la solución y bajo número de gránulos.

En la evaluación morfológica, se identificaron en la población M2, porcentajes elevados de mortalidad 20%; individuos débiles con tamaño inferior a 30 cm, 17%; y disminución general en la producción de raíces con menos de 5 kg por planta o sin tuberización, 20%. Las características mencionadas, no pueden asociarse exclusivamente con efectos de la radiación pues la autofecundación ocasiona también efectos drásticos de depresión endogámica sobre los materiales sobrevivientes. Se ha identificado, depresión endogámica en yuca sobre rasgos de importancia como rendimiento de raíces frescas, contenido de materia seca en raíces. Sin embargo, el índice endogámico no es homogéneo entre diferentes familias. El promedio y frecuencia de distribución dentro de las familias S1 para los diferentes rasgos, se correlacionaron con la importancia relativa de efectos genéticos no aditivos que controlan su herencia [19].

Sin embargo, el efecto de la endogamia sobre el tamaño del gránulo y demás características del almidón en yuca aún no se han registrado. La disminución en el tamaño de raíces y el rendimiento que puede observarse entre genotipos emparentados, abuelo no irradiado, parental M1 y el mutante M2 de gránulo pequeño, está acompañado de cambios en tamaño, forma y densidad de gránulos de almidón (Figura 1).

La evaluación fenotípica de la población autofecundada M2 de germoplasma mutante de yuca, permite únicamente la identificación de individuos atípicos pero no despeja el origen genético de dicha anomalía pues los cambios en el almidón pueden estar asociados con la expresión genética de una red intrincada de genes, en la que la relación postranscripcional es igualmente significativa [25]. De igual forma, en la población M2 confluyen efectos de la depresión endogámica [5,19], incremento en la homocigosidad del fondo genético y posible fijación de mutaciones inducidas por radiaciones ionizantes en semillas sexuales [24]. De acuerdo con lo anterior, es necesaria la aplicación de técnicas moleculares como TILLING y de expresión *In situ* para la identificación del origen de la anomalía fenotípica [27].

El TILLING, se caracteriza por su exigencia elevada en calidad del ADN molde y cebadores empleados para

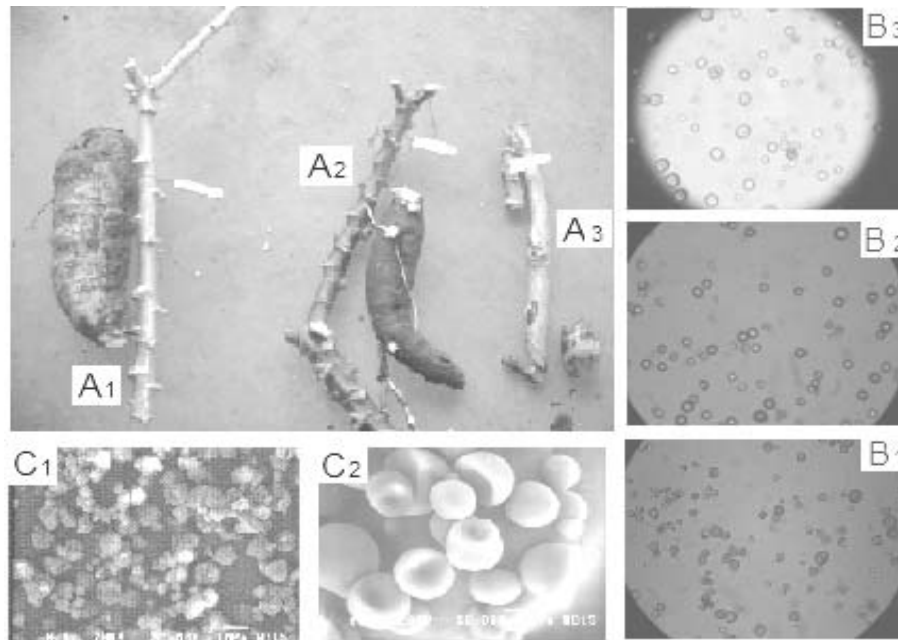


Figura 1. Cambios en las características morfológicas de la planta, tamaño de raíz y del gránulo de almidón entre individuos irradiados y no irradiados de la familia C4 en yuca. (A1) ascendiente no irradiado, (A2) parental M1 y (A3) genotipo M2 de gránulo pequeño. (B1, B2 y B3) fotografías de microscopio de luz (40X), se observan las características del gránulo de almidón correspondientes a cada individuo listado en A con igual numeración. (C1) fotografías de gránulos huecos y gránulos fracturados (C2), por microscopía electrónica de barrido. La barra en la parte inferior corresponde a 10 μ m.

la amplificación por PCR [26]. Posteriormente a la verificación de la calidad del ADN, se obtuvo amplificación impecable de cebadores asociados con genes de interés en los genotipos del estudio mediante la estandarización de las condiciones de amplificación por PCR para cada uno de los cebadores. Durante el proceso de digestión por *CELI* de los productos de amplificación en los genes de interés, se observó la carencia de productos de digestión variable, indicadores de cambios en la secuencia de ADN asociadas con mutación.

De acuerdo con los aspectos descritos, se realizó un ensayo para identificar si la ausencia de polimorfismo en los genes evaluados correspondía con anomalías en el diseño de los cebadores (Figura 2). En la amplificación del ADN de genotipos M2 con cuatro cebadores, las muestras se ubicaron entre marcadores invitrogen de peso molecular de precisión elevada. Los productos cercanos a 400 bp son apropiados para TILLING, por lo tanto el primer y segundo par de cebadores exhiben productos inapropiados para la técnica [18].

Este ensayo evidenció el diseño inapropiado de cebadores dentro del grupo de evaluación para TILLING. Ensayos similares a los realizados en IAEA, como calidad del ADN, diseño de cebadores y productos de amplificación,

al igual que análisis de secuencia de amplificaciones y validación de productos de digestión mediante Li-Cor; también se utilizaron en la identificación de cebadores con amplificación de más de un blanco en *Glycine max* y que ocasionaron ineficacia en la identificación de mutaciones con TILLING [10]. Las pruebas en IAEA mostraron superposición de picos, en la secuenciación de amplificados en algunos cebadores debido a amplificación simultánea de al menos dos fragmentos del mismo tamaño por cebadores inespecíficos (Figura 3).

Estos resultados indican que únicamente los cebadores *sacarosa fosfato sintetasa (SPS)*; *sintetasa del almidón (SS) III*, *cebador 4F/1R de sintetasa del almidón (SS) II* y *F/7R de la sintetasa de la sacarosa (SUSY)*, presentan condiciones de especificidad en amplificación requeridas por TILLING. Los otros cebadores sintetizados resultaron inespecíficos. Los resultados indican una eficiencia en la síntesis de cebadores del 30% comparable a la obtenida en *Glycine max* en la que se alcanzó 37% [10]. Este limitante, podría asociarse con evaluación de genes homólogos con copias casi idénticas, condición típica en especies poliploides o miembros de familias genéticas. La presencia de homólogos, está en concordancia con las características ge-

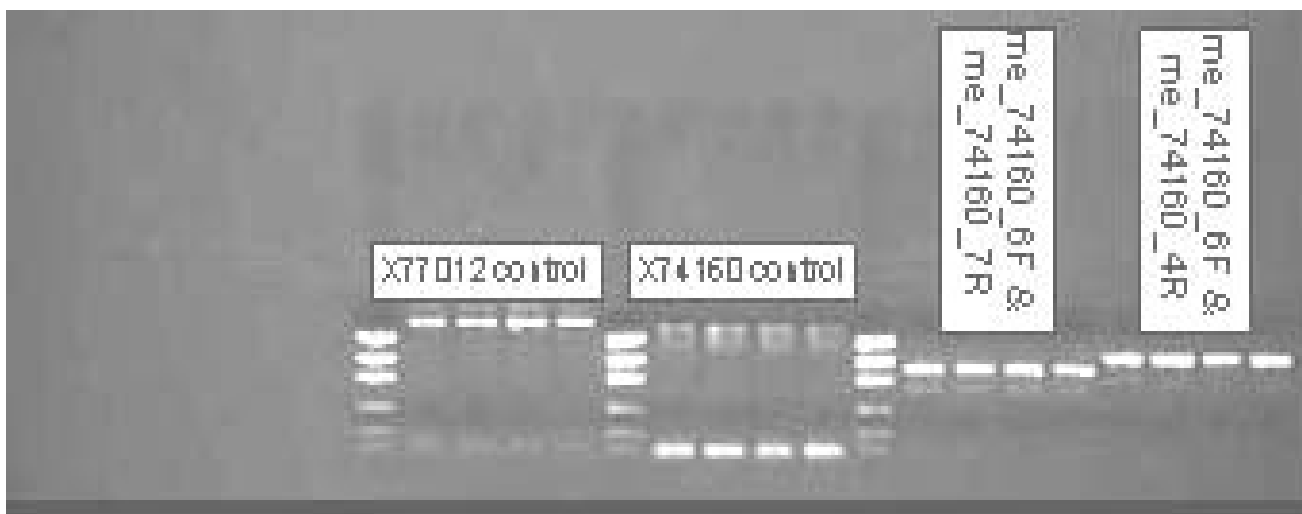


Figura 2. Validación en geles de agarosa del tamaño de fragmentos de amplificación de cebadores, mediante contraste con marcadores de peso molecular. Pozo 1 parental no irradiado familia C4, pozos 2-4 genotipos M2 familia C4, pozo 9 parental no irradiado familia C4, pozos 10-12 genotipos M2 familia C4, pozo 13 parental no irradiado familia C4, pozos 14- 16 genotipos M2 familia C4. Marcadores de peso molecular de arriba hacia abajo: (2000 bp = 200ng, 1200 bp = 120 ng, 800 bp =80ng, 400 bp=40 ng, 200 bp=20ng, 100bp =10ng).



Figura 3. Salida de cromatogramas en análisis de secuencia de fragmentos de amplificación de cebadores, en dos genes de la ruta del almidón. Se visualizan secuencias de huellas de dos muestras independientes con amplificaciones de buena calidad (parte superior) y baja calidad (parte inferior). Salida superior en *SUT* hay ausencia de picos sobrepuestos en las regiones 231 a 360pb y 197 a 372 pb. En la inferior *HET*, la amplificación de las regiones 170 a 1240 pb y 170 a 1226 pb muestra traslape de picos, indicador de amplificación simultánea de diferentes productos con secuencias similares.

néticas de algunas enzimas de la ruta biosintética del almidón como SBE, GBSSI y SS [25, 10].

Los resultados de TILLING, bajo el protocolo convencional en 30 genotipos mutantes, mostró la presencia de polimorfismo en la distribución de bandas en algunos genotipos. Sin embargo, el análisis directo del gel de agarosa es ineficiente en el caso de yuca, dado que los individuos bajo evaluación con Li-Cor, se habían probado previamente en gel de agarosa, sin que pudiesen observarse productos de digestión en los genes evaluados. La efectividad en la detección de SNPs en la técnica clásica de TILLING, se apoya en el uso de cebadores fluorescentes y el acople al Li-Cor para la detección de fragmentos de digestión [32].

Por otro lado, en *Oriza sativa* se evaluó una metodología modificada para la detección de SNPs en geles de agarosa mediante TILLING que mostró eficiencia en detección de los productos de digestión, similar a la genotipificación por Li-Cor con resolución hasta de 3 Kb [18]. La secuenciación completa del genoma de yuca facilitaría la definición de cebadores específicos, pues el conocimiento de las secuencias de genes homólogos encaminaría el diseño de cebadores hacia regiones menos conservadas, evitando la redundancia de blancos [10]. En especies que no cuentan con esa facilidad, se hace necesaria la evaluación del tamaño y secuenciación de productos de amplificación, para eliminar cebadores inespecíficos y así incrementar la eficiencia en detección de mutaciones por TILLING [2].

Consideraciones finales

Del trabajo se concluye, que la utilización conjunta de microscopía óptica y tinción por yodo en la identificación de mutantes probables es efectiva pues en una muestra tan pequeña de 30 genotipos evaluados por TILLING convencional, se identificaron polimorfismos en los productos de digestión. En trabajos posteriores, se verificará esta información preliminar con secuenciación comparativa y pruebas de actividad enzimática en *SPS*, *SS III*, *SS II* y *SUSY*.

Con respecto a la metodología de TILLING en yuca, es necesario además del uso de Coddle y primer3 para la síntesis de cebadores, la realización de pruebas complementarias de calidad y especificidad de productos de amplificación. De igual forma, el uso de gel de agarosa para la visualización de productos de digestión fue ineficiente en el presente estudio. En el caso de yuca, no se logró validar la modificación metodológica registrada en *Oriza sativa*. De acuerdo con estas consideraciones previas, el desarrollo exitoso del TILLING en yuca estaría condicionado a la extracción de ADN de alta

calidad, síntesis de cebadores altamente específicos y el uso de la metodología convencional.

Es importante precisar que una limitante en el análisis de resultados del TILLING en yuca, está asociada con el efecto de la reproducción sexual y la endogamia en M2, sobre el genoma heterocigoto; lo cual permite la expresión de genes recesivos, no expresados durante la reproducción vegetativa. Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos por TILLING, no puede diferenciarse si los mutantes identificados corresponden a variaciones por alelos múltiples recesivos o al efecto de la mutación inducida en loci de interés. La resolución de este interrogante, dependería del estudio del efecto de la endogamia sobre las características del almidón en la selección de variedades altamente productivas y con baja depresión endogámica, previamente a la irradiación. Otra alternativa biotecnológica, sería la irradiación de cultivos de microsporas para la posterior producción de poblaciones doble haploides mutagenizadas, en la cual la expresión fenotípica de individuos atípicos estaría asociada principalmente con efectos de la mutación inducida.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a COLCIENCIAS, fondo “apoyo a los Doctorados Nacionales”, por la financiación y a Chickelu Mba de la IAEA.

Referencias

- [1] AYEYEH, Kwadwo Owusu (2008). Expressed sequence tags (ESTs) and single nucleotide polymorphisms (SNPs): merging molecular marker tools for improving agronomic traits in plant biotechnology. *African J. Biot.* 7 (4): 331-341
- [2] BALYAN, Harindra S.; SREENIVASULU, Nese; RIERA LIZARAZU, Oscar; AZHAGUVEL, Perumal and KIANIAN, S. F. (2008). Mutagenesis and high-throughput functional genomics in cereal crops: current status. 98:357-417.
- [3] BOUCK, Amy; VISION, Todd. (2006). The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. *Mol. Ecol.* 16(5): 907-924.
- [4] CASTELO BRANCO, L.; BATISTA DE SOUSA, C.; DE MATTOS CARDO, C.; BLOCH, C.; CAMPOS, L. (2004). Identification and characterization of a novel cassava *Manihot esculenta* Crantz clone with high free sugar content and novel starch. *Plant Mol. Biol.* 56: 643-659.
- [5] CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D. (1999). The genetic basis of inbreeding depression. *Gen. Res.* 74:329-340.
- [6] CEBALLOS, H.; IGLESIAS, C.; PÉREZ, J.; DIXON, A. (2004). Cassava breeding: opportunities and challenges. *Plant Mol. Biol.* 56(4): 503-516.
- [7] CEBALLOS, H.; FREGENE, M.; LENTINI, Z.; SANCHEZ, T.; PUENTES, Y.; PÉREZ, J.; ROSERO, A.; TOFINO, A.

- (2006). Development and identification of high-value cassava clones. *Acta Hort. (ISHS)* 703:63-70.
- [8] CEBALLOS, H.; SÁNCHEZ, T.; MORANTE, N.; FREGENE, M.; DUFOUR, D.; SMITH, A.; DENYER, K.; PÉREZ, J.; CALLE, F.; MESTRES, C. (2007). Discovery of an amylose-free starch mutant in cassava. *J. Agric. Food Chem.* 55: 7469-7476.
- [9] CEBALLOS, H.; SÁNCHEZ, T.; DENYER, K.; TOFIÑO, A.; ROSERO, A.; DUFOUR, D.; SMITH, A.; MORANTE, N.; PÉREZ, J.; FAHY, B. (2008). Induction and Identification of a Small-Granule, High-Amylose Mutant in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Agric. Food Chem.* 56 (16), 7215-7222.
- [10] COOPER, J.; TILL, B.; LAPORT, R.; DARLOW, M.; KLEFFNER, J.; JAMAI, A.; EL-MELLOUKI, T.; LIU, S.; RITCHIE, R.; NIELSEN, N.; BILYEU, K.; MEKSEM, K.; COMAI, L.; HENIKOFF, S. (2008). TILLING to detect induced mutations in soybean. *BMC Plant Biol.* 8(9): 275-80.
- [11] CIAT, (2005). Project IP3, Improved cassava for the developing world, annual report, Cali, Colombia.
- [12] GILCHRIST, E.; HAUGHN, G. (2005). TILLING without a plough: a new method with applications for reverse genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8(2): 211-215.
- [13] FREGENE, M.; OKOGBENIN, E.; MBA, C.; ANGEL, F.; SUAREZ, M.; GUTIERREZ, J.; CHAVARRIAGA, P.; ROCA, W.; BONIERBALE, M.; TOHME, J. (2001). Genome mapping in cassava improvement: Challenges, achievements and opportunities. *Euphytica* 120(1):159-165.
- [14] KAWAKAMI, S.; KADOKAWI, K.; MORITA, R.; NISHIMURA, M. (2007). Induction of a Large Deletion Including the *waxy* Locus by Thermal Neutron Irradiation in Rice. *Breed. Sci.* 57(2): 153-157.
- [15] MOORTHY, S. (2004). Tropical sources of starch. En *Starch in food*; Eliasson A.C. Ed. CRC Press. Boca Ratón, FL.
- [16] MUTH, J.; HARTJE, S.; TWYMAN, R.; HOFFERBERT, H.; TACKE, E.; PRÜFER, D. (2008). Precision breeding for novel starch variants in potato. *Plant Biot. J.* 6(6): 576-584.
- [17] OKOGBENIN, E.; MARIN, J.; FREGENE, M. (2006). An SSR-based molecular genetic map of cassava. *Euphytica* 147(3): 433-440.
- [18] RAGHAVAN, CH.; NAREDO, M.; WANG, H.; ATIENZA, G.; LIU, B.; QUI, F.; MCNALLY, K.; LEUNG, H. (2007). Rapid method for detecting SNPs on agarose gels and its application in candidate gene mapping. *Mol. Breed.* 19(2):87-101.
- [19] ROJAS, M.; PÉREZ, J.; CEBALLOS, H.; BAENA, D.; MORANTE, N.; CALLE, F. (2009). Analysis of Inbreeding Depression in Eight S₁ Cassava Families. *Crop Sci.* 49:543-548.
- [20] ROZEN S.; SKALETSKY H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Meth. Mol. Biol.* 132:365-386.
- [21] SATOH, H.; SHIBAHARA, K.; TOKUNAGA, T.; NISHI, A.; TASAKI, M.; HWANG, S.; OKITA, T.; KANEKO, N.; FUJITA, N.; YOSHIDA, M.; HOSAKA, Y.; SATO, A.; UTSUMI, Y.; OH DAN, T.; NAKAMURA, Y. (2008). Mutation of the Plastidial -Glucan Phosphorylase Gene in Rice Affects the Synthesis and Structure of Starch in the Endosperm. *The Plant Cell.* 20:1833-1849.
- [22] SINGH, J.; MCCARTHY, O.; SINGH, H. (2006). Physico-chemical and morphological characteristics of New Zealand *Taewa* (Maori potato) starches. *Carb. Pol.* 64(4): 569-581.
- [23] SOOD, R.; ENGLISH, M.; JONES, M.; MULLIKIN, J.; WANG, D.; ANDERSON, M.; WU, D.; CHANDRASEKHARAPPA, S.; ZHANG, J.; LIU, P. (2006). Methods for reverse genetic screening in zebrafish by resequencing and TILLING. *Methods* 39(3): 220-227.
- [24] SZAREJKO, B.; FORSTER, P. (2007). Doubled haploidy and induced mutation *Euphytica* 158:359-370.
- [25] TETLOW, I.; MORELL, M.; EMES, M. (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J. Exp Bot.* 55 (406):2131-2145.
- [26] TILL, B.; COOPER, J.; TAI, T.; COLOWIT, P.; GREENE, E.; HENIKOFF, S.; COMAI, L. (2007). Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *Plant Biol.* 11: 7-19.
- [27] TOFIÑO, Adriana; ROMERO, H.; FREGENE, M.; ROSERO, A. (2007). Posibilidades y alcances del mejoramiento genético basado en mutación inducida en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Fit. Col.* 7(1): 1-12.
- [28] WANG, D.; SUN, Z.; TAO, Y. (2006). Application of TILLING in plant improvement. *Acta Gen. Sin.* 33(11): 957-964.
- [29] WANG, G.; TAN, M.; RAKSHIT, S.; SAITOH, H.; TERAUCHI, R.; IMAIZUMI, T.; OHSAKO, T.; TOMINAGA, T. (2007). Discovery of single-nucleotide mutations in acetolactate synthase gene by Ecotilling. *Pest. Bioch. Phys.* 88(2):143-148.
- [30] WONG, K.; KUBO, A.; JANE, J.; KYUYA J.; SATOH, H.; NAKAMURA, Y. (2003). Structures and Properties of Amylopectin and Phytoglycogen in the Endosperm of *sugary-1* Mutants of Rice. *J. Cer. Sci.* 37(2): 139-149.
- [31] WU, J.; WU, C.; LEI, C.; BARAOIDAN, M.; BORDEOS, A.; MADAMBA, M.; RAMOS-PAMPLONA, M.; MAULEON, R.; PORTUGAL, A.; ULAT, V.; BRUSKIEWICH, R.; WANG, G.; LEACH, J.; KHUSH, G.; LEUNG, H. (2005). Chemical- and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* 59:85-97.
- [32] XIN, Z.; WANG, M.; BARKLEY, N.; BUROW, G.; FRANKS, C.; PEDERSON, G.; BURKE, J. (2008). Applying genotyping (TILLING) and phenotyping analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population. *BMC Plant Biol.* 8:103-110.