

Artículo Científico

Autores: Adriana Tofiño, Hernán Mauricio Romero, Martín Fregene, Amparo Rosero

Posibilidades Y Alcances Del Mejoramiento Genético Basado En Mutación Inducida En Yuca (*Manihot Esculenta* Crantz)

Resumen

La yuca se cultiva por sus raíces y es el tercer cultivo fuente de calorías en el trópico. Los limitantes de la productividad incluyen constricciones bióticas y abióticas. Adicionalmente, los productores tienen problemas en el mercadeo por su rápido deterioro poscosecha y el bajo nivel de almidón y proteína de las raíces. Los programas de mejoramiento genético convencional también se enfrentan con barreras reproductivas y del mejoramiento en sí como la naturaleza alopoliploide, baja fertilidad, número bajo de semilla híbrida obtenida y baja tasa de germinación. Estas dificultades en la incorporación de rasgos útiles y deseables en un genotipo limitan la obtención de nuevos cultivos promisorios. Actualmente existen alternativas para incrementar la variabilidad genética deseable. Las nuevas herramientas de la biología molecular, ingeniería genética y las mutaciones inducidas coordinadamente con el mejoramiento convencional pueden cambiar esta situación proponiendo nuevos enfoques a los retos de la yuca. La inducción y selección de mutantes provee, especialmente, un método simple, eficiente, rápido y barato para alterar la composición genética y obtener genotipos más productivos, nutritivos y rentables a partir de genotipos bien adaptados.

Palabras clave: yuca, mejoramiento, genómica, mutaciones inducidas, biosíntesis de almidón.

Summary

Cassava is a root crop and the third most important source of calories in the tropics. Production constraints include biotic and abiotic stresses. Farmers' success in marketing their cassava has also fallen well short of its potential due to problems such as rapid post-harvest deterioration and inadequate starch and protein content in the roots. In addition, conventional genetic improvement programs are met with reproductive and breeding barriers, such as its allopolyploid nature, low fertility, low hybrid seed set, and poor germination rate. Such difficulties in incorporating useful and desirable traits in one genotype limit the possibility of obtaining new promising cultivars. Hence alternative ways to increase genetic variability are desirable. The new tools of advanced molecular biology, genetic engineering, and induced mutations, used in coordination with conventional plant breeding, can change this situation by offering new approaches to the challenges of cassava. Especially, the induction and selection of mutants provide a simple, efficient, rapid, and cheap method by which to alter the genetic make-up and obtain much more productive, nutritious, and profitable to grow genotypes from otherwise well-adapted genotypes.

Key Words: cassava, breeding, genomic, induced mutations, starch biosynthesis.

Introducción

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. Es un alimento básico para la alimentación en estas zonas y, gracias a las características rústicas de la planta, produce aun bajo condiciones de estrés hídrico, nutricional y acidez del suelo en las que otros cultivos amiláceos no lograrían completar su desarrollo (Fauquet y Tohme, 2004; Aerni, 2006).

En la actualidad 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. De acuerdo con lo anterior, el desarrollo de este cultivo es estratégico para el país y para el logro de este propósito se requieren la consolidación de las cadenas productivas y la eficiencia de los sistemas de producción y así aprovechar las ventajas comparativas de la comercialización de productos exóticos y la demanda progresiva de almidón de raíces y tubérculos del mercado global (Schuurman, 2005).

En este sentido se ha determinado que una de las estrategias de los países en desarrollo para obtener participación del mercado global es a través del desarrollo local autosostenible, que implica el posicionamiento de productos agrícolas autóctonos y con cadenas productivas amigables con el medio (FAO/FIDA, 2000; Scott *et al.*, 2000; Magnaghi, 2005).

Sin embargo, el uso múltiple de las raíces y el follaje requieren variabilidad en las propiedades fisicoquímicas del almidón, contenido de proteína y cianógenos, para beneficiar costos de producción, calidad e impacto ambiental en cada proceso (Poosaran *et al.*, 1985; Munyikwa *et al.*, 1997; Sarathi Reddy y Basappa, 1996; Ceballos *et al.*, 2006; Lin y Tanaka, 2006; Ceballos *et al.*, 2004). En yuca no se ha identificado la amplia gama de variaciones en las características del almidón encontrada en mutantes naturales de maíz, arroz y *Arabidopsis*, pues sólo se ha registrado un mutante azucarado. 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 (Ceballos *et al.*, 2004).

Para consolidar la expansión industrial de la yuca, se requiere incrementar la búsqueda de rasgos de valor agregado simultáneamente con altos rendimientos. En la industria alimenticia, el principal objetivo es acrecentar la calidad nutricional, especialmente el contenido de proteína que puede introgresarse a partir de especies silvestres relacionadas. Con respecto a la industria del almidón se requieren variedades con nuevas características fisicoquímicas del gránulo. Otros retos en el mejoramiento de la yuca incluyen la disminución del deterioro fisiológico poscosecha y la búsqueda de resistencia o tolerancia a las principales constricciones bióticas y abióticas endémicas en cada zona de cultivo. Para el alcance de estos múltiples objetivos se han modificado los métodos de mejoramiento convencional y se están implementando diferentes herramientas biotecnológicas para alcanzar la manipulación del número de flores y la sincronía de la diferenciación reproductiva entre cultivares, pues la selección de progenitores en los cruces de clones élite está asociada en mayor proporción a la capacidad reproductiva que al valor como progenitor (Ceballos *et al.*, 2004, 2006; Fauquet y Tohme, 2004; CIAT, 2005).

Adicionalmente se están implementando nuevas técnicas genómicas en combinación con el mejoramiento tradicional para modificar las características de la planta de yuca en menor número de ciclos que mediante el uso exclusivo del mejoramiento. Por ejemplo, el silenciamiento antisentido de genes, la mutagénesis inducida en asocio con cultivo de tejidos y técnicas moleculares avanzadas (Ahloowalia y Maluszynski, 2001; Puentes *et al.*, 2003; Ahloowalia *et al.*, 2004; Ceballos *et al.*, 2004; CIAT, 2005). Además de su utilidad en el mejoramiento, el trabajo con mutantes naturales e inducidos ha sido imprescindible en el avance del conocimiento de la red intrincada de la biosíntesis del almidón, requerido en la obtención de clases de almidón altamente específicas para cada proceso industrial. Sin embargo, a pesar de la creciente importancia del almidón para la humanidad, aún subsisten demasiados interrogantes sobre la síntesis y degradación del almidón *in vivo* que limitan el alcance de la manipulación del proceso biosintético (Denyer *et al.*, 2001; Baguma, 2004; Smith, 2005). Se ha sugerido que el trabajo con mutantes de genes individuales que codifican enzimas asociadas a la ruta biosintética del almidón debe combinarse con análisis genómicos multidisciplinarios para avanzar en el entendimiento de los aspectos menos conocidos de la ruta (Jobling, 2004; Tetlow *et al.*, 2004). Esta revisión destaca, a partir de los resultados obtenidos en diversos cultivos, las posibilidades actuales y futuras de la mutagénesis inducida, en el mejoramiento genético de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), especialmente en la investigación básica de la biosíntesis del almidón y su manipulación.

La Genómica Y El Mejoramiento De Cultivos

La biotecnología puede lograr contribuciones importantes para la seguridad alimentaria y el mejoramiento nutricional de las plantas. Investigaciones recientes han determinado que el mejoramiento genético requiere el acompañamiento de técnicas más precisas, rápidas y efectivas que complementen la identificación de fenotipos deseables en el campo, para suplir las expectativas de la demanda creciente de

alimento de la humanidad. Hasta hace poco se creía que el incremento en el rendimiento genético potencial se debía al efecto aditivo de muchos genes, pero los trabajos recientes con ADN recombinante demuestran la importancia del efecto de unos pocos genes “maestros” que afectan la interacción, directa o indirecta, de muchos procesos fisiológicos que modifican el rendimiento. Este hallazgo mostró las enormes posibilidades de la ingeniería genética y la mutagénesis para la modificación de genes individuales con impacto en rasgos cuantitativos (Ahloowalia *et al.*, 2004; Fauquet y Tohme, 2004; Sautter *et al.*, 2006).

Mientras que los países desarrollados han utilizado la tecnología para el mejoramiento de cultivos industrializables, los países en vía de desarrollo han implementado las herramientas de la genómica para mejorar cultivos básicos de la alimentación como arroz y yuca. Sin embargo, a pesar de que la yuca es uno de los principales cultivos comestibles, existe muy poco conocimiento de la herencia de los caracteres de relevancia agronómica. Se ha sugerido recientemente, a partir de los resultados de estudios genéticos en zonas subhúmedas, que el mejoramiento de yuca requiere la combinación de esquemas que permitan el aprovechamiento de efectos aditivos y no aditivos, dependiendo de su importancia relativa en la herencia de los caracteres específicos a mejorar (Ceballos *et al.*, 2004).

Por otro lado, se han llevado a cabo muchas estrategias para superar las constricciones en las metodologías actuales del mejoramiento genético de la yuca. Por ejemplo, las evaluaciones en estados tempranos de selección llevan a evaluar el efecto de la habilidad combinatoria general, mientras que la endocria por autopolinizaciones secuenciales facilita la identificación de rasgos recesivos útiles presentes en el germoplasma de yuca o en poblaciones inducidas por mutagénesis. Adicionalmente, los métodos de selección recurrente divergente se han utilizado para incrementar o reducir el contenido de amilasa en las raíces (Ceballos *et al.*, 2004; 2006; CIAT, 2005). Infortunadamente, las metas para incrementar el rendimiento, calidad de la raíz, resistencia a los limitantes ambientales son extremadamente lentos debido a las características biológicas intrínsecas del cultivo como ciclo de crecimiento largo, fondo genético heterocigoto y al conocimiento incipiente de la organización de la diversidad del cultivo (Fregene *et al.*, 1997).

El avance en la comprensión de la estructuración genética del cultivo mediante mapas de alta densidad, el desarrollo de bibliotecas BAC (cromosoma bacteriano artificial) y secuencias expresables TAGs de alta saturación, identificación de QTLs y la secuenciación completa del cultivo posibilitará el análisis genético de rasgos complejos en la yuca cultivada y silvestres relacionadas y su posterior introgresión en variedades comerciales mediante Ingeniería genética y mejoramiento convencional (Fregene *et al.*, 1997; Jorge *et al.*, 2000; Mba *et al.*, 2001; Akano *et al.*, 2002; Fauquet y Tohme, 2004; Havey, 2004).

El cultivo de tejidos, la ingeniería y los sistemas de transferencia genética se están implementando en yuca para incrementar la resistencia a limitantes bióticos como la mosca blanca y el mosaico africano, el mejoramiento del contenido nutricional, la modificación del metabolismo del almidón y reducción del contenido de cianógenos mediante la inserción de RNA de interferencia de enzimas críticas en su metabolismo. También se han utilizado los transgénicos para aminorar la abscisión de hojas en la planta de yuca después de periodos prolongados de sequía, mediante la introducción de un sistema autoregulatorio de inhibición de la senescencia de las hojas asociado con la expresión del gen de isopentenil transferasa, participante en la ruta de síntesis de citokininas (Taylor *et al.*, 2004).

Otras de las ventajas de la ingeniería genética y la mutagénesis radican en la promoción de tecnología limpia y la eficiencia en la utilización de recursos. Por ejemplo, el almidón de papa waxy, producida por el inserto del gen GBSSI antisentido, produce un gel claro y estable que no requiere de los tratamientos químicos usuales con epóxidos y anhídridos acéticos para aumentar la estabilidad del gel. Sin embargo, a pesar de las ventajas evidentes de los transgénicos, persisten aún dudas sobre la bioseguridad y en muchos países existen políticas restrictivas para su cultivo (Fauquet y Tohme, 2004; Jorgensen *et al.*, 2005).

La utilización de técnicas antisentido para producir nuevos cultivares de yuca presentan ventajas comparativas sobre las mutaciones naturales o inducidas por agentes químicos o físicos, debido al efecto supresor dominante del gen, contrario a lo observado en los mutantes, cuya expresión es generalmente recesiva. Debido a lo anterior, la mutagénesis no había sido la principal herramienta para la identificación genética, ya que las mutaciones carecen de marcas fenotípicas y, por lo tanto, se requiere un gran esfuerzo para aislar el gen afectado, aún después de haberse identificado el fenotipo mutante. Sin embargo, a partir del mejoramiento significativo de la eficiencia en la detección de polimorfismo genético se ha generado un interés creciente en la utilización de mutagénesis para investigación en genómica funcional en los organismos modelo (Munyikwa *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2005).

La principal ventaja de la mutagénesis, con respecto a otras técnicas productoras de variabilidad genética, es que a partir de una misma población irradiada se pueden obtener genotipos con alteraciones en genes muy diversos debido a su acción aleatoria en el genoma de cada unidad irradiada (tallo, semilla, callo, células en suspensión, antera). En arroz, por ejemplo, existen numerosas ventajas producto de la utilización de agentes mutagénicos físicos y químicos para la producción de poblaciones mutantes adecuadas tanto para la genética “delantera” y reversa por la alta densidad de mutaciones producida. Adicionalmente, la técnica proporciona series alélicas amplias que pueden complementar las obtenidas mediante mutagénesis insercional o métodos de transformación de sobre expresión o inhibición (Wu *et al.*, 2005).

Actualmente se están trabajando en proyectos de mejoramiento basados en mutación inducida por rayos gamma en embriones somáticos de yuca, en los que se produjeron variaciones morfológicas en la planta y alteraciones en el rendimiento de raíces, contenido de amilosa y cianógenos (Joseph *et al.*, 2004). También se utilizaron radiaciones ionizantes y en semillas botánicas. La población endo criada obtenida a través de autopolinizaciones (M2) se analizará mediante la técnica TILLING (*targeted induced local lesions in genome*) para identificar cambios en las secuencias genómicas asociadas con la ruta biosintética del almidón. Es de especial importancia la identificación de almidones con características inusuales de almidón, como el tipo ceroso o el azucarado. El análisis molecular se complementará con la caracterización microscópica de los gránulos y las propiedades fisicoquímicas del almidón mediante pruebas espectrofotométricas y de viscosidad (Ceballos *et al.*, 2006). De acuerdo con lo anterior y la experiencia en mutagénesis en otras especies, se presenta un panorama de las enormes posibilidades de la mutación inducida en el mejoramiento integral del cultivo de yuca.

Alcances Del Mejoramiento Basado En Mutagénesis

En la actualidad se ha estandarizado la utilización de radiaciones ionizantes, como rayos X, gamma, neutrones rápidos, haces de iones pesados y mutagénicos químicos como diepoxibutano (DEB) y metilsulfonato de etilo (EMS) para inducir variación. Las mutaciones inducidas se han utilizado para mejorar cultivos mayores de reproducción por semilla como trigo, arroz, cebada, algodón, maní y frijol. A la fecha se han obtenido más de 2250 cultivares directamente de mutantes o derivadas a partir de sus cruzamientos. En las plantas propagadas vegetativamente, muchos de los mutantes se obtuvieron a partir de la irradiación de tallos, hojas individuales y plantas dormantes. La inducción de mutaciones con radiación ha sido el método utilizado con mayor frecuencia en el desarrollo de variedad de mutantes. La principal estrategia en el mejoramiento basado en mutación ha sido la utilización de variedades bien adaptadas en las que se han alterado uno o dos rasgos mayores, que limitan su productividad o incrementan su valor cualitativo. En muchas variedades derivadas de mutación, el cambio en los rasgos ha sido el resultado de efectos sinérgicos en el aumento del rendimiento, calidad del cultivo, mejoramiento de las entradas agronómicas, rotación del cultivo y aceptación del consumidor (Ahloowalia *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005; Otani *et al.*, 2006).

La mutagénesis se ha combinado con otras herramientas de tecnología de punta para incrementar la masificación de la técnica y disminuir la pérdida de material por efectos deletéreos de los agentes mutagénicos. Por ejemplo, la irradiación de plantas *in vitro* facilita el tratamiento de poblaciones grandes; adicionalmente se disminuye el índice de letalidad al minimizar la dosis de radiación requerida normalmente en órganos o plantas completas.

La mutación de polen antes de la polinización también se ha implementado en diversos cultivos como *Eucalyptus globulus*, con resultados en la variabilidad en el tiempo de floración, tolerancia al frío y a la salinidad, lignificación y otros rasgos de importancia económica (McManus *et al.*, 2006). Por otro lado, los mutantes meióticos en papa han sido de especial importancia para estabilizar cruces entre variedades cultivadas y silvestres relacionadas y ofrece alternativas interesantes para otros poliploides polisómicos. Se ha trabajado también en la obtención de plantas apomícticas de *Arabidopsis* que exhiben órganos reproductivos masculinos no funcionales (Koltunow *et al.*, 1995; Peloquin *et al.*, 1999).

Las variedades más recientes de arroz en China se han obtenido a partir del uso combinado de mutagénicos físicos, químicos y cultivo *in vitro*, y constituyen un ejemplo sólido de las posibilidades que existen para la yuca mediante esta estrategia. Uno de los principales adelantos de la mutagénesis es la producción de arroz híbrido a partir del desarrollo de líneas macho estériles y restauradoras. Recientemente se están empleando nuevos agentes mutagénicos y metodologías como haces de iones en condiciones espaciales y cultivo de anteras para la producción rápida de líneas homocigotos derivadas de progenies irradiadas en las que se obtuvieron gran variabilidad en caracteres cuantitativos como productividad, calidad del grano, resistencia biótica y abiótica y caracteres monogénicos como disminución en el contenido de ácido fítico (Kurata *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

La mutagénesis también se ha implementado en estudios de ciencia básica. Por ejemplo, los mutantes de *Arabidopsis* se utilizan en el análisis de genes que determinan la respuesta a las auxinas, citokininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno en el desarrollo de la planta, floración, senescencia, formación del fruto y maduración. Estos mutantes también facilitan el aislamiento, identificación y clonado de genes que podrían ayudar en el incremento del rendimiento, tolerancia al estrés y reducción de las entradas agronómicas. La identificación y análisis de mutantes mediante técnicas moleculares de las huellas dactilares del ADN y el mapeo con marcadores basados en PCR como RAPD, AFLP, STMS, mutantes etiquetados y TILLING, constituyen una nueva dimensión en la tecnología genética (Ahloowalia y Maluszynski, 2001; Feng y Mundi, 2006).

Principales Técnicas Para La Detección Y Análisis De Mutantes:

En plantas, los dos métodos más comunes para producir mutaciones de reducción de función son la supresión antisentido de ARN y la mutagénesis insercional. Una fuerte limitación de las técnicas yace en que la supresión antisentido del ARN requiere conocimiento previo del funcionamiento del gen objetivo y la mutagénesis insercional ocurre a baja frecuencia por genoma (McCallum *et al.*, 2000). Contrariamente, los agentes mutagénicos alquilantes producen densidades altas de mutaciones puntuales, pero la identificación molecular de genotipos mutantes inducidos dentro de una población tiene un grado elevado de dificultad. Estudios iniciales de caracterización como la amplificación de huellas dactilares (DAF) permitió la diferenciación molecular entre el mutante "Tifway" y el parental no irradiado de *Cynodon*, aunque requirió un análisis adicional exhaustivo con 81 cebadores.

Se han desarrollado otras técnicas para la detección molecular de mutantes inducidos como el análisis de polimorfismo de un solo nucleótido que, aún a pesar de la información adicional requerida sobre la posición de la mutación, es de difícil detección en genomas largos. Recientemente se han implementado numerosas técnicas para lograr la identificación de la mutación y la ubicación del gen defectuoso en el genoma alguno de las cuales resultan de la combinación de múltiples técnicas moleculares que las convierte en metodologías complicadas y de difícil análisis. Por ejemplo, la digestión por endonucleasas múltiples de plantillas de ADN o productos de amplificación. La metodología PRS (PCR-RF-SSCP) combina las técnicas de cortes en la secuencia polimórfica amplificada (CAPS) y polimorfismo conformacional en hebra individual (SSCP), no requiere secuenciación previa y se ha utilizado en análisis de polimorfismo de ADN para resistencia a estreses bióticos y mapeo genético de plantas (Sato y Nishio, 2003). Metodologías similares como microsatélites (SSR) y sitios de secuencia identificada (STS) se han utilizado en arroz para caracterizar y localizar el gen causante de la mutación del enrollamiento de la hoja (Changjie *et al.*, 2006).

El TILLING es una de las técnicas de análisis de alta eficiencia de mutaciones puntuales que combina la alta densidad de mutaciones puntuales obtenidas por los métodos de inducción de mutagénesis con un análisis dirigido a los genes de interés, pues se requiere la secuencia previa de los genes cuyo polimorfismo se desea evaluar. La técnica puede ser tan eficiente que se utilizó en *Lotus japonicus* para evaluar miles de individuos de progenies de plantas mutagenizadas para múltiples genes asociados con el metabolismo general y la morfología de la planta. También se ha utilizado para estudios de mutantes inducidos por EMS en papa, arroz, maíz y *Arabidopsis*. El análisis de polimorfismo puede realizarse por cromatografía líquida desnaturalizante o por digestión de endonucleasas como CELI (McCallum *et al.*, 2000; Zeevaart, 2001; Henikoff y Comai, 2003; Perry *et al.*, 2003; Henikoff *et al.*, 2004; Till *et al.*, 2004).

Posibilidades Del Mejoramiento De Yuca Basado En Mutación Inducida

El mejoramiento a partir de mutagénesis inducida de las características fisiológicas y la solución a las principales constricciones del mejoramiento de la yuca presentan excelentes posibilidades. En yuca, a diferencia de otros cultivos, se ha encontrado correlación altamente significativa entre fotosíntesis neta y rendimiento de raíces secas, lo cual sugiere que la selección de parentales con alta fotosíntesis puede llevar a la obtención de rendimientos altos, si se combina con otros criterios de selección como duración del área foliar, índice de cosecha y potencia del vertedero elevados (De Tafur *et al.*, 1997; El-Sharkawy y Cadavid, 2002; Ceballos *et al.*, 2004; 2006; Lenis *et al.*, 2006). El incremento en la relación fuente vertedero por mutagénesis requeriría un proceso de mutación secuencial para modificar simultáneamente el metabolismo de la fuente, incrementar la eficiencia en el transporte de fotoasimilados y la potencia del vertedero. El proceso de mutagénesis secuencial se ha realizado con éxito en arroz; mientras que la irradiación *in vitro* en plantas de papa aumentó la capacidad del vertedero y la irradiación cíclica en cultivo *in vitro* de yuca ocasionó modificaciones del rendimiento y la composición del almidón (Chen *et al.*, 2006; Otani *et al.*, 2006).

De acuerdo con la panorámica de la fisiología de yuca, el incremento en la actividad de las enzimas PEPC, RUBISCO y PPK que controlan el flujo de carbono en las plantas aumentará la eficiencia de la fuente, mientras se mantenga la fotosíntesis neta. En trabajos de ingeniería genética, la transferencia de genes de la fotosíntesis de maíz hacia arroz, y en soya la inducción de mutantes en el contenido de RUBISCO mediante rayos gamma, han arrojado resultados en el aumento del rendimiento (Sage, 2004). Por otro lado, además de la modificación de las enzimas clave de la fijación del carbono, se requieren modificaciones simultáneas en otras enzimas relacionadas con la capacidad de la fuente y el transporte al vertedero. Por ejemplo, variaciones en las características cinéticas de algunas enzimas clave relacionadas con la síntesis de sacarosa, como la sacarosa fosfatotransferasa, para disminuir el efecto inhibitorio de la concentración citosólica de sacarosa; incremento en la expresión o actividades de transportadores asociados al simporte sacarosa-H⁺ en la carga del floema y la sintetasa de la sacarosa o invertasa ácida para incrementar la eficiencia de la descarga en el floema en el vertedero (Hopkins y Hüner, 2004).

A pesar de que la longevidad foliar presenta elevada heredabilidad, podría incrementarse también mediante mutagénesis si se obtienen mutantes de yuca ortólogos a los mutantes insensibles al etileno y a ABA *etr1-1*, *ein2* y *axr2* de *Arabidopsis* (Nishimura *et al.*, 2004; Barrero *et al.*, 2005; Rashotte *et al.*, 2005; Stepanova y Alonso, 2005). Se ha determinado también que el deterioro fisiológico Postcosecha (PPD) en yuca está relacionado con la actividad de ATPasas, peroxidadasas y lipooxigenasas, lo cual sugiere que mutaciones que disminuyan la cinética michaeliana de los complejos enzimáticos más activos implicados en el deterioro poscosecha pueden retrasar su proceso (Isamah, 2004). Por otro lado, aunque el sector industrial requiere la yuca con alto contenido de materia seca, este rasgo está correlacionado positivamente con PPD (Sánchez *et al.*, 2006). Mediante mutagénesis podría disociarse la relación entre materia seca y deterioro fisiológico.

La producción por mutagénesis de almidones con características modificadas en arroz, papa y otros cultivos, son muy prometedores para la yuca e implicarían alteraciones en la composición del almidón, tamaño del gránulo, nivel de fosforilación, grado de ramificación y longitud de las cadenas de amilopectina.

Las modificaciones en el contenido de almidón en las raíces podrían estar asociadas con cambios en la actividad de ADP glucosa pirofosforilasa o fosfoglucomutasa plastidial (Smith, 2005). La inhibición en la expresión de la enzima sintetasa del almidón ligada al gránulo (GBSSI) y actividades variables de la enzima sintetasa del almidón soluble (SSII) en genotipos M2 podrían producir genotipos waxy con longitudes diversas en las ramificaciones de la amilopectina, de manera similar a lo observado en papas transgénicas (Denyer *et al.*, 2001). El cambio en el tamaño de los gránulos podría estar asociado con alteraciones en el contenido o expresión de las isoamilasas 1 ó 2 (Jobling, 2004). La identificación de estos mutantes puede realizarse mediante análisis sistemático por microscopía óptica o electrónica, analizador rápido de la viscosidad RVA (Bao y Corke, 2002) y la caracterización bioquímica y molecular mediante *western blot* y TILLING (Dauvillée *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2003).

La mutagénesis inducida también ha sido efectiva para el mejoramiento de la calidad nutricional de los cultivos, especialmente en yuca. Las constricciones nutricionales de las raíces constituyen el principal limitante de su contribución a la seguridad alimentaria de los países tropicales (Fauquet y Tohme, 2004). En arroz se ha obtenido mediante mutación la disminución del ácido fítico, y en lino, canola y girasol se ha logrado la modificación en la composición de ácidos grasos; estos hallazgos son prometedores en la posibilidad de producción de yucas libres de cianógenos (Ahloowalia *et al.*, 2004; Joseph *et al.*, 2004; Kurata *et al.*, 2005; Chen, *et al.*, 2006).

Se han identificado poblaciones de mutantes con variabilidad en las características de resistencia a estreses bióticos y abióticos en muchos cultivos como arroz, papa, lechuga, *Lotus japonicus* y *Medicago trunculata*, *Catharanthus roseus*, entre otros se plantea la posibilidad de obtener fuentes de resistencia adicional para las principales constricciones bióticas que afectan a la yuca, gracias a la mutación (Anderson *et al.*, 1996; Kowalski y Cassells, 1999; Nagata *et al.*, 1999; Rai, 2001; Dita *et al.*, 2006). También se puede avanzar en el conocimiento de la resistencia al ataque de patógenos en el genoma de yuca, como se ha logrado en tomate mediante el mapeo para resistencia a enfermedades mediante delección por mutación (Liharska *et al.*, 2004).

Otras características de interés para los programas de mejoramiento de yuca que podrían obtenerse a través de mutagénesis son la obtención de frutos partenocárpicos, como los observados en la generación irradiada (M1) de plantas de tomate derivadas de semillas botánicas sometidas a iones de carbono y helio (Masuda *et al.*, 2004); detección de componentes individuales alterados en la ruta de la apomixis, similares a los observados en mutantes derivados de semillas irradiadas de *Arabidopsis* (Koltunow *et al.*, 1995) y modificaciones en las características de la diferenciación floral que faciliten su manipulación, de manera similar a lo obtenido en *Eucalyptus* mediante rayos gamma (McManus *et al.*, 2006).

De acuerdo con los trabajos realizados en diversos cultivos y a las características intrínsecas a la genética de yuca, se sugiere que para implementar programas exitosos de mejoramiento genético basados en mutación, se requerirá la exposición de un grupo grande de semillas, polen, tallos o vitro plantas a diferentes agentes mutagénicos con dosis estandarizadas de acuerdo al tipo de material vegetal. Además se requiere la evaluación de la sensibilidad frente a la mutación de variedades élite altamente adaptadas a diversas zonas productivas con el objetivo de identificar los genomas más sensibles a modificaciones por inserción/delección (INDELS) y polimorfismo en un solo nucleótido (SNPs), es decir, en los que se observan la mayor densidad de mutación bajo dosis no letales y que ocasionen disminuciones en la fertilidad poco significativas. En el caso de arroz y *Lotus japonicus*, se requirió la evaluación de un promedio de 40,000 plantas M2 para detectar genotipos mutantes en genes involucrados en una amplísima gama de procesos metabólicos y del desarrollo (Perry *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005).

Por otro lado es muy importante la identificación de genotipos M1 con modificaciones morfológicas y del metabolismo para obtener a partir de ellas un mayor número de líneas M2, pues la evaluación morfológica en M1 se considera un indicador de la densidad de mutación (Wu *et al.*, 2005). Aunque el porcentaje de transmisión a la progenie sea bajo, las probabilidades de penetrancia y expresividad de la modificación

será superior en estos genotipos. Finalmente, se requiere enfatizar que la realización de análisis exclusivos de las propiedades del almidón en la población M1 y M2 sería subestimar el alcance de la metodología. Se recomienda realizar en la población M2 evaluaciones de sensibilidad a las constricciones bióticas y abióticas y cambios en el desarrollo general de la planta simultáneamente a las propiedades del almidón.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a COLCIENCIAS, fondo “apoyo a los Doctorados Nacionales”, por la financiación durante la preparación del manuscrito.

Referencias Bibliográficas

Aerni, P. 2006. Mobilizing science and technology for development: The case of the cassava biotechnology network (CBN). *AgBioForum* 9(1):1-14.

Ahloowalia, B; Maluszynski, M. 2001. Induced mutations. A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118:176-173.

Ahloowalia, B.; Maluszynski, M.; Nichterlein, K. 2004. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135:187-204.

Akano, A.; Dixon, A.; Mba, C.; Barrera, E.; Fregene, M. 2002. Genetic mapping of a dominant gene conferring resistance to cassava mosaic disease. *Theor. Appl. Genet.* 105(4):521- 525.

Anderson, P. ; Okubara, P.; Arroyo-García, R.; Meyers, B.; Michelmore, R. 1996. Molecular analysis of irradiation-induced and spontaneous deletion mutants at a disease resistance locus in *Lactuca sativa*. *Mol. Gen. Genet.* 251(3):316-325.

Baguma, Y. 2004. Regulation of starch synthesis in cassava. *Acta universitatis Agriculturae Sueciae, Agraria* 478. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. 46 p.

Bao, J.; Corke, H. 2002. Analysis of the genetic behavior of some starch properties in indicarice (*Oryza sativa* L.): Thermal properties, gel texture, swelling volume *Theor. Appl. Genet.* 104:408-413.

Barrero, J.; Piqueras, P.; González-Guzmán, M.; Serrano, R.; Rodríguez, P.; Ponce, M.; Micol, J. 2005. A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J. Exp. Bot.* 56(418):2071-2083.

Ceballos, H.; Iglesias, C.; Pérez, J.; Dixon, A. 2004. Cassava breeding: Opportunities and challenges. *Plant Mol. Biol.* 56(4):503-516.

Ceballos, H.; Fregene, M.; Lentini, Z.; Sánchez, T; Puentes, Y.; Pérez, J.; Rosero, A.; Tofino, A. 2006. Development and identification of high-value cassava clones. *Acta Hort.* 703:63-70.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 2005. Project IP3, Improved cassava for the developing world. Annual Report. Cali, Colombia.

Changjie, Y. ; Song, Y.; Zhengqiu, Z.; Guohua, L.; Jufei, L.; Minghong, G. 2006. Genetic analysis and gene fine mapping for a rice novel mutant (*rl 9(t)*) with rolling leaf character. *Chinese Science Bull.* 51(1):63-69.

Chen, X.; Liu, X.; Wu, D.; Shu, Q. 2006. Recent progress of rice mutation breeding and germplasm enhancement in China. *Plant Mutation Rep.* (1):1, 4-7.

Cheng, T. 1999. The structural, biochemical, and genetic characterization of a new radiation-induced, variegated leaf mutant of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. A soybean leaf variegated mutant. Proc. Natl. Sci. Counc. ROC (B), 23(1):27-37.

Dauvillée, D; Colleoni, C.; Mouille, G.; Buléon, A.; Gallant, D.; Bouchet, B.; Morell, M.; D'Hulst, C.; Myers, A.; Ball, S.; 2001. Two loci control phytylglycogen production in the monocellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol., 125(4):1710-1722.

Denyer, K.; Johnson, P.; Zeeman, S.; Smith, A. 2001. The control of amylose synthesis. J. Plant Physiol. 158:479-487.

De Tafur, M.; El-Sharkawy, M.; Cadavid, L. 1997. Photosynthesis and yield performance of cassava in seasonally dry and semiarid environments. Photosynthetica 33(2):249- 257.

Dita, M.; Rispaill, N.; Prats, E.; Rubiales, D.; Singh, K. 2006. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. Euphytica 147(1):1-24.

El-Sharkawy, M.; Cadavid, L. 2002. Response of cassava to prolonged water stress imposed at different stages of growth. Exp. Agric., 38:333-350.

FAO/FIDA (Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola/ Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2000. La economía mundial de la yuca: Hechos, tendencias y perspectivas. Roma, Italia. 60 p.

Fauquet, C.; Tohme, J. 2004. The global cassava partnership for genetic improvement. Plant Mol. Biol. 56(4):5-10.

Feng, C.; Mundy, J. 2006. Gene discovery and functional analyses in the model plant *Arabidopsis*. Journal of Integrative Plant Biology 48(1):5-14.

Fernández, M.; Tezara, W.; Rengifo, E. 2002. Lack of downregulation of photosynthesis in a tropical root crop, cassava, grown under an elevated CO₂ concentration. Functional Plant Biology 29(7):805-814.

Fregene, M.; Angel, F.; Gómez, R; Rodríguez, F.; Chavarriaga, P.; Roca, W.; Tohme, J.; Bonierbale, M. 1997. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Theor. Appl. Genet. 95(3):431-441.

Fregene, M.; Okogbenin, E.; Mba, C.; Angel, F.; Suárez, M.; Gutiérrez, J.; Chavarriaga, P.; Roca, W.; Bonierbale, M.; Tohme, J. 2001. Genome mapping in cassava improvement: Challenges, achievements and opportunities. Euphytica. 120(1):159-165.

Havey, M. 2004. Application of genomic technologies to crop plants: Opportunities and challenges. Crop Sci. 44:1893-1895.

Henikoff, S; Comai, L. 2003. Single nucleotide mutations for plant functional genomics. Ann. Rev. Plant Biol. 54:375-401.

Henikoff, S.; Till, B.; Comai, L. 2004. TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. Plant Physiol. 135:1-7.

Hopkins, W; Hüner, N. 2004. Introduction to plant physiology. John Wiley & Sons, Inc., New York. 560 p.

Isamah, G. 2004. ATPase, peroxidase and lipoxygenase activity during post-harvest deterioration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root tubers. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 54(4):319-323.

James, D.; Dooner, H. 1990. Isolation of EMS-induced mutants in *Arabidopsis* altered in seed fatty acid composition. *Theor. Appl. Genet.* 80:241-245.

Jobling, S. 2004. Improving starch for food and industrial applications. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:210-218.

Jorge, V.; Fregene, M.; Duque, M.; Bonierbale, M.; Tohme, J.; Verdier, V. 2000. Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava. *Theor. Appl. Genet.* 101(5):862-865.

Jorgensen, K.; Bak, S.; Kamp Busk, P.; Sorensen, C.; Olsen, C.; Puonti-Kaerlas, J.; Moller, B. 2005. Cassava plants with a depleted cyanogenic glucoside content in leaves and tubers. Distribution of cyanogenic glucosides, their site of synthesis and transport, and blockage of the biosynthesis by RNA interference technology. *Plant Physiol.* 139:363-374.

Joseph, R.; Yeoh, H.; Loh, S. 2004. Induced mutations in cassava using somatic embryos and the identification of mutant plants with altered starch yield and composition. *Plant Cell Rep.* 23:91-98.

Koltunow, A.; Bicknell, R.; Chaudhury, A. 1995. Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiol.* 108:1345-1352.

Kowalski, B.; Cassells, A. 1999. Mutation breeding for yield and *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary foliar resistance in potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Golden Wonder) using computerized image analysis in selection. *Potato Res.*, 42(1):121-130.

Kurata, N.; Miyoshi, K.; Nonomura, K.; Yamazaki, Y.; Ito, Y. 2005. Rice mutants and genes related to organ development, morphogenesis and physiological traits. *Plant Cell Physiol.* 46(1):48-62.

Lenis, J.; Calle F.; Jaramillo G.; Pérez J.; Ceballos, H.; Cock, J. 2006. Leaf retention and cassava productivity. *Field Crops Res.* 95(2-3):126-134.

Liharska, T.; Hontelez, J.; Van Kammen, A.; Zabel, P.; Koornneef, M. 1997. Molecular mapping around the centromere of tomato chromosome 6 using irradiation induced deletions. *Theor. Appl. Genet.* 95(5-6):969-974.

Lin, Y.; Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29(6):627-642.

McManus, L.; Sasse, J.; Blomstedt, C.; Bossinger, G. 2006. Pollen treatment for mutation induction in *Eucalyptus globulus* ssp. *Globules* (Myrtaceae). *Aust. J. Bot.* 54(1):65-71.

Magnaghi, A. 2005. Local self-sustainable development: Subjects of transformation. *Tailoring Biotechnologies* 1(1):79-102.

Mba, C.; Stephenson, P.; Edwards, K.; Melzer, S.; Nkumbira, J.; Gullberg, U.; Apel, K.; Gale, M.; Tohme, J.; 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(1):21-31.

- Masuda, M.; Agong, S.; Tanaka, A.; Shikazono, N.; Hase, Y. 2004. Mutation spectrum of tomato induced by seed radiation with carbon and helium ion beams. *Acta Hort.* (ISHS) 637:257-262.
- McCallum, C.; Comai, L.; Greene, E.; Henikoff, S. 2000. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant Physiol.* 123:439-442.
- Munyikwa, T.; Langeveld, S.; Salehuzzaman, S.; Jacobsen, E.; Visser, R. 1997. Cassava starch biosynthesis: A new avenues for modifying starch quantity and quality. *Euphytica* 96:65-75.
- Nagata, T.; Todoriki, S.; Hayashi, T.; Shibata, Y.; Mori, M.; Kanegae, H.; Kikuchi, S. 1999. α -Radiation Induces leaf trichome formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 120:113-119.
- Nishimura, N.; Yoshida, T.; Murayama, M.; Asami, T.; Shinozaki, K.; Hirayama, T. 2004. Isolation and characterization of novel mutants affecting the abscisic acid sensitivity of *Arabidopsis* germination and seedling growth. *Plant Cell Physiol.* 45(10):1485-1499.
- Otani, M.; Saito, H.; Abe, T.; Shimada, T. 2006. Induction of mutations in sweetpotato plants by heavy-ion beam irradiation. *Acta Hort.* (ISHS) 703: ISHS Acta Horticulturae 703:171-174.
- Peloquin, S.; Boiteux, L.; Carputo, D. 1999. Anecdotal, historical and critical commentaries on genetics. *Genetics* 153:1493-1499.
- Perry, J.; Wang, T.; Welham, T.; Gardner, S.; Pike, J.; Yoshida, S.; Parniske, M. 2003. A TILLING reverse genetics tool and a web- accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 131:866-871.
- Poosaran, N.; Heyes, R.; Rogers, P. 1985. Ethanol production from cassava starch using a highly productive strain of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602. *Biomass* 7(3):171-183.
- Puentes, Y.; Barrera, E.; Chavarriaga, P.; Fregene, M. 2003. Aislamiento y clonación del gen GBSSI para la producción de almidón tipo waxy en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Fitotecnia Colombiana* 3(2):31-37.
- Rai, S., 2001. Pleiotropic morphological and abiotic stress resistance phenotypes of the hyperabscisic acid producing Abo-mutant in the periwinkle *Catharanthus roseus*. *J. Biosci.* 26(1):57-70.
- Rashotte, A.; Chae, H.; Maxwell, B.; Kieber, J. 2005. The interaction of cytokinin with others signals. *Physiol. Plant.* 123:184-194.
- Sage, R. 2004. The evolution of C4 photosynthesis. *New Phytol.* 161:341-370.
- Sánchez, T.; Chávez, A. ; Ceballos, H.; Rodríguez- Amaya, D.; Nestel, P.; Ishitani, M. 2006. Reduction or delay of post-harvest physiological deterioration in cassava roots with higher carotenoid content. *Journal of the Food and Agriculture* 86(4):634-639.
- Sarathi Reddy, V.; Basappa, S. 1996 Direct fermentation of cassava starch to ethanol by mixed cultures of *Endomycopsis fibuligera* and *Zymomonas mobilis*: Synergism and limitations. *Biotech. Letters* 18(11):1315-1318.
- Sato, Y.; Nishio, T. 2003. Mutation detection in rice waxy mutants by PCR-RF-SSCP. *Theor. Appl. Genet.* 107:560-567.

Sautter, C.; Poletti, S.; Zhang, P.; Gruissem, W. 2006. Biofortification of essential nutritional compounds and trace elements in rice and cassava. *Proceedings of the Nutritional Society*. 65(2):153-159.

Scott, G; Rosegrant, M.; Ringler, C. 2000. Tendencias y proyecciones para los cultivos de raíces y tubérculos para el año 2020. *Alimentos, Agricultura y Medio Ambiente*. Documento de discusión IFPRI-CIP. Washington, DC.

Shen, Y.; Gao, M.; Cai, Q. 1994. A novel environmental- induced genic male sterile (EGMS) mutant in indica rice. *Euphytica* 76:89-96.

Schuurman, F. 2005. Globalization and development research: some contentious Issues. *Tailoring biotechnologies* 1(1):65-78.

Smith, A. 2005. How plants make and degrade starch granules. In: *Proceedings of 3rd Conference on starch technology* 7-13. 4-5 November. Bangkok, Thailand.

Stepanova, A.; Alonso, J. 2005. Ethylene signaling and response pathway: A unique signaling cascade with a multitude of inputs and outputs. *Physiol. Plant.* 123:195-206.

Taylor, N.; Chavarriaga, P.; Raemakers, K.; Siritunga, D.; Zhang, P. 2004. Development and application of transgenic technologies in cassava. *Plant Mol. Biol.* 56(4):671- 688.

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.

Till, B.; Reynolds, S.; Weil, C.; Springer, N.; Burtner, C.; Young, K.; Bowers, E.; Codomo, C.; Enns, L.; Odden, A.; Greene, E, Comai, L.; Henikoff, S. 2004. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biology* 4:12.

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 Molec. Biol.* 59:85-97.

Zeevaart, J. 2001. Functional genomics. *Meetings of the American Society of Plant Biologists and the Canadian Society of Plant Physiologists*. *The Plant Cell*, 13:2165- 2173.