



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# Identificación, selección y caracterización genética de genotipos de *Manihot esculenta* Crantz, por tolerancia al deterioro fisiológico pos-cosecha

**Jorge Luis Luna Meléndez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Maestría en Ciencias Agrarias Línea de Investigación  
Fitomejoramiento  
Palmira, Colombia  
2016



# Identificación, selección y caracterización genética de genotipos de *Manihot esculenta* Crantz, por tolerancia al deterioro fisiológico pos-cosecha

**Jorge Luis Luna Meléndez**

Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Agrarias Línea de Investigación en Fitomejoramiento**

Directores:

Biólogo, M Sc., Ph. D. Luis Augusto Becerra Lopez-Lavalle  
Centro Internacional de agricultura Tropical

Zoot. M Sc. Ph.D. Sanín Ortiz Grisales  
Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira

Ing. Bio-Industria, Ph. D. Dominique Gabriel Alain Dufour  
French Agricultural Research Centre for International Development  
Centro Internacional de Agricultura Tropical

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Maestría en Ciencias Agrarias Línea de Investigación  
Fitomejoramiento  
Palmira, Colombia  
2016





UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS  
LINEA DE INVESTIGACIÓN FITOMEJORAMIENTO

En Palmira a los 21 días del mes de noviembre de 2016, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los investigadores **WILMER JOSÉ CUÉLLAR** y **FRANCO ALIRIO VALLEJO CABRERA**.

Para calificar la Tesis de Grado de:

**JORGE LUIS LUNA MELÉNDEZ**

Titulada:

"Identificación, selección y caracterización genética de genotipos de *Manihot esculenta* Crantz por tolerancia al deterioro fisiológico poscosecha" bajo la dirección del Doctor Sanín Ortíz Grisales y la codirección de los investigadores Luis Augusto Becerra y Dominique Dufour.

Después de terminada la sustentación, el jurado evaluador compuesto por los investigadores **WILMER JOSÉ CUÉLLAR** y **FRANCO ALIRIO VALLEJO CABRERA**, mediante deliberación privada decidieron calificar la tesis como:

APROBADA

REPROBADA

WILMER JOSÉ CUÉLLAR

FRANCO ALIRIO VALLEJO CABRERA

*La vida gira en torno a una constante evolución, que esta mediada por características únicas de cada ser; la expresión de esas características, depende de pequeñas unidades de información denominadas genes, responsables directos de la transformación día a día del mundo en que habitamos.*

*A mis padres Luis Enrique Luna y Rubiela Meléndez*

*A mi esposa adorada Maria Del Mar Mendez*

*A mi hermano Miguel Enrique Luna Meléndez*

*A la memoria de mis seres queridos quienes mientras recorría este camino partieron de este mundo: mis abuelos Sabina Luna y Jubencio Meléndez, mi tía Maria Bertilda Gómez y mi tío Hobert Meléndez, ejemplos de vida.*

*La población mundial crece a gran escala, requiriendo la producción de alimentos en masa y la forma de lograrlo es a través del mejoramiento genético.*

## Agradecimientos

Gracias a Dios por ser la energía que me fortalece y me permite caminar por el sendero de la vida

Gracias a la Universidad Nacional de Colombia, al Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIRAD y RTB, instituciones que me han permitido emprender este camino como investigador y han puesto en mis manos los recursos necesarios para culminar esta etapa de mi vida profesional.

Doctor Luis Augusto Becerra López-Lavalle, líder del programa de yuca y Laboratorio de Genética de yuca en CIAT, Doctor Dominique Dufour Líder pos cosecha de yuca y laboratorio de calidad pos cosecha y Doctor Sanin Ortiz Profesor Asociado Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Gracias por la dirección y apoyo brindado en el transcurso de esta investigación, tanto desde el punto de vista humano, técnico y científico.

A Teresa Sánchez por haber compartido conmigo sus conocimientos y haberme brindado el apoyo necesario, para cumplir mis objetivos de investigación.

Al Doctor Soroush Parsa y Jaime Vargas por su colaboración y acompañamiento en los ensayos realizados.

Al equipo de calidad pos cosecha, Mónica Pizarro, Alejandra Ospina, Jhon Larry Moreno, Andres Escobar, William Triviño, John Belalcazar, Yolanda Ramirez, Lisimaco Alonso quienes de una u otra forma contribuyeron al logro de mis objetivos, brindándome su apoyo incondicional.

Al equipo de genética de yuca, Tatiana Ovalle, Katherine Castillo, Claudia Perea, Adriana Álzate.

Al equipo de mejoramiento de yuca en cabeza del Doctor Hernán Ceballos, Fernando Calle, Sandra Salazar, Nelson Morante, Ximena Moreno, Geovany Fernandez, Luis Giraldo Quinayas, Jeferson, Omar (Q.E.P.D).

Al equipo de calidad nutricional, Moralba Dominguez, Angelica Jaramillo, Gerver Patño, Luis Fernando Londoño.

A mi esposa Maria del Mar Mendez por su amor, dedicación, colaboración y comprensión en esta etapa tan importante en mi vida.

A todas aquellas personas que compartieron conmigo diferentes momentos en el transcurso de este camino, y tienen un espacio especial en mi vida, mis padres Luis Enrique Luna, Rubiela Meléndez, mi hermano, Miguel Enrique Luna, mi tía Alba Lucia Gómez, mis amigas Ginna Alejandra Ordoñez y Magda Piedad Valdez.





## Resumen

La yuca es un alimento básico en países tropicales, contribuyendo a la seguridad alimentaria de los mismos; aunque es un cultivo de poca exigencia agronómica, sus raíces tienen una vida útil corta, ocasionada por el deterioro fisiológico pos cosecha (DFP). En efecto se estudió el comportamiento del (DFP), en raíces de *Manihot esculenta* Crantz, pertenecientes a las familias, GM3732, GM3736, CPDCR1B y CPDCR5B; las dos primeras presentan variabilidad en el contenido de carotenoides y materia seca (MS). Mientras que las dos últimas segregantes de *M. walkerae* con variabilidad en términos de DFP, MS y peso promedio de raíz. El objetivo de estudio fue Identificar, seleccionar y caracterizar genotipos de *Manihot esculenta* Crantz por tolerancia al (DFP). Se realizaron 8 ensayos entre los años 2013, 2014 y 2015, para evaluar las familias descritas, durante su cosecha y pos cosecha, realizado en CIAT, Sucre y Villavicencio. Se evaluaron las siguientes características: DFP, MS, ácido cianhídrico (HCN), contenido de escopoletina (ES), contenido total de carotenoides (CTC), beta caroteno (BC) y malondialdehído (MDA). Se realizaron análisis univariado para cada una de las características evaluadas y se diseñó un modelo lineal mixto para explicar el DFP. Correlaciones positivas y significativas fueron encontradas entre DFP y variables como MS y ES; y correlaciones negativas significativas con CTC y BC. Se lograron seleccionar 25 genotipos tolerantes y 24 susceptibles a DFP, cuya caracterización a nivel genético arrojó 1093 SNPs, que permitieron identificar 51 genes con potencialidad a ser marcadores moleculares para el carácter DFP, con sus respectivas composiciones alélicas. El estudio permitió verificar que existe tolerancia al DFP en las familias estudiadas. La fuente de tolerancia en *M. esculenta* (segregante carotenos) reveló 15 genes mientras que las familias segregantes de *M. walkerae* reveló 36 genes involucrados en la tolerancia a DFP.

**Palabras clave:** SNP, genes, tolerante, susceptible, selección, correlación

## Abstract

Cassava is a staple food in tropical countries, contributing to food security; although it is a crop of little agronomic exigency, its roots have a short useful life, caused by the postharvest physiological deterioration (PPD). Indeed, will study the behavior of (PPD), in roots of *Manihot esculenta* Crantz, belonging to the families, GM3732, GM3736, CPDCR1B and CPDCR5B; The first two presents variability in the content of carotenoids and dry matter (DM). While the last two segregants of *M. walkerae* with variability in terms of PPD, MS and root mean weight. The objective of the study was to identify, select and characterize *Manihot esculenta* Crantz genotypes by tolerance to (PPD). Eight trials were carried out between 2013, 2014 and 2015, to evaluate the families described, during their harvest and post-harvest, at CIAT, Sucre and Villavicencio. The following characteristics were evaluated: PPD, MS, hydrocyanic acid (HCN), scopoletin content (SC), total carotenoid content (TCC), beta carotene (BC) and malondialdehyde (MDA). Univariate analysis was performed for each of the evaluated characteristics and a mixed linear model was designed to explain PPD. Positive and significant correlations were found between PPD and variables such as DM and SC; And significant negative correlations with TCC and BC. It was possible to select 25 tolerant genotypes and 24 susceptible to PPD, whose genetic characterization yielded 1093 SNPs, which allowed to identify 51 genes with potential to be molecular markers for the PPD character, with their respective allelic compositions. The study allowed to verify that there is tolerance to PPD in the families studied. The tolerance source in *M. esculenta* (segregating carotene) revealed 15 genes while segregating families of *M. walkerae* revealed 36 genes involved in PPD tolerance.

**Keywords:** SNP, genes, tolerant, susceptible, selection, correlation

# Contenido

	<b>Pág.</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>X</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>20</b>
<b>2. MARCO REFERENCIAL</b> .....	<b>22</b>
2.1 <i>Manihot esculenta</i> Crantz .....	22
2.1.1 Morfología.....	233
2.1.2 Importancia del cultivo de la yuca.....	23
2.1.3 Deterioro pos cosecha en yuca.....	25
2.1.4 Deterioro Fisiológico pos cosecha en yuca (DFP).....	25
2.2 Moléculas involucradas en el deterioro pos cosecha en yuca .....	26
2.2.1 Hidroxicumarinas.....	26
2.2.2 Producción de hidroxicumarinas en yuca .....	27
2.2.3 Carotenoides .....	29
2.2.4 Malondialdehído .....	30
2.3 Marcadores genéticos.....	31
2.3.1 Marcadores Morfológicos.....	311
2.3.2 Marcadores Moleculares .....	31
2.3.3 Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) .....	32
2.3.4 RAD Sequencing.....	34
2.4 Bibliografía.....	35
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>43</b>
1.1 Introducción.....	44
1.2 Materiales y métodos.....	45
1.2.1 Localización .....	45
1.2.2 Material biológico .....	45
1.2.3 Establecimiento de campo .....	45
1.2.4 Cuantificación del contenido de materia seca (MS) .....	45
1.2.5 Cuantificación del contenido de ácido cianhídrico (HCN).....	46
1.2.6 Predicción de carotenos totales (CTC) y $\beta$ -caroteno (BC) por NIRs (Near-infrared spectroscopy) .....	46

1.2.7	Evaluación del Deterioro Fisiológico Pos Cosecha (DFP) .....	47
1.2.8	Cuantificación del contenido de escopoletina (ES) .....	48
1.2.9	Análisis de contenido de malondialdehído (MDA) .....	48
1.2.10	Identificación de SNPs .....	49
1.2.11	Análisis estadísticos .....	50
1.3	Resultados y discusión .....	50
1.3.1	Selección de genotipos .....	50
1.3.2	Caracterización de genotipos con raíces amarillas .....	51
1.3.3	Análisis univariado para las características DFP, MS, HCN, CTC, BC y ES .....	54
1.3.4	Análisis de correlación entre las características DFP, MS, HCN, CTC, BC y ES .....	59
1.3.5	Análisis estadístico de los ensayos realizados y obtención del valor estimativo de DFP .....	60
1.3.6	Selección de genotipos para caracterización genética e identificación de SNPs bialélicos relacionados al DFP .....	63
1.4	Conclusiones .....	70
1.5	Bibliografía .....	71
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>		<b>75</b>
2.1.	Introducción .....	76
<b>2.2 Materiales y métodos .....</b>		<b>77</b>
2.2.1	Localización .....	77
2.2.2	Material biológico .....	77
2.2.3	Establecimiento en campo .....	78
2.2.4	Evaluación pre cosecha .....	78
2.2.5	Evaluación características de cosecha .....	78
2.2.6	Cuantificación de características de interés agroindustrial: MS, HCN, DFP y ES .....	79
2.2.7	Identificación de SNPs .....	79
2.2.8	Análisis estadísticos .....	80
2.3.	Resultados y discusión .....	80
2.3.1.	Selección de genotipos por tamaño de raíz .....	80
2.3.2.	Selección de genotipos por uniformidad en DFP .....	82
2.3.3.	Características de pre cosecha: vigor, altura de la planta, altura primera ramificación, número de ramificaciones, longitud tallo con hojas, número de estacas por planta .....	84
2.3.4.	Características de cosecha: Peso promedio de raíces por planta, peso promedio de raíz, color de raíz, color de pulpa y tamaño de raíz .....	85
2.3.5.	Características de Interés agroindustrial: MS, HCN, DFP y ES .....	85
2.3.6	Análisis de correlación entre las características DFP, MS, HCN y ES .....	88
2.3.7	Análisis estadístico de los ensayos realizados y obtención del valor estimativo de DFP .....	89
2.3.8	Selección de genotipos para caracterización genética e identificación de SNPs bialélicos relacionados al DFP .....	90
2.4.	Conclusiones .....	100
2.5.	Bibliografía .....	100
<b>3. Conclusiones y recomendaciones .....</b>		<b>1033</b>
3.1	Conclusiones .....	1033
3.2.	Recomendaciones .....	1055
<b>A. Anexo: Datos promedios obtenidos del análisis univariado para DFP, HCN, MS, CTC, BC y ES. ....</b>		<b>1077</b>

---

<b>B. Anexo: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente familias GM3732 y GM3736.....</b>	<b>1099</b>
<b>C. Anexo: Análisis de medias con datos de pre cosecha y cosecha en las familias CPDCR1B y CPDCR5B.....</b>	<b>1144</b>
<b>D. Anexo: Datos promedios obtenidos del análisis univariado para DFP, HCN, MS y ES, en las familiasCPDCR1B y CPDCR5B .....</b>	<b>11818</b>
<b>E. Anexo: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente en las familias CPDCR1B y CPDCR5B.....</b>	<b>1199</b>

## Lista de figuras

Figura 0-1. Producción de yuca (millones de toneladas) por continente. Datos oficiales de la FAO, FAOSTAT (2015).....	24
Figura 0-2. Sección transversal de la raíz de yuca (Hunt <i>et al.</i> , 1977) .....	25
Figura 0-3. Estructura básica de cumarinas simples. Escopoletina R3=R4=R5=R8=H, R7= OH, R6=OCH <sub>3</sub> (Tomado de Waksmundzka y Hawryl, 2008). .....	277
Figura 0-4. Hidroxicumarinas identificadas en raíces de yuca (Blagbrough <i>et al.</i> , 2010). .....	27
Figura 0-5. Vía biosintética de fenilpropanoides (Bayoumi <i>et al.</i> , 2008a).....	28
Figura 0-6. Estructura básica de los carotenoides, construida a partir de ocho unidades isoprenoides (International Agency for Research on Cancer, 1998).....	29
Figura 0-7. Estructuras de los principales carotenoides en los alimentos y zeaxantina (Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004) .....	300
Figura 0-8. Ejemplo de polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) y los haplotipos observados en los seis sujetos. Se encontraron cuatro SNPs (A/G, C/T, G/A, y C/G/T), los tres primeros son SNPs bi-alélicos y el último es tri-alélico (Yu Liao y Lee, 2010).....	333
Figura 1-1. Montaje de raíces para evaluación de deterioro fisiológico pos cosecha.....	47
Figura 1-2. Escala de evaluación de deterioro fisiológico pos cosecha.....	48
Figura 1-3. Variabilidad de grupos en términos de CTC y % de materia seca seleccionados en 2013 ..	50
Figura 1-4. Variabilidad de genotipos en términos de MS, HCN, ES, DFP, CTC y BC .....	51
Figura 1-5. Correlaciones entre la producción de MDA y las variables MS, HCN, CTC, BC, DFP y ES .....	53
Figura 1-6. Producción de MDA en los días 0 y 5 de almacenamiento y contenido total de carotenoides por genotipo.....	54
Figura 1-7. Comportamiento de la variable DFP por cada genotipo en las diferentes cosechas.....	55
Figura 1-8 Variabilidad de MS por cada genotipo en las diferentes cosechas.....	56
Figura 1-9. Distribución del contenido de HCN por cada genotipo en las diferentes cosechas .....	57
Figura 1-10. Comportamiento del CTC por cada genotipo en las diferentes cosechas .....	57
Figura 1-11. Distribución del contenido de BC por cada genotipo en las diferentes cosechas .....	58
Figura 1-12. Variabilidad de ES por cada genotipo en las diferentes cosechas .....	59
Figura 1-13 Representación gráfica en FLAPJACK de SNPs Codificantes, con su respectivo genotipo por muestra en el cromosoma 12.....	64
Figura 1-14. Representación gráfica en FLAPJACK de SNPs no sinónimos, con su respectivo genotipo por muestra en el cromosoma 12.....	65
Figura 1-15. Identificación de genes empleando la herramienta JBrowse de Phytozome 11.....	67
Figura 2-1. Esquema de cruzamientos para la obtención de las familias CPDCR1B y CPDCR5B.....	77
Figura 2-2. Variabilidad para la característica tamaño de raíz año 2013 en segregantes de CW429-1 ...	81
Figura 2-3. Variabilidad para la característica DFP año 2013 en segregantes de CW429-1.....	83
Figura 2-4. Análisis de varianza y test de Tukey para la variable vigor para los 4 ensayos .....	84

---

Figura 2-5. Comportamiento de la MS durante los 4 ensayos en segregantes de CW429-1 .....	86
Figura 2-6. Distribución del contenido de HCN durante los 4 ensayos en segregantes de CW429-1 ...	86
Figura 2-7. Variabilidad para la característica DFP en los 4 ensayos en segregantes de CW429-1 .....	87
Figura 2-8. Comportamiento del contenido de ES en los 4 ensayos en segregantes de CW429-1 .....	88
Figura 2-9. Representación gráfica en FLAPJACK de SNPs Codificantes, con su respectivo genotipo por muestra en el cromosoma 14 .....	91
Figura 2-10. Representación gráfica en FLAPJCK de SNPs No Sinónimos, con su respectivo genotipo por muestra en el cromosoma 14 .....	91

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 0-1. Principales países productores de yuca. Datos oficiales de la FAO, FAOSTAT (2015).....	24
Tabla 1-1. Análisis de regresión lineal simple y múltiple entre la variable dependiente DFP y las variables MS, ES, CTC y BC.....	52
Tabla 1-2. Análisis de varianza para la característica DFP por genotipo en familias segregantes en carotenoides.....	55
Tabla 1-3. Análisis de varianza para la característica MS en familias segregantes en carotenoides.....	56
Tabla 1-4. Análisis de varianza para la característica HCN en familias segregantes en carotenoides....	56
Tabla 1-5. Análisis de varianza para la característica CTC en familias segregantes en carotenoides.....	57
Tabla 1-6. Análisis de varianza para la característica BC en familias segregantes en carotenoides.....	58
Tabla 1-7. Análisis de varianza para la característica producción de ES en familias segregantes en carotenoides.....	58
Tabla 1-8. Análisis de correlación de Pearson entre las variables DFP, MS, HCN, CTC, BC y ES.....	60
Tabla 1-9. Análisis de varianza total de ensayos de DFP combinados.....	61
Tabla 1-10. Valor estimado del DFP por genotipo, con su respectivo error estándar y valor t.....	62
Tabla 1-11. Efectos obtenidos a partir del modelo lineal mixto.....	63
Tabla 1-12. Genotipos seleccionados para caracterización genética.....	64
Tabla 1-13. Resumen número total de SNPs codificantes y no sinónimos por cromosoma para las 27 muestras seleccionadas.....	65
Tabla 1-14. Composición alélica por cromosoma con su respectiva proporción en SNPs codificantes.....	66
Tabla 1-15. Composición alélica por cromosoma con su respectiva proporción en SNPs no sinónimos.....	67
Tabla 1-16 Genes con potencialidad a marcadores moleculares.....	68
Tabla 1-17. SNPs y genes involucrados en DFP y su composición en genotipos tolerantes y susceptibles.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 2-1. Genotipos seleccionados por tamaño de raíz comercial mediante análisis univariado.....	82
Tabla 2-2. Genotipos seleccionados por % DFP y peso de raíz.....	83
Tabla 2-3. Análisis de varianza para la característica MS en 4 ensayos en segregantes de CW429-1.....	85
Tabla 2-4. Análisis de varianza para contenido de HCN en 4 ensayos en segregantes de CW429-1.....	86
Tabla 2-5. Análisis de varianza para la característica DFP en 4 ensayos en segregantes de CW429-1.....	86
Tabla 2-6. Análisis de varianza para ES en 4 ensayos en segregantes de CW429-1.....	87
Tabla 2-7. Análisis de correlación de Pearson entre las variables DFP, MS, HCN y ES.....	88
Tabla 2-8 Valor estimado del DFP por genotipo, con su respectivo error estándar y valor t.....	89
Tabla 2-9. Genotipos seleccionados para caracterización genética en segregantes de CW429-1.....	90
Tabla 2-10. Resumen número total de SNPs codificantes y no sinónimos por cromosoma para las 22 muestras seleccionadas.....	92
Tabla 2-11. Composición alélica por cromosoma con su respectiva proporción en SNPs codificantes.....	93



---

Tabla 2-12. Composición alélica por cromosoma con su respectiva proporción en SNPs no sinónimos .....	94
Tabla 2-13. Genes con potencialidad a marcadores moleculares en segregantes de CW429-1 .....	95
Tabla 2-14. SNPs y genes involucrados en DFP y su composición en genotipos tolerantes y susceptibles.....	98

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
DFP	Deterioro fisiológico pos cosecha
ROS	Reactive oxygen species
MDA	Malondialdehído o malonaldehído
ADN	Ácido desoxirribonucleico
SSRs	Secuencias simples repetidas
SNPs	Polimorfismo de un solo nucleótido
RFLPs	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RADP	Ampliación aleatoria de ADN polimórfico
AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
RAD	Restriction site associated DNA sequencing RAD-seq
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
CIAT	Centro internacional de agricultura tropical
MS	Materia seca
HCN	Ácido cianhídrico
CTC	Contenido total de carotenoides
BC	Beta-caroteno
NIRs	Near-infrared spectroscopy
ES	Escopoletina
TCA	Ácido tricloroacético
TBA	Acido 2-tiobarbiturico
BHT	Hidroxitolueno butilado
BGI	Beijin Genomic Institute
NGSEP	Next generation sequencing eclipse plugin
VCA	Variant call format
MAF	Frecuencia del alelo menor
$\mu/g$	Microgramo por gramo
$^{\circ}C$	Grados centígrados
cm	Centímetro
mm	Milímetro
ml	Mililitro
rpm	Revoluciones por minuto
M	Molaridad
nm	Nanómetros
$\mu l$	micro litros
mg/ml	Miligramos por mililitro
$\mu g/ml$	Microgramos por mililitro
ppm	Partes por millón

## Continuación Abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<b>nmol</b>	Nano mol
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>mg</b>	Miligramos
<b>2n</b>	Diploide
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>r^2</math></b>	Coefficiente de determinación
<b>m.s.n.m.</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>A</b>	Adenina
<b>G</b>	Guanina
<b>C</b>	Citosina
<b>T</b>	Timina
<b>p&lt;</b>	Probabilidad menor que
<b>%</b>	Porcentaje
<b>GxE</b>	Genotipo por ambiente
<b>pH</b>	Potencial de hidrogeniones
<b>KCN</b>	Cianuro de Potasio
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>MF</b>	Materia Fresca
<b>F</b>	Fischer
<b>Crom</b>	Cromosoma
<b>Std</b>	Estándar
<b>pb</b>	Pares de bases

# 1. Introducción

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es uno de los alimentos básicos en las zonas tropicales del mundo y su producción juega un papel importante en la seguridad alimentaria a nivel mundial, especialmente en áreas que se encuentran en desarrollo, como África, Asia-Pacífico y América del Sur (Nassar *et al.*, 2007; Montagnac *et al.*, 2009); junto con el maíz, la caña de azúcar y el arroz, constituyen la fuente más importante de energía, en la dieta de la mayoría de los países tropicales del mundo (Ceballos *et al.*, 2011).

El cultivo de la yuca, es un cultivo resistente que se produce bajo condiciones adversas, y un recurso alimenticio seguro en épocas en las que, otros cultivos, han fracasado a causa de las condiciones de crecimiento, como por ejemplo suelos infértiles (Falade y Akingbala, 2011). Este cultivo se ha descrito como una fuente de pocos nutrientes, debido a su bajo contenido y calidad de proteínas (Hahn *et al.*, 1985), y por sus contenidos cianogénicos (Cooke *et al.*, 1981), pero sus raíces contienen de 30 a 40% de materia seca, la cual está constituida hasta en un 85% por almidón (Cock, 1984), éste se emplea como alimento básico en la dieta de gran parte de la población mundial (Casey, *et al.*, 2000). La mayor parte de la producción mundial de yuca es empleada como alimento para consumo humano de forma directa y de forma indirecta como alimento para el ganado (Falade y Akingbala, 2011).

Aunque la yuca es relativamente fácil de cultivar, incluso en suelos pobres y en condiciones de sequía, las raíces presentan una corta vida útil, que está alrededor de uno a tres días, ocasionado por el deterioro fisiológico pos cosecha (DFP), que puede generar pérdidas económicas significativas, esto sucede entre dos a tres días después de cosecha, cuando las raíces presentan un rayado vascular de color azul oscuro, confiriendo características no palatables e incomedibles, afectando significativamente el valor económico del cultivo (Bayoumi *et al.*, 2008a), generando posibilidades de producción limitadas y reduciendo el tiempo de transporte y almacenamiento de las raíces. El DFP en yuca está relacionado con el escarificado de las capas de la peridermis, esclerénquima y parénquima cortical, hasta dejar expuesto el parénquima de almacenamiento causado por el daño mecánico durante la cosecha (Huang *et al.*, 2001).

Además el DFP depende del cultivar y de las condiciones ambientales, es un proceso puramente fisiológico, aunque puede aparecer subsecuentemente por deterioro microbiológico (Reilly *et al.*, 2003). Los síntomas desarrollados por el DFP son exhibidos por un rayado azul oscuro del tejido vascular, oclusiones de color marrón, y formación de depósitos químicos en las regiones donde se han generado heridas al xilema de la raíz, generando la decoloración del parénquima de almacenamiento, acompañado de un sabor y olor desagradable (Reilly *et al.*, 2001, 2007). Estas características observables del DFP, es acompañado por compuestos fluorescentes que son observados sometiendo el parénquima de la raíz bajo luz ultravioleta y han sido identificados como hidroxycumarinas, dichos compuestos son conocidos como scopolin, scopoletin y esculin (Buschmann, *et al.*, 2000a), siendo el scopoletin el compuesto de mayor fluorescencia (Rickard, 1982) y se encuentra ausente o presenta baja incidencia en raíces frescas.

Se han reportado estudios, en los que se han empleado clones de yuca mejorados por contenido de carotenoides, con un promedio de contenido total de carotenoides de 10µg/g, en los que después de 20 y 40 días, no se presentó daño alguno por DFP en raíces enteras (Morante *et al.*, 2010), que puede ser

explicado por las propiedades antioxidantes de los carotenoides, ya que el DFP es básicamente un proceso oxidativo (Reilly *et al.*, 2003).

Desafortunadamente la variabilidad genética para la característica del DFP es limitada en *Manihot esculenta*, por lo tanto se han intentado cruzamientos interespecíficos con otras especies de *Manihot* con el propósito de realizar la introgresión de alelos útiles (Ceballos *et al.*, 2004). En este sentido Fregene *et al.*, (2004) reporto una nueva fuente de genes que produce una rápida disminución al DFP, identificada en un híbrido interespecífico llamado CW429-1, obtenido mediante el cruzamiento entre la yuca cultivada y la especie silvestre *Manihot walkerae*. Este híbrido se ha empleado en la generación de poblaciones segregantes con el fin de identificar genotipos con tolerancia al DFP (Cuambe, 2007). Por lo tanto se requiere identificar genotipos dentro de las familias generadas a partir de dicho híbrido, que presenten tolerancia al DFP, además de la evaluación de familias segregantes en contenidos de carotenoides totales mediante su respuesta al DFP; de tal forma que permita la obtención de genotipos, que promueva la posibilidad, de direccionar programas de mejoramiento genético en torno a obtener tolerancia al DFP, y lograr realizar el seguimiento a la segregación genética haciendo uso de las herramientas moleculares y que permita en estudios posteriores obtener genotipos mejorados haciendo uso del mejoramiento convencional.

## Problema de estudio

No existen genotipos de *Manihot esculenta* Crantz con tolerancia al deterioro fisiológico pos cosecha

### 1.1 Hipótesis

- Genotipos segregantes en contenidos de carotenoides asociados a tolerancia en deterioro fisiológico pos cosecha en la raíz.
- Genotipos segregantes del híbrido interespecífico CW429-1 poseen alta tolerancia al deterioro fisiológico pos cosecha.

### 1.2 Objetivo general

Identificar, seleccionar y caracterizar, genotipos de *Manihot esculenta* Crantz con tolerancia al deterioro fisiológico pos cosecha (DFP).

### 1.3 Objetivos específicos

- Determinar si hay asociación entre la actividad antioxidante y la reducción a DFP.
- Identificar genotipos con alto carotenoides y por ende tolerancia a DFP.
- Evaluar la variabilidad de las familias segregantes del híbrido CW429-1 por DFP
- Seleccionar genotipos segregantes del híbrido CW429-1 por tolerancia a DFP
- Caracterizar mediante genética de asociación genotipos contrastantes a DFP

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1 *Manihot esculenta* Crantz

Todas las especies del género *Manihot* son nativas del Neotrópico, las demás especies fueron introducidas luego del descubrimiento de América; cerca de 98 especies pertenecen al género *Manihot* y su arquitectura es diversa, entre las que se encuentran: arbustos, subarbustos y árboles (Rogers y Appan, 1973).

La yuca cultivada (*Manihot esculenta* Crantz), pertenece a la familia Euphorbiaceae, de la cual hacen parte 6300 especies (Wurdack *et al.*, 2005), entre las que se destacan plantas importantes agronómicamente como *Ricinus communis* y *Hevea brasiliensis* (Reilly, 2001), cuya característica en común es la presencia de vasos laticíferos desarrollados y la producción de látex (Ceballos y De la Cruz, 2002); fue originada a partir de poblaciones silvestres de *Manihot esculenta* ssp. *Flabellifolia* (Allem, 1999) en Sur América, específicamente a lo largo de la frontera sur de la cuenca del Amazonas (Olsen y Schaal, 1999). La domesticación de la yuca fue realizada por los indígenas sur americanos en el periodo comprendido entre 12000 a 7000 años atrás (Olsen y Schaal, 1999).

El cultivo de la yuca se puede llevar a cabo en todas las tierras bajas del trópico, entre los 30° sur y 30° norte de la línea del ecuador; en sitios donde la temperatura media anual está por encima de 18°C (Nassar, 2007). Es una especie de polinización cruzada (alógama), posee  $2n=36$  cromosomas y se considera anfidiplóide o alopoliplóide secuencial (El-Sharkawy, 2004).

Estas especies presentan su mayor diversidad en dos áreas, una en el noreste de Brasil, extendiéndose hacia Paraguay y la otra en el occidente y sur de México (Jennings e Iglesias, 2002); también se conoce a la yuca en otros idiomas como cassava, mandioca, tapioca, manioc, manioca, suahili, mhogo y omowgo (Ceballos y De la Cruz, 2002).

De las 98 especies descritas del género *Manihot*, únicamente *M. esculenta* es ampliamente cultivada, principalmente por sus raíces feculentas y comestibles, siguiéndole en menor proporción *M. glaziovii*, como una fuente de caucho (Reilly, 2001). También se han reportado especies relacionadas a *M. esculenta* como *M. cathaginensis*, *M. aesculifolia* y *M. leptophylla*, que producen raíces comestibles y pudieron ser cultivadas a pequeña escala (Allem *et al.*, 2000).

A pesar de que *M. esculenta* es una especie perenne, sus raíces pueden ser cosechadas de 6 a 24 meses después de la siembra; además, debido a su tolerancia a suelos pobres y condiciones climáticas adversas, es cultivada generalmente por pequeños agricultores como un cultivo de subsistencia, en un rango diverso de sistemas agrícolas y alimenticios (Cunha, 2002).

### 2.1.1 Morfología

Las características morfológicas de la yuca son variables, lo cual indica un alto grado de hibridación interespecífica (Cunha, 2002). Es una especie monoica, cuyas flores pistiladas abren de 10 a 14 días antes que las flores estaminadas en la misma rama; la autopolinización ocurre debido a que flores masculinas y femeninas de diferentes ramas o diferentes plantas del mismo genotipo, abren al mismo tiempo (Jennings e Iglesias, 2002); algunos genotipos florecen relativamente temprano, alrededor de 4 a 5 meses después de plantados, y otros solo después de 8 a 10 meses (Ceballos *et al.*, 2010). Los frutos son capsulas triloculares, de forma ovoide o globular con diámetro de 1 a 1.5 cm y con seis aristas prominentes dispuestas de forma longitudinal (Cunha, 2002). Cada lóculo contiene una sola semilla, que es de forma ovoide-elipsoidal y mide alrededor de 1 cm de largo, 6 mm de ancho y 4 mm de espesor; cuya testa es lisa, de color café, con moteado gris (Ceballos y De la Cruz, 2002).

La planta de yuca se constituye como un arbusto que alcanza de 1 a 4 metros de altura, presentando dos tipos de planta: erecta con o sin ramificaciones en la parte superior, o ramificadas a lo largo de la planta (Cunha, 2002).

El tallo es empleado para la multiplicación vegetativa o asexual y es utilizado como semilla comercial. En su estado maduro es cilíndrico con un diámetro de 2 a 6 cm y presenta 3 colores básicos, gris-plateado, morado y amarillo verdoso (Ceballos y De la Cruz, 2002). En cuanto a las hojas, estas se caracterizan por ser simples y están formadas por la lámina y el peciolo, es lobulada con venas palmeadas; por lo general posee un número impar de lóbulos que está entre 3 y 9 (en algunas ocasiones es 11) (Cunha, 2002). Las hojas maduras son glabras y cada hoja está rodeada por dos estípulas de 0,5 a 1,0 cm de largo, que permanecen unidas al tallo, hasta que la hoja está completamente desarrollada (CIAT 1984).

Por otro lado las raíces son el principal órgano vertedero de la yuca, pero cuando las plantas son propagadas a partir de semilla verdadera (sexual), se desarrolla una raíz primaria pivotante y varias raíces secundarias (Cunha, 2002). Aparentemente, la raíz primaria evoluciona para convertirse en una raíz feculenta. Cuando la planta proviene de estacas, las raíces son adventicias y son formadas en la base inferior cicatrizada de la estaca; estas raíces al desarrollarse, inicialmente forman un sistema fibroso, que después por lo menos 10 raíces, inician su engrosamiento y se convierten en raíces tuberosas (Ceballos y De la Cruz, 2002).

### 2.1.2 Importancia del cultivo de la yuca

La mayor parte de la población mundial depende de una dieta a base de plantas, entre las cuales se encuentra la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), que es la tercera fuente más importante de calorías en los trópicos, después del arroz y el maíz<sup>1</sup>, y es el sexto cultivo alimenticio más importante después de la caña de azúcar, maíz, arroz, trigo y papa, en términos de producción global anual; se cultiva principalmente por sus raíces tuberosas y feculentas, que son el alimento básico para más de 800 millones de personas, especialmente en el África subsahariana, pero también en otras partes de África, Asia, Pacífico y Sur de América (Burns *et al.*, 2010).

Para el 2013 la producción mundial de yuca estuvo alrededor de 276.7 millones de toneladas, siendo Nigeria el mayor productor con 53 millones de toneladas, seguido por Tailandia con 30.2 millones de

---

<sup>1</sup> [http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcds/index\\_en.html](http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcds/index_en.html). FAO (2013). “Why Cassava?”

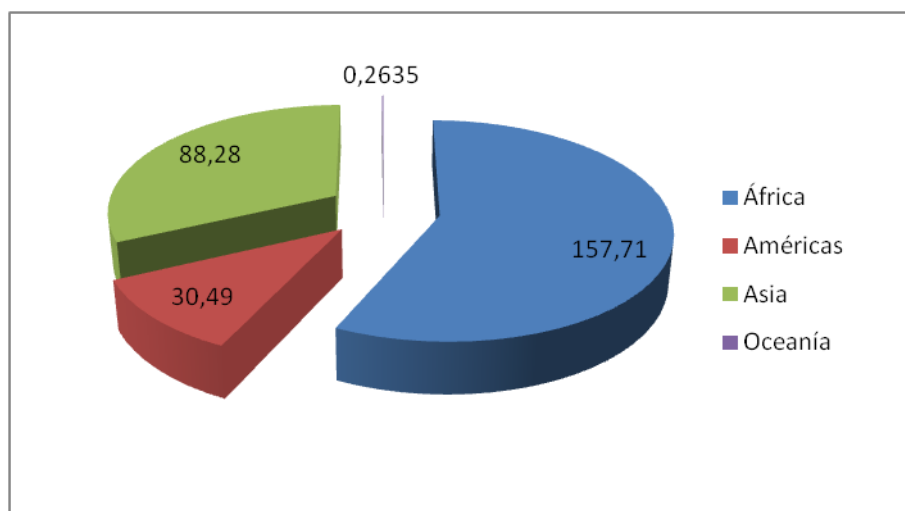
toneladas, como se presenta en la tabla 0-1, que muestra los principales países productores de yuca a nivel mundial<sup>2</sup>.

**Tabla 0-1.** Principales países productores de yuca. Datos oficiales de la FAO, FAOSTAT (2015).

Posición mundial	País	Producción de yuca (Millones de toneladas)
1	Nigeria	53
2	Tailandia	30.22
3	Indonesia	23.93
4	Brasil	21.48
5	República Democrática Del Congo	16.5
25	Colombia	2.2

De acuerdo a los registros de la FAO (FAOSTAT, 2015), la producción por continente presenta a África como la potencia en el cultivo de yuca, seguido de Asia; datos mostrados en la figura 0-1. Dicha producción de yuca es aportada por 104 países en el mundo, y cuyo principal producto alimenticio a partir del cultivo, son las raíces feculentas, que se emplean para consumo humano y pueden ser cosechadas hasta después de tres años, luego de haber alcanzado su madurez fisiológica; permitiendo almacenar las raíces durante periodos de inestabilidad social y agrícola (De Vries *et al.*, 2010).

**Figura 0-1.** Producción de yuca (millones de toneladas) por continente. Datos oficiales de la FAO, FAOSTAT (2015)



Las raíces almidonosas de yuca son una fuente valiosa de energía y se pueden cocinar o procesar de diferentes formas para consumo humano; además se pueden emplear para la obtención de almidones

<sup>2</sup> <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/S>



nativos o fermentados y como trozos secos, harinas o pellets para alimentación animal (Ceballos *et al.*, 2004).

Por otro lado, la industria de biocombustibles y bioplásticos está generando una nueva demanda en la producción de yuca, empleándola como materia prima, esto ayudado por el incremento en los precios del petróleo (Ceballos *et al.*, 2012). Es así como yucas azucaradas pueden disminuir los costos económicos y ambientales de la fermentación de carbohidratos a etanol o ácido láctico (Carvalho *et al.*, 2004).

A pesar de la diversidad de usos que tienen la raíces de yuca, estas presentan baja capacidad de almacenamiento en condiciones de anaquel, a causa del DFP, que inicia de uno a tres días después de la cosecha (Beeching, *et al.*, 1998), afectando la palatabilidad y reduciendo el valor comercial, cuyas pérdidas pueden alcanzar más del 90 % de las raíces cosechadas (Wheatley *et al.*, 1985a).

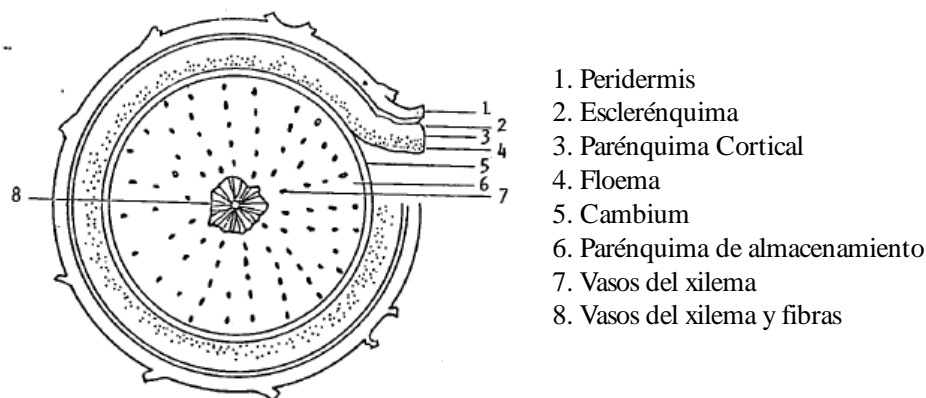
### 2.1.3 Deterioro pos cosecha en yuca

El deterioro puede estar dividido en 2 tipos, el primero llamado deterioro primario o deterioro fisiológico pos-cosecha (DFP), el cual se caracteriza por ser un proceso endógeno en el que se presenta una coloración azul oscuro de los vasos del xilema (Noon y Booth, 1977), y el segundo denominado como deterioro secundario o deterioro microbiano, generado por la presencia de microorganismos como bacterias y hongos (Huang *et al.*, 2001).

### 2.1.4 Deterioro Fisiológico pos cosecha en yuca (DFP)

La parte más importante de la raíz de yuca, es la pulpa o parénquima (porción comestible), donde se concentran los recursos de almidón de la planta. El parénquima contiene vasos del xilema distribuidos en forma de venas; el centro de la raíz contiene el corazón, compuesto de xilógeno fibroso, mientras la periferia de la raíz contiene estratos de floema, esclerénquima, y peridermis, que forman la piel (figura 0-2) (Wheatley *et al.*, 1985a).

**Figura 0-2.** Sección transversal de la raíz de yuca (Hunt *et al.*, 1977)



El deterioro primario o DFP fue observado por primera vez en Argentina en 1928, y fue descrito por Castagnino (1943) como la aparición de venas de color azul oscuro, que coincide con el desarrollo de un sabor amargo. Más tarde Pacheco (1952) se refería a este fenómeno como un rayado de color azul-

ceniza, en los vasos del xilema. Un estudio más detallado realizado por Drummond (1953), reporto un rayado radial negro, que se desarrolló en las raíces de yuca dentro de las 48 horas después de la cosecha.

Los términos rayado vascular “Vascular Streaking” y decoloración vascular “Vascular Discoloration”, fueron introducidos por Averre (1967), quien describe una decoloración azul oscura de los haces vasculares: los síntomas comienzan en las superficies cortadas, a menudo en la periferia de la raíz, y en pocos días avanza a lo largo de la longitud de la raíz.

Dentro de las 48 horas después de la cosecha, las raíces de yuca sufren una respuesta a estrés abiótico que se conoce como deterioro fisiológico pos cosecha (DFP) (Beeching *et al.*, 1998), y como ya se describió, es observado como una decoloración del tejido vascular y el parénquima de almacenamiento, y se acompaña por cambios bioquímicos que son típicos de respuesta a heridas en otros sistemas de plantas (Beeching *et al.*, 1994). El inicio y posterior grado de deterioro, está estrechamente relacionado con la presencia de daño mecánico, que por lo general ocurre durante la cosecha (Wheatley *et al.*, 1985a). Algunas características varietales (longitud de raíz, presencia de pedúnculos largos, etc.), textura y grado de compactación del suelo y métodos de cosecha (manual o mecánico), son algunos de los factores que afectan la incidencia del daño mecánico en la raíz (Cock *et al.*, 1978). El efecto inmediato generado por las escarificaciones en el tejido de la raíz almidonosa, se desarrolla como un trastorno físico de las barreras protectoras, es así como tejidos cercanos a la zona de la herida, probablemente experimentan deshidratación, disminución de los niveles de dióxido de carbono, incremento en los niveles de oxígeno y aumenta la exposición a microorganismos (Beeching *et al.*, 1994). Sin embargo los aspectos necesarios para la supervivencia como el curado y cicatrización, no se expresan de forma adecuada y son menos localizados en raíces de yuca cosechadas (Booth, 1976; Rickard and Coursey 1981).

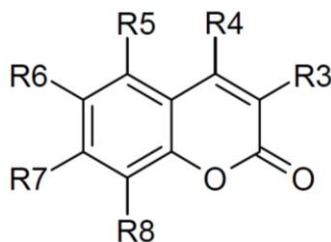
## 2.2. Moléculas involucradas en el deterioro pos cosecha en yuca

### 2.2.1 Hidroxicumarinas

Las cumarinas tienen como precursor común una benzo- $\alpha$ -pirona. Su origen biogenético las caracteriza como compuestos derivados del fenilpropano debido a su estructura básica C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, que representan el sistema lactona (Waksmundzka y Hawryl, 2008). Bilógicamente, las cumarinas son derivadas del fenilpropano y a través del ciclo del ácido shiquímico dan lugar a ácido trans- cinámico. El ácido trans-cinámico pasa a su glucósido el ácido *o*-cumárico y la cumarina. En un ciclo similar el ácido *p*-cumárico pasa a umbeliferona. El isopreno activo está unido a la molécula de cumarina sencilla y forma furano y piranocumarinas por medio de la ciclación (Estevez y Gonzales, 1997).

De acuerdo con su estructura química, las cumarinas se pueden clasificar en 4 grupos básicos: benzo- $\alpha$ -pirona, isocumarinas, furanocumarinas y piranocumarinas (Waksmundzka y Hawryl, 2008). Las cumarinas pueden aparecer en las plantas como moléculas libres o en combinación con glucósidos. La mayoría de cumarinas en la forma aglicona poseen sustituyentes como hidroxilo, metóxilo y alquilo en la posición 7 y, algunas veces en las posiciones 5, 6 y 8 (figura 0-3). Su solubilidad depende de la presencia de grupos hidroxilos fenólicos y enlaces glucósidos. Los glucósidos cumarínicos son solubles en agua y en solventes polares como metanol y etanol, el furano y piranocumarinas son solubles en solventes polares y medianamente polares, tales como diclorometano, gasolina, y cloroformo. Las cumarinas revelan fuerte fluorescencia bajo luz ultravioleta, lo que permite una fácil identificación (Waksmundzka y Hawryl, 2008).

**Figura 0-3.** Estructura básica de cumarinas simples. Escopoletina R3=R4=R5=R8=H, R7= OH, R6=OCH<sub>3</sub> (Tomado de Waksmundzka y Hawryl, 2008).

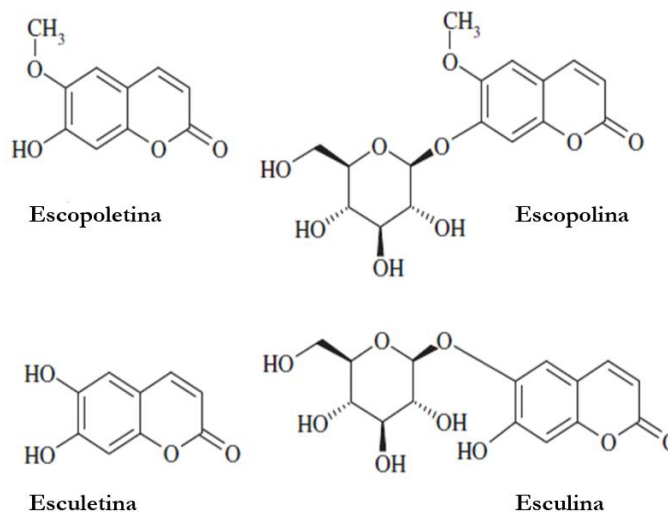


### 2.2.2 Producción de hidroxycumarinas en yuca

Después de iniciado el DFP, la respuesta inicial de la raíz de yuca, es manifestada como una oclusión de los vasos del xilema y la producción de compuestos fluorescentes en el parénquima; dichas oclusiones contienen carbohidratos, lípidos y compuestos parecidos a la lignina, además en las etapas iniciales se encuentran fenoles libres, leucoantocianinas y catequinas (Wheatley *et al.*, 1985a).

En raíces de yuca, 1 a 2 días después de cosecha, se presenta acumulación de hidroxycumarinas: escopoletina, con su glucósido escopolina, y esculetina, con su glucósido esculina (Figura 0-4); la escopoletina, debido a que aumenta su concentración de 150 a 200 veces, se asume que está involucrado en el DFP (Tanaka *et al.*, 1983; Wheatley y Schwabe, 1985b; Buschmann *et al.*, 2000b).

**Figura 0-4.** Hidroxycumarinas identificadas en raíces de yuca (Blagbrough *et al.*, 2010).



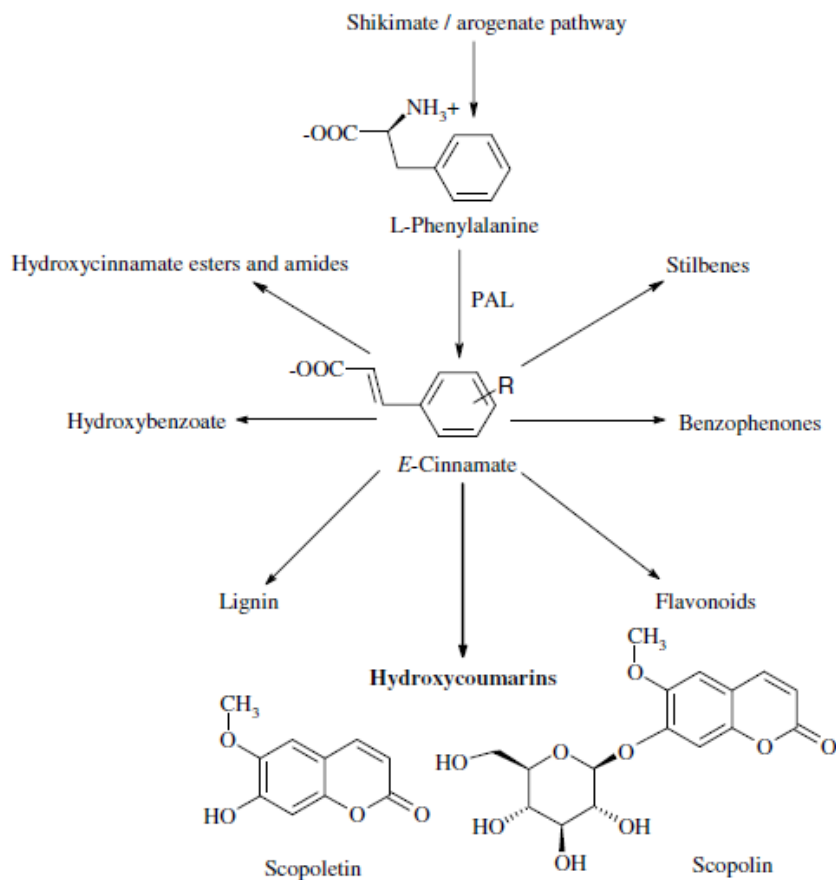
Especialmente la producción de escopoletina y algunos compuestos relacionados como escopolina, parece ser, que son las moléculas que contribuyen al incremento de la fluorescencia y decoloración, durante el proceso de DFP en raíces de yuca (Rickard, 1981; Buschmann, *et al.*, 2000b). Las hidroxycumarinas son importantes en la defensa de las plantas, actuando como fitoalexinas (compuestos antimicrobianos), su biosíntesis es inducida, después de varias situaciones de estrés (heridas, infección bacteriana o fúngica) (Giesemann *et al.*, 1986; Gutierrez *et al.*, 1995). Además presentan una alta gama de actividades farmacológicas, entre las que se encuentran funciones como anticoagulante (Mueller, 2004).

Sin embargo su biosíntesis en yuca aun no es conocida y no es claramente entendido, como si lo es en otras plantas (Petersen *et al.*, 1999). Estudios preliminares, donde se emplearon raíces de yuca con DFP, han reportado al E-ácido cinámico como uno de los primeros precursores de la biosíntesis de escopoletina (Figura 0-5) (Bayoumi *et al.*, 2008a).

Bayoumi *et al.*, (2008b), también demostró que en *Manihot esculenta*, la escopoletina es derivada principalmente del ácido ferulico, o por la O-metilación del ácido cafeico regio específicamente en la posición 3.

Durante el DFP, glucósidos cianogénicos como linamarina y las hidroxycumarinas escopoletina y su glucósido escopolina, se acumulan en las raíces de yuca, así como pequeñas cantidades o trazas de esculetina y su glucósido esculina; estas cuatro hidroxycumarinas están presentes en pequeñas cantidades en plantas sanas, pero su biosíntesis y/o almacenamiento, son regulados hasta en raíces de yuca que sufren DFP (Bayoumi *et al.*, 2010). En concordancia mientras se desarrolla el DFP, se detectan especies de oxígeno reactivas (ROS) y se incrementa la actividad de enzimas que modulan las ROS (Reilly *et al.*, 2001). Estos datos junto con observaciones donde la exclusión de oxígeno previene el DFP, son evidencias contundentes de que las ROS y las enzimas que modulan las ROS juegan un papel importante durante el DFP (Reilly *et al.*, 2003).

**Figura 0-5.** Vía biosintética de fenilpropanoides (Bayoumi *et al.*, 2008a)

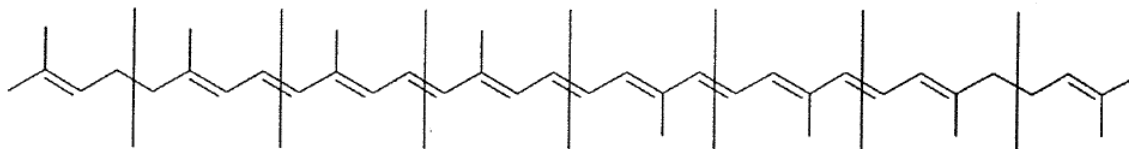


### 2.2.3 Carotenoides

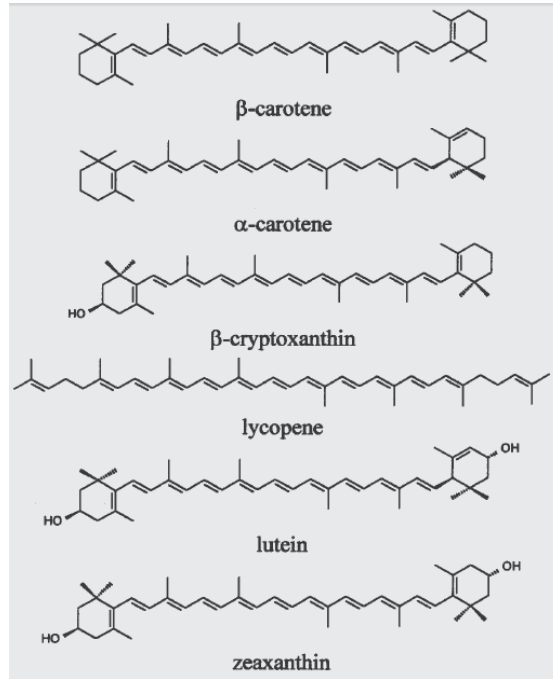
Los carotenoides son una clase de hidrocarburos denominados carotenos y cuyos derivados oxigenados se conocen como xantofilas; se componen de ocho unidades isoprenoides, enlazadas de tal manera que su disposición se invierte en el centro de la molécula, quedando los dos grupos metilos centrales en una relación de posición 1,6 y los grupos metilos restantes no terminales, están en una relación posicional 1,5 (Figura 0-6). Todos los carotenoides pueden ser derivados formalmente de la estructura acíclica  $C_{40}H_{56}$ , con una cadena central larga de dobles enlaces conjugados mediante hidrogenación, deshidrogenación, ciclación u oxidación o cualquier combinación de estos procesos (International Agency for Research on Cancer, 1998). La clase también incluye compuestos que se forman de nuevas disposiciones o degradaciones de la estructura de carbono, garantizando la retención de los dos grupos metilos centrales. Los retinoides, incluyendo retinol, ácido all-trans retinoico y el ácido 9-cis retinoico, por consiguiente no son incluidos en la clase de carotenoides (International Agency for Research on Cancer, 1998).

Al respecto conviene decir que los carotenoides son pigmentos naturales muy generalizados, no solo en las plantas sino también en bacterias, hongos, levaduras, algas y animales no mamíferos. Ejemplos conocidos de la coloración de carotenoides incluyen el amarillo de los girasoles, el naranja de las zanahorias, el rojo de los tomates, el oro de peces de colores, el rosa de la carne de salmón y las plumas rojas y amarillas de aves como los jilgueros. Se enumeran 750 carotenoides diferentes que han sido aislados de fuentes naturales, de los cuales 500 se han caracterizado de forma satisfactoria (Britton, 2008). Solo 50 carotenoides están presentes en la dieta humana, pero solo seis son ubicuos en el suero humano, los cuales son:  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina (Rao y Rao, 2007), cuyas estructuras químicas se presentan en la figura 0-7. La principal función conocida de los carotenoides en los seres humanos es la de servir como precursores de vitamina A relacionado a retinoides, tales como retinol, retinal y ácido retinoico, que desempeñan papeles importantes en el ciclo visual y en la regulación del gen relacionado con muchos procesos de desarrollo fisiológicos (Grune *et al.*, 2010).

**Figura 0-6.** Estructura básica de los carotenoides, construida a partir de ocho unidades isoprenoides (International Agency for Research on Cancer, 1998)



**Figura 0-7.** Estructuras de los principales carotenoides en los alimentos y zeaxantina (Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004)



Se ha reportado que los carotenoides presentan propiedades antioxidantes, específicamente por su habilidad para atrapar el oxígeno singlete o interactuar con radicales libres (Palozza y Krinsky, 1992). La capacidad de los carotenoides para atrapar el oxígeno singlete, se ha relacionado con el sistema conjugado de dobles enlaces, mostrando máxima eficiencia, aquellos carotenoides conformados por nueve o más enlaces dobles conjugados (Foote *et al.*, 1970), entre los que se encuentran el  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina, entre otros. En este sentido en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), mediante el screening de germoplasma de la colección de yuca, se encontró una relación entre el contenido de carotenoides en la raíz y DFP; donde raíces que presentaban una concentración por encima de 5 mg por Kg de peso fresco, reducían la respuesta al DFP (Chávez *et al.*, 2000). Sánchez *et al.*, (2006), también encontró una relación inversa entre la concentración de carotenoides totales y DFP, sugiriendo que raíces de yuca con niveles más altos de carotenoides totales, no sólo son más nutritivos, sino que reduce o retarda el DFP de uno a dos días adicionales. Sin embargo, Morante *et al.*, (2010), logró un incremento significativo en el contenido de carotenoides a través del mejoramiento genético, con promedios altos de 10,2  $\mu\text{g/g}$  y ello supuso tolerancia a DFP en clones de raíces amarillas, hasta 40 días de almacenamiento a temperatura ambiente; mientras que genotipos con niveles más bajo en carotenoides, sufren daños considerables en cuanto a DFP, planteando que posiblemente es necesario un umbral de concentración mínima de carotenoides (>9,1 $\mu\text{g/g}$ ), para que las propiedades antioxidantes sean efectivas.

#### 2.2.4 Malondialdehído

El malondialdehído (o malonaldehído) MDA, es una molécula con dos grupos aldehídos. En condiciones acuosas exhibe varios pH y formas estructurales dependientes de la edad, que incluyen tautómeros ceto-enol, formas de enlaces de hidrogeno intramolecular e intermolecular, dímeros y trímeros (Acworth y Oxon, 2003). El MDA, es uno de los productos secundarios bien conocidos de la peroxidación de lípidos, después de la exposición a especies reactivas de oxígeno y radicales libres, se

pueden utilizar como un indicador de lesión de la membrana celular (Esterbauer *et al.*, 1991). También se considera uno de los productos finales del proceso de peroxidación de lípidos y es formado durante la degeneración oxidativa como producto de radicales libres de oxígeno y es aceptado como un indicador de peroxidación lipídica (Alam, *et al.*, 2013).

## 2.3 Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos nucleares, son ubicaciones específicas de un segmento de ADN con una ubicación física identificable (locus) en un cromosoma, que sirven como puntos de referencia, para el análisis del genoma (Lefebvre *et al.*, 1995; Young, 1994). Estos permiten la diferenciación entre genotipos y se heredan de acuerdo a las leyes de herencia Mendeliana. Mediante su vinculación con los genes importantes, estos facilitan la detección de diferencias en la información genética realizada a los individuos (Lefebvre *et al.*, 1995). Los marcadores genéticos son básicamente de dos tipos: Marcadores morfológicos y marcadores moleculares (Kumar, 1999).

### 2.3.1 Marcadores Morfológicos

La herencia de estos marcadores se puede controlar visualmente sin técnicas bioquímicas o moleculares especializadas; específicamente son rasgos morfológicos que son controlados por un único locus, pueden ser utilizados como marcadores genéticos siempre que su expresión sea reproducible en un rango de entornos (Kumar, 1999). Además del medio ambiente, la expresión de tales marcadores también se ve alterada por las interacciones epistáticas y pleiotrópicas. El número de marcadores morfológicos es limitado; sus alelos interactúan de una manera dominante-recesivo, haciendo así imposible distinguir los individuos heterocigotos de los individuos homocigotos (Kumar, 1999).

### 2.3.2 Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares son aquellos que incluyen constituyentes bioquímicos, como por ejemplo metabolitos secundarios, macromoléculas y ácido desoxirribonucleico (ADN). El análisis de metabolitos secundarios es sin embargo, restringido a aquellas plantas que producen un intervalo adecuado de metabolitos, permitiendo ser analizados fácilmente y distinguir entre variedades; los cuales deben ser neutros a prácticas y efectos ambientales. Entre los marcadores moleculares utilizados, los de ADN son los más adecuados y ubicuos en la mayoría de organismos vivos (Swati *et al.*, 1999).

Aquellos marcadores que revelan polimorfismos a nivel de proteínas se conocen como marcadores bioquímicos, mientras que los marcadores de ADN revelan polimorfismos a nivel del ADN; en este sentido marcadores bioquímicos son proteínas producidas como resultado de la expresión de genes, que se pueden separar por electroforesis para identificar los alelos (Kumar, 1999). Las proteínas comúnmente utilizados como marcadores son las isoenzimas, que son formas variantes de la misma enzima (Vodenicharova, 1989). Estos marcadores revelan diferencias en la secuencia y función de genes como marcadores codominantes. Sin embargo, su uso está limitado, debido a que son limitados en cualquier especie de cultivo y también porque están sujetos a modificaciones post-traduccionales (Staub, 1982).

Al momento de considerar el uso de marcadores moleculares para estudios genéticos, se debe considerar dos puntos importantes: el primero a nivel de biología molecular, es que el genotipado debe ser el más simple y de bajo costo, con el objetivo de obtener la mayor cantidad de datos posibles en términos de genotipificación. El segundo punto, a nivel estadísticos de acuerdo al tipo de análisis a realizar, como las relaciones de dominancia, contenido de la información, neutralidad, posición e independencia genética de marcadores (Vignal *et al.*, 2002).

En este sentido, las variaciones alélicas dentro de un genoma de la misma especie se clasifican en tres grandes grupos, que incluyen diferencias en el número de repeticiones en tándem en un locus particular (microsatélites o secuencias simples repetidas SSRs) (Weber y May, 1989), inserciones/delecciones en segmentos (InDels) (Ophir y Graur, 1997) y polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) (Wang *et al.*, 1998). A pesar de que las SSRs, InDels y SNPs son las tres principales variantes alélicas, se han desarrollado un gran número de marcadores moleculares que permiten detectar polimorfismos a partir de dichas variantes (Gupta, *et al.*, 1999). De acuerdo al método de detección y rendimiento, los marcadores moleculares se pueden dividir en tres grupos principales.

- Bajo rendimiento: marcadores basados en hibridación, como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) (Botstein, *et al.*, 1980).
- Rendimiento medio: basados en PCR que incluyen la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RADP) (Welsh y McClelland, 1990), polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Vos *et al.*, 1995) y SSR (Jacob, *et al.*, 1991).
- Alto rendimiento: basado en marcadores de secuencia (SNPs) (Wang *et al.*, 1998).

### 2.3.3 Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)

Polimorfismos de un solo nucleótido son posiciones individuales de pares de bases en el ADN genómico, en el que existen diferentes alternativas de secuencia (alelos) en individuos normales en algunas poblaciones. Es decir SNP es el polimorfismo que se produce entre muestras de ADN con respecto a una sola base y son considerados como los marcadores más abundantes del genoma (Jehan y Lakhanpaul, 2006) donde el alelo menos frecuente tiene por lo menos una abundancia del 1% o superior (Jehan y Lakhanpaul, 2006). Por lo tanto, las variantes de una sola base inserción/delección (Indels), no serían considerados como SNPs (Brookes, 1999).

Los SNPs se han convertido en los marcadores de elección, ya que por su abundancia en el genoma, son extremadamente útiles, para la creación de mapas genéticos de alta densidad (Jehan y Lakhanpaul, 2006).

En el estudio de los SNPs se emplean los siguientes términos a nivel genético que vale la pena recordar (Yu Liao y Lee, 2010):

- ✓ Alelos: Las formas alternativas de un gen o locus cromosómico que difiere en la secuencia de ADN.
- ✓ Bi-alélico: Solo dos de cuatro nucleótidos comunes son encontrados en una posición específica
- ✓ Etiqueta de secuencia expresada: Sub secuencia corta de una secuencia de ADNc transcrito que puede utilizarse para la identificación de genes.
- ✓ Genotipo: Constitución genética hereditaria realizada por organismos vivos
- ✓ Haplotipos: Es un conjunto de alelos localizados en genes vecinos o secuencias genómicas que tienden a ser heredados juntos.
- ✓ SNP No-sinónimos: Variación de un solo nucleótido en la secuencia de codificación que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos.
- ✓ Fenotipo: Es la manifestación física de la información genética.
- ✓ SNP sinónimos: variación de un solo nucleótido en la secuencia de codificación, cuyo resultado no genera ningún cambio en la secuencia de aminoácidos.

Un SNP es un único cambio de base, en una secuencia de ADN, con una alternativa habitual de dos posibles nucleótidos en una posición dada. Por lo general a nivel práctico un SNP es bialélico y en cada posición de un tramo de secuencia, puede estar presente cualquiera de las cuatro posibles bases de nucleótidos, pero la probabilidad de que ocurra cambios de dos bases independientes en una misma





### 2.3.4 RAD Sequencing

Sitio de restricción asociado a secuencia de ADN por sus siglas en inglés (**R**estriction site **A**ssociated **D**N **A** sequencing RAD-Seq), son fragmentos cortos de ADN adyacente a cada instancia de un sitio particular de reconocimiento de la enzima de restricción (Baird, *et al.*, 2008). Es un método para el descubrimiento de SNP y genotipado usando secuenciación por medio de síntesis o hibridación (Davey *et al.*, 2013). La hibridación de etiquetas RAD para microarreglos de ADN, permite la búsqueda en paralelo de miles de marcadores polimórficos trazando un mapa de la variación natural e induciendo mutaciones en diversos organismos (Miller *et al.*, 2007; Lewis, *et al.*, 2007). Aunque las técnicas poderosas de RAD, ampliamente aplicables, solo pueden analizar una fracción de polimorfismos segregantes (Baird, *et al.*, 2008).

El proceso de RAD-Seq, consiste en que ADN genómico de múltiples muestras de interés, es digerido con enzimas de restricción seleccionadas, y adaptadores que contienen etiquetas de muestras específicas y finalizan con terminaciones salientes que corresponden al sitio de corte de la enzima de restricción, los cuales son ligados a los fragmentos de restricción digeridos (Davey *et al.*, 2013). Los adaptadores ligados a los fragmentos de restricción son cortados a un tamaño adecuado para la secuenciación con Illumina (típicamente de 300-700 pb), y donde los fragmentos cortados que contienen sitios de restricción salientes son amplificados usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y secuenciados, típicamente usando secuenciación Illumina mediante síntesis (Davey *et al.*, 2013).

Las lecturas de RAD-Seq pueden ser alineadas a genomas de referencia y genotipadas usando herramientas estándar, diseñadas para datos de secuenciación del genoma entero (Nielsen *et al.*, 2011), incluyendo alineadores como BWA (Li y Durbin, 2009) y Stampy (Lunter y Goodson, 2011), y genotipadores como los construidos en el kit de herramientas para análisis de genomas (GATK; DePristo *et al.*, 2011) y SAMtools (Li, 2011). RAD-Seq también puede ser usada como una herramienta nueva, generando grandes grupos de marcadores donde no se tiene disponible un genoma de referencia (Davey *et al.*, 2013).

Las etiquetas de secuenciación RAD tienen varias características atractivas para el mapeo genético. Primero, las etiquetas RAD crean una representación reducida del genoma, permitiendo sobre poner secuencias de nucleótidos al lado de los sitios de restricción y detección de SNPs. Segundo, un número adecuado de marcadores para una aplicación puede ser seleccionado, mediante la elección de enzimas de restricción, y el número de marcadores puede ser incrementado casi indefinidamente mediante el uso de enzimas adicionales. Tercero, el acercamiento es adecuado para el genotipado de poblaciones relacionadas para análisis segregante y también genotipificación múltiple de individuos para mapeamiento de escala fina (Baird, *et al.*, 2008).

## 2.4 Bibliografia

ACWORTH, IAN N., OXON, D. PHIL. (2003). The Handbook of Redox Biochemistry. ESA, Inc. www.esainc.com. 502 pp.

ALAM, Md. N., BRISTI, N. J., RAFIQUZZAMAN, Md. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal, 21, 143-152.

ALLEM, A. C. The closest wild relatives of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Euphytica 107, 1–12 (1999).

ALLEM, A., MENDEZ, A., SALOMAO, A., BURLE, M. (2000). The value of aggregation of *Manihot* genetic resources. En: Carvalho, L., Thro, A, and Vilarinhos, A. (eds) Cassava Biotechnology. Proceedings of the 4th International Scientific Meeting, Salvador, Brazil 1998, Brasilia 2000 15 -23 pp.

AVERRE, C. W. (1967). Vascular streaking of stored cassava roots. En: Proceedings 1st International Symposium Tropical Root Crops. Trinidad 2, 31-35.

BAIR, N. A., ETTER, P. D., ATWOOD, T. S., CURREY M. C., SHIVER, A. L., LEWIS, Z. A., SELKER, E. U., CRESKO, W. A., JOHNSON, E. A. (2008). Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. PLoS ONE 3 (10): e3376. doi:10.1371/journal.pone.0003376.

BAYOUMI, S. A. L., ROWAN, M. G., BLAGBROUGH, L. S., BEECHING, J. R. (2008a). Biosynthesis of scopoletin and scopolin in cassava roots during post-harvest physiological deterioration: The E-Z-isomerisation stage. Phytochemistry 69. 2928–2936.

BAYOUMI, S. A. L., ROWAN, M. G., BEECHING, J. R., BLAGBROUGH, I. S. (2008b). Investigation of biosynthetic pathways to hydroxycoumarins during post-harvest physiological deterioration in cassava roots by using stable isotope labelling. ChemBioChem 9, 3013–3022.

BAYOUMI, S. A. L., ROWAN, M. G., BEECHING, J. R., BLAGBROUGH, I. S. (2010). Constituents and secondary metabolite natural products in fresh and deteriorated cassava roots. Phytochemistry 71, 598-604.

BEECHING, J. R., DODGE, A. D., MOORE, K. G., PHILLIPS, H. M., WENHAM, E. (1994). Review. Physiological deterioration in cassava: possibilities for control. Trop. Sci. 34, 335-343.

BEECHING, J. R., YUANHUAI, H., GÓMEZ-VÁZQUEZ, R., DAY, R. C., COOPER, R. M. (1998). Wound and defense responses in cassava as related to post-harvest physiological deterioration, En: Recent Advances in Phytochemistry. Vol 32: Phytochemical Signals in Plant-Microbe, ed. Por ROMEO, J. T., DOWNUM, K. R., VERPPORTE, R. Premium Press, New York, pp. 231-248.

BOOTH, R. H. (1976). Storage of fresh cassava (*Manihot esculenta*) I. Post Harvest deterioration and its control. Experimental Agriculture 12, 103-111.

BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M., DAVIS, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics. Vol. 32, no. 3, 314-331.

BRITTON, G. (2008). TLC of Carotenoids. En: Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. WAKSMUNDZKA-HAJNOS M., SHERMA J., KOWALSKA T. (eds.). Chromatographic science series. Volume 99. pp 543-573.

- BROOKES, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene* 234, 177-186.
- BURNS, A., GLEADOW, R., CLIFF, J., ZACARIAS, A., CAVAGNARO, T. (2010). Cassava: The Drought, War and Famine Crop in a Changing World. *Sustainability* 2. 3572-3607.
- BUSCHMANN, H., RODRIGUEZ, M. X., THOME, J., BEECHING, J. (2000a). Accumulation of hydroxycoumarins during post-harvest deterioration of tuberous roots of cassava *Manihot esculenta* Crantz. *Ann. Bot.* 86, 1153-1160.
- BUSCHMANN, H., REILLY, K., RODRIGUEZ, M.X., THOME, J., BEECHING, J.R. (2000b). Hydrogen peroxide and flavan-3-ols in storage roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) during postharvest deterioration. *J. Agric. Food. Chem.* 48, 5522-5529.
- CASEY, J., SLATTERRY, I., KAVAKLI, H., OKITA, T. W. (2000). Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends in plant science Reviews*, 5 (7), 291-298.
- CASTAGNINO, G. A. (1943). Conservación de la raíz de mandioca. *El Campo (Buenos Aires)* 27, 23.
- CHAVEZ, A. L., BEDOYA, J. M., SANCHEZ, T., IGLESIAS, C., CEBALLOS, H., ROCA, W. (2000). Iron, carotene, and ascorbic acid in cassava roots and leaves. *Food Nutr. Bull.* 21, 410-413.
- CEBALLOS, H., OKOGBENIN, E., PEREZ, J. C., BECERRA, L. V. L. A., DEBOUCK, D. (2010). CASSAVA. En: Root and Tuber Crops. BRADSHAW, J. E. United Kingdom. ISBN 978-0-387-92764-0. p. 53-96.
- CEBALLOS, H., DE LA CRUZ, G. A. (2002). Taxonomía y Morfología de la Yuca. En: La Yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. ISBN 958-694-043-8. p. 16-32.
- CEBALLOS, H., IGLESIAS, C. A., PEREZ, J. C., DIXON, A. G. O. (2004). Cassava breeding: opportunities and challenges. *Plant Molecular Biology* 56, 503-516.
- CEBALLOS, H., RAMIREZ, J., BELLOTTI, A. C., JARVIS, A., ALVAREZ, E. (2011). Adaptation of Cassava to Changing Climates: *Crop Adaptation to Climate Change*, First Edition. Shyam, S., Yadav Robert J., Redden, Jerry L., Hatfield, Herman Lotze-Campen., Anthony E. Hall. p. 411-425.
- CIAT. (1984). Morphology of the Cassava Plant: Study Guide. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- COCK, J. H. (1984). La yuca: Una fuente Básica de Energía en los Trópicos. Traducción autorizada del artículo "Cassava: A Basic Energy Source in the Tropics". *Science* 218 (4574), 755-762.
- COCK, J. H., CASTRO, A. M., TORO, J. C. (1978). Agronomic implications of mechanical harvesting. En: WEBER, E. J., COCK, J. H., CHOUINARD, A. (ed.). Cassava harvesting and processing: Proceedings of a workshop held at CIAT, Cali, Colombia, 24-28 April 1978. Ottawa, International Development Research Centre, IDRC-114e, pp. 60-65.
- COOKE, R.D., COURSEY, D. G. (1981). Cassava: a major cynical containing food crop. In: *Cyanide in Biology*; Vennesland, B.; Conn, E.E.; Knowles, C.J.; Wesley, J.; Wissing, F.; Academic Press: London; p.93-114.

CUAMBE, C. E. (2007). EVALUACIÓN DEL DETERIORO FISIOLÓGICO POSCOSECHA Y MAPEO PRELIMINAR DE QTLs EN EL PRIMER RETROCRUZAMIENTO DERIVADO DEL HIBRIDO INTER-ESPECÍFICO (CW429-1) ENTRE *Manihot esculenta* Crantz Y LA ESPECIE SILVESTRE *Manihot walkerae* Croizat. Tesis de Maestría. Escuela de Posgrados Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 86 pp.

CUNHA, A. A. A. (2002). Cassava Botany and Physiology. En: CAB International. Cassava: Biology, production and utilization. p. 67-89.

DAVEY, J. W., CEZARD, T., FUENTES-UTRILLA, P., ELAND, C., GHARBI, K., BLAXTER, M. L. (2013). Special features of RAD Sequencing data: implications for genotyping. *Molecular Ecology*, 22, 3151-3164.

DePRISTO, M. A., BANKS, E., POPLIN, R., *et al.*, (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*, 43, 491-498.

De VRIES, S. C., VAN DE VEN, G. W. J., VAN ITTEERSUM, M. K., GILLER, K. E. (2010). Resource use efficiency and environmental performance of nine major biofuel crops, processed by first-generation conversion techniques. *Biomass Bioenerg.* 34. 588-601.

DRUMMOND, O. A. (1953). Da etiología de rajas pretas das de Mandioca. *Anais de Congresso Nacional da Sociedade Botanica do Brasil*, Recife 57-60.

EDWARDS, D., FORSTER, J. W., CHAGNE, D., BATLEY, J. (2007). What is SNPs? En: N.C. Oraguzie, RIKKERINK, E.H.A., GARDINER, S. E., De SILVA, H. N. (eds), *Association Mapping in Plants*. Springer, Berlin, pp 41-52.

EKUNDAYO, J. A., DANIEL, T. M. (1973). Cassava rot and its control. *Transactions of the British Mycological Society*, 61: 27-32.

EL-SHARKAWY, M. A. (2004). Cassava biology and physiology. *Plant Molecular Biology* 56: 481-501.

ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. J., ZOLLNER, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynoneal malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radicals Biol. Med.* 11. 81-128.

ESTEVEZ-BRAUN, A., GONZALES, A. G. (1997). Coumarins. *Nat. Prod. Rep.*, 14, 465-475.

FALADE, KOLAWOLE O., AKINGBALA, JOHN O. (2011). Utilization of Cassava for Food. *Food Reviews International*. 27. 51-83.

FAO. (2013). Why Cassava? Disponible en línea: [http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcids/index\\_en.html](http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcids/index_en.html). (consultado el 14 de septiembre de 2013).

FAOSTAT (2015). Producción mundial de yuca año 2013. Disponible en línea: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/S>. (Consultado el 8 de octubre de 2015).

FREGENE, M., MBA, R. E. C. (2004). Marker-Assisted Selection (MAS) In: Hershey C. (ed) *Cassava Breeding*. FAO, Rome Italy (in Press).

FOOTE, C. S., CHANG, Y. C., DENNY, R. W. (1970). Chemistry of singlet oxygen X. Carotenoid quenching parallels biological protection. *J Am Chem Soc.* 92, 5216-5218.

- GIESEMANN, A., BIEHL, B., LIEBEREI, R. (1986). Identification of scopoletin as a phytoalexin of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *J. Phytopathol.* 117, 373– 376.
- GRUNE, T., LIETZ, G., PALOU, A., ROSS, A. C., STAHL, W., TANG, G., THURNHAM, D., YIN, SHI-AN., BIESALSKI, H. K., (2010).  $\beta$ -Carotene is an important Vitamin A source for Humans. *The Journal of Nutrition.* 140. 2268S-2285S.
- GUTIERREZ, M.C., PARRY, A., TENA, M., JORRIN, J., EDWARDS, R. (1995). Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochemistry* 38, 1185–1191.
- GUPTA, P. K., VARSHNEY, R. K., SHARMA, P. C., RAMESH, B. (1999). Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding*, Vol. 118, no. 5, 369-390.
- HAHN S.K., KEYSER, J. (1985). Cassava; A basic food of Africa, outlook on Agriculture, 14: 95–99.
- HUANG, J., BACHEM, C., JACOBSEN, E., VISSER, R. (2001). Molecular analysis of differentially expressed genes during posharvest deterioration in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) tuberous roots. *Euphytica* 120: 85-93.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. (1998). Carotenoids. En su: IARC Handbooks of Cancer Prevention. Vol. 2: World Health Organization. Francia, 346 pp.
- JACOB, H. J., LINDPAINTENER, K., LINCOLN, S. E., *et al.*, (1991). Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell*, Vol. 67, no. 1, 213-224.
- JEHAN, T., LAKHANPAUL, S. (2006). Single nucleotide polymorphism (SNP)-Methods and applications in plant genetics: A review. *Indian Journal of Biotechnology*, Vol. 5, 435-459.
- JENNINGS, D. L., IGLESIAS, C. (2002). Breeding for Crop Improvement. En: CAB International. Cassava: Biology, production and utilization. p. 149-166.
- JIANG, GUO-LIANG. (2013). Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants. En: Plant Breeding from Laboratories to Fields. INTECH. Disponible en línea: <http://dx.doi.org/10.5772/52583>. (Consultado el 31 de enero de 2016).
- KUMAR, L. S. (1999). DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advances* 17, 143-182.
- LEFEBVRE, V., CHEVRE, A. M. (1995). Tools for marking plant disease and pest resistance genes, a review. *Agronomie*, 15, 3–19.
- LEWIS, Z. A., SHIVER, A. L., STIFFLER, N., MILLER, M. R., JOHNSON, E. A., *et al.*, (2007). High-density detection of restriction-site associated DNA markers for rapid mapping of mutated loci in *Neurospora*. *Genetics* 177: 1163-1171.
- LI, H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetic parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, 27, 2987-2993.
- LI, H., DURBIN, R. (2009). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 26, 589-595.

- LUNTER, G., GOODSON, M. (2011). Stampy: a statistical algorithm for sensitive and fast mapping of Illumina sequence reads. *Genome Research*, 21, 936-939.
- MILLER, M. R., DUNHAM, J. P., AMORES, A., CRESKO, W. A., JOHNSON, E. A. (2007). Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Res* 17: 240-248.
- MONTAGNAC, J. A., DAVIS, C. R., TANUMIHARDJO, S. A. (2009). Nutritional value of cassava for use as a staple food and recent advances for improvement. *Compr. Food Sci. Food Saf.* 8, 181–194.
- MORANTE, N., SÁNCHEZ, T., CEBALLOS, H., CALLE, F., PÉREZ, J. C., EGESI, C., CUAMBE, C. E., ESCOBAR, A. F., ORTIZ, D., CHÁVEZ, A. L., FREGENE, M. (2010). Tolerance to Postharvest Physiological Deterioration in Cassava Roots. *CROP SCIENCE*, Vol. 50, 1333-1338.
- MUELLER, R.L. (2004). First-generation agents: aspirin, heparin and coumarins. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 17, 23–53.
- NASSAR, N. M. A. (2007). Wild and indigenous cassava, *Manihot esculenta* Crantz diversity: An untapped genetic resource. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 54: 1523-1530.
- NASSAR, N. M. A., ORTIZ, R. (2007). Cassava improvement: challenges and impacts. *J. Agric. Sci.* 145, 163–171.
- NIELSEN, R., PAUL, J. S., ALBRECHTSEN, A. SONG, Y. S. (2011). Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nature Reviews Genetics*, 12, 443-451.
- NOON, R., BOOTH, R. (1977) Nature of post-harvest deterioration of cassava roots. *Transactions of the British Mycological Society* 69: 287-290.
- OPHIR, R., GRAUR, D. (1997). Patterns and rates of indel evolution in processed pseudogenes from humans and murids. *Gene* Vol. 205, no. 1-2, 191-202.
- OLSEN, K. M., SCHAAL, B. A. (1999). Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 5586–5591.
- PACHECO, J. A. de C. (1952). Alterações de qualidade da fécula durante o armazenamento das raízes de mandioca. *Bragantia* 12, 297-298.
- PALOZZA, P., KRINSKY, N. I. (1992). Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: An overview. *Meth Enzymol.* 213, 403-420.
- PETERSEN, M., STRACK, D., MATERN, U. (1999). Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds. En: Wink, M. (Ed.), *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Academic Press, Sheffield, pp. 151–185.
- RAO, A. V., RAO, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*. Volume 55 (3), 207-216.
- REILLY, K., (2001). Oxidative Stress Related Genes in Cassava Post-harvest Physiological Deterioration. Tesis de Doctorado. University of Bath. 263 pp.

- REILLY, K., GÓMEZ, V. R., BUSCHMANN, H., TOHME, J., BEECHING, J. R. (2003). Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Molecular Biology* 53, 669-685.
- REILLY, K., YUANHUANI, H., THOME, J., BEECHING, J. (2001). Isolation and characterization of cassava catalase expressed during post-harvest physiological deterioration. *Biochim. Biophys. Acta*, 1518, 317-323.
- REILLY, K., BERNA, D., CORTES, D. F., GOMEZ-VASQUEZ, R., THOME, J., BEECHING, J. (2007). Towards identifying the full set of genes expressed during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Mol. Biol.*, 64, 187-203.
- RICKARD, J. E. (1982). Investigation into post-harvest behavior of cassava roots and their response to wounding. Thesis Ph.D. Biochemist University of London.
- RICKARD, J. E., COURSEY, D. G. (1981). Cassava storage. Part 1: Storage of fresh cassava roots. *Tropical Science* 23, 1-32.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D., KIMURA, M. (2004). HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. HarvestPlus Technical Monograph Series 58 p.
- ROGERS, D. J., APPAN, S. G. (1973). *Manihot Manihotoides* (Euphorbiaceae). Reviewed Works. *Flora Neotropica* Vol.13, 272 pp. Disponible en <http://www.jstor.org/stable/4393691>.
- SANCHEZ, T., CHAVEZ, A. L., CEBALLOS, H., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., NESTEL, P., ISHITAMI, M. (2006). Reduction or delay of post-harvest physiological deterioration in cassava roots with higher carotenoid content. *Journal of the Science of Food and Agriculture* Vol. 86, 634-639.
- SMITH, K. (2002). Genetic Polymorphism and SNPs.
- STAUB, J. E., KUHNS, L. J., MAY, B., GRUN, P. (1982). Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes. *J. Am. Sci.* 107, 405-408.
- SWATI, P. J., PRABHAKAR, K.R., VIDYA, S. G. (1999). Molecular markers in plant genome analysis. *CURRENT SCIENCE*, Vol. 77. No. 2, 230-240.
- TANAKA, Y., DATA, E. S., HIROSE, S., TANIGUCHI, T., URITANI, I. (1983). Biochemical-changes in secondary metabolites in wounded and deteriorated cassava roots. *Agric. Biol. Chem.* 47, 693-700.
- VIGNAL, A., MILAN, D., SAN CRISTOBAL, M., EGGEN, A. (2002). A Review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34. 275-305.
- VODENICHAROVA, M (1989). Use of proteins as molecular-genetic markers in plants. *Genet. Sel.* 22, 269-77.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., *et al.*, (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. Vol. 23, no. 21, 4407-4414.
- WAKSMUNDZKA-HAJNOS M., HAWRYL M. A. (2008). Application of TLC in the Isolation and Analysis of Coumarins. En: Thin Layer Chromatography in Phytochemistry.



- WAKSMUNDZKA-HAJNOS M., SHERMA J., KOWALSKA T. (eds.). *Cromatographic science series*. Volume 99. Pp 365-375.
- WANG, D. G., FAN, J. B., SIAO, C. J. *et al.*, (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, Vol. 280, no. 5366, 1077-1082.
- WEBER, J. L., MAY, P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction, *American Journal of Human Genetics*, vol. 44, no. 3, pp. 388–396.
- WELSH, J., McCLELLAND, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. Vol. 18, no. 24, 7213-7218.
- WHEATLEY, C., LOZANO, C., GOMEZ, G. (1985a). Post-harvest deterioration of cassava roots, En: COCK, J. H., REYES, J. A. (Eds.), Cassava: Research, Production and Utilization. pp. 655-671. UNDP-CIAT, Cali.
- WHEATLEY, C. C., SCHWABE, W. W. (1985b). Scopoletin involvement in post-harvest physiological deterioration of cassava root (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Exp. Bot.* 36, 783–791.
- WURDACK, K. J., HOFFMANN, P., CHASE, M. W. (2005). Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid RBCL and TRNL-F DNA sequences. *AM. J. Bot.* 92 (8): 1397-1420.
- XU, Y. (2010). *Molecular Plant breeding*. CAB International.
- YOUNG, N. D. (1994). Plant gene mapping. *Encyclopedia of Agricultural Science*. 3, 275–282.
- YU LIAO, P., LEE, K. H. (2010). From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. *Biochemical Engineering Journal*, 49, 149-158.



# CAPÍTULO 1

## IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE *Manihot esculenta* Crantz CON TOLERANCIA AL DFP EN FAMILIAS SEGREGANTES EN CAROTENOIDES EN LA RAÍZ

### RESUMEN

Se estudió el comportamiento del deterioro fisiológico pos cosecha (DFP), en raíces de *Manihot esculenta* Crantz, pertenecientes a las familias GM3732 y GM3736, seleccionadas por su variabilidad en el contenido de carotenoides y materia seca. Se valoraron características como contenido de ácido cianhídrico (HCN), contenido total de carotenoides (CTC), contenido de beta caroteno (BC), escopoletina (ES) y malondialdehído (MDA) durante 4 ensayos distribuidos en los años 2013 CIAT, 2014 CIAT, 2014 SUCRE y 2015 VILLAVICENCIO. El contenido de MDA evaluado, permitió inferir que los carotenoides no actúan como antioxidante, que impida el desarrollo del DFP, demostrando que el CTC y BC no revela contribución suficiente, para minimizar el DFP de forma directa. Los análisis univariados para DFP, MS, HCN, CTC, BC, ES, demostraron que existe alta variabilidad entre genotipos para las características estudiadas, evidenciando que el DFP debe ser evaluado en diferentes localidades y años de cosecha para observar el comportamiento real de cada individuo. El análisis de correlación de Pearson arrojó correlaciones significativas entre DFP y ES ( $0,55 p < 0,0001$ ), DFP y MS ( $0,32 p < 0,0001$ ), DFP y CTC ( $-0,28 p < 0,0012$ ). Se logró seleccionar 13 genotipos tolerantes a DFP y 14 susceptibles. La caracterización genética de estos genotipos, posibilitó la obtención de 361 SNPs bialélicos y 15 genes como potenciales candidatos a marcadores moleculares para DFP.

**Palabras clave:** SNP, genes, tolerante, susceptible, escopoletina, marcadores.

# IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENOTIPOS DE *Manihot esculenta* Crantz CON TOLERANCIA AL DFP EN FAMILIAS SEGREGANTES EN CAROTENOIDES EN LA RAÍZ

## 1.1 Introducción

La yuca es un cultivo único, debido a que cada una de las partes de la planta puede ser utilizada, siendo las raíces el producto más importante de la yuca (Ceballos *et al.*, 2010). También ofrece la ventaja de presentar una fecha de cosecha flexible, es decir permite que el agricultor mantenga las raíces en el suelo hasta que realmente, por condiciones de mercado sea necesaria la cosecha (Iglesias *et al.*, 1997).

Los cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) a menudo demuestran adaptación específica, debido a su alta sensibilidad a la interacción genotipo x ambiente; donde el genotipo (G) se refiere al conjunto de genes que poseen los individuos, que son importantes para la expresión de los caracteres (rasgos) bajo estudio (Maroya, *et al.*, 2012). El ambiente (E), es definido como todos los factores no genéticos que influyen en la expresión de rasgos e incluye todos los factores biofísicos (Basford y Cooper, 1998). En este sentido la interacción GxE, es el cambio en el carácter de interés cuando los individuos se cultivan en diferentes entornos, como resultado de la respuesta diferencial de los genotipos a diversos factores edafoclimáticos y bióticos (Maroya, *et al.*, 2012).

En cuanto a composición, la yuca presenta gran variabilidad en términos genotípicos, ya que depende del tejido específico (raíz u hoja) o factores como ubicación geográfica, genotipo, edad fisiológica y condiciones ambientales. Las raíces y hojas constituyen el 50% y 6% respectivamente de la planta de yuca madura y son las partes de mayor valor nutricional (Tewe y Lutaladio, 2004). La importancia de la yuca radica en que es un cultivo básico en regiones como Africa tropical, Asia y Latinoamérica, por esta razón es un cultivo objetivo para incrementar su biofortificación, para lo cual la fundación Bill y Melinda Gates ha apoyado la iniciativa mundial para el desarrollo de germoplasma de yuca enriquecida con nutrientes biodisponibles desde el año 2005; los objetivos principales de dicha iniciativa son seis: incrementar minerales zinc y hierro, proteínas, vitaminas A y E, disminuir el contenido cianogénico, retardar el deterioro pos cosecha y desarrollar variedades resistentes a virus (Montagnac, *et al.*, 2009).

El DFP, es una de las limitaciones más importantes en la producción y comercialización de yuca en fresco, es así como Sanchez *et al.*, (2006), estudiaron el comportamiento de 101 clones de yuca en términos de DFP, materia seca y contenido total de carotenoides, encontrando una correlación positiva débil entre el DFP y materia seca ( $R^2=0.1$ ;  $p<0.01$ ) y una relación inversa entre DFP y contenido total de carotenoides en las raíces ( $R^2=0.515$ ;  $p<0.01$ ), presumiendo que hay un efecto antioxidante generado por la actividad antioxidante de los carotenoides sobre la reducción del DFP.

El objetivo del presente capítulo fue, identificar genotipos segregantes en carotenoides con tolerancia al DFP, determinar si hay asociación entre carotenoides y la reducción a DFP, y caracterizar a nivel genético.

## 1.2 Materiales y métodos

### 1.2.1 Localización

Se realizaron 4 cosechas de genotipos de *Manihot esculenta* Crantz, para evaluación del DFP y características de interés. Dos de las cuales fueron realizadas en el Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT ubicado en el municipio de Palmira (Departamento del Valle del Cauca) a 03° 30' latitud Norte y 76° 30' longitud Oeste, 965 m.s.n.m. con 24 °C de temperatura promedio anual (Cuambe, 2007) en dos años consecutivos mayo 2013 y octubre 2014; una cosecha realizada en el municipio de Ovejas-Sucre a 09° 31' 48" latitud Norte, 75° 14' 01" latitud Oeste, 265 m.s.n.m. con temperatura media anual de 27°C<sup>2</sup> en noviembre 2014 y una cosecha realizada en Corpoica estación la libertad, Villavicencio-Meta a 04° 03' 35" 9742'N, 73° 28' 8.8776'W, 366 m.s.n.m. con 26°C de temperatura promedio anual (Monroy *et al.*, 2013) Enero 2015.

### 1.2.2 Material biológico

A partir de estudios previos realizados en CIAT durante los años 2011, 2012 y primer semestre 2013 en 90 clones de genotipos pertenecientes a las familias GM3736 y GM3732, en términos de contenido de carotenos totales, beta caroteno y materia seca en la raíz; se seleccionaron mediante análisis de Cluster, los 44 clones que presentaran valores bajos, intermedios y altos en contenido de carotenoides y materia seca, empleando las raíces pertenecientes a tres plantas de cada genotipo para los análisis en las diferentes épocas de cosecha.

### 1.2.3 Establecimiento de campo

De cada genotipo se sembraron 10 semillas clonales (estacas) obtenidas a partir de tallos de plantas cosechadas, realizando siembras durante los años 2012, 2013 y 2014, obteniendo 10 plantas por genotipo. La disposición de las plantas en el campo experimental fue de 0.8 m entre plantas y 1.20 m entre surcos, en el centro de caballones (camas) de 30 cm de altura y empleando aleatorización de genotipos.

### 1.2.4 Cuantificación del contenido de materia seca (MS)

De cada genotipo cosechado, se seleccionan 4 raíces de tamaño comercial (5 cm de diámetro y mínimo 18 cm de longitud), a las cuales se elimina la epidermis y se homogeniza la pulpa de yuca, usando un procesador de alimentos en acero inoxidable (SKYMPSEN Food Processor MODEL PA-7SE), obteniéndose una masa uniforme, a partir de la cual se toman tres muestras y con ellas se determinará el contenido de materia seca MS mediante la técnica reportada por la AOAC (AOAC, 1995), que consiste en el secado del material en estufa a 105 °C por 24 horas.

El porcentaje de materia seca (MS) se calcula mediante la ecuación 1.1. Esta prueba se realizara para caracterizar cada uno de los genotipos evaluados en este estudio, permitiendo observar cuales son los genotipos más sobresalientes, en cuanto al carácter de interés agronómico y agroindustrial % MS.

---

<sup>2</sup> [https://es.wikipedia.org/wiki/Ovejas\\_\(Sucre\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Ovejas_(Sucre))

$$\%MS = \frac{\text{Peso inicial de la muestra}}{\text{Peso final de la muestra}} \times 100 \quad \text{Ec. 1.1}$$

### 1.2.5 Cuantificación del contenido de ácido cianhídrico (HCN)

La cuantificación de HCN total se realiza a todas las muestras de yuca, de cada uno de los genotipos empleados en el estudio, haciendo uso de la metodología descrita por Essers *et al.*, (1993). La cual consiste en homogeneizar en licuadora 40g de pulpa a temperatura ambiente con 50 ml de medio de extracción, durante 3 minutos. Guardar una alícuota del homogenizado en tubos de 20 ml. Centrifugar una parte del homogenizado anterior durante 10 minutos a 6000 rpm a 25°C.

Almacenar el centrifugado (extracto) a 4°C, el cual es estable por 2 meses. Agregar 0.1 ml del extracto a tubos con tapa rosca que contengan 0.4 ml de solución tampón fosfato 0.1 M pH 7. Agregar 0.1 ml de linamarasa y tapar. Incubar los tubos a 30 °C durante 15 minutos; terminar la reacción agregando 0.6 ml de NaOH 0.2 M. Esperar 5 minutos a temperatura ambiente y agregar 2.8 ml de solución tampón fosfato 0.1 M pH 6.0. Analizar espectrofotométricamente de la siguiente manera: agregar 0.1 ml de cloramina T, esperar exactamente 5 minutos, luego adicionar 0.6 ml del reactivo Isonicotinato/1,3-dimetil barbiturato. Después de 10 minutos, leer la absorbancia a 605 nm. Utilizar una curva standard de KCN, descrita posteriormente.

Realizar el análisis por duplicado y preparar un blanco, la cuantificación se realiza empleando la ecuación 1.2.

#### Preparación de la curva standard con cianuro de potasio y obtención de los resultados

**Solución Stock:** Secar KCN durante 12 horas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, en un desecador. Preparar una solución de 1 mg/ml.

**Solución Standard:** Preparar una solución de 1 µg/mL partiendo de la solución stock de 1 mg/mL. A partir de esta solución se prepara la curva estándar.

#### CALCULOS

$$\text{HCN (ppm)} = \frac{m_{\text{HCN}} \times \text{Vol. corregido} \times Fd}{m_{m.ps} (g) \times 0.1} \quad \text{Ec. 1.2}$$

Dónde:

$m_{\text{HCN}}$ : µg HCN obtenidos de la curva.

$\text{Vol. corregido}$ : Vol. Solución extractora (50 ml) + (PF - (PF \* (MS/100))).

$Fd$ : Factor de dilución (Volumen total de dilución/ volumen de muestra).

$PF$ : Peso fresco de la muestra (40 g en pulpa).

$MS$ : % de Materia Seca de la muestra.

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

0.1: Volumen de la muestra diluido empleado en la reacción

### 1.2.6 Predicción de carotenos totales (CTC) y β-caroteno (BC) por NIRs (Near-infrared spectroscopy)

De cada genotipo se emplearon dos muestras, cada muestra, debidamente homogenizada, con el procesador de alimentos (SKYSEN Food Processor MODEL PA-7SE), las muestras se coloca en

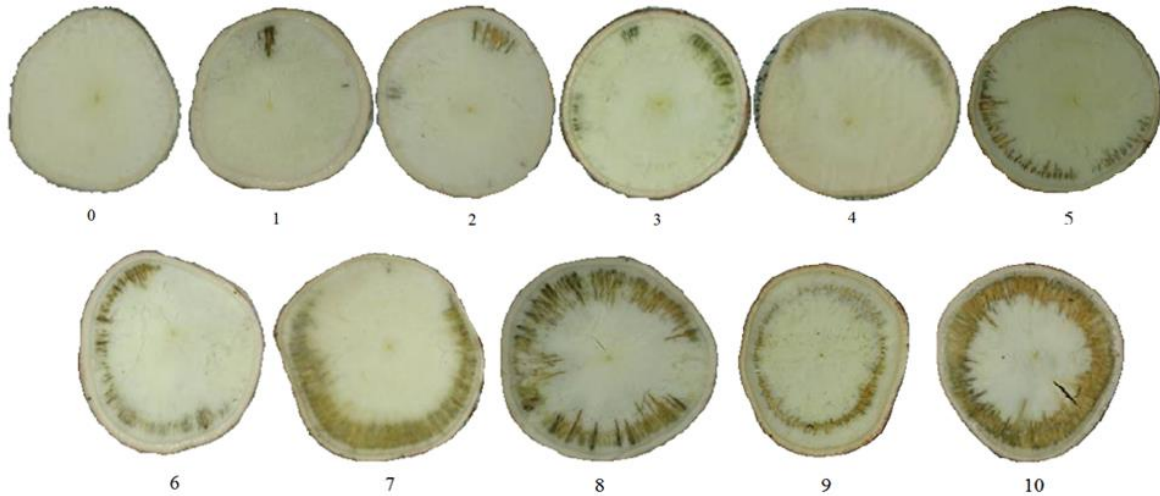
celdas de cuarzo para predicción mediante NIRs. El equipo de predicción permite recoger espectros de cada muestra, usando un espectrómetro (FOOS 6500, monocromador, con módulo de muestreo, auto celda). Las muestras se miden con una longitud de onda de 400 nm a 2500 nm (con paso de adquisición de 2 nm), obteniendo predicciones eficientes, en cuanto a contenido de materia seca (%), carotenos totales ( $\mu$ /g) y  $\beta$ -caroteno total ( $\mu$ /g) (Sánchez *et al.*, 2012).

### 1.2.7 Evaluación del Deterioro Fisiológico Pos Cosecha (DFP)

La evaluación del DFP en raíces de yuca, se efectuó empleando el método desarrollado por Wheatley *et al.*, (1985a), con algunas modificaciones. Se seleccionaron 6 raíces de tamaño comercial, por cada genotipo, con un tamaño mínimo de 18 cm, sin daños mecánicos y sin pudrición de pre cosecha, a cada raíz, se le eliminaron los extremos proximal y distal, mediante cortes transversales, obteniendo una longitud de aproximadamente 15 cm, para acelerar el proceso y evitar la contaminación microbiana, que tiene lugar durante largos periodos de almacenamiento. La sección distal fue cubierta con una película de PVC, para evitar el flujo de oxígeno por este extremo y forzar a que el DFP se desarrolle por el extremo proximal, el cual se deja descubierto, como se presenta en la figura 1-1; las raíces se almacenaron a temperatura ambiente, en un lugar protegido del sol y lluvia y expuesto al aire libre. Las raíces se evaluaron después de 5 días de almacenamiento, realizando 7 cortes de forma transversal a lo largo de la raíz, comenzando en el extremo proximal y cada corte con un espesor de 2 cm. A cada rodaja obtenida se le asignó una puntuación que varía de 1 a 10, y corresponde al porcentaje de la superficie del corte que presenta decoloración del parénquima como se puede observar en la figura 1-2 (1=10%, 2=20%, etc.). La puntuación media del DFP para cada raíz se calculó promediando los puntajes de las siete secciones transversales (rodajas) y por genotipo a través del promedio entre las raíces. Genotipos con valores promedios por debajo de 12% en DFP se consideran tolerantes, por encima del 12% se consideran susceptibles. Las raíces que presentaron síntomas de descomposición microbiana o afectada por insectos, se descartaron.

**Figura 1-1.** Montaje de raíces para evaluación de deterioro fisiológico pos cosecha



**Figura 1-2.** Escala de evaluación de deterioro fisiológico pos cosecha

### 1.2.8 Cuantificación del contenido de escopoletina (ES)

Se empleó la metodología descrita por Sánchez *et al.*, (2013), con algunas modificaciones. Se pesan 5 gramos de yuca homogenizada, en un tubo falcón de 50 ml; obtenida a partir de las rodajas sin epicarpio, de raíces con DFP que ya han sido evaluadas, la yuca homogenizada se obtiene mediante el uso del procesador de alimentos en acero inoxidable (SKYMSEN Food Processor MODEL PA-7SE), luego se adiciona 5 ml de etanol al 98% (J.T. Baker, 9000-03 (USA)), y se homogeniza en un ultraturrax durante 1 minuto. El extracto se centrifugó a 10000 rpm a 25°C por 5 minutos, el sobrenadante se adiciona a un tubo falcón nuevo; al precipitado se le adiciona 5ml de etanol, se realizó vortex por 30 segundos, se centrifugó de nuevo a las mismas condiciones descritas. Este paso se repite una vez más y los sobrenadantes se juntaron y re-ensavaron en viales de vidrio, por último se concentró la muestra hasta un volumen de 1 ml en un evaporador de nitrógeno a 80 °C (NEvap 112, Organomation Associates, Berlin, MA, USA), posteriormente fue filtrado con filtros millex de 0,22µm a viales de HPLC (Agilent Technologies 1200series, Waldbronn, Alemania), para su inyección y posterior cuantificación.

Para la separación y cuantificación de la escopoletina (ES), se emplea una columna de fase inversa (Techsphere BDS C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm, HPLC Technology, UK) en un sistema de HPLC (Agilent Technologies 1200 serie, Waldbronn, Alemania), utilizando un detector DAD (No. DE64257792). La columna se mantiene a 30 °C. Se usa un gradiente de fase móvil A (0.5% de ácido fosfórico en solución acuosa) y fase móvil B acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN). La composición del gradiente es de 1-60% de B en 30 min, utilizando un flujo de 1.3 mL/min, con un volumen de inyección de 15 µL. El compuesto se detecta simultáneamente a 215, 280 y 350 nm, se identifica mediante el tiempo de retención y el análisis espectral del estándar puro de ES (Sigma-Aldrich: Scopoletin ≥ 99%— No. S2500). La cuantificación de la ES se determina a través de una curva estándar de calibración con ocho niveles de concentraciones (5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 µg/mL) cada nivel se realiza por triplicado.

### 1.2.9 Análisis de contenido de malondialdehído (MDA)

Se emplea el método descrito por Dhindsa *et al.*, (1981), con algunas modificaciones. De cada genotipo se pesan 200 mg de muestra liofilizada de pulpa de yuca, en un tubo eppendorf de 2 ml y se adiciona 1 ml de solución de extracción (Ácido Tricloroacético (TCA) al 0,1%), seguido por homogenización mediante vortex (VX 2500 Multi-Tube Vortexer, VWR) por 10 minutos a una velocidad de 2400 rpm, posteriormente centrifugado a 10000 rpm a 25°C. Del sobrenadante obtenido se toman 300 µL y se



mezclan con 1.5 mL de solución A (20% TCA; 0.5% de TBA (ácido 2-tiobarbiturico) y 0.04% de BHT (Hidroxitolueno butilado)) en un tubo nuevo, se realiza vortex por 30 segundos, continuando con incubación en baño maría (Thermo Fisher Scientific) a 95°C por 1 hora, seguido se enfrían en baño con hielo para detener la reacción, posteriormente se centrifugan de nuevo y se mide la absorbancia a longitudes de onda de 532 nm y 600 nm. La concentración de MDA se determina de acuerdo a la ley de Lamber Beer, empleando el coeficiente de extinción de 155mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> con la ecuación 1.3.

$$MDA \left( \frac{nmol}{mg} \right) = \frac{(Abs_{532nm} - Abs_{600nm}) * 10^6 * VolF (\mu L)}{155 * 300 \mu L * Masa (mg)} \quad \text{Ec. 1.3}$$

Donde:

Abs: Es la absorbancia a cada una de las longitudes de onda descritas en la ecuación

10<sup>6</sup>: Son factores de conversión a nanomol

VolF: Volumen final de la muestra en microlitros

155: Coeficiente de extinción en milimol por cm

Masa: Masa de la muestra

### 1.2.10 Identificación de SNPs

Para llevar a cabo la identificación de SNPs, se usaron solo aquellos genotipos que presentaron valores estimados de DFP inferiores a 0.22 y superiores o iguales a 1; 13 genotipos presentaron el fenotipo tolerante y 14 el susceptible, mediante el empleo de la secuenciación genética RAD-Sequencing (Baird, *et al.*, 2008), se llevó a cabo una identificación de variaciones bialélicas de nucleótido simple (SNPs), que diferenciaran las poblaciones tolerantes y susceptibles al deterioro fisiológico pos cosecha. Para esto, se seleccionó genotipos que presentaran diferencias fenotípicas en el valor estimado de DFP, es decir tolerantes aquellos con DFP menor a 0.22 y susceptibles con DFP superior o igual a 1. Se extrajo ADN de las muestras seleccionadas utilizando la metodología descrita por Doyle & Doyle (1990) y se enviaron al Beijing Genomic Institute (BGI), donde se realizó la secuenciación genética por RAD sequencing (Baird, *et al.*, 2008), esta técnica consiste en la digestión de ADN genómico, de múltiples muestras de interés con enzimas de restricción seleccionadas, y adaptadores con etiquetas específicas de las muestras, con terminaciones salientes que corresponden al sitio de corte de la enzima de restricción, que son ligados a los fragmentos de restricción digeridos (Davey *et al.*, 2013). Estos adaptadores son cortados a un tamaño adecuado (típicamente de 300-700pb) para secuenciación con Illumina mediante síntesis. Una vez obtenidas las secuencias, se utilizó el software NGSEP (Next Generation Sequencing Eclipse Plugin) (Cruz *et al.*, 2014) para mapear las secuencias crudas de illumina a la versión actualizada del genoma de referencia AM560-2 vs 6.1 (Prochnik 2012), disponible en Phytozome ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)), con el propósito de identificar SNPs entre los genomas en estudio y el genoma de referencia, generando un catálogo de variantes y obteniendo los genotipos correspondientes a cada muestra.

El archivo con los genotipos de las variaciones identificadas en cada una de las muestras se obtuvo en formato VCF (Variant Call Format). Este archivo, posteriormente fue filtrado para eliminar las variaciones que aún no estuvieran ensambladas en cromosoma en el genoma de referencia (es decir que estuvieran aun en scaffolds), y se seleccionaron aquellas variaciones cuya frecuencia del alelo menor (MAF) fuera mayor a 0,05 en la población analizada y que se hubieran genotipado en por lo menos 85 % de las muestras. Se compararon las frecuencias alélicas de las poblaciones tolerantes y susceptibles a DFP y se seleccionaron las variaciones que presentaron una diferencia alélica superior a 0,3. Posteriormente, de estas variaciones que potencialmente diferenciarían entre las poblaciones susceptibles y tolerantes, se seleccionaron los SNPs que estuvieran anotados en regiones codificantes y que fueran no sinónimos. La visualización grafica de estos SNPs se realizó en el programa FLAPJACK (Milne *et al.*, 2010).

### 1.2.11 Análisis estadísticos

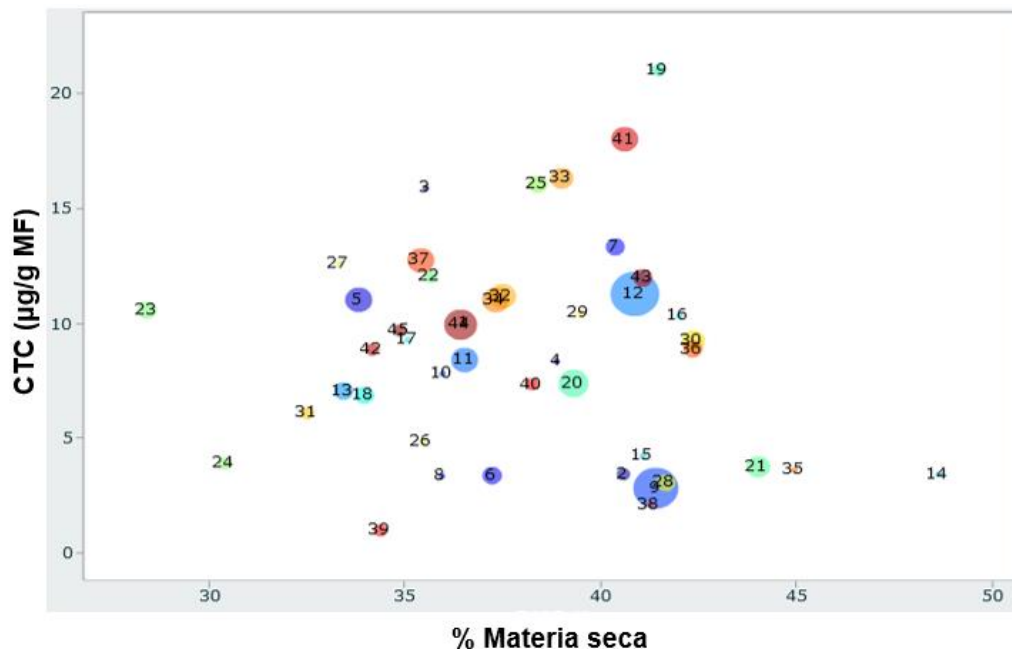
Se realizó un análisis de Clúster para la selección de los genotipos a evaluar fenotípicamente por DFP, empleando el software JMP versión 12.2; mediante análisis de regresión simple y múltiple con el software SAS versión 3.1 (2013), se realizaron graficas de dispersión entre la variable malondialdehído y las demás variables analizadas para observar la relación entre sí, empleando el software JMP versión 12.2; se observó el comportamiento entre los diferentes caracteres como HCN, MS, ES, carotenos totales, beta caroteno con respecto a DFP, para el primer ensayo cosechado en 2013, posteriormente se realizó análisis univariado por genotipo empleando los datos obtenidos a partir de los 4 ensayos realizados, se efectuó análisis de correlaciones mediante correlación de PEARSON, con el software estadístico Infogen Versión 2014. Se realizó análisis estadístico de cada uno de los 4 ensayos en estudio y además 4 ensayos adicionales que se describen en el capítulo dos del presente documento, en el que se estudian los efectos de genotipo, temporada, día de cosecha, rodaja, lluvia, y la obtención final de un estimador numérico que representa el DFP, el cual permitió explicar la mayor variación encontrada por genotipo; para lo cual se utilizó el software estadístico R versión 3.1.1. y a partir del cual se realizó la selección de genotipos tolerantes y susceptibles al DFP para el análisis genético.

## 1.3 Resultados y discusión

### 1.3.1 Selección de genotipos

A partir del análisis de clúster mediante el software JMP versión 12, realizado a 90 clones de *Manihot esculenta* Crantz pertenecientes a la familia segregante en carotenos, empleando datos obtenidos previamente por el programa de mejoramiento genético de yuca, durante los años 2011, 2012 y 2013, se logró obtener 45 grupos de genotipos, que presentan variabilidad en términos de contenido total de carotenoides (CTC), materia seca (MS) y tamaño de raíz, como se puede observar en la figura 1-3.

**Figura 1-3.** Variabilidad entre grupos de familias segregantes en carotenoides, en términos de CTC y % materia seca, seleccionados en 2013

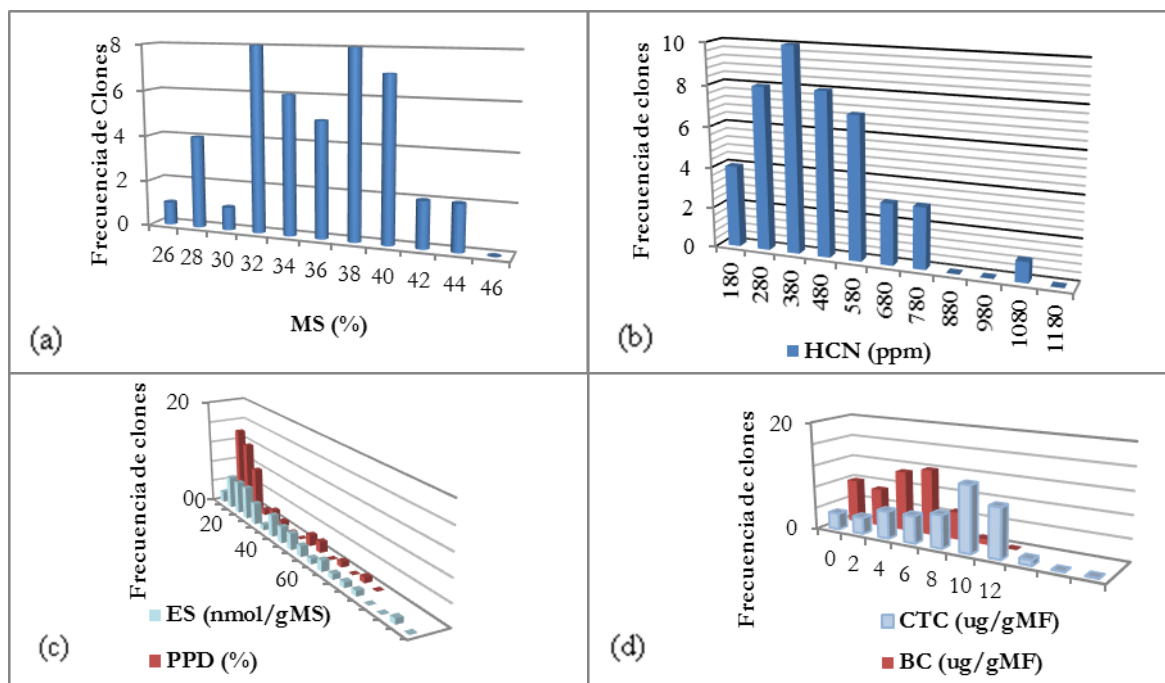


Grupos con círculos grandes, poseen mayor número de genotipos. La característica CTC osciló entre 0.96 a 21.03 con media de 8.58  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco, mientras que la MS estuvo entre 28.38 a 48.62 con media 38.22 %. A partir de los grupos formados, se seleccionó un genotipo por cada grupo que presentara tamaño de raíz comercial, obteniendo un total de 44 genotipos para realizar el estudio de DFP.

### 1.3.2 Caracterización de genotipos con raíces amarillas

Los genotipos seleccionados se cosecharon y se evaluaron en mayo de 2013 en términos de DFP, carotenos totales, beta caroteno, HCN, MS, ES y MDA, presentando amplia variabilidad, como se presenta en la figura 1-4, mediante graficas de distribución.

**Figura 1-4.** Variabilidad de genotipos en términos de MS, HCN, ES, DFP, CTC y BC.



La MS osciló entre 26-44 (%) con media de 36.53%, HCN entre 180-1080 ppm, ES varió de 25-195 nmol/gMS y media de 82.32 nmol/gMS, DFP entre 0-65% cuya media es 13.83%, CTC de 0-14 ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ ) y BC de 0-10 ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ ). El análisis de regresión simple y múltiple, arrojó que las variables que presentan mayor correlación son el DFP y ES con 37,29%. En la tabla 1-1 se presentan las ecuaciones obtenidas a partir del análisis de regresión, para la variable dependiente DFP (%), siendo las ecuaciones 5, 6 y 7 las que mejor explican el comportamiento del DFP; para este caso, pendientes positivas indican que el DFP, se incrementa a medida que aumenta la MS y ES, y viceversa. Estos resultados son acordes con Morante *et al.*, (2010), quien reporta que el DFP se reduce con una concentración mínima de  $9.1\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de CTC.

**Tabla 1-1.** Análisis de regresión lineal simple y múltiple entre la variable dependiente DFP y las variables MS, ES, CTC y BC

Ecuación	R <sup>2a</sup>	Pr>F*
1) DFP (%)= -21.473 + 0.985MS	0.0684	0.0458
2) DFP (%)= -5.9514 + 0.2418ES	0.3729	< .0001
3) DFP (%)= 25.5312 - 1.3723CTC	0.1463	0.0055
4) DFP (%)= 25.4306 - 2.2516BC	0.1706	0.0028
<b>5) DFP (%)= -47.845 + 1.1346MS + 0.2512ES</b>	<b>0.4819</b>	<b>&lt; .0001</b>
<b>6) DFP (%)= -41.1291 + 1.0943MS + 0.2296ES - 0.4185CTC</b>	<b>0.4824</b>	<b>&lt; .0001</b>
<b>7) DFP (%)= -38.188 + 1.0110 MS + 0.2305ES - 0.6932BC</b>	<b>0.4842</b>	<b>&lt; .0001</b>
8) DFP (%)= 0.9837 + 0.2135ES - 0.5553CTC	0.3808	< .0001
9) DFP (%)= 2.9383 + 0,2075ES - 1.2101BC	0.4071	< .0001
10) DFP (%)= -7.5441 + 0.8988MS - 1.3104CTC	0.2038	0.0031
11) DFP (%)= -0.0033 + 0.6656MS - 1.9874BC	0.1910	0.0044

<sup>a</sup> Coeficiente de determinación. \*Significancia estadística del modelo

Mientras que el comportamiento de la producción de MDA antes del almacenamiento de raíces, es decir en el día cero con respecto a variables de interés como MS, HCN, CTC, BC y posterior al almacenamiento por 5 días en relación al DFP y ES, se presenta en la figura 1.5.

La producción de malondialdehído MDA, se presentó tanto en raíces frescas como en raíces almacenadas por 5 días, con variabilidad entre los diferentes genotipos evaluados; encontrando correlaciones negativas entre MDA con MS, HCN, % PPD y ES; con MS ( $Y=46.31 - 0.41*MDA_{día0}$ ,  $r^2=0.49$ ), HCN ( $Y= 623.77 - 4.93*MDA_{día0}$ ,  $r^2=0,03$ ), %PPD ( $Y= 25.15 - 0.30*MDA_{día5}$ ,  $r^2=0.05$ ), y ES ( $Y= 104.92 - 0.611*MDA_{día5}$ ,  $r^2=0.033$ ), figura 1-5 (A, B, E y D respectivamente).

Se presentaron correlaciones positivas entre CTC con MDA ( $Y= 14.20 + 0.38*CTC$ ,  $r^2=0.36$ ) y MDA ( $Y= 14.87 + 0.60*BC$ ,  $r^2=0.44$ ), figura 1-5 (C y D respectivamente), también hay una correlación positiva entre la producción de MDA día 0 y MDA día 5 ( $Y= 16.83 + 0.84 * MDA_{día0}$ ,  $r^2=0.28$ ) no presentada en la figura 1-5.

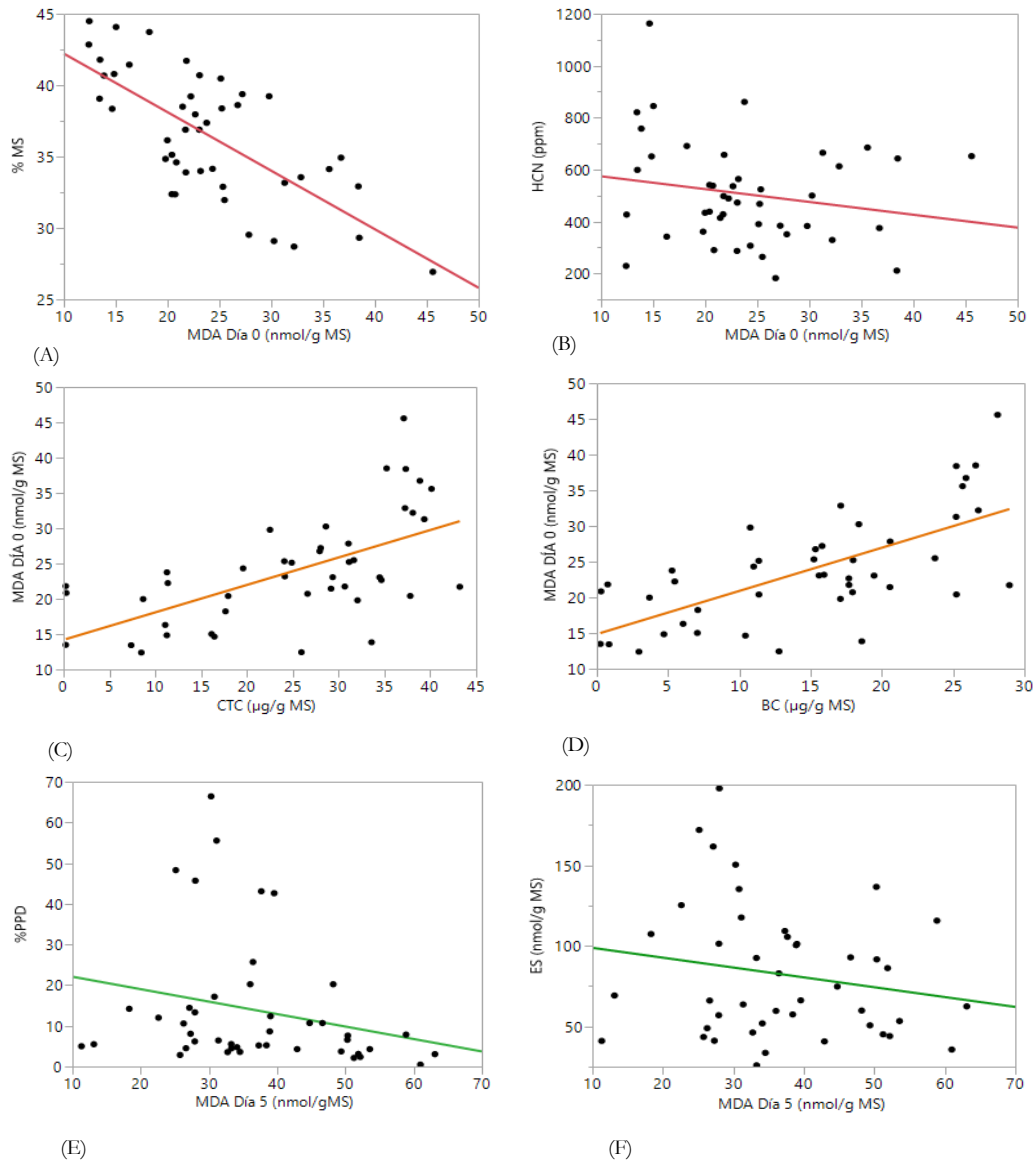
Aunque las correlaciones observadas son bajas para las variables estudiadas, los resultados indican la complejidad que existe, al relacionar las distintas características de interés con compuestos secundarios, que puedan explicar el desarrollo del DFP en raíces de yuca, el cual comienza a partir de la cosecha, generando una cascada de reacciones en cadena, con el propósito de reparar los daños generados en la raíz.

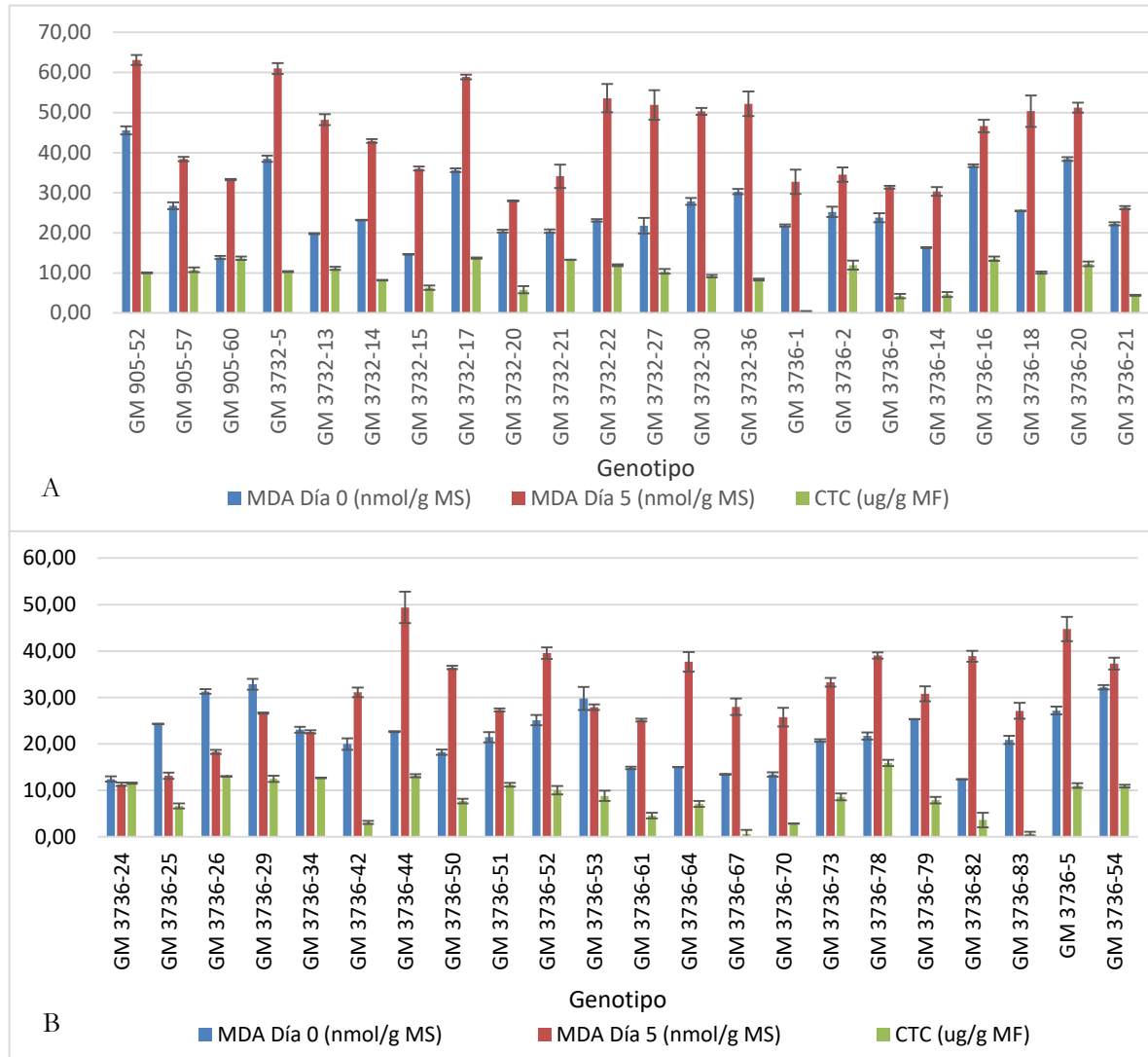
Para este estudio en particular, la correlación negativa entre el DFP (PPD) y MDA, y la correlación positiva entre CTC y MDA no son las esperadas, puesto que se esperaría de forma general, que ante un incremento en DFP se obtenga un incremento en la producción de MDA y ante un mayor CTC se esperaría menor MDA, por efecto de la actividad antioxidante ejercida por los carotenos sobre el DFP como ha sido referenciado en la literatura (Morante *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2006). En este caso no se evidencia de forma simple este fenómeno, debido a que la producción y almacenamiento de compuestos como el MDA, CTC y desarrollo del DFP depende del componente genético (Reilly *et al.*, 2003), como se puede observar en la figura 1-6 (A y B), en donde se presenta variabilidad en la producción de MDA entre el día cero y cinco de almacenamiento.

Solo en cinco genotipos, la producción de MDA fue mayor en el día cero y disminuye al día cinco, resultados acordes a lo reportado por Qiuxiang *et al.*, (2016) quien reporto que la producción de MDA incrementa rápidamente y disminuye con el progreso del DFP, pero la tendencia no es general en todos los genotipos, lo que confirma que cada genotipo genera una expresión genética diferente en la producción de metabolitos secundarios. Entre tanto el CTC no presentó un efecto antioxidante frente

a la peroxidación lipídica de la membrana celular, representada por la producción de MDA, ya que estas dos variables presentaron una correlación positiva en este estudio, lo que permite inferir que el contenido de carotenoides no generan un efecto antioxidante en el parénquima de la raíz. El MDA permite evidenciar que existe un estrés oxidativo y la incapacidad de mantener la homeóstasis celular, en la estructura interna de la raíz de yuca después de la cosecha y durante el almacenamiento, fenómeno que ha sido reportado en otras especies (Sigaud-Kutner, *et al.*, 2005).

**Figura 1-5.** Correlaciones entre la producción de MDA y las variables MS, HCN, CTC, BC, DFP y ES



**Figura 1-6.** Producción de MDA en los días 0 y 5 de almacenamiento y contenido total de carotenoides por genotipo

### 1.3.3 Análisis univariado para las características DFP, MS, HCN, CTC, BC y ES

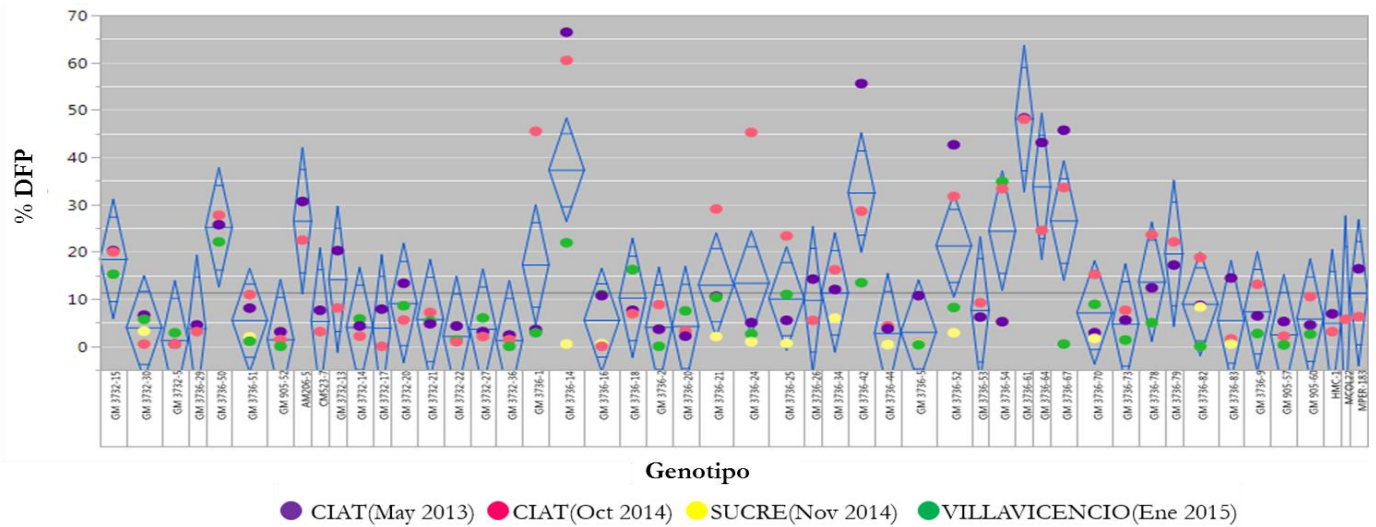
El análisis univariado para las características, DFP, MS, HCN, CTC, BC y ES evaluadas en los genotipos de *Manihot esculenta* Crantz pertenecientes a las familias GM3732 y GM3736, empleando los datos obtenidos de las cosechas realizadas en 2013 CIAT, 2014 CIAT, 2014 SUCRE y 2015 Villavicencio, permitió visualizar la variación respectiva entre cada una de las repeticiones (cosechas), mediante la representación gráfica de rombos y cuya media por genotipo está dada por la línea horizontal central dibujada en los rombos, en cada una de las características estudiadas. En cada variable estudiada se presenta el comportamiento de los genotipos elites AM206-5, CM523-7, HMC-1, MCOL 22, MPER183, empleados como testigos. En la figura 1-7 se presenta el comportamiento por genotipo en cada una de las cosechas, para la variable DFP donde se exhiben los 44 genotipos de las dos familias y los testigos,

cuya media muestral es 11.39 %, un mínimo de 0 % y un máximo de 66.43 % de DFP; la razón F es 2.5542, cuya probabilidad es menor que la razón F, lo que indica que hay diferencias significativas para la variable DFP con una significancia de 0.0001, confirmando que la varianza es altamente significativa como se presenta en la tabla 1-2.

**Tabla 1-2.** Análisis de varianza para la característica DFP por genotipo en familias segregantes en carotenoides

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Genotipo	48	14889,522	310,198	2,5542	<,0001*
Error	95	11537,526	121,448		
C. Total	143	26427,047			

**Figura 1-7.** Comportamiento de la variable DFP por cada genotipo en las diferentes cosechas realizadas



Estos resultados muestran que el DFP es variable tanto dentro de genotipos como entre genotipos; con genotipos que se mantienen en un rango estable de DFP representados en la figura 1-7 como aquellos cuyos valores de DFP son cercanos a la barra horizontal (media), como los son GM3732-36, GM3732-21, GM905-52 entre otros, y genotipos menos estables con una mayor variación cuyos valores de DFP son alejados de la media como ejemplo esta GM3736-14, GM3736-1, GM3736-42, estos genotipos pueden presentar comportamientos de tolerancia o susceptibilidad de acuerdo a las condiciones previas de cosecha, ya que no solo es el componente genético el que influye en el desarrollo del DFP, también las condiciones ambientales juegan un papel importante. Estos resultados son acordes a lo reportado por Wheatley *et al.*, (1985a) y Cuambe (2007). Por lo tanto aquellos genotipos con mayor estabilidad en los ensayos son potenciales como referencia en estudios de DFP, ya que permitirían un acercamiento a la obtención de un valor absoluto del grado de tolerancia o susceptibilidad al DFP.

En cuanto al contenido de materia seca (MS), también se encontraron diferencias significativas entre los genotipos evaluados, como se presenta en el análisis de varianza mostrado en la tabla 1-3 y las medias por genotipo en el anexo A, donde la media muestral fue de 35.93 %, con un mínimo de 16.15% y un

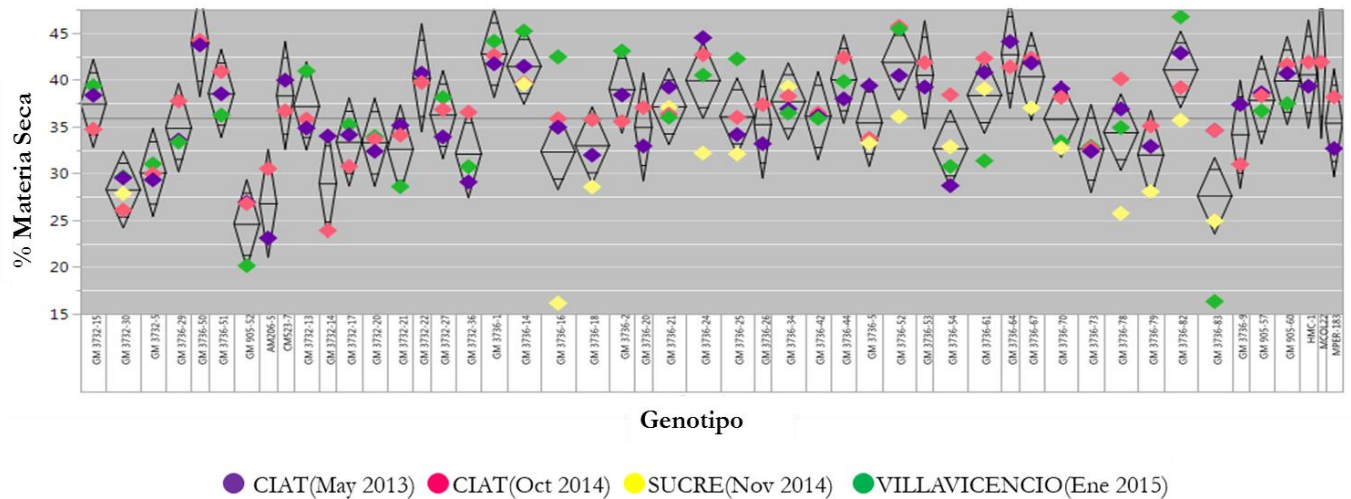
máximo de 46.72 % de MS; de igual modo en la figura 1-8 se muestra la distribución fenotípica para la característica MS por cada genotipo en las repeticiones realizadas.

**Tabla 1-3.** Análisis de varianza para la característica MS en familias segregantes en carotenoides

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Genotipo	48	2850,8115	59,3919	3,5205	<,0001*
Error	99	1670,1511	16,8702		
C. Total	147	4520,9626			

De igual forma el análisis de varianza para las características HCN, CTC, BC y ES se presenta en las tablas 1-4, 1-5, 1-6 y 1-7 respectivamente; en este mismo sentido el comportamiento de estas variables es mostrado en las figuras 1-9, 1-10, 1-11 y 1-12 respectivamente (anexo A). En todas las variables evaluadas hubo diferencias significativas entre los genotipos evaluados excepto para la variable ES, puesto que a pesar de que hay diferencias entre los genotipos no es significativa, además esta variable solo se evaluó en dos cosechas CIAT 2013 y CIAT 2014.

**Figura 1-8** Variabilidad de MS por cada genotipo en las diferentes cosechas



**Tabla 1-4.** Análisis de varianza para la característica HCN en familias segregantes en carotenoides

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Genotipo	48	3203792,1	66745,7	2,2149	0,0005*
Error	93	2802483,9	30134,2		
C. Total	141	6006276,0			



Figura 1-9. Distribución del contenido de HCN por cada genotipo en las diferentes cosechas

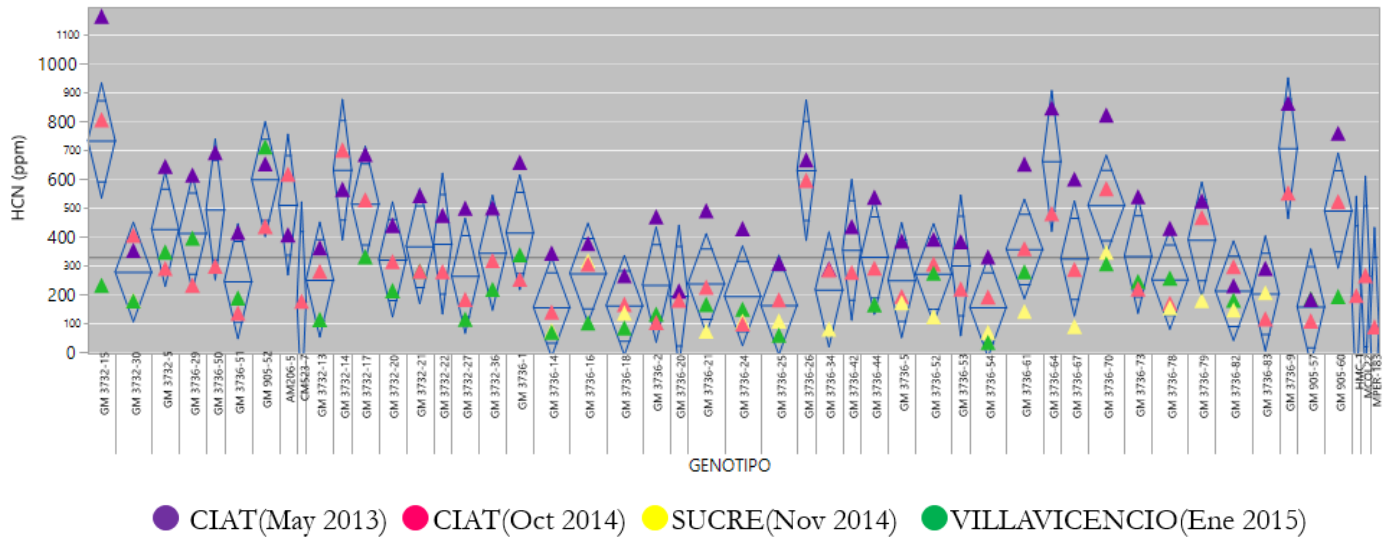
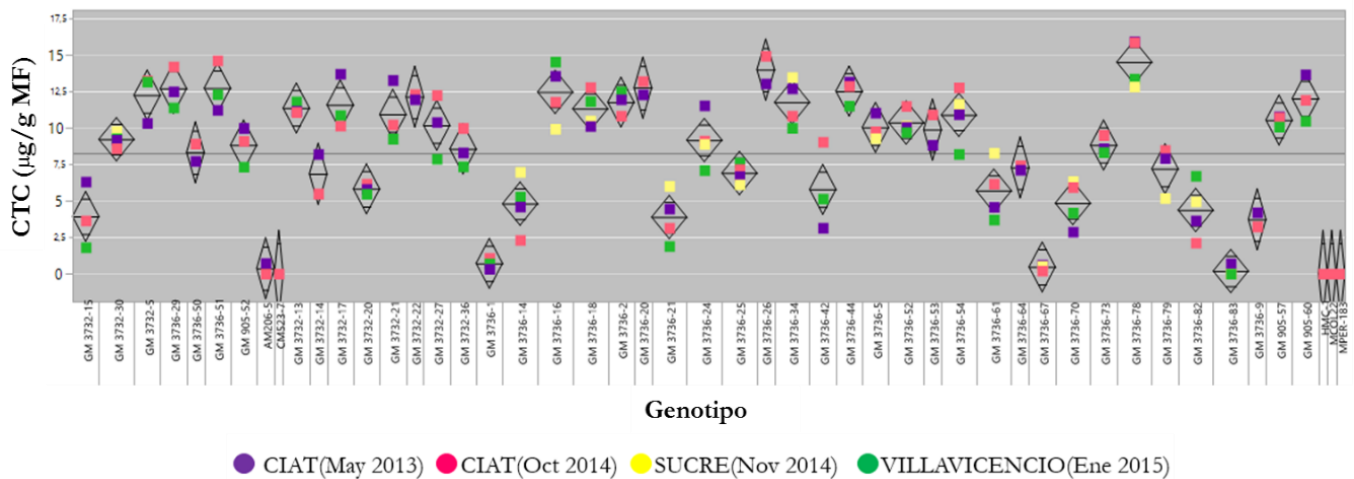


Tabla 1-5. Análisis de varianza para la característica CTC en familias segregantes en carotenoides

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Genotipo	48	2349,5970	48,9499	21,9620	<,0001*
Error	96	213,9694	2,2288		
C. Total	144	2563,5664			

Figura 1-10. Comportamiento del CTC por cada genotipo en las diferentes cosechas

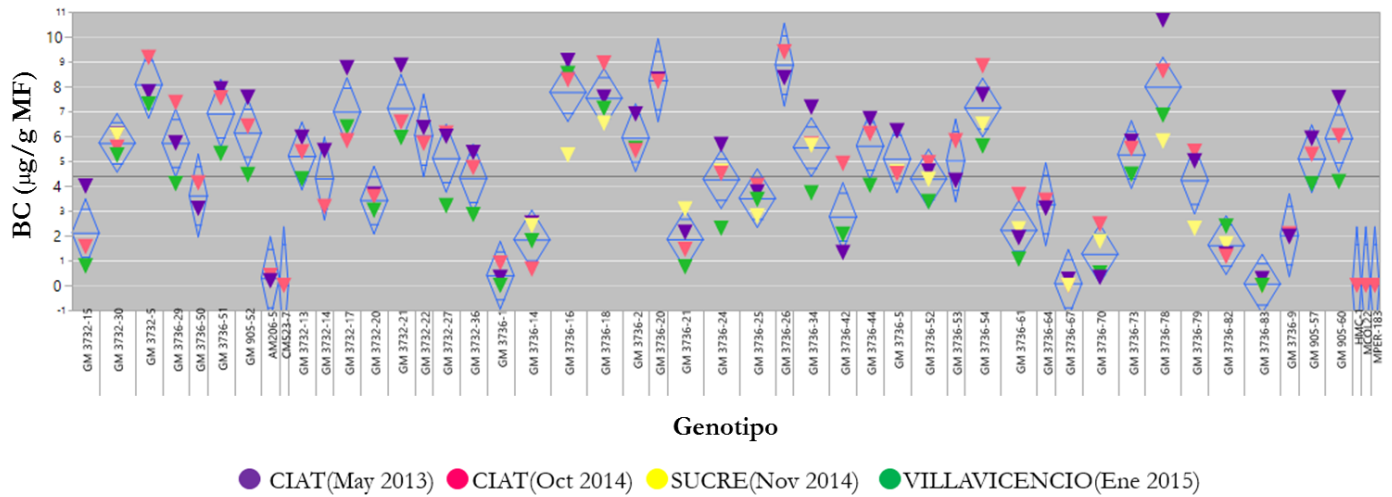


La media muestral para el contenido de HCN fue de 329.5 ppm, con un valor mínimo de 32.81 ppm y un máximo de 1163.06 ppm, por su parte el contenido total de carotenos, presento una media muestral de 8.25  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF, con un mínimo de 0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF y un máximo de 15.94  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF; a su vez el contenido de BC (beta caroteno) alcanzo una media muestral de 4.4  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF, valores mínimos de 0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF y máximos de 10.68  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF.

**Tabla 1-6.** Análisis de varianza para la característica BC en familias segregantes en carotenoides

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Genotipo	48	875,4176	18,2379	12,9676	<,0001*
Error	96	135,0166	1,4064		
C. Total	144	1010,4342			

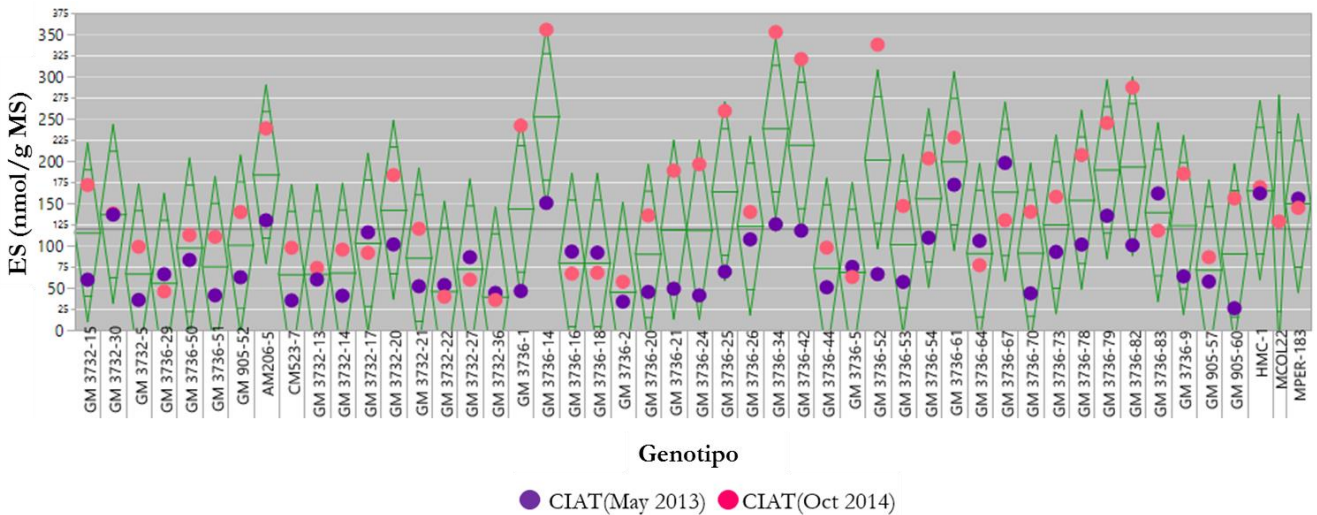
**Figura 1-11.** Distribución del contenido de BC por cada genotipo en las diferentes cosechas



**Tabla 1-7.** Análisis de varianza para la característica producción de ES en familias segregantes en carotenoides

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Genotipo	48	267081,54	5564,20	1,0047	0,4935
Error	48	265828,82	5538,10		
C. Total	96	532910,36			

**Figura 1-12.** Variabilidad de la ES por cada genotipo en las diferentes cosechas



Estos resultados muestran que las características evaluadas presentan gran variabilidad entre los genotipos; en este sentido las características de mayor variación son: DFP, MS, HCN y ES ya que fueron las que presentaron mayores diferencias entre los ensayos, lo que a nivel gráfico se puede observar mediante la amplitud de los rombos en cada una de las variables y por cada genotipo, que a su vez está representado dentro de cada análisis de varianza como la suma de cuadrados total. Es así como se observa que el orden de las características de mayor a menor variación es: HCN, ES, DFP, MS, CTC y BC. De acuerdo a esto, las características más estables para este estudio en particular fueron CTC y BC. Es claro que las evaluaciones permiten identificar ciertos genotipos que presentaron mejor estabilidad que otros, entre los diferentes años o periodos de cosecha. De este modo el comportamiento de las variables evaluadas es acorde a características de tipo cuantitativo, ya que muestran una variación continua lo que implican que son características controladas por muchos genes (poligenes) y que son afectadas por el ambiente, motivo por el cual los estudios de DFP deben realizarse en varias localidades (mínimo 3) y años de cosecha para así evaluar el comportamiento real de los individuos en estudio.

### 1.3.4. Análisis de correlación entre las características DFP, MS, HCN, CTC, BC y ES

El análisis de correlación de Pearson entre las variables estudiadas, reveló interacciones importantes y altamente significativas entre las que se destacan el CTC con BC y DFP con ES, cuyos coeficientes de correlación de Pearson son 0.93 y 0.55 respectivamente con  $p < 0.0001$ , como se presentan en la tabla 1-8. Estos resultados son acordes con lo reportado por Reilly *et al.*, (2003) quien describió al DFP como un proceso fisiológico que resulta de la expresión alterada de genes, que conlleva a la acumulación de metabolitos secundarios como la escopoletina (ES), que exhibe propiedades antioxidantes; además mediante la oxidación y polimerización, esta molécula confiere una coloración azul oscura, típica del fenotipo de raíces de yuca que presentan DFP (Uarrota, *et al.*, 2015).

**Tabla 1-8.** Análisis de correlación de Pearson entre las variables DFP, MS, HCN, CTC, BC y ES

Correlación de Pearson				
Variable (1)	Variable (2)	n	Pearson	p-valor
DFP	MS	135	<b>0,32</b>	<b>0,0001</b>
DFP	HCN	131	0,09	0,2817
DFP	CTC	132	<b>-0,28</b>	<b>0,0012</b>
DFP	BC	132	<b>-0,26</b>	<b>0,0029</b>
DFP	ES	97	<b>0,55</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
MS	HCN	142	-0,09	0,2948
MS	CTC	145	0,02	0,7708
MS	BC	145	-0,11	0,1723
MS	ES	97	0,12	0,2294
HCN	CTC	142	-0,06	0,5007
HCN	BC	142	0,04	0,6391
HCN	ES	94	-0,25	0,0148
CTC	BC	145	<b>0,93</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
CTC	ES	94	<b>-0,29</b>	<b>0,0045</b>
BC	ES	94	<b>-0,29</b>	<b>0,0054</b>

La correlación entre las variables CTC y BC es muy alta debido a que son variables ligadas, ya que comparten la misma ruta metabólica de biosíntesis, además la variable BC está contenida en la variable CTC. Por otro lado la correlación negativa obtenida entre CTC y DFP y a su vez BC y DFP (-0.28 y -0.26 respectivamente), indica que los carotenoides previenen o retrasan el desarrollo del DFP, resultados que son acordes con lo reportado por Morante *et al.*, (2010) quien reporta que raíces de yuca con altos contenidos de carotenoides tienen tendencia a reducir la incidencia del DFP.

En este mismo sentido otra correlación de gran interés es la obtenida entre el DFP y MS (0.32), ya que involucra dos características de interés agroindustrial desde el punto de vista de la producción y comercialización de raíces de yuca en fresco; esta correlación es acorde a lo encontrado por Van Oirschot *et al.*, (2000) y Sánchez *et al.*, (2006), quienes también encontraron correlación positiva entre estas dos características, resultado que es un poco desalentador puesto que uno de los objetivos de los programas de mejoramiento es incrementar el contenido de materia seca, para lograr facilitar procesos agroindustriales de transformación y a su vez reducir los efectos del DFP que permitan incrementar los tiempos de almacenamiento de las raíces de yuca fresca.

### 1.3.5. Análisis estadístico de los ensayos realizados y obtención del valor estimativo de DFP

Se logró ajustar un modelo lineal mixto, con el total de los datos aportados por cada uno de los ensayos, con efectos fijos por genotipo, rodaja, día de evaluación, madurez y época; también se incluyó un efecto aleatorio por raíz anidado en el ensayo por día, por genotipo, por madurez y por raíz. En la tabla 1-9 se presenta el análisis de varianza para los efectos de genotipo y rodaja en el DFP.

**Tabla 1-9.** Análisis de varianza total de ensayos de DFP combinados

	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CME</b>	<b>F</b>
<b>Genotipo</b>	165	3443.53	20.87	10.61
<b>Rodaja</b>	6	23691.30	3948.55	2006.92
<b>Día</b>	6	307.31	51.22	26.03
<b>Madurez</b>	3	133.52	44.51	22.62
<b>Lluvia</b>	1	117.83	117.83	59.89

Los valores estimados para los efectos de madurez, día, rodaja y lluvia se mantendrían constantes para todos los genotipos, mientras que el valor estimado para el efecto genotipo sería constante solo para cada genotipo, de esta forma el valor de DFP aportado por el modelo lineal sería único para cada uno de los genotipos valores que se presentan en la tabla 1-10, con su respectivo error estándar y valor t. De forma general se pueden realizar las siguientes observaciones a partir de los efectos estimados:

- Los efectos estimados para los genotipos en DFP, estuvieron en un rango de -0.229 a 4.263 a partir de los 4 ensayos realizados.
- El DFP disminuye conforme las rodajas van de 1 a 7 en el proceso de evaluación fenotípica del DFP cuyo valor de reducción entre rodajas es alrededor de 2.8 unidades. Este resultado es acorde con lo presentado por Cuambe (2007), quien encontró el mismo comportamiento del progreso del DFP, que inicia en el extremo proximal (rodaja 1) y disminuye conforme se acerca al extremo distal (rodaja 7); fenómeno que se da debido a que el extremo proximal es el que se encuentra expuesto al flujo de oxígeno a través de esta sección de la raíz.
- El DFP incrementa conforme avanza el tiempo de almacenamiento en días por cerca de 2.5 unidades.
- El incremento en las lluvias es asociado con la disminución en el DFP en 0.8 unidades, a pesar de que es un factor de menor importancia en comparación con los efectos generados con los ya descritos.

En la tabla 1-11 se presentan los valores estimados para los efectos de madurez, día, rodaja y lluvia, que se mantendrían constantes para cada uno de los genotipos y que conformarían el modelo lineal mixto, que incluye cada uno de los efectos, que se describe a continuación en la ecuación 1.4.

$$DFP = \alpha + \beta 1i + \beta 2i + \beta 3i + \beta 4 + \beta 5 + \beta 6 + \beta 7 + \beta 8 + \beta 9 + \beta 10 + \beta 11 \quad \text{Ec. 1.4.}$$

Donde:

$\alpha$ =Intercepto

$\beta 1i$ =Valor estimado del genotipo i

$\beta 2i$ = Efecto de madurez de cosecha del genotipo i

$\beta 3i$ = Efecto día final de almacenamiento del genotipo i

$\beta 4$ = Efecto generado por la rodaja 1

$\beta 5$ = Efecto generado por la rodaja 2

$\beta 6$ = Efecto generado por la rodaja 3

$\beta 7$ = Efecto generado por la rodaja 4

$\beta 8$ = Efecto generado por la rodaja 5

$\beta 9$ = Efecto generado por la rodaja 6

$\beta 10$ = Efecto generado por la rodaja 7

$\beta 11$ = Efecto generado por la lluvia

**Tabla 1-10.** Valor estimado del DFP por genotipo, con su respectivo error estándar y valor t

Efecto	Nivel	Estimado	Error Std	Valor t	Efecto	Nivel	Estimado	Error Std	Valor t
Intercepto		0,2542	0,2986	0,8514	Intercepto		0,2542	0,2986	0,8514
Genotipo	GM905-52	-0,2295	0,4350	-0,5275	Genotipo	GM3736-51	0,5705	0,3869	1,4744
Genotipo	GM3732-36	-0,1928	0,4258	-0,4528	Genotipo	GM3736-18	0,5769	0,4265	1,3528
Genotipo	GM3732-5	-0,1872	0,4167	-0,4492	Genotipo	GM3732-20	0,5795	0,4261	1,3599
Genotipo	GM3732-22	-0,1731	0,4497	-0,3849	Genotipo	GM3736-70	0,6296	0,3877	1,6239
Genotipo	GM3736-29	-0,1598	0,4757	-0,3359	Genotipo	HMC-1	0,7032	0,1848	3,8048
Genotipo	GM3732-17	-0,1479	0,4757	-0,3109	Genotipo	GM3732-13	0,8759	0,4757	1,8412
Genotipo	GM3732-27	-0,1434	0,4483	-0,3199	Genotipo	GM3736-82	0,9277	0,3755	2,4708
Genotipo	GM905-57	-0,0178	0,4163	-0,0428	Genotipo	GM3736-25	0,9637	0,3936	2,4482
Genotipo	GM3732-14	-0,0081	0,4363	-0,0186	Genotipo	GM3736-34	1,0227	0,4172	2,4514
Genotipo	AM206-5	0,0000	NA	NA	Genotipo	GM3736-78	1,0917	0,4173	2,6163
Genotipo	GM3736-20	0,0550	0,4259	0,1292	Genotipo	GM3736-79	1,4015	0,4764	2,9418
Genotipo	MPER183	0,0637	0,1892	0,3366	Genotipo	GM3736-21	1,4329	0,3941	3,6363
Genotipo	GM3736-44	0,0687	0,4271	0,1608	Genotipo	GM3732-15	1,4840	0,4274	3,4720
Genotipo	GM3736-2	0,1102	0,4477	0,2461	Genotipo	GM3736-24	1,5041	0,3788	3,9704
Genotipo	GM3736-73	0,1597	0,4177	0,3823	Genotipo	GM3736-1	1,6566	0,4358	3,8011
Genotipo	GM3736-53	0,2183	0,4761	0,4587	Genotipo	GM3736-54	1,7708	0,4480	3,9523
Genotipo	GM3732-21	0,2318	0,4263	0,5437	Genotipo	CM523-7	1,8504	0,1843	10,0405
Genotipo	GM3736-5	0,2909	0,3806	0,7644	Genotipo	GM3736-50	2,1731	0,4368	4,9750
Genotipo	GM905-60	0,3041	0,4167	0,7297	Genotipo	GM3736-52	2,2395	0,3875	5,7798
Genotipo	GM3732-30	0,3317	0,3865	0,8580	Genotipo	GM3736-67	2,8125	0,4368	6,4392
Genotipo	GM3736-26	0,4312	0,4761	0,9058	Genotipo	GM3736-64	2,8402	0,4757	5,9702
Genotipo	GM3736-16	0,4678	0,3866	1,2099	Genotipo	GM3736-42	3,0704	0,4283	7,1689
Genotipo	GM3736-9	0,4885	0,4079	1,1976	Genotipo	GM3736-14	4,0827	0,3931	10,3848
Genotipo	GM3736-83	0,5234	0,4398	1,1902	Genotipo	GM3736-61	4,2634	0,4764	8,9494
Genotipo	MCOL22	0,5381	0,1873	2,8729					

**Tabla 1-11.** Efectos obtenidos a partir del modelo lineal mixto

Efecto	Nivel	Estimado	Error Std	Valor t
Madurez	9	0	NA	NA
Madurez	11	0,9027876	0,1733887	5,2067257
Madurez	12	1,2337477	0,2002395	6,1613615
Madurez	10	1,2397863	0,189857	6,5301044
Día	1	0	NA	NA
Día	2	0,962569	0,278893	3,4513919
Día	3	1,0720874	0,2800301	3,8284723
Día	5	1,5805005	0,2460565	6,423323
Día	4	1,6077235	0,2790071	5,7623032
Día	6	2,1923521	0,2786835	7,8668173
Día	7	2,4592985	0,2225588	11,050109
Rodaja	7	-2,816648	0,0367606	-76,62129
Rodaja	6	-2,782946	0,0318195	-87,460511
Rodaja	5	-2,638228	0,0307998	-85,65725
Rodaja	4	-2,360385	0,0306201	-77,086034
Rodaja	3	-2,034202	0,0305967	-66,484462
Rodaja	2	-1,463278	0,0305988	-47,821448
Rodaja	1	0	NA	NA
Lluvia		-0,001605	0,0002074	-7,7389196

### 1.3.6. Selección de genotipos para caracterización genética e identificación de SNPs bialélicos relacionados al DFP

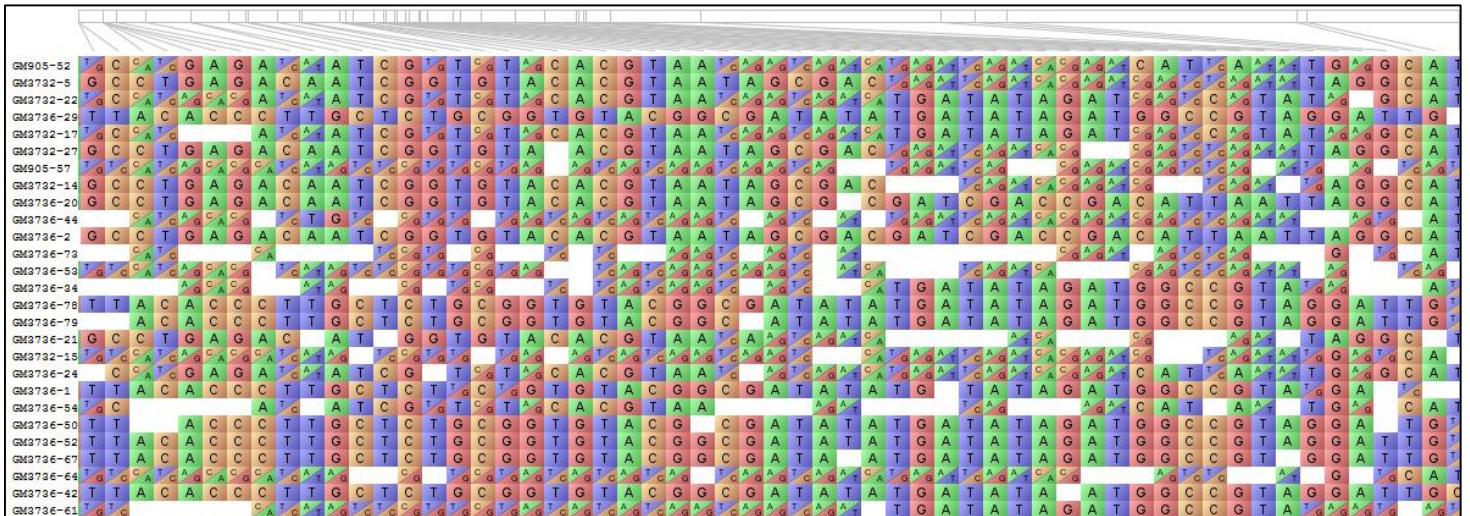
A partir de los datos obtenidos con el modelo lineal mixto, presentados en la tabla 1-10, se seleccionaron los genotipos con valores estimativos de DFP extremos para caracterización genética; los genotipos tolerantes a DFP presentaron valores inferiores a 0,22 y genotipos susceptibles a DFP valores estimativos de DFP fueron superiores o iguales a 1. Los genotipos seleccionados se presentan en la tabla 1-12. Los genotipos GM3732-36 y GM3736-14, a pesar de estar dentro del rango de selección no se incluyeron en el análisis genético puesto que no se contaba con las secuencias genéticas de dichos genotipos.

Con las secuencias obtenidas de Illumina y los datos de DFP, se logró la obtención de variantes alélicas (SNPs) entre los genotipos en estudio y el genoma de referencia AM560-2 vs 6.1. Se obtuvieron 15765 SNPs iniciales, de los cuales 361 SNPs cumplían con los requisitos de selección ya descritos en el numeral 1.2.10, de los cuales 28 SNPs son no sinónimos que en otras palabras son SNPs que generan un cambio en la secuencia de aminoácidos. En las figuras 1-13 y 1-14 se presenta un ejemplo de la representación gráfica de los SNPs codificantes y no sinónimos respectivamente para el cromosoma 12 del genoma de *Manihot esculenta* Crantz, obtenida mediante el software FLAPJACK (Milne *et al.*, 2010). En la tabla 1-13 se presenta el resumen del número de SNPs codificantes y no sinónimos por cromosoma. En el anexo B. Se presenta la tabla de frecuencias alélicas donde se incluye la posición y número de cromosoma de los SNPs encontrados entre las poblaciones resistentes y susceptibles.

Tabla 1-12. Genotipos seleccionados para caracterización genética

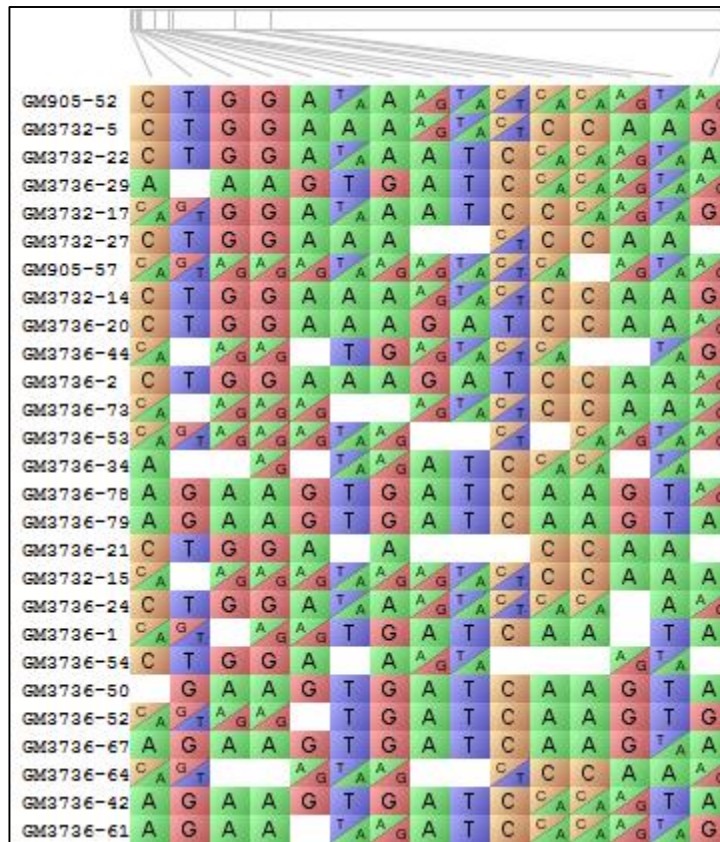
Genotipo tolerante	Valor estimado DFP	% DFP	Genotipo susceptible	Valor estimado DFP	% DFP
GM905-52	-0,2295	1,50	GM3736-34	1,0227	11,39
GM3732-5	-0,1872	1,27	GM3736-78	1,0917	13,65
GM3732-22	-0,1731	2,19	GM3736-79	1,4015	19,64
GM3736-29	-0,1598	3,81	GM3736-21	1,4329	13,01
GM3732-17	-0,1479	3,93	GM3732-15	1,4840	18,48
GM3732-27	-0,1434	3,72	GM3736-24	1,5041	13,45
GM905-57	-0,0178	2,56	GM3736-1	1,6566	17,30
GM3732-14	-0,0081	4,07	GM3736-54	1,7708	24,46
GM3736-20	0,0550	4,28	GM3736-50	2,1731	25,18
GM3736-44	0,0687	2,79	GM3736-52	2,2395	21,35
GM3736-2	0,1102	4,14	GM3736-67	2,8125	26,58
GM3736-73	0,1597	4,83	GM3736-64	2,8402	33,81
GM3736-53	0,2183	7,70	GM3736-42	3,0704	32,53
			GM3736-61	4,2634	48,16

Figura 1-13 Representación gráfica en FLAPJACK de SNPs Codificantes, con su respectivo genotipo por muestra en el cromosoma 12





**Figura 1-14.** Representación gráfica en FLAPJACK de SNPs no sinónimos, con su respectivo genotipo por muestra en el cromosoma 12



**Tabla 1-13.** Resumen número total de SNPs codificantes y no sinónimos por cromosoma para las 27 muestras seleccionadas

Cromosoma	# SNPs Codificantes	# SNPs No Sinónimos	Muestras seleccionadas
1	4		27
2	22	3	27
3	30		27
4	12	1	27
5	14	1	27
6	3		27
8	6		27
9	1		27
10	15		27
11	37	1	27
12	118	15	27
13	26	3	27
14	2		27
15	21	2	27
16	22		27
18	28	2	27

El cromosoma 12 fue el que más presentó SNPs tanto codificantes como no sinónimos (118 y 15 respectivamente), mientras que los cromosomas 7 y 17 no presentaron ningún SNP. En cuanto al número total de alelos teniendo en cuenta que son 361 SNPs y 27 muestras son 9747 alelos y cuya descomposición por cromosoma se presenta en la tabla 1-14 para codificantes y 1-15 para no sinónimos, con sus respectivos porcentajes de peso dentro de cada cromosoma, encontrando que el alelo de mayor frecuencia es el A con 1445 presencias y el de menor presencia es la combinación heterocigota C/G con 174. Por su parte los alelos de los SNPs no sinónimos se presentan en la tabla 1-15, resultados que muestran también que el alelo predominante es el A y el de menor predominio es la combinación G/T.

**Tabla 1-14.** Composición alélica por cromosoma con su respectiva proporción en SNPs codificantes

Alelo		G	A	C	A/G	T/G	T	C/A	T/C	A/T	C/G
<b>Cromosoma 1</b>	20	18	23	8	29	0	0	10	0	0	0
%	18,5	16,7	21,3	7,4	26,9	0	0	9,3	0	0	0
<b>Cromosoma 2</b>	66	81	107	75	64	27	97	5	29	35	8
%	11,1	13,6	18	12,6	10,8	4,5	16,3	0,8	4,9	5,9	1,3
<b>Cromosoma 3</b>	103	100	82	74	93	48	157	0	142	11	0
%	12,7	12,3	10,1	9,1	11,5	5,9	19,4	0	17,5	1,4	0
<b>Cromosoma 4</b>	43	23	37	32	17	21	63	10	44	34	0
%	13,3	7,1	11,4	9,9	5,2	6,5	19,4	3,1	13,6	10,5	0
<b>Cromosoma 5</b>	31	43	58	34	98	14	22	37	41	0	0
%	8,2	11,4	15,3	9	25,9	3,7	5,8	9,8	10,8	0	0
<b>Cromosoma 6</b>	12	1	28	19	5	0	2	10	4	0	0
%	14,8	1,2	34,6	23,5	6,2	0	2,5	12,3	4,9	0	0
<b>Cromosoma 8</b>	26	6	12	30	14	11	25	13	14	11	0
%	16	3,7	7,4	18,5	8,6	6,8	15,4	8	8,6	6,8	0
<b>Cromosoma 9</b>	6	0	0	8	0	0	5	0	8	0	0
%	22,2	0	0	29,6	0	0	18,5	0	29,6	0	0
<b>Cromosoma 10</b>	58	48	50	59	62	0	49	12	62	5	0
%	14,3	11,9	12,3	14,6	15,3	0	12,1	3	15,3	1,2	0
<b>Cromosoma 11</b>	100	125	174	156	79	26	136	48	93	53	9
%	10	12,5	17,4	15,6	7,9	2,6	13,6	4,8	9,3	5,3	0,9
<b>Cromosoma 12</b>	339	450	529	371	329	104	451	120	251	172	70
%	10,6	14,1	16,6	11,6	10,3	3,3	14,2	3,8	7,9	5,4	2,2
<b>Cromosoma 13</b>	84	119	100	87	51	55	91	37	43	18	17
%	12	17	14,2	12,4	7,3	7,8	13	5,3	6,1	2,6	2,4
<b>Cromosoma 14</b>	9	25	2	0	18	0	0	0	0	0	0
%	16,7	46,3	3,7	0	33,3	0	0	0	0	0	0
<b>Cromosoma 15</b>	81	45	86	75	38	30	78	50	54	30	0
%	14,3	7,9	15,2	13,2	6,7	5,3	13,8	8,8	9,5	5,3	0
<b>Cromosoma 16</b>	70	114	56	35	102	35	67	14	53	8	40
%	11,8	19,2	9,4	5,9	17,2	5,9	11,3	2,4	8,9	1,3	6,7
<b>Cromosoma 18</b>	117	109	101	87	70	34	102	20	75	11	30
%	15,5	14,4	13,4	11,5	9,3	4,5	13,5	2,6	9,9	1,5	4
<b>Frecuencia Total Alelo</b>	1165	1307	1445	1150	1069	405	1345	386	913	388	174

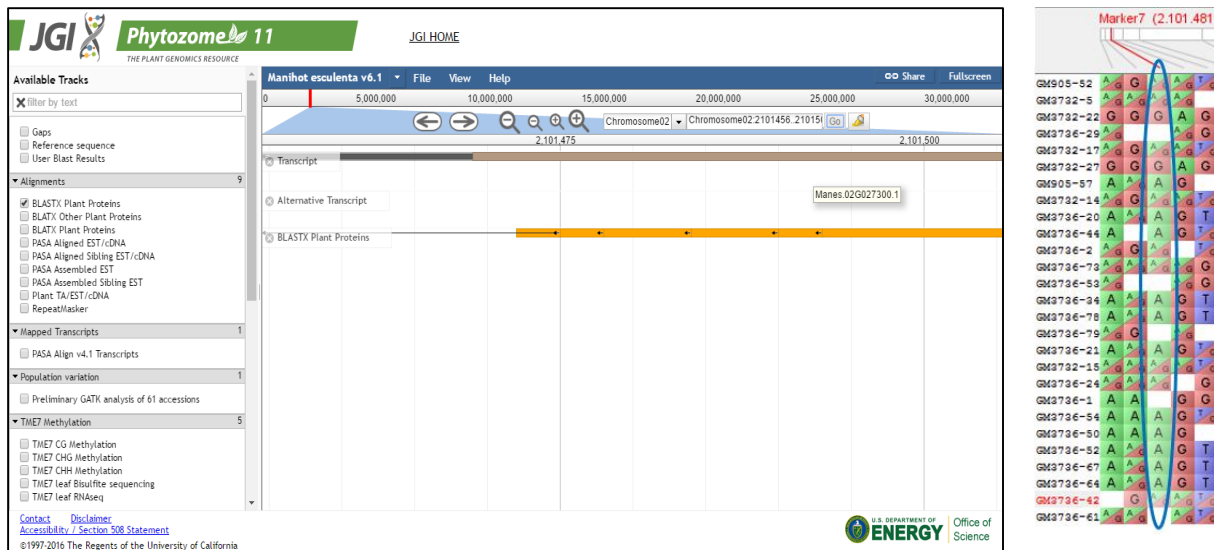
Las composiciones alélicas por cromosoma, permiten identificar en que sitios específicos del genoma hay diferencias entre genotipos (tolerantes y susceptibles) mediante la variación de bases nitrogenadas entre genotipos como se presentó en las figuras 1-14 y 1-15, es decir la variación en una sola base en un SNP codificante, puede diferenciar entre genotipos, debido a la influencia que puede ejercer sobre la expresión de un gen que esté relacionado a DFP.

**Tabla 1-15.** Composición alélica por cromosoma con su respectiva proporción en SNPs no sinónimos

Alelo		G	A	C/A	C/T	C	T	A/G	T/A	G/T
<b>Cromosoma 2</b>	5	2	18	3	0	19	15	10	9	0
%	6,2	2,5	22,2	3,7	0	23,5	18,5	12,3	11,1	0
<b>Cromosoma 4</b>	4	4	8	0	0	0	0	11	0	0
%	15	14,8	29,6	0	0	0	0	40,7	0	0
<b>Cromosoma 5</b>	2	0	0	0	13	6	6	0	0	0
%	7,4	0	0	0	48,1	22,2	22,2	0	0	0
<b>Cromosoma 11</b>	3	0	0	0	7	13	4	0	0	0
%	11	0	0	0	25,9	48,1	14,8	0	0	0
<b>Cromosoma 12</b>	41	56	100	27	11	41	39	54	30	6
%	10	13,8	24,7	6,7	2,7	10,1	9,6	13,3	7,4	1,5
<b>Cromosoma 13</b>	1	12	12	11	11	16	8	0	0	10
%	1,2	14,8	14,8	13,6	13,6	19,8	9,9	0	0	12,3
<b>Cromosoma 15</b>	6	6	10	10	0	5	10	0	0	7
%	11	11,1	18,5	18,5	0	9,3	18,5	0	0	13
<b>Cromosoma 18</b>	11	0	0	0	13	16	14	0	0	0
%	20	0	0	0	24,1	29,6	25,9	0	0	0
<b>Frecuencia Total Alelo</b>	73	80	148	51	55	116	96	75	39	23

Haciendo uso de la tabla de posición de cada SNP codificante (Anexo B), se logró identificar el número total de genes correspondientes a cada cromosoma, es así como de 361 SNPs encontrados, se identificaron 266 genes, puesto que los 95 SNPs restantes, algunos son cercanos entre si y caen dentro de la misma región de un gen, además de los 266 genes encontrados 89 corresponden a genes que se encuentran en regiones cercanas a la posición del SNP, los genes correspondientes a cada SNP, también se presenta en el anexo B. La identificación de genes se realizó empleando la herramienta JBrowse de Phytozome para *Manihot esculenta* v 6.1 como se presenta en la figura 1-15, en la cual se introduce la posición del SNP y se obtiene el gen que corresponde a esa posición, en la figura se presenta el ejemplo para el SNP localizado en la posición 2101481 del cromosoma 2 (SNP número 7) y cuya región pertenece al gen Manes.02G027300; en esta posición se observa una diferencia clara entre las frecuencias alélicas entre genotipos tolerantes y susceptibles, en los tolerantes predomina la frecuencia alélica heterocigota A/G, mientras en los susceptibles predomina la frecuencia alélica homocigota A.

**Figura 1-15.** Identificación de genes empleando la herramienta JBrowse de Phytozome 11



A partir de las funciones relacionadas con DFP, en especial aquellas reacciones que implican presencia de oxidación-reducción o especies reactivas de oxígeno que han sido reportadas como moléculas que intervienen en el proceso de DFP (Reilly, 2001), se seleccionaron genes potenciales como marcadores moleculares para la característica DFP. En la tabla 1-16, se presentan los genes con su respectiva localización, la descripción corta y algunos nombres que recibe.

**Tabla 1-16** Genes con potencialidad a marcadores moleculares

ID Gen	Localización (Phytozome)	Descripción corta	Nombres
Manes.02G027300	Chr02:2101379-2103149 reverse strand	(M=128) KOG0156 - Cytochrome P450 CYP2 subfamily	Actividad de mono-oxigenasa, oxidoreductasa, proceso oxidación-reducción, etc.
Manes.03G085900	Chr03:14082275-14084195	(M=7) PTHR11709:SF27 - L-ASCORBATE OXIDASE PECTINESTERASE-LIKE PROTEIN POLLEN-SPECIFIC PROTEIN-LIKE	Actividad de oxidoreductasa, procesos de oxidación reducción.
Manes.03G096600	Chr03:16343124-16345251 reverse strand	(M=5) 1.1.1.34 - Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) / HMG-CoA reductase	Actividad de oxidoreductasa, procesos de oxidación reducción.
Manes.05G150400	Chr05:21372521-21374112 reverse strand	(M=23) PTHR24298:SF86 - CYTOCHROME P450 71B21-RELATED	Actividad de mono-oxigenasa, oxidoreductasa, proceso oxidación-reducción, etc.
Manes.08G029800	Chr08:2673634-2675999 reverse strand	(M=68) KOG0725 - Reductases with broad range of substrate specificities	Actividad de deshidrogenasa, actividad de oxidoreductasa, procesos de oxidación reducción.
Manes.10G069000	Chr10:10126311-10129446	(M=1) PTHR10209//PTHR10209:SF177 - OXIDOREDUCTASE, 2OG-FE II OXYGENASE FAMILY PROTEIN	Actividad de oxidoreductasa, procesos de oxidación reducción. 2-Oxoglutarate dioxigenasa.
Manes.10G084700	Chr10:17432509-17432851 reverse strand	(M=12) 1.13.11.12 - Linoleate 13S-lipoxygenase / Lipoxidase	Actividad de oxidoreductasa, procesos de oxidación reducción, lipoxigenasa.
Manes.12G004500	Chr12:512434-517442	(M=564) PF13041 - PPR repeat family (PPR_2)	Perfil de repetición, Pentatricopeptido
Manes.12G013000	Chr12:1091983-1095365	(M=15) PF00646//PF01344 - F-box domain (F-box) // Kelch motif (Kelch_1)	Galactosa oxidasa
Manes.12G026900	Chr12:2081938-2083938	(M=1) PTHR24015:SF705 - PENTATRICOPEPTIDE REPEAT-CONTAINING PROTEIN	Perfil de repetición, Pentatricopeptido
Manes.12G030100	Chr12:2317414-2323177 reverse strand	(M=4) PTHR11699:SF180 - ALDEHYDE DEHYDROGENASE FAMILY 2 MEMBER B7, MITOCHONDRIAL	Actividad de oxidoreductasa, procesos de oxidación reducción, aldehído deshidrogenasa
Manes.15G107700	Chr15:8163456-8167585	(M=6) 1.14.12.20 - Pheophorbide a oxygenase / Pheide a oxygenase	Actividad de oxidoreductasa, procesos de oxidación reducción
Manes.16G012900	Chr16:1265267-1266594	(M=105) 1.11.1.7 - Peroxidase / Lactoperoxidase	Actividad de peroxidasa, respuesta a estrés oxidativo, proceso de oxidación reducción.
Manes.16G025000	Chr16:2416694-2424959	(M=5) PTHR10992//PTHR10992:SF869 - ALPHA/BETA HYDROLASE FOLD-CONTAINING PROTEIN	Trans etilbeno oxido hidrolasa
Manes.18G043000	Chr18:3718183-3720397 reverse strand	(M=6) 1.14.13.53 - 4'-methoxyisoflavone 2'-hydroxylase / Isoflavone 2'-monooxygenase	Actividad de mono-oxigenasa, actividad de oxidoreductasa, procesos de oxidación reducción

Se encontraron 15 genes involucrados en procesos de oxidación reducción, actividades de oxidoreductasa, estrés oxidativo, entre otras. Las expresiones génicas de dichos genes, están en

concordancia con lo reportado por Reilly (2001) quien describe que la generación de heridas en las raíces de yuca desencadena una cascada de reacciones de oxidación a nivel interno de la raíz, como efecto inicial de la lesión, cuyo nivel de desarrollo depende del genotipo. Por otra parte Shimizu (2014) explica que la 2-Oxoglutarate Dioxigenasa (2OGD) interviene en la síntesis de cumarinas simples como la escopoletina, que en este estudio tuvo un coeficiente de correlación de Pearson de carácter medio pero altamente significativo ( $0,55 p < 0.0001$ ) con el DFP y sustenta la identificación del SNP que está ubicado en el cromosoma 10 y su localización es 10115869 pb cuya región genética pertenece al gen Manes.10G069000, en esta posición los alelos que presentan los genotipos tolerantes de forma homocigota son 4 con alelos T, 3 con C y 5 heterocigotos T/C, mientras que los genotipos susceptibles presentan 8 homocigotos C, y 4 heterocigotos T/C, como se presenta en la tabla 1-17, donde se presenta la localización del SNP, el gen y su composición genética entre genotipos tolerantes y susceptibles. Lo anterior presume que este gen en los genotipos tolerantes puede estar silenciado ya sea por algún efecto de dominancia del alelo T sobre el alelo C. La mayoría de genes tienen implicación en procesos de oxidación reducción y actividad de oxidoreductasa, los cuales son factores claves que inducen el DFP y facilitan su progreso durante el tiempo de almacenamiento de raíces; en especial la actividad oxidoreductasa incrementa notablemente durante el DFP (Vanderschuren, *et al.*, 2014).

Posicion SNP	Gen con potencial a marcador	13 Genotipos Tolerantes				14 Genotipos Susceptibles				SNP No sinonimo	Genotipos sin variantes
		Homocigotos		Heterocigotos		Homocigotos		Heterocigotos			
		#	Alelo	#	Alelo	#	Alelo	#	Alelo		
2101481	Manes.02G027300	2	G	6	A/G	8	A	3	A/G	NO	4
		3	A								
14052964	Manes.03G085900	10	G	3	A/G	4	G	6	A/G	NO	2
						2	A				
16346821	Manes.03G096600	1	A	2	A/T	4	A	9	A/T	NO	4
		6	T			1	T				
21371137	Manes.05G150400	4	A	9	A/G	5	G	5	A/G	NO	4
2673172	Manes.08G029800	3	C	8	T/C	5	T	6	T/C	NO	4
						1	C				
10115869	Manes.10G069000	4	T	5	T/C	8	C	4	T/C	NO	3
		3	C								
17425509	Manes.10G084700	5	A	5	A/G	2	A	5	A/G	NO	4
		1	G			5	G				
511665	Manes.12G004500	6	C	4	C/G	1	C	5	C/G	NO	1
		3	G			7	G				
1093673	Manes.12G013000	7	T	5	T/C	2	T	4	T/C	NO	3
		1	C			5	C				
2083077	Manes.12G026900	1	T	7	T/G	7	T	3	T/G	NO	3
		5	G			1	G				
2318704	Manes.12G030100	5	C	4	C/A	7	A	5	C/A	NO	5
		1	A								
8164336	Manes.15G107700	4	T	8	T/G	2	T	4	T/G	NO	4
						5	G				
1265074	Manes.16G012900	7	A	4	C/A	1	C	10	C/A	NO	4
						1	A				
2422025	Manes.16G025000	7	G	2	A/G	2	A	6	A/G	NO	8
						2	G				
3719743	Manes.18G043000	10	T	2	T/C	3	T	4	T/C	SI	6
						2	C				

La tabla 1-17 muestra que solo un gen (Manes 18G043000) tiene un SNP de identificación que es no sinónimo, lo que quiere decir que este SNP puede actuar en la forma de expresión del gen puesto que

conlleva a una modificación en la secuencia de aminoácidos, indicando que puede ser de gran importancia en el estudio de la expresión génica en el proceso de DFP.

## 1.4 Conclusiones

- Se identificaron 361 SNPs codificantes, logrando visualizar la composición genética de cada alelo por cada genotipo estudiado, obteniendo la proporción de cada alelo en cada uno de los cromosomas en que se presentaron SNPs y se postularon 15 genes como potenciales marcadores, involucrados en el proceso de DFP, ya que intervienen en procesos de oxidación reducción, actividad oxidoreductasa y biosíntesis de cumarinas simples.
- La escopoletina y niveles altos de materia seca en la raíz, están positivamente correlacionados de manera significativa con DFP, y ello supone un resultado desafortunado, pues una de las metas en programas de mejoramiento es identificar genotipos con alto contenido de materia seca en la raíz.
- El contenido de beta-caroteno y carotenos totales, no revelan contribución suficiente para minimizar el DFP de manera directa.
- El estudio demostró que el contenido total de carotenoides y beta-caroteno, son características estables dentro de las familias segregantes en carotenoides, de lo cual se deriva la identificación de 13 genotipos tolerantes a DFP (tabla 1-12).

## 1.5 Bibliografía

BAIR, N. A., ETTER, P. D., ATWOOD, T. S., CURREY M. C., SHIVER, A. L., LEWIS, Z. A., SELKER, E. U., CRESKO, W. A., JOHNSON, E. A. (2008). Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE* 3 (10): e3376. doi:10.1371/journal.pone.0003376

BASFORD, K. E., COOPER, M. (1998). Genotype x environmental interactions and some considerations of their implications for wheat breeding in Australia. *Australian Journal Agricultural Research* 49, 154-174.

CEBALLOS, H., OKOGBENIN, E., PEREZ, J. C., BECERRA, L. V. L. A., DEBOUCK, D. (2010). CASSAVA. *En: Root and Tuber Crops*. BRADSHAW, J. E. United Kingdom. ISBN 978-0-387-92764-0. p. 53-96.

CRUZ, D. F., DE LA HOZ, J. F., PEREA, C. S., QUINTERO, J. C., DUTTAMA, J. (2014). NGSEP (Next Generation Sequencing Eclipse Plugin). Software download (Available online at <http://sourceforge.net/p/ngsep/wiki/Home/>).

CUAMBE, C. E. (2007). EVALUACIÓN DEL DETERIORO FISIOLÓGICO POSCOSECHA Y MAPEO PRELIMINAR DE QTLs EN EL PRIMER RETROCRUZAMIENTO DERIVADO DEL HIBRIDO INTER-ESPECIFICO (CW429-1) ENTRE *Manihot esculenta* Crantz Y LA ESPECIE SILVESTRE *Manihot walkerae* Croizat. Tesis de Maestría. Escuela de Posgrados Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 86 pp.

DAVEY, J. W., CEZARD, T., FUENTES-UTRILLA, P., ELAND, C., GHARBI, K., BLAXTER, M. L. (2013). Special features of RAD Sequencing data: implications for genotyping. *Molecular Ecology*, 22, 3151-3164.

DHINDSA, R. S., DHINDSA, P. P., THORPE, T. A. (1981). Leaf Senescence: Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation, and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 32, No. 126, 93-101.

DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, 13-15.

ESSERS, S. A. J. A., BOSVELD, M., GRIFT, VAN DER R. M., VORAGEN, A. G. J. (1993). Studies on the quantification of specific cyanogens in cassava products and introduction of a new chromogen. *J. Sci. Food Agric.* 63, 287-296.

IGLESIAS, C., MAYER, J., CHAVEZ, L., CALLE, F. (1997). Genetic potential and stability of carotene content in cassava roots. *Euphytica* 94, 367-373.

BALZARINI M.G., DI RIENZO J.A. (2014). InfoGen versión 2014. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>

MAROYA, N. G., KULAKOW, P., DIXON, A. G. O., DIXON, B. M., BAKARE, M. O. (2012). Genotype x Environment Interaction of Carotene Content of Yellow-Fleshed Cassava Genotypes in Nigeria. *Journal of Life Sciences* 6, 595-601.

MILNE, I., SHAW, P., STEPHEN, G., BAYER, M., CARDLE, L., THOMAS, W. T. B., FLAVELL, A. J. MARSHALL, D. (2010). Flapjack-graphical genotype visualization. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE*, vol 26 no. 24, 3133-3134.

- MONROY, L. H. J., SALAMANCA, S. C. R., CANO, C., MORENO-CONN, L. M., ORDUZ-RODRIGUEZ, J. O. (2013). Influencia de las coberturas en cultivos de cítricos sobre los hongos formadores de micorrizas arbusculares en Oxisoles del piedemonte llanero Colombiano. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 14 (1), 53-65.
- MONTAGNAC, J. A., DAVIS, C. R., TANUMIHARDJO, S. A. (2009). Nutritional Value of Cassava for Use as a Staple Food and Recent Advances for Improvement. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*. Vol. 8, 181-194.
- MORANTE, N., SÁNCHEZ, T., CEBALLOS, H., CALLE, F., PÉREZ, J. C., EGESI, C., CUAMBE, C. E., ESCOBAR, A. F., ORTIZ, D., CHÁVEZ, A. L., FREGENE, M. (2010). Tolerance to Postharvest Physiological Deterioration in Cassava Roots. *CROP SCIENCE*, Vol. 50, 1333-1338.
- OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS AOAC. 1995. Method 925.09 Solid (Total) and moisture in flour. Vacuum oven method (p.32).
- PROCHNIK, S., MARRI, P. R., DESANY, B., RABINOWICZ, P. D., KODIRA, C., MOHIUDIN, M., RODRIGUEZ, F., FAUQUET, C., TOHME, J., HARKINS, T., ROKHSAR, D. S., ROUNSLEY, S. (2012). The Cassava Genome: Current Progress, Future Directions. *Tropical Plant Biol.* 5: 88-94.
- QIUXIANG, Ma., TING, Z., PENG, Z., ZHEN-YU, W. (2016). Melatonin attenuates postharvest physiological deterioration of cassava storage roots. *Journal of Pineal Research*. Doi:10.1111/jpi.12325, 1-11.
- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.
- REILLY, K., (2001). Oxidative Stress Related Genes in Cassava Post-harvest Physiological Deterioration. Tesis de Doctorado. University of Bath. 263 pp.
- REILLY, K., GÓMEZ, V. R., BUSCHMANN, H., TOHME, J., BEECHING, J. R. (2003). Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Molecular Biology* 53, 669-685.
- SANCHEZ, T., CHAVEZ, A. L., CEBALLOS, H., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., NESTEL, P., ISHITAMI, M. (2006). Reduction or delay of post-harvest physiological deterioration in cassava roots with higher carotenoid content. *Journal of the Science of Food and Agriculture* Vol. 86, 634-639.
- SANCHEZ, T., ORTIZ, D., CEBALLOS, H., DUFOUR, D., DAVRIEUX, F., MORANTE, N., CALLE, F., ZUM FELDE, T., BECERRA-L, L. A., CHAVARRIAGA, P., HERSHEY, C. (2012). Utilization of NIRS and chromameter in selection for increased carotenoids content in cassava roots. Poster session in: Global Cassava Partnership second scientific Conference GCP21-II. Cassava: overcoming challenges of global climatic change. National Crops Resources Research Institute, Namulonge, Uganda, June 18-22.
- SÁNCHEZ, T., DUFOUR, D., MORENO, J.L., PIZARRO, M., ARAGÓN, I.J., DOMÍNGUEZ, M., CEBALLOS, H. (2013). Changes in extended shelf life of cassava roots during storage in ambient conditions. *Postharvest Biology and Technology* 86, 520-528.
- SHIMIZU, B.I. (2014). 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases in the biosynthesis of simple coumarins. *Frontiers in PLANT SCIENCE*. doi: 10.3389/fpls.2014.00549. Volume 5. Article 549, 1-7



SIGAUD-KUTNER, T. C. S., NETO, A. M. P., PINTO, E., COLEPICOLO, P. (2005). Diel activities of antioxidant enzymes, photosynthetic pigments and malondialdehyde content in stationary-phase cells of *Tetraselmis gracilis* (Prasinophyceae). *Aquatic Botany* 82, 239-249.

TEWE. O. O., LUTALADIO, N. (2004). Cassava for livestock feed in sub-Saharan Africa. Rome, Italy: FAO.

UARROTA, V. G., Da COSTA, N. E., MARTINS, P. L. A., De OLIVEIRA, N. E., COELHO, B., MORESCO, R., GARCIA, D. M., SANCHEZ, T., LUNA, M. J. L., DUFOUR, D., CEBALLOS, H., BECERRA, L-V. L. A., HERSHEY, C., ROCHA, M., MARASCHIN, M. (2015). Toward better understanding of postharvest deterioration: biochemical changes in stored cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. *Food Science & Nutrition*. doi: 10.1002/fsn3.303, 1-14.

VANDERSCHUREN, H., NYABOGA, E., POON, J. S., BAERENFALLER, K., GROSSMANN, J., HIRSCH-HOFFMANN, M., KIRCHGESSNER, N., NANNI, P., GRUISSEM, W. (2014). Large-Scale Proteomics of the Cassava Storage Root and Identification of a Target Gene to Reduce Postharvest Deterioration. *The Plant Cell*, Vol. 26: 1913-1924.

VAN ORISCHOT, Q. E. A., O'BRIEN, G. M., DUFOUR, D., EL-SHARKAWY, M. A., MESA, E. (2000). The effect of pre-harvest pruning of cassava upon root deterioration and quality characteristics. *J. Sci Food Agric* 80: 1866-1873.

WHEATLEY, C., LOZANO, C., GOMEZ, G. (1985a). Post-harvest deterioration of cassava roots, En: COCK, J. H., REYES, J. A. (Eds.), *Cassava: Research, Production and Utilization*. pp. 655-671. UNDP-CIAT, Cali.



## CAPÍTULO 2

# IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE *Manihot esculenta* Crantz EN FAMILIAS SEGREGANTES DEL HÍBRIDO INTERESPECÍFICO CW429-1 EN TÉRMINOS DEL DFP Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA

### RESUMEN

Se evaluó el comportamiento del deterioro fisiológico pos cosecha (DFP) en raíces, de las familias segregantes (CPDCR1B y CPDCR5B) del híbrido interespecífico CW429-1 entre *Manihot esculenta* y *Manihot walkerae* (tolerante), se seleccionaron 35 genotipos de interés, mediante las variables tamaño de raíz, DFP y peso promedio de raíz; a partir de los cuales se estudiaron características morfológicas, características de poscosecha como materia seca (MS), ácido cianhídrico (HCN) y producción de escopoletina (ES), durante edades fisiológicas de 10 y 12 meses en los años 2013 y 2014, llevados a cabo en CIAT. Las Características morfológicas no contribuyeron a la diferenciación entre genotipos, mientras que características de pos cosecha, permitieron evidenciar el comportamiento variable de cada genotipo, mediante análisis univariado. Se obtuvieron correlaciones positivas entre las variables DFP y MS con coeficiente de Pearson de 0.53, DFP y ES con 0.35 ambas significativas ( $p < 0.0001$ ). El modelo lineal mixto, permitió seleccionar genotipos contrastantes para DFP, encontrando 12 genotipos tolerantes a DFP, cuya caracterización genética contribuyó a la identificación de 732 SNPs bialélicos, que permitieron identificar 36 genes con potencialidad a ser marcadores moleculares para DFP.

**Palabras clave:** SNPs, genes, correlación, materia seca, escopoletina, selección

# IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE *Manihot esculenta* Crantz EN FAMILIAS SEGREGANTES DEL HÍBRIDO INTERESPECIFICO CW429-1 EN TERMINOS DEL DFP Y CARACTERIZACION GENETICA

## 2.1. Introducción

El mejoramiento genético en yuca se basa en la producción de hermanos completos y progenies de hermanos medios, que se evalúan posteriormente a través de selección fenotípica masal (Jennings y Hershey 1985; Jennings e Iglesias 2002; Ceballos et al. 2012). A menudo se presta poca atención, a la estructura de la familia en el proceso de selección. Los mejoradores centran su atención en la evaluación y selección de genotipos individuales, independientemente del origen de la familia (Ceballos *et al.*, 2015). La yuca por poseer plantas alogamas, presentan un cambio constante a nivel genético, por lo que se consideran como poblaciones altamente heterogéneas, con un comportamiento, genético individual de tipo heterocigoto (Allard, 1978); una característica clave del mejoramiento en yuca, es que todos los efectos genéticos (aditivo, dominante, sobredominante y epistáticos) a pesar de que influyen en las decisiones del mejorador durante el proceso de selección, también se pueden explotar durante su cultivo mediante la clonación de los genotipos. La reproducción clonal en yuca, no solo permite la multiplicación de genotipos individuales sino que facilita la separación de factores genéticos y ambientales que afectan los rendimientos, permitiendo de esta forma estimar los efectos genéticos de forma adecuada dentro de las familias (Ceballos *et al.*, 2015).

A nivel mundial, la yuca es el quinto cultivo más importante en términos de ingesta calórica humana (Rosenthal, *et al.*, 2012). Sin embargo el mantenimiento y comercialización de las raíces de yuca son afectados por una corta vida útil que es el resultado de un proceso rápido denominado, deterioro fisiológico pos cosecha (DFP), que confiere a las raíces características desagradables, dentro de las 72 horas posteriores a la cosecha (Owiti *et al.*, 2011). El DFP es generado por el daño mecánico, resultado que es inevitable de las operaciones involucradas en la cosecha. Una vez inicia el DFP, continua su progreso desde el sitio del daño, causando decoloración general del parénquima de almacenamiento a lo largo de la raíz (Uarrota *et al.*, 2015).

La variabilidad genética para la característica DFP ha sido limitada en *Manihot esculenta*, lo que sugiere necesario, incrementar la base genética a través de nuevos genotipos con tolerancia al DFP; por lo tanto se han intentado cruzamientos interespecíficos con otras especies de *Manihot* con el propósito de realizar la introgresión de alelos útiles (Ceballos *et al.*, 2004). En este sentido Fregene *et al.*, (2004) reporto una nueva fuente de genes que produce una rápida disminución al DFP, identificada en un híbrido interespecífico llamado CW429-1, obtenido mediante el cruzamiento entre la yuca cultivada *Manihot esculenta* Crantz y la especie silvestre *Manihot walkerae*, tolerante al DFP, originaria de Gran México (Rogers y Appan, 1973). Este híbrido se ha empleado en la generación de poblaciones segregantes con el fin de identificar genotipos con tolerancia al DFP (Cuambe, 2007; Rosero, 2008).

El objetivo de este capítulo fue identificar genotipos segregantes del híbrido interespecífico CW429-1, por tolerancia a DFP y caracterizar a nivel genético.

## 2.2 Materiales y métodos

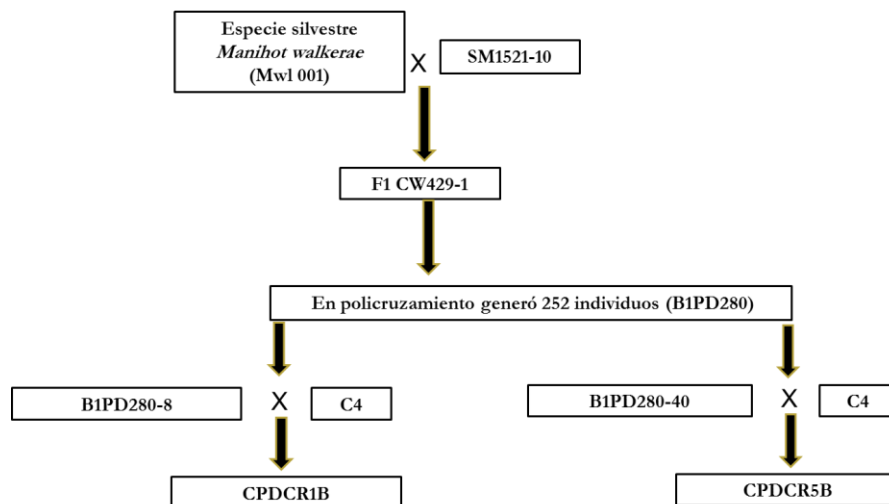
### 2.2.1 Localización

Se realizaron 4 cosechas de genotipos de *Manihot esculenta* Crantz, para evaluación del DFP y características de interés. Las cosechas fueron realizadas durante los años 2013 y 2014 en dos edades fisiológicas, 10 y 12 meses para cada año, el estudio fue realizado en el Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT ubicado en el municipio de Palmira (Departamento del Valle del Cauca) a 03° 30' latitud Norte y 76° 30' longitud Oeste, 965 m.s.n.m. con 24 °C de temperatura promedio anual (Cuambe, 2007).

### 2.2.2 Material biológico

Se emplearon dos familias segregantes, la familia CPDCR1B con 55 genotipos y la familia CPDCR5B con 45 genotipos, se incluyen los 3 parentales (B1PD280-008, B1PD280.040 y C4), familias de gran interés, puesto que son segregantes del híbrido interespecífico CW429-1, obtenido a partir de un cultivar de *Manihot esculenta* y la especie silvestre *Manihot walkerae* tolerante al DFP. Estas familias fueron obtenidas mediante investigaciones previas realizadas en CIAT a partir del estudio realizado por Cuambe (2007) y Rosero (2008), donde se obtuvo una población de hermanos medios (B1PD280, compuesta por 252 individuos), a partir del parental resistente CW429-1 en policruzamiento con 8 genotipos elites como parentales susceptibles (MTAI 8, CM523-7, HMC-1, MCOL1505, MBRA337, MPER183, CM2772-3 y SM909-25); El esquema de obtención de las familias se presentan en la figura 2-1.

**Figura 2-1.** Esquema de cruzamientos para la obtención de las familias CPDCR1B y CPDCR5B



### 2.2.3 Establecimiento en campo

Las familias CPDCR1B y CPDCR5B y 5 testigos elites (MPER 183, MCOL 22, AM206-5, CM523-7 y HMC-1), se sembraron en campo en septiembre de 2012 y octubre de 2013, empleando 10 semillas clonales (estacas) de cada genotipo, obteniendo 10 plantas por genotipo para estudio. La disposición de las plantas en el campo experimental fue de 0.8 m entre plantas y 1.20 m entre surcos, en el centro de caballones (camas) de 30 cm de altura y empleando aleatorización de genotipos. Por cada año se realizaron dos cosechas correspondientes a dos edades fisiológicas 10 y 12 meses, cosechando 3 plantas por genotipo en cada cosecha para evaluación del DFP, características pre cosecha y características de cosecha como MS, HCN y ES.

### 2.2.4 Evaluación pre cosecha

Se evaluaron características de pre cosecha 3 días antes de la cosecha, realizada a dos de las tres plantas a cosechar. Las características evaluadas son: vigor, número estimado de estacas por planta y evaluación planta, datos que son de tipo cualitativo ya que son datos obtenidos de forma subjetiva de acuerdo al fenotipo que presenta la planta. También se evaluaron características de tipo cuantitativo como altura de la planta, altura a la primera ramificación, longitud tallo con hojas, medidas en cm, también se reportó el número de ramificaciones que presenta la planta.

**Vigor:** Se emplea una escala de 1 a 5, siendo 1 el menor grado de vigor y 5 el máximo de vigor presente en la planta, básicamente de acuerdo al fenotipo presentado por el tallo, máximo vigor, posee un tallo grueso y mínimo un tallo delgado.

**Número de estacas por planta:** Es el número de estacas de 20 cm de largo, que posiblemente se pueden obtener de una planta, es de interés ya que representaría el número de semilla de tipo comercial, que se puede obtener de cada planta.

**Evaluación planta:** Se estima mediante una escala de 1 a 5, siendo 1 el mejor grado y 5 el peor. Se tiene en cuenta la arquitectura de la planta, el vigor, el nivel de ramificación, capacidad de producir estacas, cantidad de follaje, ausencia de enfermedades y presencia de características silvestres (CIAT, 2002). La escala a usar es la siguiente:

- 1 = Plantas con buena arquitectura y vigor.
- 2 = Plantas con arquitectura y vigor intermedio.
- 3 = Plantas con buen vigor pero no buena arquitectura.
- 4 = Plantas con vigor intermedio pero características silvestres.
- 5 = Plantas con bajo vigor y/o características silvestres.

### 2.2.5 Evaluación características de cosecha

Se evaluaron características de cosecha a partir de las 3 plantas cosechadas para evaluación de DFP, se evaluaron características de tipo cualitativo y cuantitativo.

**Tamaño de raíz:** Evaluación de forma visual cuyas alternativas son las siguientes: Muy pequeña (diámetro < 3 cm), pequeña (diámetro de 3 a 5 cm), mediana (diámetro de 5 a 8 cm), grande (diámetro de 8 a 11 cm) y muy grande (diámetro > 11 cm), tomado como el promedio general de las raíces de cada genotipo.

**Color de raíz:** Color promedio, que presenta cada genotipo en la epidermis, y puede ser raíz blanca o café, medido de forma visual.

**Color de Pulpa:** Color promedio de la pulpa, de las raíces de cada genotipo, pueden ser blanco, crema y amarillo, medida de forma visual.

En términos cuantitativos se evaluó, el peso promedio de raíces por planta en kilogramos, y peso promedio de raíz.

### **2.2.6 Cuantificación de características de interés agroindustrial: MS, HCN, DFP y ES**

Se realizó la evaluación del contenido de MS a cada uno de los genotipos cosechados, empleando 3 a 4 raíces, mediante el método de la AOAC (AOAC, 1995), cuya metodología y ecuación de cálculo, fueron descritas previamente en el capítulo 1 numeral 1.2.4.

La cuantificación de HCN, se realizó usando el material restante del análisis de materia seca y usando la metodología descrita por Essers *et al.*, (1993) con algunas modificaciones como se detalló en el capítulo 1 numeral 1.2.5.

En cuanto al DFP se utilizaron 10 raíces por genotipo a partir de 3 plantas cosechadas, el proceso seguido para el montaje y almacenamiento de las raíces para evaluación del DFP es el desarrollado por Wheatley *et al.*, (1985a) cuyo procedimiento fue escrito previamente en el capítulo 1 numeral 1.2.7, modificando el tiempo de almacenamiento, ya que para este caso las raíces se almacenaron por siete días.

Por otro lado la cuantificación del contenido de escopoletina, se realizó a la mezcla de las raíces evaluadas por DFP, con la metodología propuesta por Sánchez *et al.*, (2013), cuyo método está consignado en el capítulo 1 numeral 1.2.8 del presente documento.

### **2.2.7 Identificación de SNPs**

Para llevar a cabo la identificación de SNPs, se usaron solo aquellos genotipos que presentaron valores estimados de DFP inferiores a -0.45 y superiores o iguales a 0.33; 12 genotipos presentaron el fenotipo tolerante y 10 el susceptible, mediante el empleo de la secuenciación genética RAD-Sequencing (Baird, *et al.*, 2008), se llevó a cabo una identificación de variaciones bialélicas de nucleótido simple (SNPs), que diferenciaran las poblaciones tolerantes y susceptibles al deterioro fisiológico pos cosecha. Para esto, se seleccionó genotipos que presentaran diferencias fenotípicas en el valor estimado de DFP, es decir tolerantes aquellos con DFP menor a -0.45 y susceptibles con DFP superior o igual a 0.33. Se extrajo ADN de las muestras seleccionadas utilizando la metodologías descrita por Doyle & Doyle (1990) y se enviaron al Beijing Genomic Institute (BGI), donde se realizó la secuenciación genética por RAD sequencing (Baird, *et al.*, 2008), esta técnica consiste en la digestión de ADN genómico, de múltiples muestras de interés con enzimas de restricción seleccionadas, y adaptadores con etiquetas específicas de las muestras, con terminaciones salientes que corresponden al sitio de corte de la enzima de restricción, que son ligados a los fragmentos de restricción digeridos (Davey *et al.*, 2013). Estos adaptadores son cortados a un tamaño adecuado (típicamente de 300-700pb) para secuenciación con Illumina mediante síntesis. Una vez obtenidas las secuencias, se utilizó el software NGSEP (Next Generation Sequencing Eclipse Plugin) (Cruz *et al.*, 2014) para mapear las secuencias crudas de illumina a la versión actualizada del genoma de referencia AM560-2 vs 6.1 (Prochnik *et al.*, 2012) disponible en Phytozome ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)), con el propósito de identificar SNPs entre los genomas en estudio y el genoma

de referencia, generando un catálogo de variantes y obteniendo los genotipos correspondientes a cada muestra.

El archivo con los genotipos de las variaciones identificadas en cada una de las muestras se obtuvo en formato VCF (Variant Call Format). Este archivo, posteriormente fue filtrado para eliminar las variaciones que aún no estuvieran ensambladas en cromosoma en el genoma de referencia (es decir que estuvieran aun en scaffolds), y se seleccionaron aquellas variaciones cuya frecuencia del alelo menor (MAF) fuera mayor a 0,05 en la población analizada y que se hubieran genotipado en por lo menos 85 % de las muestras. Se compararon las frecuencias alélicas de las poblaciones tolerantes y susceptibles a DFP y se seleccionaron las variaciones que presentaron una diferencia alélica superior a 0,3. Posteriormente, de estas variaciones que potencialmente diferenciarían entre las poblaciones susceptibles y tolerantes, se seleccionaron los SNPs que estuvieran anotados en regiones codificantes y que fueran no sinónimos. La visualización grafica de estos SNPs se realizó en el programa FLAPJACK (Milne *et al.*, 2010).

### **2.2.8. Análisis estadísticos**

Se realizó un análisis univariado para la característica tamaños de raíz, con el software JMP versión 12.2, empleando los datos de las cosechas realizadas en el año 2013, con el objetivo de seleccionar solo aquellos genotipos que presenten tamaños de raíz comercial, para uniformizar tamaños y eliminar el ruido que se generaría por aquellos genotipos que presente raíces que no permitan realizar una adecuada evaluación de DFP.

Una vez seleccionado los genotipos por tamaños de raíz, se realizó otra selección a través de la característica DFP, con el software JMP versión 12.2, mediante un análisis Univariado, con el objetivo de seleccionar aquellos genotipos que presentaron mayor uniformidad con respecto a la variable de respuesta y que permita diferenciar genotipos con valores bajos, medios y altos en DFP y a su vez cruzada con los datos de peso promedio de raíz. Una vez realizadas las selecciones respectivas, se continuo las evaluaciones en el año 2014 solo con los genotipos seleccionados a partir de los dos filtros realizados e incluyendo los 5 genotipos como testigos.

Con las características de pre cosecha y de cosecha se realizó análisis de varianza y test de Tukey con el software Infogen, con el objetivo de indagar si dichas características permiten discriminar entre genotipos para posibles correlaciones.

Se realizó análisis univariado por genotipo empleando los datos obtenidos a partir de los 4 ensayos realizados, se efectuó análisis de correlaciones mediante correlación de PEARSON, con el software estadístico Infogen Versión 2014. Se realizó análisis estadístico de cada uno de los 4 ensayos en estudio en conjunto con los 4 ensayos adicionales descritos previamente en el capítulo uno del presente documento, en el que se estudian los efectos de genotipo, temporada, día de cosecha, rodaja, lluvia, y la obtención final de un estimador numérico que representa el DFP, el cual permitió explicar la mayor variación encontrada por genotipo; para lo cual se utilizó el software estadístico R versión 3.1.1. y a partir del cual se realizó la selección de genotipos tolerantes y susceptibles al DFP para el análisis genético.

## **2.3. Resultados y discusión**

### **2.3.1. Selección de genotipos por tamaño de raíz**

Puesto que estas familias no se habían evaluado previamente, solo en el año 2013 se logró observar el comportamiento de cada uno de los genotipos en términos de producción de raíces, motivo por el cual

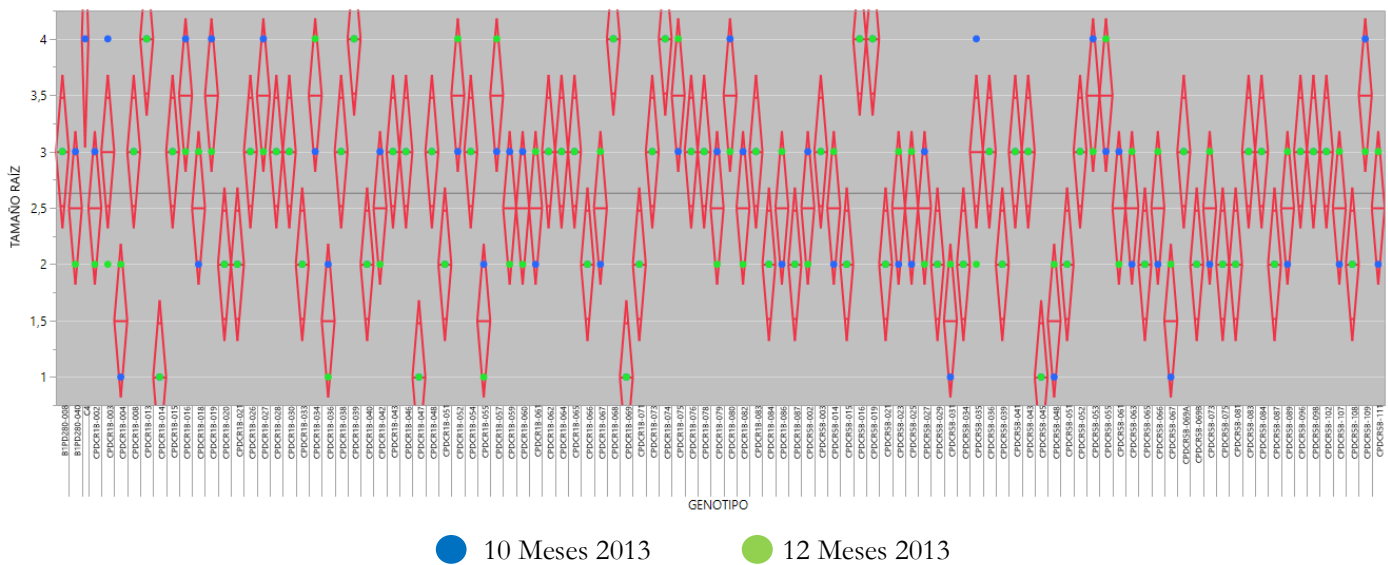


se evaluaron todos los genotipos. A partir de los datos obtenidos de las dos primeras cosechas, realizadas en el año 2013 a edades fisiológicas de 10 y 12 meses a los 100 genotipos de las familias CPDCR1B y CPDCR5B, incluyendo además los tres parentales, se seleccionaron aquellos genotipos que presentaron raíces de tamaño comercial (Diámetro  $\geq 5$  cm). En la figura 2-2 se presenta la variabilidad para la característica tamaño de raíz encontrada en las familias CPDCR1B y CPDCR5B, en la cual se empleó la siguiente escala:

- Muy pequeña (Diámetro de raíz inferior a 3 cm) = 1
- Pequeña (Diámetro de raíz entre 3-5 cm) = 2
- Mediana (Diámetro de raíz entre 5-8 cm) = 3
- Grande (Diámetro de raíz entre  $>8$  cm) = 4

La selección de raíces se realizó para eliminar ruido al momento de evaluar las raíces por DFP y además para cumplir con los requisitos de selección de la raíces descrito por Wheatley *et al.*, (1985a) quien reporta que las raíces deben tener un tamaño comercial y una longitud mínima de 18 cm.

**Figura 2-2.** Variabilidad para la característica tamaño de raíz año 2013, en familias segregantes de CW429-1



A partir del análisis univariado, se seleccionaron genotipos con tamaño de raíz comercial es decir aquellos con tamaños promedios igual o superior a 3, mostrado en la figura 2-2, la línea horizontal de los rombos representan la media de las observaciones realizadas; obteniendo un total de 50 genotipos aptos para continuar las evaluaciones dentro de los cuales están incluidos los 3 parentales, genotipos que se presentan en la tabla 2-1.

**Tabla 2-1.** Genotipos seleccionados por tamaño de raíz comercial mediante análisis univariado

Genotipo	# de observaciones	Media	Genotipo	# de observaciones	Media
B1PD280-008	2	3	CPDCR1B-068	2	4
B1PD280-040	2	2,5	CPDCR1B-073	2	3
C4	1	4	CPDCR1B-074	2	4
CPDCR1B-003	2	3	CPDCR1B-075	2	3,5
CPDCR1B-008	2	3	CPDCR1B-076	2	3
CPDCR1B-013	2	4	CPDCR1B-078	2	3
CPDCR1B-015	2	3	CPDCR1B-080	2	3,5
CPDCR1B-016	2	3,5	CPDCR1B-083	2	3
CPDCR1B-019	2	3,5	CPDCR5B-003	2	3
CPDCR1B-026	2	3	CPDCR5B-016	2	4
CPDCR1B-027	2	3,5	CPDCR5B-019	2	4
CPDCR1B-028	2	3	CPDCR5B-035	2	3
CPDCR1B-030	2	3	CPDCR5B-036	2	3
CPDCR1B-034	2	3,5	CPDCR5B-041	2	3
CPDCR1B-038	2	3	CPDCR5B-043	2	3
CPDCR1B-039	2	4	CPDCR5B-052	2	3
CPDCR1B-043	2	3	CPDCR5B-053	2	3,5
CPDCR1B-046	2	3	CPDCR5B-055	2	3,5
CPDCR1B-048	2	3	CPDCR5B-069A	2	3
CPDCR1B-052	2	3,5	CPDCR5B-083	2	3
CPDCR1B-054	2	3	CPDCR5B-084	2	3
CPDCR1B-057	2	3,5	CPDCR5B-096	2	3
CPDCR1B-062	2	3	CPDCR5B-098	2	3
CPDCR1B-064	2	3	CPDCR5B-102	2	3
CPDCR1B-065	2	3	CPDCR5B-109	2	3,5

### 2.3.2. Selección de genotipos por uniformidad en DFP

Los datos obtenidos a partir de la selección por tamaño de raíz, permitieron realizar la selección de aquellos genotipos que presentaron mayor uniformidad en primer lugar en términos de DFP, es decir, se seleccionaron genotipos con valores promedios de DFP, de forma variable (% DFP bajo, medio y alto), cuya desviación estándar sea la más baja, es así como por ejemplo el genotipo CPDCR1B-008 con media de 17,06 %DFP y desviación estándar de 9.71 es seleccionado en vez del genotipo CPDCR1B-083 (17,11 %DFP), con desviación de 14.67, como se muestra en la figura 2-3; en segundo lugar la selección se continuó en términos de peso promedio de raíz, seleccionando aquellos genotipos con mejor comportamiento para esta característica. De esta forma el número de genotipos se redujo a 35 incluidos los 3 parentales, para continuar con los ensayos en el año 2014, los cuales se presentan en la tabla 2-3.

Figura 2-3. Variabilidad para la característica DFP año 2013 en familias segregantes de CW429-1

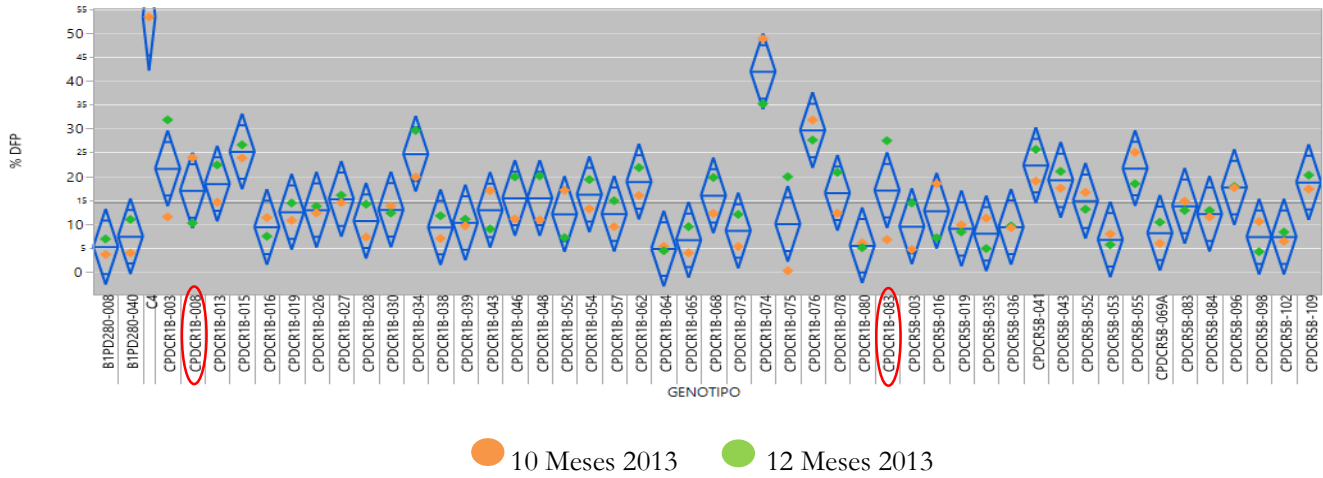


Tabla 2-2. Genotipos seleccionados por % DFP y peso de raíz

GENOTIPO	Promedio %DFP	DS	Peso promedio de raíz (Kg)	DS
B1PD280-008	5,25	2,31	0,230	0,009
B1PD280-040	7,45	4,98	0,125	0,021
C4	53,42	ND	ND	ND
CPDCR1B-008	17,06	9,71	0,225	0,064
CPDCR1B-013	18,49	5,53	0,441	0,006
CPDCR1B-015	25,23	1,96	0,282	0,047
CPDCR1B-019	12,59	2,59	0,235	0,097
CPDCR1B-026	13,03	0,97	0,254	0,019
CPDCR1B-027	15,28	1,09	0,360	0,010
CPDCR1B-028	10,71	4,90	0,151	0,039
CPDCR1B-034	24,76	6,90	0,250	0,047
CPDCR1B-043	12,99	5,67	0,213	0,003
CPDCR1B-046	15,49	6,25	0,200	0,052
CPDCR1B-048	15,48	6,50	0,205	0,016
CPDCR1B-052	12,12	7,01	0,352	0,120
CPDCR1B-054	16,25	4,36	0,238	0,018
CPDCR1B-062	18,92	4,13	0,265	0,018
CPDCR1B-064	4,87	0,66	0,278	0,082
CPDCR1B-065	6,70	3,89	0,238	0,002
CPDCR1B-068	16,02	5,31	0,352	0,027
CPDCR1B-074	42,02	9,65	0,596	0,194
CPDCR1B-075	10,06	13,95	0,338	0,059
CPDCR1B-076	29,73	2,98	0,224	0,051
CPDCR1B-078	16,56	6,05	0,250	0,045
CPDCR1B-080	5,55	0,71	0,238	0,009
CPDCR5B-016	12,80	8,03	0,282	0,021
CPDCR5B-036	9,43	0,27	0,215	0,039
CPDCR5B-041	22,35	4,68	0,256	0,038
CPDCR5B-043	19,28	2,49	0,319	0,036
CPDCR5B-053	6,80	1,59	0,267	0,060
CPDCR5B-055	21,75	4,67	0,345	0,200
CPDCR5B-069A	8,17	3,14	1,399	1,630
CPDCR5B-096	17,76	0,17	0,236	0,018
CPDCR5B-102	7,36	1,35	0,239	0,008
CPDCR5B-109	18,80	2,07	0,387	0,108

### 2.3.3. Características de pre cosecha: vigor, altura de la planta, altura primera ramificación, número de ramificaciones, longitud tallo con hojas, número de estacas por planta

Los análisis de varianza y test de Tukey para características de precosecha (morfológicas), como la variable vigor, demuestra que solo 5 genotipos difieren significativamente, indicando que esta variable no es adecuada para realizar una buena discriminación entre genotipos, como se puede observar en la figura 2-4.

**Figura 2-4.** Análisis de varianza y test de Tukey para la variable vigor en 4 ensayos en familias segregantes de CW429-1

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Vigor	138	0,40	0,21	19,29

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	22,93	34	0,67	2,04	0,0032
Genotipo	22,93	34	0,67	2,04	0,0032
Error	34,00	103	0,33		
Total	56,93	137			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,62277

Error: 0,3301 gl: 103

Genotipo	Medias	n	E.E.
B1PD280-008	2,00	4	0,29 A
C4	2,50	2	0,41 A B
CPDCR5B-036	2,50	4	0,29 A B
CPDCR1B-078	2,50	4	0,29 A B
CPDCR1B-052	2,50	4	0,29 A B
CPDCR1B-028	2,75	4	0,29 A B
CPDCR1B-065	2,75	4	0,29 A B
CPDCR1B-046	2,75	4	0,29 A B
CPDCR1B-048	2,75	4	0,29 A B
CPDCR5B-069A	2,75	4	0,29 A B
CPDCR1B-015	2,75	4	0,29 A B
CPDCR5B-102	2,75	4	0,29 A B
CPDCR5B-016	2,75	4	0,29 A B
CPDCR1B-080	2,75	4	0,29 A B
CPDCR1B-064	2,75	4	0,29 A B
CPDCR5B-043	3,00	4	0,29 A B
CPDCR1B-013	3,00	4	0,29 A B
CPDCR1B-026	3,00	4	0,29 A B
CPDCR1B-027	3,00	4	0,29 A B
B1PD280-040	3,00	4	0,29 A B
CPDCR5B-096	3,00	4	0,29 A B
CPDCR1B-008	3,00	4	0,29 A B
CPDCR5B-055	3,00	4	0,29 A B
CPDCR1B-062	3,00	4	0,29 A B
CPDCR1B-043	3,00	4	0,29 A B
CPDCR1B-034	3,00	4	0,29 A B
CPDCR1B-075	3,00	4	0,29 A B
CPDCR1B-054	3,00	4	0,29 A B
CPDCR1B-076	3,25	4	0,29 A B
CPDCR1B-074	3,50	4	0,29 A B
CPDCR1B-068	3,50	4	0,29 A B
CPDCR5B-109	3,75	4	0,29 B
CPDCR5B-041	3,75	4	0,29 B
CPDCR5B-053	3,75	4	0,29 B
CPDCR1B-019	4,00	4	0,29 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

El análisis de varianza y el test de Tukey arrojaron que las variables altura de planta, altura a la primera ramificación, número de ramificaciones, longitud tallo con hojas y número de estacas por planta

tampoco discrimina entre genotipos, en el mejor de los casos solo dos genotipos difieren significativamente, resultados que se pueden observar en el anexo C. Estos resultados, son esperados puesto que las poblaciones usadas en el estudio son conformadas por hermanos medios, es decir comparten información genética, y por lo general, características de tipo morfológico son controladas por pocos genes, lo que hace que los genotipos sean estables y no son influenciados por los factores ambientales.

### 2.3.4. Características de cosecha: Peso promedio de raíces por planta, peso promedio de raíz, color de raíz, color de pulpa y tamaño de raíz

Los análisis de varianzas y test de Tukey realizados, muestra que las variables peso promedio de raíces por planta, peso promedio de raíz, color de raíz, color de pulpa y tamaño de raíz, de forma general no permiten establecer diferencias significativas de medias entre los genotipos. En cuanto al tamaño de raíz, es un resultado esperado, puesto que esta variable fue de gran importancia en la selección previa de los genotipos, por tamaño de raíz comercial, para eliminar ruido al momento de evaluar DFP. Los análisis de varianza de estas características se presentan en el anexo C.

### 2.3.5. Características de Interés agroindustrial: MS, HCN, DFP y ES

El análisis univariado para cada una de las características evaluadas como materia seca (MS), ácido cianhídrico (HCN), deterioro fisiológico pos cosecha (DFP), y contenido de escopoletina (ES), permitió obtener análisis de varianza para cada una de las variables, que se presentan en las tablas 2-3, 2-4, 2-5 y 2-6 respectivamente; en concordancia el comportamiento de las mismas a través de cada uno de los ensayos se presentan en las figuras 2-5, 2-6, 2-7 y 2-8 respectivamente. En el anexo D se presentan las medias de las características ya mencionadas.

**Tabla 2-3.** Análisis de varianza para la característica MS en 4 ensayos en segregantes de CW429-1

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Genotipo	39	1265,6593	32,4528	3,2402	<,0001*
Error	119	1191,8549	10,0156		
C. Total	158	2457,5143			

El comportamiento del contenido de MS, fue variable a través de los ensayos, lo que se demuestra con el análisis de varianza, el cual reporta diferencias significativas, es decir al menos un genotipo es diferente de los demás. Se presentó una media muestral de 36.94% MS, teniendo valores desde 25 a 45 % de MS. Algunos genotipos más estables que otros, lo que es pertinente puesto que la característica es de tipo cuantitativa, es decir es afectada por los factores ambientales.

Figura 2-5. Comportamiento de la MS durante los 4 ensayos en segregantes de CW429-1

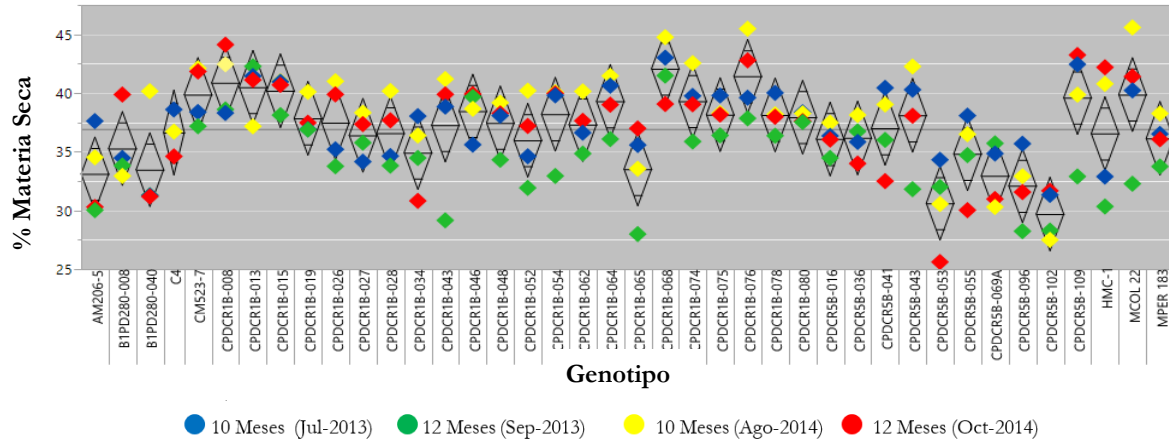
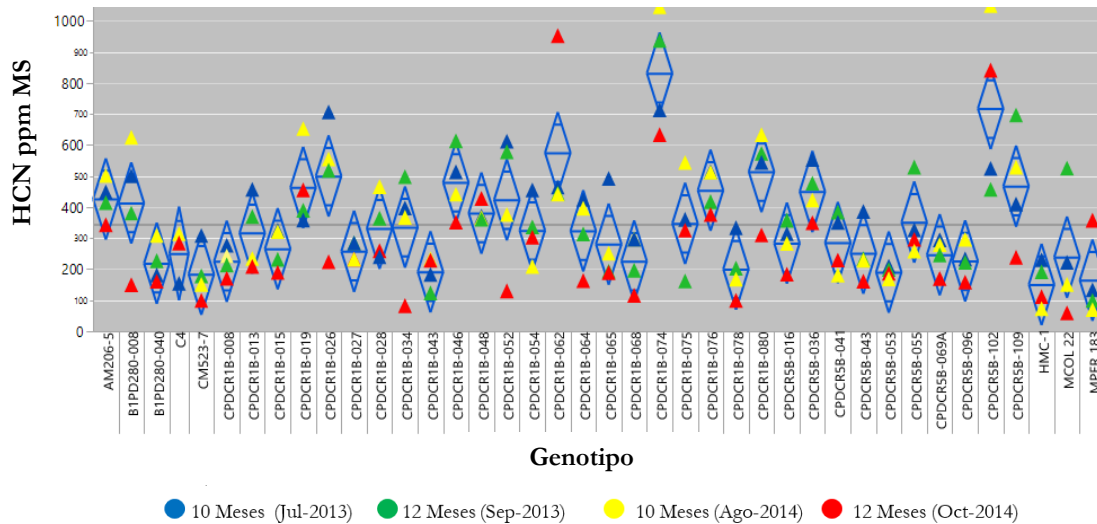


Tabla 2-4. Análisis de varianza para contenido de HCN en 4 ensayos en segregantes de CW429-1

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Genotipo	39	3423883,5	87791,9	5,0463	<,0001*
Error	119	2070281,2	17397,3		
C. Total	158	5494164,7			

Figura 2-6. Distribución del contenido de HCN durante los 4 ensayos en segregantes de CW429-1

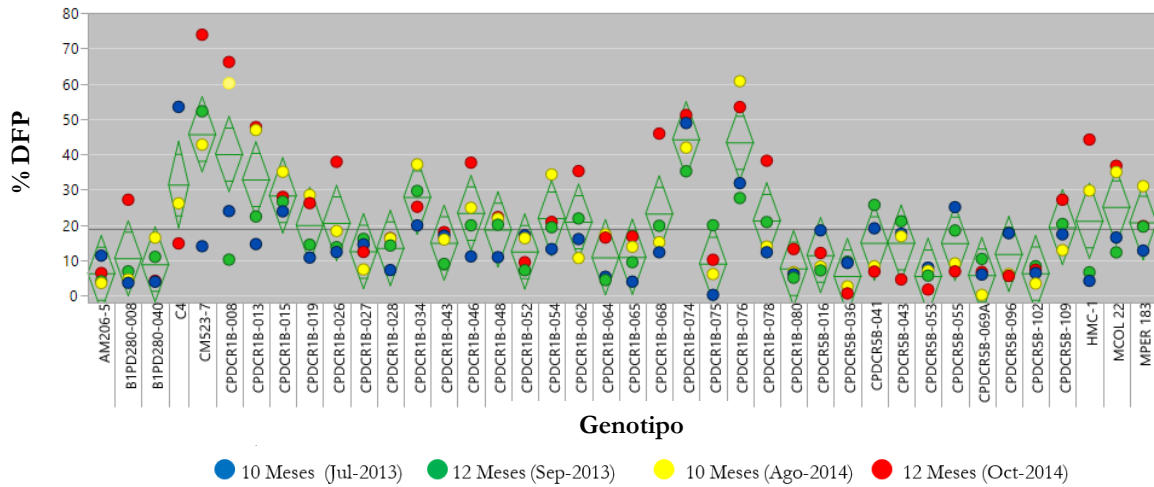


El contenido de HCN también fue variable con diferencias significativas de acuerdo al análisis de varianza, con valores que van desde 58 a 1048 ppm y una media muestral de 345 ppm. Se presentaron genotipos más estables que otros como por ejemplo CPDCR5B-053 y otros con mucha variación como CPDCR5B-102, representado en la figura 2-6 donde se observa el comportamiento de cada genotipo y cuya variación a través de los ensayos se ve representada por la ubicación de los rombos.

**Tabla 2-5.** Análisis de varianza para la característica DFP en 4 ensayos en segregantes de CW429-1

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Genotipo	39	18577,727	476,352	4,1159	<,0001*
Error	119	13772,408	115,735		
C. Total	158	32350,135			

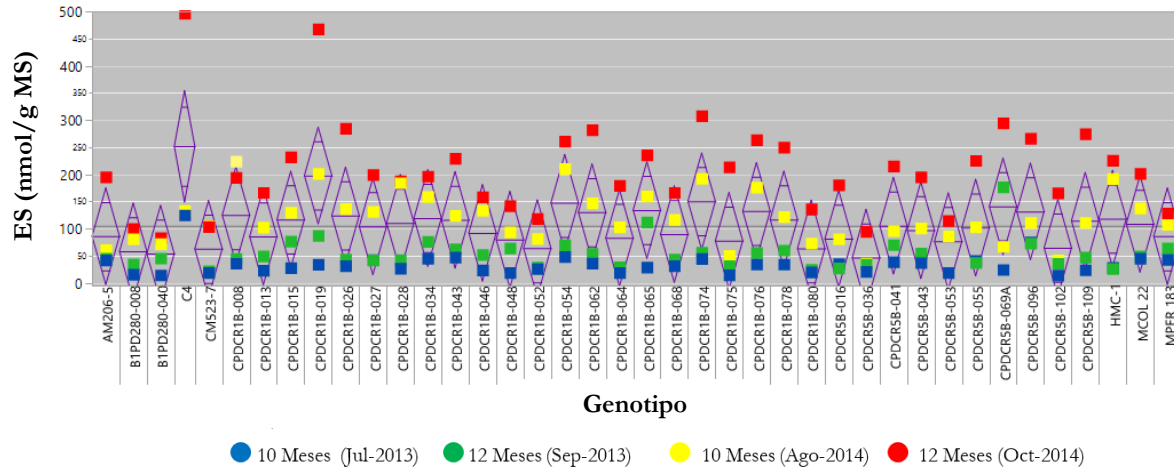
**Figura 2-7.** Variabilidad para la característica DFP en los 4 ensayos en segregantes de CW429-1



Por su parte el DFP también permitió discriminar entre genotipos, obteniendo diferencias significativas en el análisis de varianza, con promedios por genotipo que van desde 5 a 45 % de DFP, con media general de 18.9 % DFP; además se logra identificar que hay genotipos muy estables para la característica, como por ejemplo CPDCR5B-102 y el parental B1PD280-008, que para efectos de este estudio se presentan como tolerantes y genotipos con características de susceptibles, con una alta variación entre los ensayos realizados como los genotipos CPDCR1B-008 y CPDCR1B-013: comportamientos presentados en la figura 2-7. La media general obtenida para DFP, es mucho más baja que la reportada por Rosero (2008) quien evaluó la población B1PD280 y obtuvo una media de 30.5 % de DFP para un tiempo de almacenamiento de 7 días.

**Tabla 2-6.** Análisis de varianza para ES en 4 ensayos en segregantes de CW429-1

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Genotipo	39	217527,0	5577,62	0,6914	0,9065
Error	119	959932,1	8066,66		
C. Total	158	1177459,1			

**Figura 2-8.** Comportamiento del contenido de ES en los 4 ensayos en segregantes de CW429-1

La característica contenido de escopoletina (ES), fue muy variable dentro de los genotipos y entre genotipos, pero el análisis de varianza reporta que las diferencias no son significativas, con valores promedios por genotipos que van desde 46 a 251 nmol g<sup>-1</sup> en base seca, con una media general de 105 nmol g<sup>-1</sup> en base seca.

### 2.3.6 Análisis de correlación entre las características DFP, MS, HCN y ES

Mediante el análisis de correlación de Pearson se identificaron dos interacciones importantes entre las variables estudiadas; en este sentido las variables que mejor se correlacionan son DFP con MS, y DFP con ES, con coeficientes de correlación de 0.53 y 0.35 altamente significativa ( $p < 0,0001$ ) como se presenta en la tabla 2-7.

**Tabla 2-7.** Análisis de correlación de Pearson entre las variables DFP, MS, HCN y ES

Correlación de Pearson				
Variable (1)	Variable (2)	n	Pearson	p-valor
DFP	MS	159	<b>0,53</b>	<b>&lt;0,0001</b>
DFP	HCN	159	-0,07	0,3508
DFP	ES	159	<b>0,35</b>	<b>&lt;0,0001</b>
MS	HCN	159	-0,04	0,5888
MS	ES	159	0,17	0,0282
HCN	ES	159	-0,16	0,0502

El contenido de MS se correlacionó de forma positiva con el contenido de ES con un coeficiente de 0.17 pero no es significativa. La correlación positiva entre DFP y MS es acorde a lo encontrado por Van Oirschot *et al.*, (2000) y Sánchez *et al.*, (2006), quienes también encontraron correlación positiva entre estas dos características, resultado que confirma que el desarrollo del DFP se ve favorecido por altos contenidos de materia seca, variables que a nivel de mejoramiento genético deberían ir en sentidos



contrarios, es decir alta MS y bajo desarrollo de DFP. En cuanto al contenido de ES, es claro que el DFP favorece la producción de ES, puesto que es un proceso que se acelera en la medida en que las raíces sufren heridas al momento de la cosecha, con la consecuente acumulación de metabolitos secundarios, inducida por la alteración de genes aunada a los factores ambientales Reilly *et al.*, (2003). En cuanto a la relación existente entre el DFP y HCN es negativa y aunque no es significativa es un comportamiento de interés puesto que estudios previos realizados por Zidenga *et al.*, (2012) demuestran que la expresión oxidativa, se inicia por la liberación de cianuro generada por las heridas causadas durante la cosecha, lo que conlleva a una acumulación de especies reactivas de oxígeno, inducida por la inhibición de la citocromo oxidasa en la cadena de transporte de electrones en el proceso de respiración, cuya concentración de cianuro para inhibir la citocromo oxidasa es de 10-20  $\mu\text{M}$ , concentración muy por debajo de las concentraciones normales de las raíces (1-5 mM Yip y Yang (1998); Hell y Wirtz (2008)). Nuestros resultados demuestran lo contrario puesto que la correlación negativa entre DFP y HCN presume que no hay un efecto directo entre el contenido de HCN y el desarrollo de DFP.

### 2.3.7 Análisis estadístico de los ensayos realizados y obtención del valor estimativo de DFP

Se logró ajustar un modelo lineal mixto, con el total de los datos aportados por cada uno de los ensayos, con efectos fijos por genotipo, rodaja, día de evaluación, madurez y época; también se incluyó un efecto aleatorio por raíz anidado en el ensayo por día, por genotipo, por madurez y por raíz. Resultados que fueron presentados previamente en este documento en el capítulo 1 numeral 1.3.5 tabla 1-9, donde se presenta el análisis de varianza para los efectos de genotipo y rodaja en el DFP, de igual forma los valores estimados para los efectos de madurez, día, rodaja y lluvia se mantendrían constantes para todos los genotipos, presentados previamente en la tabla 1-11 del capítulo 1. Mientras que el valor estimado para el efecto genotipo sería constante solo para cada genotipo, de esta forma el valor de DFP aportado por el modelo lineal sería único para cada uno de los genotipos, valores que se presentan en la tabla 2-8, con su respectivo error estándar y valor t.

**Tabla 2-8** Valor estimado del DFP por genotipo, con su respectivo error estándar y valor t

Efecto	Nivel	Estimado	Error Std	Valor t	Efecto	Nivel	Estimado	Error Std	Valor t
<b>Intercepto</b>		<b>0.2542</b>	<b>0.2986</b>	<b>0.8514</b>	<b>Intercepto</b>		<b>0.2542</b>	<b>0.2986</b>	<b>0.8514</b>
Genotipo	<b>CPDCR5B-036</b>	-1.2339	0.2842	-4.3409	Genotipo	<b>MPER 183</b>	0.0637	0.1892	0.3366
Genotipo	<b>CPDCR5B-102</b>	-1.2260	0.2943	-4.1660	Genotipo	<b>CPDCR1B-048</b>	0.0812	0.2847	0.2852
Genotipo	<b>CPDCR1B-075</b>	-1.1428	0.3290	-3.4731	Genotipo	<b>CPDCR5B-109</b>	0.1855	0.2844	0.6520
Genotipo	<b>CPDCR5B-069A</b>	-0.9727	0.2855	-3.4069	Genotipo	<b>CPDCR1B-026</b>	0.2326	0.2870	0.8105
Genotipo	<b>CPDCR1B-080</b>	-0.9646	0.2841	-3.3956	Genotipo	<b>CPDCR1B-062</b>	0.3127	0.2846	1.0984
Genotipo	<b>B1PD280-040</b>	-0.8948	0.2877	-3.1100	Genotipo	<b>CPDCR1B-078</b>	0.3394	0.2850	1.1909
Genotipo	<b>CPDCR5B-053</b>	-0.7561	0.2840	-2.6627	Genotipo	<b>CPDCR1B-054</b>	0.4002	0.2849	1.4046
Genotipo	<b>B1PD280-008</b>	-0.6678	0.2839	-2.3524	Genotipo	<b>MCOL 22</b>	0.5381	0.1873	2.8729
Genotipo	<b>CPDCR1B-064</b>	-0.6609	0.2842	-2.3251	Genotipo	<b>CPDCR1B-019</b>	0.5430	0.2909	1.8665
Genotipo	<b>CPDCR1B-065</b>	-0.6529	0.2954	-2.2098	Genotipo	<b>CPDCR1B-068</b>	0.5722	0.2844	2.0122
Genotipo	<b>CPDCR5B-096</b>	-0.6229	0.2897	-2.1502	Genotipo	<b>CPDCR1B-046</b>	0.6057	0.2840	2.1327
Genotipo	<b>CPDCR1B-027</b>	-0.5532	0.2880	-1.9209	Genotipo	<b>HMC-1</b>	0.7032	0.1848	3.8048
Genotipo	<b>CPDCR1B-052</b>	-0.5251	0.2876	-1.8260	Genotipo	<b>C4</b>	0.7876	0.3611	2.1812
Genotipo	<b>CPDCR5B-016</b>	-0.4325	0.2926	-1.4782	Genotipo	<b>CPDCR1B-015</b>	1.0594	0.2985	3.5493
Genotipo	<b>CPDCR1B-028</b>	-0.3691	0.2921	-1.2636	Genotipo	<b>CPDCR1B-034</b>	1.1317	0.2876	3.9356
Genotipo	<b>CPDCR5B-043</b>	-0.2985	0.2896	-1.0305	Genotipo	<b>CPDCR1B-013</b>	1.5503	0.2841	5.4569
Genotipo	<b>CPDCR5B-055</b>	-0.2723	0.2995	-0.9092	Genotipo	<b>CM523-7</b>	1.8504	0.1843	10.0405
Genotipo	<b>CPDCR1B-043</b>	-0.2643	0.2844	-0.9292	Genotipo	<b>CPDCR1B-008</b>	2.2674	0.2841	7.9816
Genotipo	<b>CPDCR5B-041</b>	-0.2642	0.2843	-0.9291	Genotipo	<b>CPDCR1B-076</b>	2.5740	0.2844	9.0524
Genotipo	<b>AM 206-5</b>	0.0000	NA	NA	Genotipo	<b>CPDCR1B-074</b>	3.0114	0.2846	10.5816

### 2.3.8 Selección de genotipos para caracterización genética e identificación de SNPs bialélicos relacionados al DFP

Empleando los datos obtenidos con el modelo lineal mixto, presentados en la tabla 2-8, se seleccionaron genotipos extremos en términos del valor estimador de DFP; 12 genotipos tolerantes a DFP que presentaron valores inferiores a -0.45 y 10 genotipos susceptibles con valores superiores o iguales a 0.33, con los cuales se realizó la caracterización genética, los cuales se les realizó secuenciación genética, genotipos presentados en la tabla 2-9. Solo tres genotipos que estaban dentro de los rangos de selección entre tolerantes y susceptibles, no fueron tenidos en cuenta (CPDCR1B-027, CPDCR1B-052 y CPDCR1B-019), puesto que no se tenían sus respectivas secuencias.

**Tabla 2-9.** Genotipos seleccionados para caracterización genética en segregantes de CW429-1

Genotipo tolerante	Valor estimado DFP	% DFP	Genotipo susceptible	Valor estimado DFP	% DFP
CPDCR5B-036	-1,2339	5,52	CPDCR1B-078	0,3394	21,30
CPDCR5B-102	-1,2260	6,37	CPDCR1B-054	0,4002	21,92
CPDCR1B-075	-1,1428	9,09	CPDCR1B-068	0,5722	23,25
CPDCR5B-069 <sup>a</sup>	-0,9727	5,81	CPDCR1B-046	0,6057	23,37
CPDCR1B-080	-0,9646	7,73	CPDCR1B-015	1,0594	28,37
B1PD280-040	-0,8948	8,87	CPDCR1B-034	1,1317	27,96
CPDCR5B-053	-0,7561	5,58	CPDCR1B-013	1,5503	32,89
B1PD280-008	-0,6678	10,56	CPDCR1B-008	2,2674	40,09
CPDCR1B-064	-0,6609	10,87	CPDCR1B-076	2,5740	43,38
CPDCR1B-065	-0,6529	10,98	CPDCR1B-074	3,0114	44,27
CPDCR5B-096	-0,6229	11,79			
CPDCR5B-016	-0,4325	11,47			

Con las secuencias obtenidas de Illumina y los datos de DFP, se logró la obtención de variantes alélicas (SNPs) entre los genotipos en estudio y el genoma de referencia AM560-2 vs 6.1, se obtuvieron como resultado 732 SNPs, de los cuales 71 SNPs son no sinónimos, que en otras palabras son SNPs que generan un cambio en la secuencia de aminoácidos. En las figuras 2-9 y 2-10 se presenta un ejemplo de la representación gráfica de los SNPs codificantes y no sinónimos respectivamente para el cromosoma 14 del genoma de *Manihot esculenta* Crantz, obtenida mediante el software FLAPJACK (Milne *et al.*, 2010). En la tabla 2-10 se presenta una tabla resumen del número de SNPs codificantes y no sinónimos por cromosoma. En el anexo 4. Se presenta la tabla frecuencias alélicas donde se incluye la posición y número de cromosoma de los SNPs encontrados entre las poblaciones tolerantes y susceptibles.

**Figura 2-9.** Representación gráfica en FLAPJACK de SNPs Codificantes, con su respectivo genotipo por muestra en el cromosoma 14



**Figura 2-10.** Representación gráfica en FLAPJACK de SNPs No Sinónimos, con su respectivo genotipo por muestra en el cromosoma 14



**Tabla 2-10.** Resumen número total de SNPs codificantes y no sinónimos por cromosoma para las 22 muestras seleccionadas

<b>Cromosoma</b>	<b># SNPs Codificantes</b>	<b>SNPs No Sinónimos</b>	<b>Muestras seleccionadas</b>
1	23	1	22
2	2		22
3	48	2	22
4	32	2	22
5	33	4	22
6	11		22
7	46	5	22
8	75	10	22
9	18	1	22
10	19	1	22
11	21	2	22
12	60	7	22
13	20	3	22
14	236	25	22
15	12		22
16	53	8	22
17	6		22
18	17		22
<b>Total</b>	732	71	

El cromosoma 14 fue el que más presentó SNPs tanto codificantes como no sinónimos (236 y 25 respectivamente), mientras que los cromosomas 2 y 17 fueron los que menos SNPs codificantes presentaron (2 y 6 respectivamente) y no presentaron ningún SNP no sinónimo.

En cuanto al número total de alelos teniendo en cuenta que son 732 SNPs y 22 muestras son 16104 alelos y cuya descomposición por cromosoma se presenta en la tabla 2-11 para codificantes y 2-12 para no sinónimos, con sus respectivos porcentajes de peso dentro de cada cromosoma, encontrando que los alelos de mayor frecuencia son el T con 2491 y el A con 2417 presencias y los alelos de menor frecuencia son las combinaciones heterocigotas G/C con 379 y C/A 439 presencias.

Por su parte los alelos de los SNPs no sinónimos se presentan en la tabla 2-15, resultados que muestran también que los alelos más predominantes son el G con 244 y la combinación heterocigota A/G con 221 y los alelos de menor frecuencia son las combinaciones C/G con 45 y T/G con 57.

**Tabla 2-11.** Composición alélica por cromosoma con su respectiva proporción en SNPs codificantes

Alelo		G/A	T/G	G	C/T	G/C	A	T	C	C/A	A/T
<b>Cromosoma 1</b>	54	29	40	70	74	28	58	60	62	31	0
%	10,7	5,7	7,9	13,8	14,6	5,5	11,5	11,9	12,3	6,1	0
<b>Cromosoma 2</b>	6	0	0	0	5	0	3	3	16	11	0
%	13,6	0	0	0	11,4	0	6,8	6,8	36,4	25	0
<b>Cromosoma 3</b>	95	71	42	147	80	12	173	204	126	17	89
%	9	6,7	4	13,9	7,6	1,1	16,4	19,3	11,9	1,6	8,4
<b>Cromosoma 4</b>	80	28	20	67	75	17	90	158	95	25	49
%	11,4	4	2,8	9,5	10,7	2,4	12,8	22,4	13,5	3,6	7
<b>Cromosoma 5</b>	64	36	33	127	45	13	139	121	96	6	46
%	8,8	5	4,5	17,5	6,2	1,8	19,1	16,7	13,2	0,8	6,3
<b>Cromosoma 6</b>	26	27	10	32	26	0	23	44	28	0	26
%	10,7	11,2	4,1	13,2	10,7	0	9,5	18,2	11,6	0	10,7
<b>Cromosoma 7</b>	92	130	32	158	77	28	122	145	161	13	54
%	9,1	12,8	3,2	15,6	7,6	2,8	12,1	14,3	15,9	1,3	5,3
<b>Cromosoma 8</b>	172	222	60	231	215	31	186	228	168	29	108
%	10,4	13,5	3,6	14	13	1,9	11,3	13,8	10,2	1,8	6,5
<b>Cromosoma 9</b>	35	52	0	53	30	20	70	50	58	7	21
%	8,8	13,1	0	13,4	7,6	5,1	17,7	12,6	14,6	1,8	5,3
<b>Cromosoma 10</b>	45	69	3	93	25	5	49	65	42	0	22
%	10,8	16,5	0,7	22,2	6	1,2	11,7	15,6	10	0	5,3
<b>Cromosoma 11</b>	47	80	14	89	43	17	55	40	77	0	0
%	10,2	17,3	3	19,3	9,3	3,7	11,9	8,7	16,7	0	0
<b>Cromosoma 12</b>	104	111	57	201	109	16	226	250	176	35	35
%	7,9	8,4	4,3	15,2	8,3	1,2	17,1	18,9	13,3	2,7	2,7
<b>Cromosoma 13</b>	42	39	21	46	44	8	67	65	84	7	17
%	9,5	8,9	4,8	10,5	10	1,8	15,2	14,8	19,1	1,6	3,9
<b>Cromosoma 14</b>	485	527	180	723	369	97	930	707	776	188	210
%	9,3	10,2	3,5	13,9	7,1	1,9	17,9	13,6	14,9	3,6	4
<b>Cromosoma 15</b>	29	20	0	9	47	21	23	39	46	10	20
%	11	7,6	0	3,4	17,8	8	8,7	14,8	17,4	3,8	7,6
<b>Cromosoma 16</b>	110	101	28	157	97	57	147	194	168	52	55
%	9,4	8,7	2,4	13,5	8,3	4,9	12,6	16,6	14,4	4,5	4,7
<b>Cromosoma 17</b>	14	20	0	9	21	0	16	25	19	0	8
%	10,6	15,2	0	6,8	15,9	0	12,1	18,9	14,4	0	6,1
<b>Cromosoma 18</b>	29	7	24	24	44	9	40	93	64	6	34
%	7,8	1,9	6,4	6,4	11,8	2,4	10,7	24,9	17,1	1,6	9,1
<b>Frecuencia Total Alelo</b>	1529	1569	564	2236	1426	379	2417	2491	2262	437	794

**Tabla 2-12.** Composición alélica por cromosoma con su respectiva proporción en SNPs no sinónimos

Alelo		T/G	A	T	G	T/A	C	C/G	A/G	C/T	C/A
<b>Cromosoma 1</b>	1	10	0	3	8	0	0	0	0	0	0
%	4,5	45,5	0	13,6	36,4	0	0	0	0	0	0
<b>Cromosoma 3</b>	4	6	9	9	8	0	0	0	8	0	0
%	9,1	13,6	20,5	20,5	18,2	0	0	0	18,2	0	0
<b>Cromosoma 4</b>	6	7	0	15	0	0	12	0	0	4	0
%	13,6	15,9	0	34,1	0	0	27,3	0	0	9,1	0
<b>Cromosoma 5</b>	11	0	11	2	24	10	15	5	5	5	0
%	12,5	0	12,5	2,3	27,3	11,4	17	5,7	5,7	5,7	0
<b>Cromosoma 7</b>	5	0	14	2	17	14	2	14	42	0	0
%	4,5	0	12,7	1,8	15,5	12,7	1,8	12,7	38,2	0	0
<b>Cromosoma 8</b>	25	0	8	41	33	0	13	0	56	44	0
%	11,4	0	3,6	18,6	15	0	5,9	0	25,5	20	0
<b>Cromosoma 9</b>	0	0	9	0	5	0	0	0	8	0	0
%	0	0	40,9	0	22,7	0	0	0	36,4	0	0
<b>Cromosoma 10</b>	2	0	3	0	6	0	0	0	11	0	0
%	9,1	0	13,6	0	27,3	0	0	0	50	0	0
<b>Cromosoma 11</b>	5	0	7	0	7	0	8	8	9	0	0
%	11,4	0	15,9	0	15,9	0	18,2	18,2	20,5	0	0
<b>Cromosoma 12</b>	12	10	8	36	17	0	42	5	0	16	8
%	7,8	6,5	5,2	23,4	11	0	27,3	3,2	0	10,4	5,2
<b>Cromosoma 13</b>	5	10	1	8	2	0	27	0	0	6	7
%	7,6	15,2	1,5	12,1	3	0	40,9	0	0	9,1	10,6
<b>Cromosoma 14</b>	47	9	113	49	87	21	79	6	70	22	47
%	8,5	1,6	20,5	8,9	15,8	3,8	14,4	1,1	12,7	4	8,5
<b>Cromosoma 16</b>	10	5	16	47	30	14	22	7	12	6	7
%	5,7	2,8	9,1	26,7	17	8	12,5	4	6,8	3,4	4
<b>Frecuencia Total Alelo</b>	133	57	199	212	244	59	220	45	221	103	69

Haciendo uso de la tabla de la posición de cada SNP codificante (Anexo E), se logró identificar el número total de genes correspondientes a cada cromosoma, es así como de 732 SNPs encontrados, se identificaron 496, puesto que los 236 SNPs restantes, son cercanos entre si y caen dentro del mismo gen o región cercana al gen, además de los 496 genes encontrados 174 corresponden a genes que se encuentran en regiones cercanas a la posición del SNP, los genes por cada SNP se presenta en el anexo E. Se identificaron genes empleando la herramienta JBrowse de Phytozome para *Manihot esculenta* v 6.1 como se describió en el capítulo 1, en la figura 1-15.

A partir de la identificación de genes, se seleccionaron aquellos genes que presentan funciones relacionadas con DFP en específico aquellas reacciones que implican presencia de oxidación-reducción o especies reactivas de oxígeno que han sido reportadas como moléculas que intervienen en el proceso de DFP (Reilly, 2001). Obteniendo 36 genes con potencialidad a marcadores moleculares para la característica DFP, los cuales se presentan en la tabla 2-13 con su respectiva localización, la descripción corta y algunos nombres que recibe, que están involucrados en procesos de oxidación reducción, actividades de óxido-reductasa, estrés oxidativo, entre otras. Las expresiones génicas de dichos genes, son acordes a reportes en la literatura cuyos resultados están relacionados al DFP y principalmente involucran la formación de metabolitos secundarios que inician su proceso de síntesis a partir de la generación de heridas en las raíces de yuca. Es así como el gen Manes.12G082100 (Prochnik, *et al.*, 2012) puede ser de gran interés como potencial marcador molecular, para identificar procesos que regulan la

producción de metabolitos secundarios como lo es la síntesis de superóxido dismutasa (SOD), que de acuerdo a lo reportado por Xu *et al.*, (2013), la actividad de SOD se incrementa dramáticamente durante las primeras 24 horas de pos cosecha de raíces de yuca y se mantiene hasta las 96 horas. Además de la identificación de genes que contribuyan a la tolerancia al DFP, se debe realizar operaciones de cosecha adecuadas, que en conjunto, permitirían alcanzar periodos más altos de almacenamiento de raíces de yuca que evitarían la expresión de especies reactivas de oxígeno y por ende el DFP. Zidenga *et al.*, (2012) reportó que la inhibición de la actividad citocromo oxidasa genera acumulación de especies reactivas de oxígeno, puesto que se inhibe el transporte de electrones durante la respiración; ahora bien los genes involucrados con la actividad de la citocromo oxidasa como el gen Manes.18G064600, pueden ser de gran interés a la hora de identificar genotipos tolerantes, debido a que, si existe expresión génica para la actividad citocromo oxidasa, no habría producción de especies reactivas de oxígeno. En la tabla 2-14 se presentan los SNPs y los genes correspondientes con la composición de alelos entre genotipos tolerantes y susceptibles.

**Tabla 2-13.** Genes con potencialidad a marcadores moleculares en segregantes de CW429-1

ID Gen	Localización (Phytozome)	Descripción corta	Nombres
Manes.01G066000	Chr01:18960176-18969527	(M=2) PTHR31764:SF0 - PROTEIN HAPLESS 2	Actividad de citocromo-c oxidasa y procesos de oxidación-reducción
Manes.01G076900	Chr01:20313857-20323293 reverse strand	(M=2) 2.3.1.180 - Beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III / KASIII	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase activity
Manes.01G083700	Chr01:20921407-20928127 reverse strand	(M=2) PTHR10909:SF250 - PEROXISOMAL ACYL-COENZYME A OXIDASE 2	Acyl-CoA actividad de oxidasa, peroxisoma, beta oxidación de ácidos grasos, actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción
Manes.03G135400	Chr03:23094330-23096873	(M=1) PTHR12263//PTHR12263:SF3 - VACUOLAR ATP SYNTHASE SUBUNIT H	Actividad de citocromo-c oxidasa
Manes.03G166100	Chr03:25841648-25845486 reverse strand	(M=1) PTHR10209//PTHR10209:SF120 - OXIDOREDUCTASE, 2OG-FE II OXYGENASE FAMILY PROTEIN	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción
Manes.05G119600	Chr05:12516645-12518842	(M=3) 1.1.1.54//1.3.1.102 - 2-alkenal reductase (NADP(+)) / NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción, NADPH-dependent alkenal/una oxidoreductasa
Manes.05G120000	Chr05:12876283-12878076 reverse strand	(M=3) 1.1.1.54//1.3.1.102 - 2-alkenal reductase (NADP(+)) / NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción, NADPH-dependent alkenal/una oxidoreductasa
Manes.05G144200	Chr05:20557130-20559172 reverse strand	(M=1) PTHR11695//PTHR11695:SF556 - ALCOHOL DEHYDROGENASE RELATED	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción
Manes.07G120700	Chr07:24796152-24805235 reverse strand	(M=2) 1.2.1.41 - Glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase / Glutamyl-gamma-semialdehyde dehydrogenase	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción

Continuación tabla 2-13. Genes con potencialidad a marcadores moleculares en segregantes CW429-1

ID Gen	Localización (Phytosome)	Descripción corta	Nombres
Manes.08G054800	Chr08:5595297-5597475 reverse strand	(M=4) PTHR13878:SF53 - CYTOKININ DEHYDROGENASE 6	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción, actúa sobre el grupo de donadores CH-OH.
Manes.10G090600	Chr10:18847490-18849131	(M=2) PTHR11540:SF21 - MALATE DEHYDROGENASE, GLYOXYSOMAL	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción, actúa sobre el grupo de donadores CH-OH, NAD o NADP como aceptor
Manes.11G062800	Chr11:6385423-6395508	(M=1) 1.1.1.85 - 3-isopropylmalate dehydrogenase / IMDH	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción, actúa sobre el grupo de donadores CH-OH, NAD o NADP como aceptor
Manes.12G082100	Chr12:9818089-9819434 reverse strand	(M=2) PTHR34793:SF1 - PROTEIN THYLAKOID FORMATION 1, CHLOROPLASTIC	Fe;Mn dominio superóxido dismutasa (SOD)
Manes.12G094300	Chr12:15358962-15359537 reverse strand	(M=2) PTHR36766:SF1 - HR3	NADP-dependiente de oxidoreductasa
Manes.12G094600	Chr12:15889458-15894281	(M=2) PTHR11709//PTHR11709:SF26 - MULTI-COPPER OXIDASE	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción, Cu-oxidasa, Cu-oxidasa_2, Cu-oxidasa_3
Manes.12G096800	Chr12:18146460-18147873	(M=5) PTHR10209//PTHR10209:SF154 - OXIDOREDUCTASE, 2OG-Fe II OXYGENASE FAMILY PROTEIN	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción
Manes.13G129000	Chr13:25625964-25629994	(M=2) PTHR11709//PTHR11709:SF26 - MULTI-COPPER OXIDASE	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción, Cu-oxidasa, Cu-oxidasa_2, Cu-oxidasa_3
Manes.14G078500	Chr14:6372270-6375555 reverse strand	(M=2) PTHR11540//PTHR11540:SF29 - MALATE AND LACTATE DEHYDROGENASE	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción, actúa sobre el grupo de donadores CH-OH, NAD or NADP com aceptor.
Manes.14G082900	Chr14:6692981-6696474 reverse strand	(M=2) PTHR23023:SF86 - FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE FMO GS-OX-LIKE 8-RELATED	N,N-actividad dimetilnilina monooxigenasa, actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción, FMOXIGENASA
Manes.14G107600	Chr14:8736568-8740357	(M=5) PTHR10165 - LIPID PHOSPHATE PHOSPHATASE	Cloroperoxidasa contienen vanadium; dominio 1
Manes.14G108800	Chr14:8830100-8836265 reverse strand	(M=2) 1.14.11.4 - Procollagen-lysine 5-dioxygenase / Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase	Actividad oxidoreductasa, actúa sobre los donantes pareados, con incorporación o reducción de oxígeno molecular, Proceso de oxidación-reducción
Manes.14G124100	Chr14:11040158-11052127	(M=9) PTHR22981 - 3-HYDROXYISOBUTYRATE DEHYDROGENASE-RELATED	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción, F420_oxidoreduccion
Manes.14G125300	Chr14:11151407-11153079 reverse strand	(M=2) PTHR32448:SF34 - F22M8.11 PROTEIN-RELATED	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción, actúa sobre el grupo de donadores CH-OH



Continuación tabla 2-13. Genes con potencialidad a marcadores moleculares en segregantes CW429-1

ID Gen	Localización (Phytosome)	Descripción corta	Nombres
Manes.14G129000	Chr14:11489685-11493377	(M=2) PTHR24282:SF25 - CYTOCHROME P450 734A1	Actividad oxidoreductasa, actua sobre los donantes pareados, con incorporación o reduccion de oxigeno molecular, Proceso de oxidación-reducción
Manes.14G141400	Chr14:12705523-12706603 reverse strand	(M=2) PTHR10612 - APOLIPOPROTEIN D	Zea-epoxidasa
Manes.14G154000	Chr14:16500990-16507055 reverse strand	(M=1) PTHR19384//PTHR19384:SF74 - FLAVODOXIN-RELATED	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción
Manes.14G159000	Chr14:19011413-19017644 reverse strand	(M=2) PTHR11863:SF2 - PROTEIN ECERIFERUM 3	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción
Manes.14G163400	Chr14:21284520-21284820	(M=8) 1.9.3.1 - Cytochrome-c oxidase / Warburg's respiratory enzyme	Actividad citocromo-c oxidasa, Citocromo C oxidasa subunidad h
Manes.14G163500	Chr14:21313788-21323278 reverse strand	(M=8) 1.9.3.1 - Cytochrome-c oxidase / Warburg's respiratory enzyme	Actividad citocromo-c oxidasa, Citocromo C oxidasa subunidad Vib
Manes.16G048100	Chr16:8031982-8047353	(M=1) PTHR11699:SF49 - SUCCINATE-SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE, MITOCHONDRIAL	Actividad oxidoreductasa, actividad oxidoreductasa, actua en el grupo aldehido o grupo oxo de donadores, NAD o NADP como aceptor.
Manes.16G109800	Chr16:26512691-26517271	(M=2) PTHR10209:SF146 - 2-OXOGLUTARATE (2OG) AND FE(II)-DEPENDENT OXYGENASE SUPERFAMILY PROTEIN-RELATED	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción
Manes.18G021600	Chr18:1696119-1700638 reverse strand	(M=2) PTHR13878:SF60 - CYTOKININ DEHYDROGENASE 5	Actividad oxidoreductasa, actividad oxidoreductasa, actua sobre el grupo de donadores CH-OH, procesos de oxidación-reducción
Manes.18G058200	Chr18:5058453-5065077	(M=3) 1.6.2.4 - NADPH--hemoprotein reductase / TPNH-cytochrome c reductase	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción
Manes.18G064600	Chr18:5571015-5574941 reverse strand	(M=2) KOG3057 - Cytochrome c oxidase, subunit VIb/COX12	Actividad citocromo-c oxidasa, Citocromo C oxidasa subunidad h
Manes.18G064700	Chr18:5593106-5594128 reverse strand	(M=1) PTHR11695:SF492 - ALCOHOL DEHYDROGENASE-LIKE 1-RELATED	Actividad oxidoreductasa, procesos de oxidación-reducción
Manes.18G065100	Chr18:5621249-5623444	(M=9) 1.13.11.19 - Cysteamine dioxygenase / Persulfurase	Actividad oxidoreductasa, actua sobre los donantes pareados, con incorporación o reduccion de oxigeno molecular, Proceso de oxidación-reducción

**Tabla 2-14.** SNPs y genes involucrados en DFP y su **composición** en genotipos tolerantes y susceptibles

Posición SNP	Gen con potencial a marcador	12 Genotipos Tolerantes				10 Genotipos Susceptibles				SNP No sinónimo	Genotipos sin variantes																																																																																																																																																																																																																																																																		
		Homocigotos		Heterocigotos		Homocigotos		Heterocigotos																																																																																																																																																																																																																																																																					
		#	Alelo	#	Alelo	#	Alelo	#	Alelo																																																																																																																																																																																																																																																																				
18968777	Manes.01G066000	2	G	7	G/A	6	G	3	G/A	NO	2																																																																																																																																																																																																																																																																		
		2	A									20318058	Manes.01G076900	5	G	5	G/C	1	G	4	G/C	NO	3	4	C	20924022	Manes.01G083700	1	G	6	G/A	10	A	0	NA	NO	0	5	A	23094723	Manes.03G135400	3	G	3	G/C	8	G	1	G/C	NO	3	4	C	25844007	Manes.03G166100	4	T	2	T/G	5	T	4	T/G	SI	3	4	G	12517523	Manes.05G119600	3	T	3	T/G	7	G	1	T/G	NO	3	5	G	12877446	Manes.05G120000	4	G	4	G/A	7	G	1	G/A	SI	3	3	A	20558982	Manes.05G144200	5	C	3	C/T	7	C	2	C/T	NO	1	4	T	24798474	Manes.07G120700	9	C	3	C/T	3	C	5	C/T	NO	1	1	T	5595893	Manes.08G054800	3	G	5	G/A	6	G	2	G/A	NO	2	4	A	18832757	Manes.10G090600	1	A	5	A/T	8	T	0	NA	NO	3	5	T	6398437	Manes.11G062800	2	C	5	C/T	5	C	4	C/T	NO	2	4	T	9818771	Manes.12G082100	5	G	1	G/A	6	A	3	G/A	NO	3	4	A	15356349	Manes.12G094300	4	C	3	C/T	6	C	2	C/T	NO	3	4	T	15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2	2	C	5	C	18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G
20318058	Manes.01G076900	5	G	5	G/C	1	G	4	G/C	NO	3																																																																																																																																																																																																																																																																		
						4	C					20924022	Manes.01G083700	1	G	6	G/A	10	A	0	NA	NO	0	5	A	23094723	Manes.03G135400	3	G	3	G/C	8	G	1	G/C	NO	3	4	C	25844007	Manes.03G166100	4	T	2	T/G	5	T	4	T/G	SI	3	4	G	12517523	Manes.05G119600	3	T	3	T/G	7	G	1	T/G	NO	3	5	G	12877446	Manes.05G120000	4	G	4	G/A	7	G	1	G/A	SI	3	3	A	20558982	Manes.05G144200	5	C	3	C/T	7	C	2	C/T	NO	1	4	T	24798474	Manes.07G120700	9	C	3	C/T	3	C	5	C/T	NO	1	1	T	5595893	Manes.08G054800	3	G	5	G/A	6	G	2	G/A	NO	2	4	A	18832757	Manes.10G090600	1	A	5	A/T	8	T	0	NA	NO	3	5	T	6398437	Manes.11G062800	2	C	5	C/T	5	C	4	C/T	NO	2	4	T	9818771	Manes.12G082100	5	G	1	G/A	6	A	3	G/A	NO	3	4	A	15356349	Manes.12G094300	4	C	3	C/T	6	C	2	C/T	NO	3	4	T	15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2	2	C	5	C	18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A				
20924022	Manes.01G083700	1	G	6	G/A	10	A	0	NA	NO	0																																																																																																																																																																																																																																																																		
		5	A									23094723	Manes.03G135400	3	G	3	G/C	8	G	1	G/C	NO	3	4	C	25844007	Manes.03G166100	4	T	2	T/G	5	T	4	T/G	SI	3	4	G	12517523	Manes.05G119600	3	T	3	T/G	7	G	1	T/G	NO	3	5	G	12877446	Manes.05G120000	4	G	4	G/A	7	G	1	G/A	SI	3	3	A	20558982	Manes.05G144200	5	C	3	C/T	7	C	2	C/T	NO	1	4	T	24798474	Manes.07G120700	9	C	3	C/T	3	C	5	C/T	NO	1	1	T	5595893	Manes.08G054800	3	G	5	G/A	6	G	2	G/A	NO	2	4	A	18832757	Manes.10G090600	1	A	5	A/T	8	T	0	NA	NO	3	5	T	6398437	Manes.11G062800	2	C	5	C/T	5	C	4	C/T	NO	2	4	T	9818771	Manes.12G082100	5	G	1	G/A	6	A	3	G/A	NO	3	4	A	15356349	Manes.12G094300	4	C	3	C/T	6	C	2	C/T	NO	3	4	T	15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2	2	C	5	C	18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																		
23094723	Manes.03G135400	3	G	3	G/C	8	G	1	G/C	NO	3																																																																																																																																																																																																																																																																		
		4	C									25844007	Manes.03G166100	4	T	2	T/G	5	T	4	T/G	SI	3	4	G	12517523	Manes.05G119600	3	T	3	T/G	7	G	1	T/G	NO	3	5	G	12877446	Manes.05G120000	4	G	4	G/A	7	G	1	G/A	SI	3	3	A	20558982	Manes.05G144200	5	C	3	C/T	7	C	2	C/T	NO	1	4	T	24798474	Manes.07G120700	9	C	3	C/T	3	C	5	C/T	NO	1	1	T	5595893	Manes.08G054800	3	G	5	G/A	6	G	2	G/A	NO	2	4	A	18832757	Manes.10G090600	1	A	5	A/T	8	T	0	NA	NO	3	5	T	6398437	Manes.11G062800	2	C	5	C/T	5	C	4	C/T	NO	2	4	T	9818771	Manes.12G082100	5	G	1	G/A	6	A	3	G/A	NO	3	4	A	15356349	Manes.12G094300	4	C	3	C/T	6	C	2	C/T	NO	3	4	T	15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2	2	C	5	C	18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																
25844007	Manes.03G166100	4	T	2	T/G	5	T	4	T/G	SI	3																																																																																																																																																																																																																																																																		
		4	G									12517523	Manes.05G119600	3	T	3	T/G	7	G	1	T/G	NO	3	5	G	12877446	Manes.05G120000	4	G	4	G/A	7	G	1	G/A	SI	3	3	A	20558982	Manes.05G144200	5	C	3	C/T	7	C	2	C/T	NO	1	4	T	24798474	Manes.07G120700	9	C	3	C/T	3	C	5	C/T	NO	1	1	T	5595893	Manes.08G054800	3	G	5	G/A	6	G	2	G/A	NO	2	4	A	18832757	Manes.10G090600	1	A	5	A/T	8	T	0	NA	NO	3	5	T	6398437	Manes.11G062800	2	C	5	C/T	5	C	4	C/T	NO	2	4	T	9818771	Manes.12G082100	5	G	1	G/A	6	A	3	G/A	NO	3	4	A	15356349	Manes.12G094300	4	C	3	C/T	6	C	2	C/T	NO	3	4	T	15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2	2	C	5	C	18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																														
12517523	Manes.05G119600	3	T	3	T/G	7	G	1	T/G	NO	3																																																																																																																																																																																																																																																																		
		5	G									12877446	Manes.05G120000	4	G	4	G/A	7	G	1	G/A	SI	3	3	A	20558982	Manes.05G144200	5	C	3	C/T	7	C	2	C/T	NO	1	4	T	24798474	Manes.07G120700	9	C	3	C/T	3	C	5	C/T	NO	1	1	T	5595893	Manes.08G054800	3	G	5	G/A	6	G	2	G/A	NO	2	4	A	18832757	Manes.10G090600	1	A	5	A/T	8	T	0	NA	NO	3	5	T	6398437	Manes.11G062800	2	C	5	C/T	5	C	4	C/T	NO	2	4	T	9818771	Manes.12G082100	5	G	1	G/A	6	A	3	G/A	NO	3	4	A	15356349	Manes.12G094300	4	C	3	C/T	6	C	2	C/T	NO	3	4	T	15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2	2	C	5	C	18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																																												
12877446	Manes.05G120000	4	G	4	G/A	7	G	1	G/A	SI	3																																																																																																																																																																																																																																																																		
		3	A									20558982	Manes.05G144200	5	C	3	C/T	7	C	2	C/T	NO	1	4	T	24798474	Manes.07G120700	9	C	3	C/T	3	C	5	C/T	NO	1	1	T	5595893	Manes.08G054800	3	G	5	G/A	6	G	2	G/A	NO	2	4	A	18832757	Manes.10G090600	1	A	5	A/T	8	T	0	NA	NO	3	5	T	6398437	Manes.11G062800	2	C	5	C/T	5	C	4	C/T	NO	2	4	T	9818771	Manes.12G082100	5	G	1	G/A	6	A	3	G/A	NO	3	4	A	15356349	Manes.12G094300	4	C	3	C/T	6	C	2	C/T	NO	3	4	T	15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2	2	C	5	C	18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																																																										
20558982	Manes.05G144200	5	C	3	C/T	7	C	2	C/T	NO	1																																																																																																																																																																																																																																																																		
		4	T									24798474	Manes.07G120700	9	C	3	C/T	3	C	5	C/T	NO	1	1	T	5595893	Manes.08G054800	3	G	5	G/A	6	G	2	G/A	NO	2	4	A	18832757	Manes.10G090600	1	A	5	A/T	8	T	0	NA	NO	3	5	T	6398437	Manes.11G062800	2	C	5	C/T	5	C	4	C/T	NO	2	4	T	9818771	Manes.12G082100	5	G	1	G/A	6	A	3	G/A	NO	3	4	A	15356349	Manes.12G094300	4	C	3	C/T	6	C	2	C/T	NO	3	4	T	15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2	2	C	5	C	18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																																																																								
24798474	Manes.07G120700	9	C	3	C/T	3	C	5	C/T	NO	1																																																																																																																																																																																																																																																																		
						1	T					5595893	Manes.08G054800	3	G	5	G/A	6	G	2	G/A	NO	2	4	A	18832757	Manes.10G090600	1	A	5	A/T	8	T	0	NA	NO	3	5	T	6398437	Manes.11G062800	2	C	5	C/T	5	C	4	C/T	NO	2	4	T	9818771	Manes.12G082100	5	G	1	G/A	6	A	3	G/A	NO	3	4	A	15356349	Manes.12G094300	4	C	3	C/T	6	C	2	C/T	NO	3	4	T	15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2	2	C	5	C	18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																																																																																						
5595893	Manes.08G054800	3	G	5	G/A	6	G	2	G/A	NO	2																																																																																																																																																																																																																																																																		
		4	A									18832757	Manes.10G090600	1	A	5	A/T	8	T	0	NA	NO	3	5	T	6398437	Manes.11G062800	2	C	5	C/T	5	C	4	C/T	NO	2	4	T	9818771	Manes.12G082100	5	G	1	G/A	6	A	3	G/A	NO	3	4	A	15356349	Manes.12G094300	4	C	3	C/T	6	C	2	C/T	NO	3	4	T	15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2	2	C	5	C	18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																																																																																																				
18832757	Manes.10G090600	1	A	5	A/T	8	T	0	NA	NO	3																																																																																																																																																																																																																																																																		
		5	T									6398437	Manes.11G062800	2	C	5	C/T	5	C	4	C/T	NO	2	4	T	9818771	Manes.12G082100	5	G	1	G/A	6	A	3	G/A	NO	3	4	A	15356349	Manes.12G094300	4	C	3	C/T	6	C	2	C/T	NO	3	4	T	15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2	2	C	5	C	18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																																																																																																																		
6398437	Manes.11G062800	2	C	5	C/T	5	C	4	C/T	NO	2																																																																																																																																																																																																																																																																		
		4	T									9818771	Manes.12G082100	5	G	1	G/A	6	A	3	G/A	NO	3	4	A	15356349	Manes.12G094300	4	C	3	C/T	6	C	2	C/T	NO	3	4	T	15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2	2	C	5	C	18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																																																																																																																																
9818771	Manes.12G082100	5	G	1	G/A	6	A	3	G/A	NO	3																																																																																																																																																																																																																																																																		
		4	A									15356349	Manes.12G094300	4	C	3	C/T	6	C	2	C/T	NO	3	4	T	15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2	2	C	5	C	18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																																																																																																																																														
15356349	Manes.12G094300	4	C	3	C/T	6	C	2	C/T	NO	3																																																																																																																																																																																																																																																																		
		4	T									15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2	2	C	5	C	18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																																																																																																																																																												
15889997	Manes.12G094600	5	G	4	G/C	2	G	2	G/C	NO	2																																																																																																																																																																																																																																																																		
		2	C			5	C					18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1	4	A	25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																																																																																																																																																																												
18100224	Manes.12G096800	4	G	4	G/A	6	G	3	G/A	NO	1																																																																																																																																																																																																																																																																		
		4	A									25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3	4	T	6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																																																																																																																																																																																										
25626618	Manes.13G129000	1	C	5	C/T	9	T	0	NA	NO	3																																																																																																																																																																																																																																																																		
		4	T									6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3	1	A	6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																																																																																																																																																																																																								
6374169	Manes.14G078500	9	C	2	C/A	2	C	5	C/A	NO	3																																																																																																																																																																																																																																																																		
						1	A					6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0	1	G	8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																																																																																																																																																																																																																						
6695383	Manes.14G082900	9	T	3	T/G	2	T	7	T/G	NO	0																																																																																																																																																																																																																																																																		
						1	G					8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0	1	A																																																																																																																																																																																																																																																				
8729982	Manes.14G107600	11	G	1	G/A	2	G	7	G/A	NO	0																																																																																																																																																																																																																																																																		
						1	A																																																																																																																																																																																																																																																																						

Continuación tabla 2-14. SNPs y genes involucrados en DFP y su composición en genotipos tolerantes y susceptibles.

Posición SNP	Gen con potencial a marcador	12 Genotipos Tolerantes				10 Genotipos Susceptibles				SNP No sinónimo	Genotipos sin variantes																																																																																																																																																																																																												
		Homocigotos		Heterocigotos		Homocigotos		Heterocigotos																																																																																																																																																																																																															
		#	Alelo	#	Alelo	#	Alelo	#	Alelo																																																																																																																																																																																																														
8829770	Manes.14G108800	2	T	7	T/G	6	T	1	T/G	NO	3																																																																																																																																																																																																												
		2	G			1	G					11040585	Manes.14G124100	1	C	1	C/A	5	C	3	C/A	NO	2	9	A	1	A	11152054	Manes.14G125300	11	G	1	G/A	2	G	6	G/A	NO	1	1	A	11485770	Manes.14G129000	10	G	1	G/A	2	G	6	G/A	NO	3	12705711	Manes.14G141400	4	C	7	C/A	1	C	6	C/A	NO	1	3	A	16503115	Manes.14G154000	6	G	6	T/G	3	T	2	T/G	NO	3	2	G	19029046	Manes.14G159000	4	C	5	C/A	9	A	0	NA	NO	3	1	A	21286195	Manes.14G163400	9	G	1	T/G	2	G	7	T/G	NO	3	21313982	Manes.14G163500	4	T	5	T/G	7	G	1	T/G	NO	3	2	G	8079168	Manes.16G048100	4	G	4	G/C	7	G	1	G/C	NO	2	4	C	26513433	Manes.16G109800	1	C	4	C/A	4	C	5	C/A	NO	2	5	A	1	A	1696255	Manes.18G021600	9	T	3	T/G	4	T	2	T/G	NO	1	3	G	5063481	Manes.18G058200	4	C	7	C/T	9	C	1	C/T	NO	0	1	T	5571629	Manes.18G064600	1	C	5	C/A	9	A	1	C/A	NO	3	3	A	5593698	Manes.18G064700	6	A	4	A/T	2	A	4	A/T	NO	2	1	T	3	T	5621423	Manes.18G065100	1	T	8	T/G
11040585	Manes.14G124100	1	C	1	C/A	5	C	3	C/A	NO	2																																																																																																																																																																																																												
		9	A			1	A					11152054	Manes.14G125300	11	G	1	G/A	2	G	6	G/A	NO	1	1	A	11485770	Manes.14G129000	10	G	1	G/A	2	G	6	G/A	NO	3	12705711	Manes.14G141400	4	C	7	C/A	1	C	6	C/A	NO	1	3	A	16503115	Manes.14G154000	6	G	6	T/G	3	T	2	T/G	NO	3	2	G	19029046	Manes.14G159000	4	C	5	C/A	9	A	0	NA	NO	3	1	A	21286195	Manes.14G163400	9	G	1	T/G	2	G	7	T/G	NO	3	21313982	Manes.14G163500	4	T	5	T/G	7	G	1	T/G	NO	3	2	G	8079168	Manes.16G048100	4	G	4	G/C	7	G	1	G/C	NO	2	4	C	26513433	Manes.16G109800	1	C	4	C/A	4	C	5	C/A	NO	2	5	A	1	A	1696255	Manes.18G021600	9	T	3	T/G	4	T	2	T/G	NO	1	3	G	5063481	Manes.18G058200	4	C	7	C/T	9	C	1	C/T	NO	0	1	T	5571629	Manes.18G064600	1	C	5	C/A	9	A	1	C/A	NO	3	3	A	5593698	Manes.18G064700	6	A	4	A/T	2	A	4	A/T	NO	2	1	T	3	T	5621423	Manes.18G065100	1	T	8	T/G	7	G	3	T/G	NO	0	3	G								
11152054	Manes.14G125300	11	G	1	G/A	2	G	6	G/A	NO	1																																																																																																																																																																																																												
						1	A					11485770	Manes.14G129000	10	G	1	G/A	2	G	6	G/A	NO	3	12705711	Manes.14G141400	4	C	7	C/A	1	C	6	C/A	NO	1	3	A	16503115	Manes.14G154000	6	G	6	T/G	3	T	2	T/G	NO	3	2	G	19029046	Manes.14G159000	4	C	5	C/A	9	A	0	NA	NO	3	1	A	21286195	Manes.14G163400	9	G	1	T/G	2	G	7	T/G	NO	3	21313982	Manes.14G163500	4	T	5	T/G	7	G	1	T/G	NO	3	2	G	8079168	Manes.16G048100	4	G	4	G/C	7	G	1	G/C	NO	2	4	C	26513433	Manes.16G109800	1	C	4	C/A	4	C	5	C/A	NO	2	5	A	1	A	1696255	Manes.18G021600	9	T	3	T/G	4	T	2	T/G	NO	1	3	G	5063481	Manes.18G058200	4	C	7	C/T	9	C	1	C/T	NO	0	1	T	5571629	Manes.18G064600	1	C	5	C/A	9	A	1	C/A	NO	3	3	A	5593698	Manes.18G064700	6	A	4	A/T	2	A	4	A/T	NO	2	1	T	3	T	5621423	Manes.18G065100	1	T	8	T/G	7	G	3	T/G	NO	0	3	G																						
11485770	Manes.14G129000	10	G	1	G/A	2	G	6	G/A	NO	3																																																																																																																																																																																																												
12705711	Manes.14G141400	4	C	7	C/A	1	C	6	C/A	NO	1																																																																																																																																																																																																												
						3	A					16503115	Manes.14G154000	6	G	6	T/G	3	T	2	T/G	NO	3	2	G	19029046	Manes.14G159000	4	C	5	C/A	9	A	0	NA	NO	3	1	A	21286195	Manes.14G163400	9	G	1	T/G	2	G	7	T/G	NO	3	21313982	Manes.14G163500	4	T	5	T/G	7	G	1	T/G	NO	3	2	G	8079168	Manes.16G048100	4	G	4	G/C	7	G	1	G/C	NO	2	4	C	26513433	Manes.16G109800	1	C	4	C/A	4	C	5	C/A	NO	2	5	A	1	A	1696255	Manes.18G021600	9	T	3	T/G	4	T	2	T/G	NO	1	3	G	5063481	Manes.18G058200	4	C	7	C/T	9	C	1	C/T	NO	0	1	T	5571629	Manes.18G064600	1	C	5	C/A	9	A	1	C/A	NO	3	3	A	5593698	Manes.18G064700	6	A	4	A/T	2	A	4	A/T	NO	2	1	T	3	T	5621423	Manes.18G065100	1	T	8	T/G	7	G	3	T/G	NO	0	3	G																																																
16503115	Manes.14G154000	6	G	6	T/G	3	T	2	T/G	NO	3																																																																																																																																																																																																												
						2	G					19029046	Manes.14G159000	4	C	5	C/A	9	A	0	NA	NO	3	1	A	21286195	Manes.14G163400	9	G	1	T/G	2	G	7	T/G	NO	3	21313982	Manes.14G163500	4	T	5	T/G	7	G	1	T/G	NO	3	2	G	8079168	Manes.16G048100	4	G	4	G/C	7	G	1	G/C	NO	2	4	C	26513433	Manes.16G109800	1	C	4	C/A	4	C	5	C/A	NO	2	5	A	1	A	1696255	Manes.18G021600	9	T	3	T/G	4	T	2	T/G	NO	1	3	G	5063481	Manes.18G058200	4	C	7	C/T	9	C	1	C/T	NO	0	1	T	5571629	Manes.18G064600	1	C	5	C/A	9	A	1	C/A	NO	3	3	A	5593698	Manes.18G064700	6	A	4	A/T	2	A	4	A/T	NO	2	1	T	3	T	5621423	Manes.18G065100	1	T	8	T/G	7	G	3	T/G	NO	0	3	G																																																														
19029046	Manes.14G159000	4	C	5	C/A	9	A	0	NA	NO	3																																																																																																																																																																																																												
		1	A									21286195	Manes.14G163400	9	G	1	T/G	2	G	7	T/G	NO	3	21313982	Manes.14G163500	4	T	5	T/G	7	G	1	T/G	NO	3	2	G	8079168	Manes.16G048100	4	G	4	G/C	7	G	1	G/C	NO	2	4	C	26513433	Manes.16G109800	1	C	4	C/A	4	C	5	C/A	NO	2	5	A	1	A	1696255	Manes.18G021600	9	T	3	T/G	4	T	2	T/G	NO	1	3	G	5063481	Manes.18G058200	4	C	7	C/T	9	C	1	C/T	NO	0	1	T	5571629	Manes.18G064600	1	C	5	C/A	9	A	1	C/A	NO	3	3	A	5593698	Manes.18G064700	6	A	4	A/T	2	A	4	A/T	NO	2	1	T	3	T	5621423	Manes.18G065100	1	T	8	T/G	7	G	3	T/G	NO	0	3	G																																																																												
21286195	Manes.14G163400	9	G	1	T/G	2	G	7	T/G	NO	3																																																																																																																																																																																																												
21313982	Manes.14G163500	4	T	5	T/G	7	G	1	T/G	NO	3																																																																																																																																																																																																												
		2	G									8079168	Manes.16G048100	4	G	4	G/C	7	G	1	G/C	NO	2	4	C	26513433	Manes.16G109800	1	C	4	C/A	4	C	5	C/A	NO	2	5	A	1	A	1696255	Manes.18G021600	9	T	3	T/G	4	T	2	T/G	NO	1	3	G	5063481	Manes.18G058200	4	C	7	C/T	9	C	1	C/T	NO	0	1	T	5571629	Manes.18G064600	1	C	5	C/A	9	A	1	C/A	NO	3	3	A	5593698	Manes.18G064700	6	A	4	A/T	2	A	4	A/T	NO	2	1	T	3	T	5621423	Manes.18G065100	1	T	8	T/G	7	G	3	T/G	NO	0	3	G																																																																																																						
8079168	Manes.16G048100	4	G	4	G/C	7	G	1	G/C	NO	2																																																																																																																																																																																																												
		4	C									26513433	Manes.16G109800	1	C	4	C/A	4	C	5	C/A	NO	2	5	A	1	A	1696255	Manes.18G021600	9	T	3	T/G	4	T	2	T/G	NO	1	3	G	5063481	Manes.18G058200	4	C	7	C/T	9	C	1	C/T	NO	0	1	T	5571629	Manes.18G064600	1	C	5	C/A	9	A	1	C/A	NO	3	3	A	5593698	Manes.18G064700	6	A	4	A/T	2	A	4	A/T	NO	2	1	T	3	T	5621423	Manes.18G065100	1	T	8	T/G	7	G	3	T/G	NO	0	3	G																																																																																																																				
26513433	Manes.16G109800	1	C	4	C/A	4	C	5	C/A	NO	2																																																																																																																																																																																																												
		5	A			1	A					1696255	Manes.18G021600	9	T	3	T/G	4	T	2	T/G	NO	1	3	G	5063481	Manes.18G058200	4	C	7	C/T	9	C	1	C/T	NO	0	1	T	5571629	Manes.18G064600	1	C	5	C/A	9	A	1	C/A	NO	3	3	A	5593698	Manes.18G064700	6	A	4	A/T	2	A	4	A/T	NO	2	1	T	3	T	5621423	Manes.18G065100	1	T	8	T/G	7	G	3	T/G	NO	0	3	G																																																																																																																																				
1696255	Manes.18G021600	9	T	3	T/G	4	T	2	T/G	NO	1																																																																																																																																																																																																												
						3	G					5063481	Manes.18G058200	4	C	7	C/T	9	C	1	C/T	NO	0	1	T	5571629	Manes.18G064600	1	C	5	C/A	9	A	1	C/A	NO	3	3	A	5593698	Manes.18G064700	6	A	4	A/T	2	A	4	A/T	NO	2	1	T	3	T	5621423	Manes.18G065100	1	T	8	T/G	7	G	3	T/G	NO	0	3	G																																																																																																																																																		
5063481	Manes.18G058200	4	C	7	C/T	9	C	1	C/T	NO	0																																																																																																																																																																																																												
		1	T									5571629	Manes.18G064600	1	C	5	C/A	9	A	1	C/A	NO	3	3	A	5593698	Manes.18G064700	6	A	4	A/T	2	A	4	A/T	NO	2	1	T	3	T	5621423	Manes.18G065100	1	T	8	T/G	7	G	3	T/G	NO	0	3	G																																																																																																																																																																
5571629	Manes.18G064600	1	C	5	C/A	9	A	1	C/A	NO	3																																																																																																																																																																																																												
		3	A									5593698	Manes.18G064700	6	A	4	A/T	2	A	4	A/T	NO	2	1	T	3	T	5621423	Manes.18G065100	1	T	8	T/G	7	G	3	T/G	NO	0	3	G																																																																																																																																																																														
5593698	Manes.18G064700	6	A	4	A/T	2	A	4	A/T	NO	2																																																																																																																																																																																																												
		1	T			3	T					5621423	Manes.18G065100	1	T	8	T/G	7	G	3	T/G	NO	0	3	G																																																																																																																																																																																														
5621423	Manes.18G065100	1	T	8	T/G	7	G	3	T/G	NO	0																																																																																																																																																																																																												
		3	G																																																																																																																																																																																																																				

Se encontraron 2 genes cuyos SNPs son no sinónimos, de esta forma estos SNPs son de gran interés puesto que como generan un cambio en la secuencia de aminoácidos, podría generar un cambio en la expresión génica, lo que contribuiría proporcionando información sobre cómo es la expresión génica con respecto al desarrollo del DFP.

## 2.4. Conclusiones

- Se seleccionaron 12 genotipos tolerantes a DFP (Tabla 2-9) a partir de familias segregantes del híbrido CW429-1 derivado de *walkerae*.
- Se identificaron 732 SNPs codificantes, que permitieron conocer la composición genética de los genotipos estudiados y a su vez identificar 36 genes con potencialidad a ser marcadores moleculares involucrados en el desarrollo del DFP.
- Se evidenció que valores altos del contenido de materia seca (MS) y escopoletina (ES), contribuyen al DFP.
- Características morfológicas no permitieron discriminar entre los genotipos estudiados.

## 2.5. Bibliografía

ALLARD, R. (1978). Principios de la mejora genética de las plantas. Barcelona. 498 pp.

BAIR, N. A., ETTER, P. D., ATWOOD, T. S., CURREY M. C., SHIVER, A. L., LEWIS, Z. A., SELKER, E. U., CRESKO, W. A., JOHNSON, E. A. (2008). Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. PLoS ONE 3 (10): e3376. doi:10.1371/journal.pone.0003376

BALZARINI M.G., DI RIENZO J.A. (2014). InfoGen versión 2014. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>

CEBALLOS, H., IGLESIAS, C. A., PEREZ, J. C., DIXON, A. G. O. (2004). Cassava breeding: opportunities and challenges. Plant Molecular Biology 56, 503-516.

CEBALLOS, H., HERSHEY, C., BECERRA-LÓPEZ-LAVALLE, L. A. (2012) New approaches to cassava breeding. Plant Breed Rev 36:427–504.

CEBALLOS. H., SAWUKI, R. S., GRACEN, V. E., YENCHO, G. C., HERSHEY, C. H. (2015). Conventional breeding, marker-assisted selection, genomic selection and inbreeding in clonally propagated crops: a case study for cassava. DOI 10.1007/s00122-015-2555-4. Theor Appl Genet, 128: 1647-1667.

CIAT. (2002). Annual report from IP3 project: improved cassava for the developing world. Cali, Colombia: CIAT, Apdo. Aéreo 6713.

CUAMBE, C. E. (2007). EVALUACIÓN DEL DETERIORO FISIOLÓGICO POSCOSECHA Y MAPEO PRELIMINAR DE QTLs EN EL PRIMER RETROCRUZAMIENTO DERIVADO DEL HÍBRIDO INTER-ESPECÍFICO (CW429-1) ENTRE *Manihot esculenta* Crantz Y LA ESPECIE SILVESTRE *Manihot walkerae* Croizat. Tesis de Maestría. Escuela de Posgrados Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 86 pp.

CRUZ, D. F., DE LA HOZ, J. F., PEREA, C. S., QUINTERO, J. C., DUITAMA, J. (2014). NGSEP (Next Generation Sequencing Eclipse Plugin). Software download (Available online at <http://sourceforge.net/p/ngsep/wiki/Home/>).

DAVEY, J. W., CEZARD, T., FUENTES-UTRILLA, P., ELAND, C., GHARBI, K., BLAXTER, M. L. (2013). Special features of RAD Sequencing data: implications for genotyping. *Molecular Ecology*, 22, 3151-3164.

DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, 13-15.

ESSERS, S. A. J. A., BOSVELD, M., GRIFT, VAN DER R. M., VORAGEN, A. G. J. (1993). Studies on the quantification of specific cyanogens in cassava products and introduction of a new chromogen. *J. Sci. Food Agric.* 63, 287-296.

FREGENE, M., MBA, R. E. C. (2004). Marker-Assisted Selection (MAS) In: Hershey C. (ed) *Cassava Breeding*. FAO, Rome Italy (in Press).

HELL, R., WIRTZ, M. (2008). Metabolism of cysteine in plants and phototrophic bacteria. In R Hell, C Dahl, T Leustek, eds, *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 61–94

JENNINGS, D.L., HERSHEY C. (1985). Cassava breeding: a decade of progress from international programmes. In: Russel GE (ed) *Progress in plant breeding*. Butterworths Press, London, pp 89–116.

JENNINGS, D. L., IGLESIAS, C. A. (2002) Breeding for crop improvement. In: Hillocks RJ, Thresh JM, Bellotti AC (eds) *Cassava: biology, production and utilization*. CABI Publishing, Wallingford, pp149–166.

MILNE, I., SHAW, P., STEPHEN, G., BAYER, M., CARDLE, L., THOMAS, W. T. B., FLAVELL, A. J. MARSHALL, D. (2010). Flapjack-graphical genotype visualization. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE*, vol 26 no. 24, 3133-3134.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS AOAC. 1995. Method 925.09 Solid (Total) and moisture in flour. Vacuum oven method (p.32).

OWITI, J., GROSSMANN, J., GEHRIG, P., DESSIMOZ, C., LALOI, C., HANSEN, M. B., GRUISSEM, W., VANDERSCHUREN, H. (2011). iTRAQ-based analysis of changes in the cassava root proteome reveals pathways associated with post-harvest physiological deterioration. *The Plant Journal*. 67, 145–156.

PROCHNIK, S., MARRI, P. R., DESANY, B., RABINOWICZ, P. D., KODIRA, C., MOHIUDIN, M., RODRIGUEZ, F., FAUQUET, C., TOHME, J., HARKINS, T., ROKHSAR, D. S., ROUNSLEY, S. (2012). The Cassava Genome: Current Progress, Future Directions. *Tropical Plant Biol.* 5: 88-94.

REILLY, K., GÓMEZ, V. R., BUSCHMANN, H., TOHME, J., BEECHING, J. R. (2003). Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Molecular Biology* 53, 669-685.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.

- ROGERS, D. J., APPAN, S. G. (1973). *Manihot Manihotoides* (Euphorbiaceae). Reviewed Works. *Flora Neotropica* Vol.13, 272 pp. Disponible en <http://www.jstor.org/stable/4393691>.
- ROSENTHAL, D. M., ORT, D. R. (2012). Examining cassava's potential to enhance food security under climate change. *Trop. Plant Biol.* 5:30–38.
- ROSERO, A. E. A. (2008). AVANCES EN LA INTROGRESION ASISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA AL DETERIORO FISIOLÓGICO POST-COSECHA DESDE *Manihot walkerae* Croizat EN POBLACIONES DE YUCA *M. esculenta* Crantz. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias-Fitomejoramiento. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 99 pp.
- SÁNCHEZ, T., DUFOUR, D., MORENO, J.L., PIZARRO, M., ARAGÓN, I.J., DOMÍNGUEZ, M., CEBALLOS, H. (2013). Changes in extended shelf life of cassava roots during storage in ambient conditions. *Postharvest Biology and Technology* 86, 520-528.
- SANCHEZ, T., CHAVEZ, A. L., CEBALLOS, H., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., NESTEL, P., ISHITAMI, M. (2006). Reduction or delay of post-harvest physiological deterioration in cassava roots with higher carotenoid content. *Journal of the Science of Food and Agriculture* Vol. 86, 634-639.
- UARROTA, V. G., DA COSTA, N. E., MARTINS, P. L. A., DE OLIVEIRA, N. E., COELHO, B., MORESCO, R., GARCIA, D. M., SÁNCHEZ, T., LUNA, M. J. L., DUFOUR, D., CEBALLOS, H., BECERRA LOPEZ-LAVALLE, L. A., HERSHEY, C., ROCHA, M., MARASCHIN, M. (2015). Toward better understanding of postharvest deterioration: biochemical changes in stored cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots: *Food Science & Nutrition*. doi: 10.1002/fsn3.303. 1-14.
- VAN ORISCHOT, Q. E. A., O'BRIEN, G. M., DUFOUR, D., EL-SHARKAWY, M. A., MESA, E. (2000). The effect of pre-harvest pruning of cassava upon root deterioration and quality characteristics. *J. Sci Food Agric* 80: 1866-1873.
- VLAAR, P. W. L., VAN BEEK, P., VISSER, R. G. F. (2007). Genetic modification and its impact on industry structure and performance: post-harvest deterioration of cassava in Thailand. *Journal on Chain and Network Science* 7, 133–142.
- WHEATLEY, C., LOZANO, C., GOMEZ, G. (1985a). Post-harvest deterioration of cassava roots, En: COCK, J. H., REYES, J. A. (Eds.), *Cassava: Research, Production and Utilization*. pp. 655-671. UNDP-CIAT, Cali.
- XU, J., DUAN, X., YANG, J., BEECHING, J. R., ZHANG, P. (2013). Enhanced Reactive Oxygen Species Scavenging by Overproduction of Superoxide Dismutase and Catalase Delays Postharvest Physiological Deterioration of Cassava Storage Roots. *Plant Physiology*, Vol.161, 1517-1528.
- YIP, W. K., YANG, S. (1998). Ethylene biosynthesis in relation to cyanide metabolism. *Bot Bull Acad Sinica* 39: 1–7.
- ZIDENGA, T., LEYVA-GUERRERO, E., MOON, H., SIRITUNGA, D., SAYRE, R. (2012). Extending Cassava Root Shelf Life via Reduction of Reactive Oxygen Species Production. *Plant Physiology*, Vol. 159, 1396-1407.

## 3. Conclusiones y recomendaciones

### 3.1 Conclusiones

- El estudio realizado encontró tolerancia genética al Deterioro Fisiológico Pos cosecha (DFP) en Yuca (*Manihot esculenta* Crantz), en 25 genotipos (13 genotipos de familias segregantes en carotenoides y 12 genotipos segregantes de la especie silvestre *Manihot Walkerae*).
- El estudio permitió evidenciar la importancia de evaluar DFP a través de localidades y años distintos de cosecha, estableció mínimo 3 cosechas en diferentes ambientes para evaluar el comportamiento real de los individuos en estudio. Estudios realizados sobre DFP no son válidos con una sola evaluación en un mismo ambiente.
- El contenido de beta-caroteno y carotenos totales, en yuca, no revela contribución suficiente para minimizar el DFP de manera directa y no actúa como antioxidante que impida el desarrollo del proceso, además el contenido de carotenoides es estable frente al efecto ambiental. Este hallazgo cuestiona de manera radical las hipótesis reportadas con respecto al efecto antioxidante, generado por carotenoides en la reducción del DFP de raíces de yuca, y obliga a hacer otras búsquedas sobre el terreno, en la interface fisiología y agronomía.
- Se demostró que existe una alta variabilidad en la producción de compuestos tales como: Cianuro y Cumarina escopoletina, esta última es sintetizada durante el proceso de almacenamiento pos cosecha de raíces de yuca, por lo que se estableció una correlación positiva y significativa con el DFP ( $0.55 p < 0.0001$ ).
- El desarrollo en el tratamiento de datos y la generación de un modelo estadístico a partir de los datos primarios, permitió obtener un nuevo estimador de deterioro fisiológico pos cosecha (DFP), para cada genotipo, a partir de 4 evaluaciones para el carácter, el cual reúne el total de la variación obtenida entre las evaluaciones. Modelo que fue validado mediante genotipos elites con comportamientos conocidos de DFP.
- Identificación mediante genética de asociación (SNPs) 51 genes con potencialidad a ser marcadores moleculares y sus respectivos genotipos depositarios, que permitirán acelerar los procesos de selección en programas de Fitomejoramiento. Los resultados permiten el desarrollo de herramientas moleculares, para la selección de clones tolerantes o susceptibles al DFP en edades tempranas.

- El método de selección de genotipos contrastantes extremos, en términos de DFP dentro de las familias evaluadas fue adecuado para lograr la caracterización genética por secuenciación.
- El trabajo permite el ajuste de metodologías vigentes para la evaluación analítica de DFP.
- El trabajo presenta los primeros resultados obtenidos para esta metodología de evaluación de DFP, y plantea nuevos ensayos para determinar materiales de Yuca utilizados en los sectores agroindustriales de comercialización, para consumo en fresco, aptitud a la cocción y preferencia de los consumidores.
- El estudio ha permitido compartir las experiencias adquiridas con otros centros de investigación como IITA, NARO, IIRR, y a su vez capacitar investigadores en el tema, proceso iniciado durante la etapa final del presente trabajo de tesis, mediante el proyecto “South-South Collaboration for Strengthening Capacities in Assessing the Postharvest Physiological Deterioration (PPD) of Fresh Cassava Roots and Technologies for Shelf-life Extension: Lessons Learnt by the Ugandan Research Team”. Extending the shelf-life of fresh cassava roots for increased incomes and postharvest loss reduction.



### 3.2. Recomendaciones

- Se recomienda continuar con estudios que tiendan a la confirmación sobre las rutas metabólicas y proteómicas que están inmersas en el desarrollo del DFP y que tipo de influencia tienen los genes identificados en este estudio.
  
- Se hace necesario continuar con programas de mejoramiento genético cuyos objetivos se encaminen en la búsqueda de genotipos tolerantes al DFP, aprovechando las familias estudiadas, ya que poseen dos alternativas de fuentes de tolerancia, que posiblemente al ser usadas de forma conjunta se incrementen las posibilidades de obtención de buenos resultados.
  
- Se debe realizar análisis metabólico, en raíces de yuca antes y después de almacenamiento pos cosecha; en torno a dilucidar el papel que cumplen los carotenoides frente a la reducción del DFP.



**A. Anexo: Datos promedios obtenidos del análisis univariado para DFP, HCN, MS, CTC, BC y ES.**

Genotipo	DFP	HCN	MS	CTC	BC	ES
GM 3732-15	18,48	732,92	37,48	3,92	2,12	115,62
GM 3732-30	3,99	277,60	28,28	9,22	5,74	137,38
GM 3732-5	1,27	426,24	30,10	12,25	8,09	67,13
GM 3736-29	3,81	412,68	34,89	12,70	5,73	55,94
GM 3736-50	25,18	494,09	43,97	8,32	3,62	97,71
GM 3736-51	5,51	245,46	38,54	12,73	6,92	75,75
GM 905-52	1,50	599,05	24,62	8,81	6,15	101,04
AM206-5	26,55	511,05	26,81	0,04	0,29	184,23
CM523-7	5,36	175,51	38,33	0,00	0,00	66,29
GM 3732-13	14,17	251,01	37,20	11,36	5,21	66,78
GM 3732-14	4,07	631,77	28,95	6,85	4,30	68,00
GM 3732-17	3,93	514,12	33,37	11,57	6,99	103,50
GM 3732-20	9,15	321,13	33,34	5,81	3,43	142,38
GM 3732-21	5,77	366,93	32,61	10,92	7,13	85,92
GM 3732-22	2,19	375,85	40,21	12,14	6,04	46,46
GM 3732-27	3,72	264,34	36,28	10,17	5,11	73,00
GM 3732-36	1,27	344,16	32,11	8,55	4,31	39,80
GM 3736-1	17,30	414,97	42,82	0,07	0,41	144,08
GM 3736-14	37,32	155,54	41,47	4,80	1,85	252,85
GM 3736-16	5,56	273,65	32,34	12,46	7,78	79,84
GM 3736-18	10,25	161,74	33,02	11,31	7,55	79,73
GM 3736-2	4,14	233,64	39,00	11,76	5,95	45,38
GM 3736-20	4,28	195,54	34,98	12,75	8,26	90,37
GM 3736-21	13,01	237,56	37,16	3,88	1,86	118,78
GM 3736-24	13,45	194,55	39,96	9,16	4,27	118,58
GM 3736-25	10,10	163,06	36,11	6,90	3,51	164,20
GM 3736-26	9,85	630,07	35,26	13,99	8,88	123,55
GM 3736-34	11,39	216,84	37,72	11,76	5,56	238,91
GM 3736-42	32,53	354,53	36,17	5,78	2,77	219,14
GM 3736-44	2,79	330,11	40,06	12,52	5,62	74,15
GM 3736-5	3,08	249,31	35,46	10,03	5,10	68,82
GM 3736-52	21,35	272,37	41,92	10,36	4,30	201,95

Continuación Anexo A: Datos promedios obtenidos del análisis univariado para DFP, HCN, MS, CTC, BC y ES.

Genotipo	DFP	HCN	MS	CTC	BC	ES
<b>GM 3736-53</b>	7,70	300,18	40,54	9,88	5,03	101,93
<b>GM 3736-54</b>	24,46	155,24	32,68	10,89	7,16	156,19
<b>GM 3736-61</b>	48,16	356,88	38,37	5,69	2,23	199,91
<b>GM 3736-64</b>	33,81	662,45	42,73	7,28	3,27	91,21
<b>GM 3736-67</b>	26,58	324,49	40,37	0,05	0,08	163,82
<b>GM 3736-70</b>	7,16	509,37	35,82	4,84	1,27	91,73
<b>GM 3736-73</b>	4,83	333,61	32,67	8,82	5,26	125,12
<b>GM 3736-78</b>	13,65	251,55	34,41	14,51	7,99	154,15
<b>GM 3736-79</b>	19,64	389,53	32,01	7,20	4,24	190,12
<b>GM 3736-82</b>	8,95	212,52	41,11	4,36	1,62	193,68
<b>GM 3736-83</b>	5,49	203,29	27,62	0,02	0,00	139,66
<b>GM 3736-9</b>	7,41	706,28	34,17	3,73	2,02	124,34
<b>GM 905-57</b>	2,56	157,72	37,87	10,54	5,10	71,87
<b>GM 905-60</b>	5,86	490,07	39,92	12,01	5,92	90,86
<b>HMC-1</b>	4,99	195,22	40,61	0,00	0,00	165,47
<b>MCOL22</b>	5,71	264,75	41,90	0,00	0,00	128,57
<b>MPER-183</b>	11,33	86,60	35,41	0,00	0,00	150,09

## B. Anexo: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente familias GM3732 y GM3736

Crom	Loc	Gen	Crom	Loc	Gen
Crom01	19447679	Manes.01G069900	Crom03	12317347	Manes.03G080900
Crom01	22526662	Manes.01G103000	Crom03	12325928	Manes.03G080900
Crom01	22805726	Manes.01G106100	Crom03	12539241	Manes.03G081300
Crom01	23392603	Manes.01G113800	Crom03	12539251	Manes.03G081300
Crom02	1843574	Manes.02G022900	Crom03	12605221	Manes.03G081400
Crom02	1956992	Manes.02G024800	Crom03	12826321	Manes.03G081900
Crom02	2101481	Manes.02G027300	Crom03	12826329	Manes.03G081900
Crom02	2150430	Manes.02G028100	Crom03	12830490	Manes.03G081900
Crom02	2365891	Manes.02G031200	Crom03	12830512	Manes.03G081900
Crom02	2739146	Manes.02G035400	Crom03	12881610	Manes.03G082000
Crom02	4144791	Manes.02G054600	Crom03	12881653	Manes.03G082000
Crom02	10528127	Manes.02G141900	Crom03	13137247	Manes.03G082300
Crom02	11244165	Manes.02G150700	Crom03	13146724	Manes.03G082400
Crom02	11397566	Manes.02G153000	Crom03	14052964	Manes.03G085900
Crom02	11529826	Manes.02G153900	Crom03	14053005	Manes.03G085900
Crom02	11582649	Manes.02G154600	Crom03	16263854	Manes.03G096300
Crom02	11610513	Manes.02G155000	Crom03	16263924	Manes.03G096300
Crom02	12329475	Manes.02G163200	Crom03	16346821	Manes.03G096600
Crom02	12329480	Manes.02G163200	Crom03	16417520	Manes.03G096700
Crom02	12593235	Manes.02G166800	Crom03	20118175	Manes.03G110000
Crom02	12721347	Manes.02G167900	Crom03	20137753	Manes.03G110100
Crom02	12721443	Manes.02G167900	Crom03	23902483	Manes.03G142900
Crom02	12721462	Manes.02G167900	Crom03	26056283	Manes.03G168800
Crom02	12734932	Manes.02G168200	Crom04	18390297	Manes.04G065100
Crom02	12743059	Manes.02G168200	Crom04	22518352	Manes.04G087800
Crom02	13547473	Manes.02G172100	Crom04	22537384	Manes.04G088100
Crom03	10025281	Manes.03G074000	Crom04	25126056	Manes.04G120600
Crom03	10530080	Manes.03G075900	Crom04	26234918	Manes.04G133700
Crom03	11966548	Manes.03G080100	Crom04	26728414	Manes.04G140500
Crom03	11966554	Manes.03G080100	Crom04	26768553	Manes.04G141200
Crom03	11997321	Manes.03G080200	Crom04	26768556	Manes.04G141200
Crom03	12089483	Manes.03G080300	Crom04	26932206	Manes.04G143000
Crom03	12152683	Manes.03G080500	Crom04	26952377	Manes.04G143200

Continuación anexo B: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente familias GM3732 y GM3736.

<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>	<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>
Crom04	26952414	Manes.04G143200	Crom10	18141751	Manes.10G088500
Crom04	26952439	Manes.04G143200	Crom10	18742754	Manes.10G090200
Crom05	6663021	Manes.05G085900	Crom10	18742762	Manes.10G090200
Crom05	20856531	Manes.05G146500	Crom11	48512	Manes.11G000200
Crom05	20856555	Manes.05G146500	Crom11	73732	Manes.11G000300
Crom05	20963305	Manes.05G147800	Crom11	73742	Manes.11G000300
Crom05	21371137	Manes.05G150400	Crom11	73795	Manes.11G000300
Crom05	21509925	Manes.05G151400	Crom11	95673	Manes.11G000400
Crom05	21556080	Manes.05G151800	Crom11	139393	Manes.11G000600
Crom05	21692767	Manes.05G152400	Crom11	172076	Manes.11G000900
Crom05	21701760	Manes.05G152600	Crom11	189275	Manes.11G001200
Crom05	21731678	Manes.05G152700	Crom11	189279	Manes.11G001200
Crom05	21780834	Manes.05G152900	Crom11	189290	Manes.11G001200
Crom05	21797435	Manes.05G152900	Crom11	189291	Manes.11G001200
Crom05	21850269	Manes.05G153200	Crom11	256549	Manes.11G002000
Crom05	22030837	Manes.05G155200	Crom11	785673	Manes.11G007300
Crom06	5092680	Manes.06G025100	Crom11	785674	Manes.11G007300
Crom06	27451064	Manes.06G175700	Crom11	802055	Manes.11G007500
Crom06	27686712	Manes.06G178000	Crom11	5220469	Manes.11G053100
Crom08	228362	Manes.08G002100	Crom11	10680175	Manes.11G081500
Crom08	1650582	Manes.08G017400	Crom11	10680178	Manes.11G081500
Crom08	2673172	Manes.08G029800	Crom11	10680209	Manes.11G081500
Crom08	26080352	Manes.08G100600	Crom11	10680223	Manes.11G081500
Crom08	26080385	Manes.08G100600	Crom11	10680577	Manes.11G081500
Crom08	29140932	Manes.08G126700	Crom11	11656500	Manes.11G084600
Crom09	15609754	Manes.09G083000	Crom11	11983619	Manes.11G086300
Crom10	5662140	Manes.10G053500	Crom11	12261686	Manes.11G087500
Crom10	7318093	Manes.10G058200	Crom11	12861853	Manes.11G088800
Crom10	7318095	Manes.10G058200	Crom11	13462988	Manes.11G090600
Crom10	9565865	Manes.10G068000	Crom11	14000826	Manes.11G091900
Crom10	10115869	Manes.10G069000	Crom11	14000828	Manes.11G091900
Crom10	10115880	Manes.10G069000	Crom11	14336279	Manes.11G092900
Crom10	16540955	Manes.10G083200	Crom11	14336280	Manes.11G092900
Crom10	16540965	Manes.10G083200	Crom11	14457034	Manes.11G093500
Crom10	17425509	Manes.10G084700	Crom11	14460898	Manes.11G093500
Crom10	17515199	Manes.10G085100	Crom11	16472791	Manes.11G098000
Crom10	17854584	Manes.10G086500	Crom11	16868659	Manes.11G099000
Crom10	17874892	Manes.10G086900	Crom11	16964332	Manes.11G099200

Continuación anexo B: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente familias GM3732 y GM3736.

<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>	<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>
Crom11	16964344	Manes.11G099200	Crom12	1865433	Manes.12G025000
Crom11	26222365	Manes.11G151200	Crom12	1940123	Manes.12G025300
Crom12	445488	Manes.12G003400	Crom12	1940129	Manes.12G025300
Crom12	462911	Manes.12G003900	Crom12	2003872	Manes.12G025800
Crom12	511665	Manes.12G004500	Crom12	2032090	Manes.12G026100
Crom12	837410	Manes.12G009600	Crom12	2034745	Manes.12G026200
Crom12	910063	Manes.12G010500	Crom12	2083077	Manes.12G026900
Crom12	912867	Manes.12G010500	Crom12	2119692	Manes.12G027300
Crom12	939678	Manes.12G011200	Crom12	2122966	Manes.12G027300
Crom12	939715	Manes.12G011200	Crom12	2186070	Manes.12G028400
Crom12	939721	Manes.12G011200	Crom12	2186106	Manes.12G028400
Crom12	1045184	Manes.12G012500	Crom12	2195712	Manes.12G028600
Crom12	1093673	Manes.12G013000	Crom12	2207985	Manes.12G028800
Crom12	1170508	Manes.12G014000	Crom12	2208060	Manes.12G028800
Crom12	1170511	Manes.12G014000	Crom12	2241434	Manes.12G029000
Crom12	1170564	Manes.12G014000	Crom12	2241445	Manes.12G029000
Crom12	1242541	Manes.12G015200	Crom12	2258463	Manes.12G029200
Crom12	1272954	Manes.12G016000	Crom12	2263105	Manes.12G029200
Crom12	1352089	Manes.12G016800	Crom12	2277230	Manes.12G029500
Crom12	1382935	Manes.12G017500	Crom12	2281292	Manes.12G029500
Crom12	1399960	Manes.12G017800	Crom12	2295136	Manes.12G029600
Crom12	1531655	Manes.12G020000	Crom12	2295160	Manes.12G029600
Crom12	1536963	Manes.12G020100	Crom12	2300945	Manes.12G029700
Crom12	1536996	Manes.12G020100	Crom12	2316012	Manes.12G030000
Crom12	1543704	Manes.12G020200	Crom12	2318704	Manes.12G030100
Crom12	1588114	Manes.12G020800	Crom12	2330356	Manes.12G030200
Crom12	1594270	Manes.12G020900	Crom12	2330357	Manes.12G030200
Crom12	1610265	Manes.12G021200	Crom12	2330390	Manes.12G030200
Crom12	1754688	Manes.12G023500	Crom12	2373714	Manes.12G030700
Crom12	1754696	Manes.12G023500	Crom12	2373716	Manes.12G030700
Crom12	1754708	Manes.12G023500	Crom12	2384699	Manes.12G030800
Crom12	1754754	Manes.12G023500	Crom12	2384745	Manes.12G030800
Crom12	1795398	Manes.12G024100	Crom12	2419842	Manes.12G031400
Crom12	1795425	Manes.12G024100	Crom12	2474984	Manes.12G031800
Crom12	1795492	Manes.12G024100	Crom12	2474987	Manes.12G031800
Crom12	1795518	Manes.12G024100	Crom12	2522884	Manes.12G032500
Crom12	1795519	Manes.12G024100	Crom12	2576522	Manes.12G032900
Crom12	1818687	Manes.12G024500	Crom12	2576527	Manes.12G032900

Continuación anexo B: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente familias GM3732 y GM3736.

<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>	<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>
Crom12	2579989	Manes.12G032900	Crom12	7924528	Manes.12G076100
Crom12	2587999	Manes.12G033000	Crom12	12301684	Manes.12G088600
Crom12	2591896	Manes.12G033100	Crom12	12302128	Manes.12G088600
Crom12	2631737	Manes.12G033500	Crom12	24602304	Manes.12G107600
Crom12	2780106	Manes.12G035000	Crom12	24603854	Manes.12G107600
Crom12	3176174	Manes.12G038600	Crom12	24633100	Manes.12G107700
Crom12	3234333	Manes.12G038900	Crom13	1242783	Manes.13G012800
Crom12	3285233	Manes.12G039500	Crom13	1318124	Manes.13G012900
Crom12	3764709	Manes.12G044500	Crom13	1337109	Manes.13G013200
Crom12	3780076	Manes.12G044800	Crom13	1370391	Manes.13G013900
Crom12	4030569	Manes.12G047300	Crom13	1370507	Manes.13G013900
Crom12	4271383	Manes.12G048800	Crom13	1370512	Manes.13G013900
Crom12	4422029	Manes.12G050700	Crom13	1370520	Manes.13G013900
Crom12	4879850	Manes.12G055200	Crom13	2415762	Manes.13G025900
Crom12	4913494	Manes.12G055800	Crom13	2440072	Manes.13G026100
Crom12	5044725	Manes.12G057200	Crom13	2440075	Manes.13G026100
Crom12	5044756	Manes.12G057200	Crom13	2440077	Manes.13G026100
Crom12	5048142	Manes.12G057200	Crom13	2440115	Manes.13G026100
Crom12	5143445	Manes.12G058300	Crom13	2440126	Manes.13G026100
Crom12	5185499	Manes.12G058700	Crom13	2443347	Manes.13G026100
Crom12	5565871	Manes.12G061400	Crom13	2450055	Manes.13G026300
Crom12	5573206	Manes.12G061500	Crom13	2458201	Manes.13G026400
Crom12	5594775	Manes.12G061600	Crom13	2467008	Manes.13G026600
Crom12	5600005	Manes.12G061600	Crom13	2580981	Manes.13G027300
Crom12	5600032	Manes.12G061600	Crom13	2700903	Manes.13G028400
Crom12	5600044	Manes.12G061600	Crom13	3011020	Manes.13G032200
Crom12	5636861	Manes.12G062200	Crom13	3321378	Manes.13G036000
Crom12	5636867	Manes.12G062200	Crom13	3327192	Manes.13G036000
Crom12	5674739	Manes.12G062500	Crom13	3447367	Manes.13G037600
Crom12	5773971	Manes.12G063300	Crom13	3677219	Manes.13G039000
Crom12	5797696	Manes.12G063500	Crom13	3740387	Manes.13G040000
Crom12	5821617	Manes.12G063700	Crom13	23184639	Manes.13G107400
Crom12	5844360	Manes.12G063800	Crom14	5240032	Manes.14G064600
Crom12	5886521	Manes.12G064000	Crom14	21806271	Manes.14G165200
Crom12	6056443	Manes.12G065000	Crom15	730486	Manes.15G007300
Crom12	6490049	Manes.12G067100	Crom15	1139790	Manes.15G013500
Crom12	6527294	Manes.12G067600	Crom15	1196176	Manes.15G014400
Crom12	6527298	Manes.12G067600	Crom15	1254946	Manes.15G015300



Continuación anexo B: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente familias GM3732 y GM3736.

<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>	<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>
Crom15	1281972	Manes.15G015700	Crom16	24080247	Manes.16G084000
Crom15	5036784	Manes.15G068700	Crom16	24080280	Manes.16G084000
Crom15	7058436	Manes.15G095600	Crom16	26902239	Manes.16G113500
Crom15	8044566	Manes.15G107200	Crom16	27469344	Manes.16G122800
Crom15	8164336	Manes.15G107700	Crom16	27495547	Manes.16G123100
Crom15	8164341	Manes.15G107700	Crom18	3719743	Manes.18G043000
Crom15	8945072	Manes.15G118100	Crom18	3935616	Manes.18G046000
Crom15	8945143	Manes.15G118100	Crom18	3935617	Manes.18G046000
Crom15	9590353	Manes.15G126700	Crom18	3935627	Manes.18G046000
Crom15	9754343	Manes.15G128300	Crom18	3935636	Manes.18G046000
Crom15	10973890	Manes.15G142500	Crom18	3935657	Manes.18G046000
Crom15	11122779	Manes.15G143400	Crom18	3979539	Manes.18G046700
Crom15	11508778	Manes.15G147400	Crom18	4071407	Manes.18G048200
Crom15	11698501	Manes.15G149300	Crom18	4078138	Manes.18G048300
Crom15	12864285	Manes.15G163000	Crom18	4107505	Manes.18G048900
Crom15	14276257	Manes.15G171600	Crom18	4114009	Manes.18G048900
Crom15	18209442	Manes.15G179400	Crom18	4114064	Manes.18G048900
Crom16	1245145	Manes.16G012700	Crom18	4133849	Manes.18G049300
Crom16	1265074	Manes.16G012900	Crom18	4194816	Manes.18G050200
Crom16	1361711	Manes.16G014000	Crom18	4235356	Manes.18G050900
Crom16	2054206	Manes.16G020700	Crom18	4244707	Manes.18G051000
Crom16	2091387	Manes.16G020800	Crom18	4311525	Manes.18G051900
Crom16	2422025	Manes.16G025000	Crom18	4311559	Manes.18G051900
Crom16	2661367	Manes.16G027000	Crom18	4314323	Manes.18G051900
Crom16	3881097	Manes.16G034900	Crom18	4333579	Manes.18G052300
Crom16	3909572	Manes.16G035100	Crom18	5302058	Manes.18G061300
Crom16	3909619	Manes.16G035100	Crom18	5302069	Manes.18G061300
Crom16	3909658	Manes.16G035100	Crom18	5997516	Manes.18G069500
Crom16	3956141	Manes.16G035200	Crom18	6011286	Manes.18G069700
Crom16	3964099	Manes.16G035300	Crom18	6083404	Manes.18G071000
Crom16	23273469	Manes.16G076700	Crom18	7055517	Manes.18G082500
Crom16	24079557	Manes.16G084000	Crom18	9854987	Manes.18G107800
Crom16	24080239	Manes.16G084000	Crom18	9855018	Manes.18G107800
Crom16	24080241	Manes.16G084000			

## C. Anexo: Análisis de medias con datos de pre cosecha y cosecha en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Altura Planta (cm)	138	0,42	0,23	11,84

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	52180,46	34	1534,72	2,22	0,0011
Genotipo	52180,46	34	1534,72	2,22	0,0011
Error	71129,69	103	690,58		
Total	123310,14	137			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=74,22359

Error: 690,5795 gl: 103

Genotipo	Medias	n	E.E.
C4	168,75	2	18,58 A
CPDCR1B-078	179,38	4	13,14 A B
CPDCR1B-046	185,63	4	13,14 A B
CPDCR1B-052	195,63	4	13,14 A B C
CPDCR5B-102	197,50	4	13,14 A B C
CPDCR1B-008	199,38	4	13,14 A B C
CPDCR5B-016	201,25	4	13,14 A B C
CPDCR5B-036	208,13	4	13,14 A B C
CPDCR1B-065	211,25	4	13,14 A B C
B1PD280-008	211,88	4	13,14 A B C
CPDCR1B-075	212,50	4	13,14 A B C
CPDCR5B-055	213,75	4	13,14 A B C
CPDCR1B-064	217,50	4	13,14 A B C
CPDCR5B-043	220,00	4	13,14 A B C
CPDCR1B-043	221,25	4	13,14 A B C
CPDCR1B-019	221,88	4	13,14 A B C
CPDCR5B-069A	223,13	4	13,14 A B C
CPDCR1B-054	223,13	4	13,14 A B C
CPDCR1B-080	223,75	4	13,14 A B C
CPDCR1B-068	227,50	4	13,14 A B C
CPDCR1B-034	228,13	4	13,14 A B C
CPDCR1B-076	229,38	4	13,14 A B C
CPDCR1B-028	229,38	4	13,14 A B C
B1PD280-040	230,63	4	13,14 A B C
CPDCR1B-026	230,63	4	13,14 A B C
CPDCR1B-048	231,25	4	13,14 A B C
CPDCR1B-013	233,13	4	13,14 A B C
CPDCR5B-109	233,13	4	13,14 A B C
CPDCR1B-027	236,25	4	13,14 A B C
CPDCR5B-041	240,63	4	13,14 A B C
CPDCR5B-096	243,13	4	13,14 B C
CPDCR1B-062	244,38	4	13,14 B C
CPDCR1B-015	248,75	4	13,14 B C
CPDCR1B-074	252,50	4	13,14 B C
CPDCR5B-053	265,00	4	13,14 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Altura Prime Ramif (cm)	138	0,49	0,33	30,40

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	45476,70	34	1337,55	2,97	<0,0001
Genotipo	45476,70	34	1337,55	2,97	<0,0001
Error	46435,50	103	450,83		
Total	91912,20	137			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=59,97104

Error: 450,8301 gl: 103

Genotipo	Medias	n	E.E.
CPDCR1B-027	32,50	4	10,62 A
CPDCR1B-078	39,38	4	10,62 A B
CPDCR1B-052	44,38	4	10,62 A B C
CPDCR1B-015	46,88	4	10,62 A B C
CPDCR1B-068	46,88	4	10,62 A B C
CPDCR1B-028	51,88	4	10,62 A B C D
CPDCR1B-065	53,13	4	10,62 A B C D
B1PD280-008	55,00	4	10,62 A B C D
CPDCR1B-008	55,00	4	10,62 A B C D
CPDCR1B-064	58,75	4	10,62 A B C D
CPDCR1B-054	61,88	4	10,62 A B C D
CPDCR1B-019	63,13	4	10,62 A B C D
CPDCR5B-041	63,75	4	10,62 A B C D
CPDCR5B-016	65,63	4	10,62 A B C D
CPDCR5B-096	66,88	4	10,62 A B C D
CPDCR5B-055	66,88	4	10,62 A B C D
CPDCR5B-069A	68,13	4	10,62 A B C D
CPDCR1B-080	68,75	4	10,62 A B C D
CPDCR1B-062	69,38	4	10,62 A B C D
CPDCR1B-043	70,00	4	10,62 A B C D
CPDCR1B-026	71,88	4	10,62 A B C D
CPDCR5B-109	72,50	4	10,62 A B C D
CPDCR1B-046	74,38	4	10,62 A B C D
CPDCR5B-043	78,75	4	10,62 A B C D
CPDCR1B-048	80,00	4	10,62 A B C D
CPDCR5B-102	83,13	4	10,62 A B C D
C4	86,25	2	15,01 A B C D
CPDCR1B-075	86,25	4	10,62 A B C D
CPDCR1B-034	88,13	4	10,62 A B C D
CPDCR1B-076	88,63	4	10,62 A B C D
B1PD280-040	90,00	4	10,62 A B C D
CPDCR1B-013	94,38	4	10,62 B C D
CPDCR5B-053	96,88	4	10,62 B C D
CPDCR5B-036	103,13	4	10,62 C D
CPDCR1B-074	110,63	4	10,62 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Continuación anexo C: Análisis de medias con datos de pre cosecha y cosecha en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

## Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
# Ramificaciones	138	0,38	0,17	17,31

## Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	24,17	34	0,71	1,85	0,0098
Genotipo	24,17	34	0,71	1,85	0,0098
Error	39,63	103	0,38		
Total	63,79	137			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,75187

Error: 0,3847 gl: 103

Genotipo	Medias	n	E.E.
CPDCR5B-102	2,88	4	0,31 A
CPDCR1B-046	2,88	4	0,31 A
CPDCR5B-036	3,00	4	0,31 A
CPDCR5B-016	3,00	4	0,31 A
CPDCR1B-075	3,13	4	0,31 A B
CPDCR1B-013	3,13	4	0,31 A B
CPDCR1B-048	3,25	4	0,31 A B
CPDCR1B-034	3,25	4	0,31 A B
B1PD280-008	3,25	4	0,31 A B
C4	3,25	2	0,44 A B
CPDCR1B-064	3,38	4	0,31 A B
CPDCR5B-053	3,38	4	0,31 A B
CPDCR1B-074	3,50	4	0,31 A B
CPDCR1B-026	3,50	4	0,31 A B
CPDCR1B-078	3,50	4	0,31 A B
B1PD280-040	3,50	4	0,31 A B
CPDCR1B-062	3,50	4	0,31 A B
CPDCR1B-043	3,50	4	0,31 A B
CPDCR1B-052	3,50	4	0,31 A B
CPDCR1B-080	3,63	4	0,31 A B
CPDCR5B-069A	3,63	4	0,31 A B
CPDCR5B-109	3,63	4	0,31 A B
CPDCR1B-015	3,75	4	0,31 A B
CPDCR1B-028	3,75	4	0,31 A B
CPDCR1B-008	3,75	4	0,31 A B
CPDCR1B-027	3,88	4	0,31 A B
CPDCR1B-054	3,88	4	0,31 A B
CPDCR1B-076	3,88	4	0,31 A B
CPDCR5B-043	4,00	4	0,31 A B
CPDCR1B-068	4,00	4	0,31 A B
CPDCR5B-041	4,00	4	0,31 A B
CPDCR5B-096	4,13	4	0,31 A B
CPDCR1B-065	4,13	4	0,31 A B
CPDCR5B-055	4,13	4	0,31 A B
CPDCR1B-019	4,88	4	0,31 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p &gt; 0,05)

## Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Long. Ta. Hoj	138	0,21	0,00	131,09

## Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12889,49	34	379,10	0,79	0,7865
Genotipo	12889,49	34	379,10	0,79	0,7865
Error	49703,13	103	482,55		
Total	62592,62	137			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=62,04522

Error: 482,5546 gl: 103

Genotipo	Medias	n	E.E.
B1PD280-008	0,00	4	10,98 A
CPDCR1B-028	0,00	4	10,98 A
CPDCR1B-064	1,25	4	10,98 A
CPDCR1B-078	5,00	4	10,98 A
CPDCR5B-102	6,25	4	10,98 A
CPDCR1B-065	6,88	4	10,98 A
CPDCR1B-075	8,13	4	10,98 A
CPDCR1B-062	10,00	4	10,98 A
CPDCR5B-016	10,63	4	10,98 A
CPDCR1B-068	11,88	4	10,98 A
CPDCR1B-015	12,50	4	10,98 A
CPDCR1B-052	12,50	4	10,98 A
CPDCR1B-046	13,13	4	10,98 A
CPDCR1B-027	13,75	4	10,98 A
CPDCR5B-069A	13,75	4	10,98 A
CPDCR1B-026	15,00	4	10,98 A
CPDCR5B-055	15,00	4	10,98 A
CPDCR1B-048	15,00	4	10,98 A
CPDCR5B-096	15,63	4	10,98 A
CPDCR1B-013	16,25	4	10,98 A
CPDCR5B-036	17,50	4	10,98 A
CPDCR1B-080	18,13	4	10,98 A
CPDCR5B-109	20,00	4	10,98 A
CPDCR1B-034	20,63	4	10,98 A
CPDCR1B-054	21,88	4	10,98 A
CPDCR1B-008	21,88	4	10,98 A
CPDCR5B-041	24,38	4	10,98 A
CPDCR1B-043	25,63	4	10,98 A
C4	26,25	2	15,53 A
B1PD280-040	26,25	4	10,98 A
CPDCR1B-019	28,13	4	10,98 A
CPDCR1B-074	29,38	4	10,98 A
CPDCR1B-076	31,88	4	10,98 A
CPDCR5B-053	36,88	4	10,98 A
CPDCR5B-043	40,00	4	10,98 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p &gt; 0,05)

Continuación anexo C: Análisis de medias con datos de pre cosecha y cosecha en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
# estacas Pla	138	0,28	0,04	53,43

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	749,53	34	22,04	1,15	0,2915
Genotipo	749,53	34	22,04	1,15	0,2915
Error	1975,19	103	19,18		
Total	2724,72	137			

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=12,36860

Error: 19,1766 gl: 103

Genotipo	Medias	n	E.E.
C4	4,75	2	3,10 A
CPDCR5B-016	5,00	4	2,19 A
B1PD280-008	5,25	4	2,19 A
CPDCR5B-036	5,25	4	2,19 A
CPDCR1B-078	5,25	4	2,19 A
CPDCR1B-046	5,75	4	2,19 A
CPDCR1B-008	6,13	4	2,19 A
CPDCR1B-028	6,25	4	2,19 A
CPDCR1B-065	6,38	4	2,19 A
CPDCR1B-080	6,38	4	2,19 A
CPDCR1B-052	6,50	4	2,19 A
CPDCR5B-102	6,50	4	2,19 A
CPDCR5B-043	6,63	4	2,19 A
CPDCR5B-069A	7,25	4	2,19 A
CPDCR1B-043	7,25	4	2,19 A
CPDCR1B-075	7,88	4	2,19 A
CPDCR5B-055	7,88	4	2,19 A
CPDCR1B-054	8,00	4	2,19 A
CPDCR5B-096	8,13	4	2,19 A
CPDCR1B-048	8,25	4	2,19 A
CPDCR1B-027	8,38	4	2,19 A
CPDCR1B-013	8,38	4	2,19 A
B1PD280-040	8,63	4	2,19 A
CPDCR1B-015	9,00	4	2,19 A
CPDCR1B-034	9,13	4	2,19 A
CPDCR1B-064	9,63	4	2,19 A
CPDCR1B-076	9,75	4	2,19 A
CPDCR5B-109	9,88	4	2,19 A
CPDCR1B-026	10,13	4	2,19 A
CPDCR5B-041	10,50	4	2,19 A
CPDCR1B-068	10,63	4	2,19 A
CPDCR1B-062	10,75	4	2,19 A
CPDCR1B-074	11,25	4	2,19 A
CPDCR5B-053	13,50	4	2,19 A
CPDCR1B-019	15,00	4	2,19 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso Prom Raices por Plant..	138	0,25	0,01	90,59

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	233,60	34	6,87	1,04	0,4308
Genotipo	233,60	34	6,87	1,04	0,4308
Error	682,88	103	6,63		
Total	916,48	137			

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,27260

Error: 6,6299 gl: 103

Genotipo	Medias	n	E.E.
C4	1,39	2	1,82 A
CPDCR1B-028	1,79	4	1,29 A
CPDCR1B-046	2,03	4	1,29 A
CPDCR5B-055	2,06	4	1,29 A
CPDCR5B-036	2,15	4	1,29 A
CPDCR1B-026	2,19	4	1,29 A
CPDCR1B-015	2,19	4	1,29 A
CPDCR1B-078	2,24	4	1,29 A
CPDCR1B-027	2,27	4	1,29 A
CPDCR1B-008	2,28	4	1,29 A
CPDCR1B-065	2,29	4	1,29 A
CPDCR1B-068	2,32	4	1,29 A
CPDCR5B-016	2,45	4	1,29 A
CPDCR5B-041	2,46	4	1,29 A
CPDCR5B-053	2,47	4	1,29 A
B1PD280-008	2,49	4	1,29 A
B1PD280-040	2,49	4	1,29 A
CPDCR5B-102	2,59	4	1,29 A B
CPDCR1B-019	2,60	4	1,29 A B
CPDCR1B-043	2,61	4	1,29 A B
CPDCR5B-096	2,62	4	1,29 A B
CPDCR1B-075	2,76	4	1,29 A B
CPDCR1B-048	2,78	4	1,29 A B
CPDCR5B-043	2,87	4	1,29 A B
CPDCR1B-076	2,88	4	1,29 A B
CPDCR1B-052	2,93	4	1,29 A B
CPDCR1B-080	3,05	4	1,29 A B
CPDCR1B-034	3,10	4	1,29 A B
CPDCR1B-054	3,19	4	1,29 A B
CPDCR5B-109	3,20	4	1,29 A B
CPDCR1B-013	3,29	4	1,29 A B
CPDCR1B-074	3,48	4	1,29 A B
CPDCR1B-062	3,64	4	1,29 A B
CPDCR1B-064	3,83	4	1,29 A B
CPDCR5B-069A	9,81	4	1,29 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Continuación anexo C: Análisis de medias con datos de pre cosecha y cosecha en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso Prom Raíz	138	0,29	0,06	65,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,33	34	0,07	1,24	0,2069
Genotipo	2,33	34	0,07	1,24	0,2069
Error	5,70	103	0,06		
Total	8,02	137			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,66423

Error: 0,0553 gl: 103

Genotipo	Medias	n	E.E.
CPDCR1B-028	0,19	4	0,12 A
CPDCR1B-046	0,20	4	0,12 A B
CPDCR5B-036	0,22	4	0,12 A B
C4	0,24	2	0,17 A B
CPDCR5B-053	0,25	4	0,12 A B
CPDCR5B-102	0,27	4	0,12 A B
CPDCR5B-096	0,28	4	0,12 A B
CPDCR1B-043	0,28	4	0,12 A B
CPDCR1B-015	0,29	4	0,12 A B
CPDCR5B-016	0,30	4	0,12 A B
CPDCR1B-034	0,30	4	0,12 A B
CPDCR1B-019	0,31	4	0,12 A B
CPDCR1B-026	0,31	4	0,12 A B
CPDCR1B-080	0,31	4	0,12 A B
CPDCR1B-065	0,31	4	0,12 A B
CPDCR5B-055	0,31	4	0,12 A B
CPDCR1B-008	0,31	4	0,12 A B
CPDCR5B-041	0,33	4	0,12 A B
CPDCR1B-078	0,33	4	0,12 A B
CPDCR1B-054	0,34	4	0,12 A B
CPDCR1B-048	0,35	4	0,12 A B
B1PD280-008	0,35	4	0,12 A B
CPDCR5B-109	0,36	4	0,12 A B
CPDCR1B-052	0,36	4	0,12 A B
CPDCR1B-064	0,37	4	0,12 A B
CPDCR5B-043	0,38	4	0,12 A B
CPDCR1B-076	0,39	4	0,12 A B
B1PD280-040	0,39	4	0,12 A B
CPDCR1B-068	0,39	4	0,12 A B
CPDCR1B-027	0,40	4	0,12 A B
CPDCR1B-075	0,44	4	0,12 A B
CPDCR1B-013	0,52	4	0,12 A B
CPDCR1B-062	0,63	4	0,12 A B
CPDCR1B-074	0,65	4	0,12 A B
CPDCR5B-069A	0,85	4	0,12 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Tamaño Raíz	139	0,30	0,07	15,64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10,75	34	0,32	1,32	0,1447
Genotipo	10,75	34	0,32	1,32	0,1447
Error	24,92	104	0,24		
Total	35,67	138			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,36925

Error: 0,2396 gl: 104

Genotipo	Medias	n	E.E.
C4	2,67	3	0,28 A
CPDCR5B-096	2,75	4	0,24 A
CPDCR5B-102	2,75	4	0,24 A
CPDCR5B-036	2,75	4	0,24 A
CPDCR1B-046	2,75	4	0,24 A
CPDCR5B-069A	2,75	4	0,24 A
CPDCR1B-048	3,00	4	0,24 A
CPDCR5B-055	3,00	4	0,24 A
CPDCR1B-076	3,00	4	0,24 A
CPDCR1B-078	3,00	4	0,24 A
CPDCR1B-065	3,00	4	0,24 A
CPDCR5B-041	3,00	4	0,24 A
CPDCR1B-015	3,00	4	0,24 A
CPDCR1B-008	3,00	4	0,24 A
B1PD280-040	3,00	4	0,24 A
B1PD280-008	3,00	4	0,24 A
CPDCR1B-026	3,00	4	0,24 A
CPDCR1B-028	3,00	4	0,24 A
CPDCR1B-043	3,00	4	0,24 A
CPDCR5B-043	3,25	4	0,24 A
CPDCR5B-053	3,25	4	0,24 A
CPDCR1B-080	3,25	4	0,24 A
CPDCR5B-109	3,25	4	0,24 A
CPDCR1B-064	3,25	4	0,24 A
CPDCR1B-052	3,25	4	0,24 A
CPDCR1B-054	3,25	4	0,24 A
CPDCR1B-034	3,25	4	0,24 A
CPDCR1B-075	3,25	4	0,24 A
CPDCR1B-019	3,25	4	0,24 A
CPDCR1B-027	3,25	4	0,24 A
CPDCR5B-016	3,50	4	0,24 A
CPDCR1B-062	3,50	4	0,24 A
CPDCR1B-013	3,75	4	0,24 A
CPDCR1B-074	3,75	4	0,24 A
CPDCR1B-068	3,75	4	0,24 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Color pulpa	139	sd	sd	0,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,00	34	0,00	sd	sd
Genotipo	0,00	34	0,00	sd	sd
Error	0,00	104	0,00		
Total	0,00	138			

## D. Anexo: Datos promedios obtenidos del análisis univariado para DFP, HCN, MS y ES, en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

GENOTIPO	DFP	MS	HCN	ES
AM206-5	6,34	33,12	426,53	86,11
B1PD280-008	10,56	35,29	413,55	58,15
B1PD280-040	8,87	33,48	219,32	53,99
C4	31,44	36,64	250,68	251,71
CM523-7	45,69	39,88	183,93	62,89
CPDCR1B-008	40,09	40,88	225,72	125,05
CPDCR1B-013	32,89	40,51	317,08	85,58
CPDCR1B-015	28,37	40,20	266,25	116,93
CPDCR1B-019	19,96	37,85	463,63	197,93
CPDCR1B-026	20,55	37,47	500,45	124,33
CPDCR1B-027	12,58	36,41	257,95	104,18
CPDCR1B-028	13,48	36,58	332,07	110,67
CPDCR1B-034	27,96	34,93	335,89	119,54
CPDCR1B-043	14,96	37,28	191,73	116,20
CPDCR1B-046	23,37	38,47	479,73	92,24
CPDCR1B-048	18,75	37,46	380,91	79,91
CPDCR1B-052	12,48	35,99	423,81	64,00
CPDCR1B-054	21,92	38,20	325,28	147,70
CPDCR1B-062	20,94	37,32	575,41	130,21
CPDCR1B-064	10,87	39,30	323,81	83,04
CPDCR1B-065	10,98	33,53	281,14	134,28
CPDCR1B-068	23,25	42,09	226,37	89,87
CPDCR1B-074	44,27	39,31	831,60	150,55
CPDCR1B-075	9,09	38,17	347,61	77,79
CPDCR1B-076	43,38	41,43	454,56	132,68
CPDCR1B-078	21,30	38,14	200,72	116,96
CPDCR1B-080	7,73	37,95	514,71	63,72
CPDCR5B-016	11,47	36,09	284,27	81,29
CPDCR5B-036	5,52	36,18	450,25	46,75
CPDCR5B-041	14,96	37,00	285,99	105,42
CPDCR5B-043	14,98	38,11	252,03	97,19
CPDCR5B-053	5,58	30,62	190,84	76,91
CPDCR5B-055	14,87	34,83	352,00	101,91
CPDCR5B-069A	5,81	32,96	247,12	140,99
CPDCR5B-096	11,79	32,11	226,99	131,68
CPDCR5B-102	6,37	29,70	717,47	64,75
CPDCR5B-109	19,40	39,62	467,84	114,53
HMC-1	21,17	36,56	151,23	118,37
MCOL 22	25,11	39,88	239,16	108,86
MPER 183	20,73	36,15	164,64	86,05

## E. Anexo: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

Crom	Loc	Gen	Crom	Loc	Gen
Crom01	18522517	Manes.01G063000	Crom03	3878174	Manes.03G046600
Crom01	18859598	Manes.01G065400	Crom03	4108692	Manes.03G048200
Crom01	18968777	Manes.01G066000	Crom03	4758558	Manes.03G053100
Crom01	19105212	Manes.01G066700	Crom03	4883440	Manes.03G054100
Crom01	19237812	Manes.01G067900	Crom03	4883462	Manes.03G054100
Crom01	19237838	Manes.01G067900	Crom03	4883470	Manes.03G054100
Crom01	19463805	Manes.01G070000	Crom03	5205673	Manes.03G056700
Crom01	19463808	Manes.01G070000	Crom03	5296043	Manes.03G057200
Crom01	19832235	Manes.01G073200	Crom03	6627710	Manes.03G062800
Crom01	20042662	Manes.01G074800	Crom03	6627712	Manes.03G062800
Crom01	20272085	Manes.01G076500	Crom03	7387702	Manes.03G066200
Crom01	20318058	Manes.01G076900	Crom03	7586268	Manes.03G066600
Crom01	20359448	Manes.01G077400	Crom03	8469249	Manes.03G069700
Crom01	20382238	Manes.01G077700	Crom03	8746240	Manes.03G070600
Crom01	20835229	Manes.01G082900	Crom03	8746305	Manes.03G070600
Crom01	20835253	Manes.01G082900	Crom03	8746306	Manes.03G070600
Crom01	20924022	Manes.01G083700	Crom03	8988616	Manes.03G071200
Crom01	20994394	Manes.01G084700	Crom03	9099211	Manes.03G071500
Crom01	20994443	Manes.01G084700	Crom03	9132619	Manes.03G071600
Crom01	21146173	Manes.01G086300	Crom03	9132633	Manes.03G071600
Crom01	23438958	Manes.01G114800	Crom03	9132672	Manes.03G071600
Crom01	32642891	Manes.01G249900	Crom03	9132674	Manes.03G071600
Crom01	34427832	Manes.01G270800	Crom03	9132678	Manes.03G071600
Crom02	17983936	Manes.02G201200	Crom03	9139820	Manes.03G071600
Crom02	29252202	Manes.02G220300	Crom03	9139895	Manes.03G071600
Crom03	120998	Manes.03G000500	Crom03	9139928	Manes.03G071600
Crom03	305497	Manes.03G002900	Crom03	9139942	Manes.03G071600
Crom03	305498	Manes.03G002900	Crom03	9139955	Manes.03G071600
Crom03	3261494	Manes.03G040200	Crom03	11328380	Manes.03G078200
Crom03	3261554	Manes.03G040200	Crom03	11333508	Manes.03G078200
Crom03	3264787	Manes.03G040200	Crom03	12810601	Manes.03G081800
Crom03	3658256	Manes.03G045200	Crom03	18227848	Manes.03G106200

Continuación anexo E: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>	<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>
Crom03	21006336	Manes.03G113900	Crom04	26234969	Manes.04G133700
Crom03	22709694	Manes.03G130600	Crom04	26506711	Manes.04G137600
Crom03	23094723	Manes.03G135400	Crom04	27807893	Manes.04G155600
Crom03	23201089	Manes.03G137000	Crom04	27807924	Manes.04G155600
Crom03	23874514	Manes.03G142600	Crom05	11104612	Manes.05G114700
Crom03	25567507	Manes.03G162100	Crom05	11104776	Manes.05G114700
Crom03	25586863	Manes.03G162400	Crom05	11122652	Manes.05G114800
Crom03	25648035	Manes.03G163200	Crom05	12517523	Manes.05G119600
Crom03	25844007	Manes.03G166100	Crom05	12667728	Manes.05G119700
Crom04	478983	Manes.04G003900	Crom05	12877446	Manes.05G120000
Crom04	2959776	Manes.04G027500	Crom05	13611768	Manes.05G121000
Crom04	15839351	Manes.04G061700	Crom05	15001757	Manes.05G125400
Crom04	21685149	Manes.04G078700	Crom05	15001891	Manes.05G125400
Crom04	21815755	Manes.04G080100	Crom05	15027128	Manes.05G125500
Crom04	22749888	Manes.04G090400	Crom05	15034283	Manes.05G125600
Crom04	22799777	Manes.04G090800	Crom05	15107181	Manes.05G126200
Crom04	23164339	Manes.04G094400	Crom05	15120942	Manes.05G126300
Crom04	23164348	Manes.04G094400	Crom05	15180553	Manes.05G126700
Crom04	23289285	Manes.04G095500	Crom05	15180568	Manes.05G126700
Crom04	24615939	Manes.04G112900	Crom05	15275374	Manes.05G127100
Crom04	24615949	Manes.04G112900	Crom05	15275419	Manes.05G127100
Crom04	24615963	Manes.04G112900	Crom05	15287998	Manes.05G127200
Crom04	24615964	Manes.04G112900	Crom05	15313006	Manes.05G127800
Crom04	24656035	Manes.04G113700	Crom05	15492619	Manes.05G128200
Crom04	24656044	Manes.04G113700	Crom05	16106726	Manes.05G130900
Crom04	24671906	Manes.04G113900	Crom05	17606366	Manes.05G133200
Crom04	24679481	Manes.04G114100	Crom05	17834882	Manes.05G133600
Crom04	24696760	Manes.04G114500	Crom05	17912884	Manes.05G134800
Crom04	24696786	Manes.04G114500	Crom05	18016329	Manes.05G135300
Crom04	24696788	Manes.04G114500	Crom05	20558946	Manes.05G144200
Crom04	24939868	Manes.04G118300	Crom05	20558982	Manes.05G144200
Crom04	24989327	Manes.04G119200	Crom05	20664442	Manes.05G144900
Crom04	24989341	Manes.04G119200	Crom05	20665300	Manes.05G144900
Crom04	24989362	Manes.04G119200	Crom05	20967688	Manes.05G147900
Crom04	26113713	Manes.04G131900	Crom05	21118825	Manes.05G148900
Crom04	26129255	Manes.04G132400	Crom05	21161898	Manes.05G149200
Crom04	26205610	Manes.04G133400	Crom05	21495922	Manes.05G151200



Continuación anexo E: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>	<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>
Crom06	1183899	Manes.06G007300	Crom07	23367237	Manes.07G104800
Crom06	1242335	Manes.06G007900	Crom07	23511289	Manes.07G105800
Crom06	1340813	Manes.06G008600	Crom07	23816656	Manes.07G109600
Crom06	1340814	Manes.06G008600	Crom07	23816672	Manes.07G109600
Crom06	2276520	Manes.06G015000	Crom07	23816674	Manes.07G109600
Crom06	2276542	Manes.06G015000	Crom07	23816682	Manes.07G109600
Crom06	17716339	Manes.06G064400	Crom07	23816683	Manes.07G109600
Crom06	17716377	Manes.06G064400	Crom07	23957822	Manes.07G111000
Crom06	17716410	Manes.06G064400	Crom07	23957823	Manes.07G111000
Crom06	17753513	Manes.06G064800	Crom07	23957824	Manes.07G111000
Crom06	22520607	Manes.06G116900	Crom07	23957825	Manes.07G111000
Crom07	4381147	Manes.07G043500	Crom07	23957826	Manes.07G111000
Crom07	6909268	Manes.07G058500	Crom07	24722532	Manes.07G119500
Crom07	6909289	Manes.07G058500	Crom07	24722623	Manes.07G119500
Crom07	14407687	Manes.07G073500	Crom07	24722624	Manes.07G119500
Crom07	15300261	Manes.07G075900	Crom07	24722634	Manes.07G119500
Crom07	15300272	Manes.07G075900	Crom07	24798474	Manes.07G120700
Crom07	15876201	Manes.07G076400	Crom07	24890581	Manes.07G122000
Crom07	15876224	Manes.07G076400	Crom07	24890599	Manes.07G122000
Crom07	15876246	Manes.07G076400	Crom07	24890627	Manes.07G122000
Crom07	15876261	Manes.07G076400	Crom08	94356	Manes.08G000900
Crom07	16476443	Manes.07G077300	Crom08	165525	Manes.08G001600
Crom07	17323975	Manes.07G078000	Crom08	228362	Manes.08G002100
Crom07	17702703	Manes.07G078500	Crom08	301603	Manes.08G002800
Crom07	17841223	Manes.07G079500	Crom08	497120	Manes.08G006400
Crom07	17880776	Manes.07G080000	Crom08	573408	Manes.08G007900
Crom07	20893598	Manes.07G089000	Crom08	583475	Manes.08G008000
Crom07	22394053	Manes.07G097600	Crom08	760411	Manes.08G010600
Crom07	22843794	Manes.07G100500	Crom08	866032	Manes.08G011900
Crom07	22916475	Manes.07G101100	Crom08	941910	Manes.08G013200
Crom07	23283507	Manes.07G103900	Crom08	941926	Manes.08G013200
Crom07	23283508	Manes.07G103900	Crom08	941948	Manes.08G013200
Crom07	23321062	Manes.07G104400	Crom08	1339756	Manes.08G014800
Crom07	23358817	Manes.07G104700	Crom08	1346348	Manes.08G014800
Crom07	23358862	Manes.07G104700	Crom08	1921090	Manes.08G020600
Crom07	23367014	Manes.07G104800	Crom08	2396834	Manes.08G026600
Crom07	23367050	Manes.07G104800	Crom08	2613422	Manes.08G029100

Continuación anexo E: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>	<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>
Crom08	2613489	Manes.08G029100	Crom08	24679842	Manes.08G094400
Crom08	2655580	Manes.08G029400	Crom08	24985822	Manes.08G095200
Crom08	2863279	Manes.08G031900	Crom08	26347289	Manes.08G101200
Crom08	2956591	Manes.08G033000	Crom08	26366757	Manes.08G101400
Crom08	3896169	Manes.08G042400	Crom08	26602250	Manes.08G102000
Crom08	3896207	Manes.08G042400	Crom08	26602263	Manes.08G102000
Crom08	3914533	Manes.08G042700	Crom08	26692380	Manes.08G102400
Crom08	3914545	Manes.08G042700	Crom08	27961456	Manes.08G114600
Crom08	3996756	Manes.08G043300	Crom08	28230180	Manes.08G116900
Crom08	4284450	Manes.08G045800	Crom08	28254474	Manes.08G117300
Crom08	4284469	Manes.08G045800	Crom08	29039447	Manes.08G125200
Crom08	4284516	Manes.08G045800	Crom08	29290788	Manes.08G127200
Crom08	5155647	Manes.08G051700	Crom08	29290814	Manes.08G127200
Crom08	5595893	Manes.08G054800	Crom08	29937397	Manes.08G132300
Crom08	7389204	Manes.08G061600	Crom08	30650918	Manes.08G141000
Crom08	9142047	Manes.08G066800	Crom08	30650954	Manes.08G141000
Crom08	9142052	Manes.08G066800	Crom08	30984000	Manes.08G144400
Crom08	9142069	Manes.08G066800	Crom08	31789102	Manes.08G153900
Crom08	9142105	Manes.08G066800	Crom08	33211662	Manes.08G172300
Crom08	11656320	Manes.08G072300	Crom08	33846655	Manes.08G174400
Crom08	11997506	Manes.08G072800	Crom08	33846664	Manes.08G174400
Crom08	12064747	Manes.08G072900	Crom09	2838421	Manes.09G019100
Crom08	14117855	Manes.08G076500	Crom09	3185453	Manes.09G021400
Crom08	15944702	Manes.08G078500	Crom09	3807633	Manes.09G025400
Crom08	19139819	Manes.08G082000	Crom09	5824687	Manes.09G043100
Crom08	19139864	Manes.08G082000	Crom09	6111583	Manes.09G045800
Crom08	19356222	Manes.08G082200	Crom09	6590951	Manes.09G048700
Crom08	21814032	Manes.08G087700	Crom09	6590959	Manes.09G048700
Crom08	21814036	Manes.08G087700	Crom09	6590978	Manes.09G048700
Crom08	23694607	Manes.08G091200	Crom09	7888819	Manes.09G059200
Crom08	24051909	Manes.08G092500	Crom09	17927215	Manes.09G088200
Crom08	24366049	Manes.08G093100	Crom09	21935189	Manes.09G100000
Crom08	24393390	Manes.08G093200	Crom09	22032094	Manes.09G101300
Crom08	24679796	Manes.08G094400	Crom09	24332523	Manes.09G120000
Crom08	24679799	Manes.08G094400	Crom09	26454241	Manes.09G147200
Crom08	24679821	Manes.08G094400	Crom09	28853375	Manes.09G180400
Crom08	24679839	Manes.08G094400	Crom09	28853390	Manes.09G180400

Continuación anexo E: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>	<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>
Crom09	28853418	Manes.09G180400	Crom11	13170016	Manes.11G090000
Crom09	29016382	Manes.09G183400	Crom11	13206618	Manes.11G090100
Crom10	1000437	Manes.10G012700	Crom11	13206619	Manes.11G090100
Crom10	1204120	Manes.10G015600	Crom11	16329087	Manes.11G097800
Crom10	1204257	Manes.10G015600	Crom11	22322171	Manes.11G117600
Crom10	5911149	Manes.10G054100	Crom12	1045184	Manes.12G012500
Crom10	6095171	Manes.10G054700	Crom12	1048062	Manes.12G012500
Crom10	7324427	Manes.10G058200	Crom12	1129738	Manes.12G013600
Crom10	9565875	Manes.10G068000	Crom12	1536963	Manes.12G020100
Crom10	15981851	Manes.10G082000	Crom12	1536989	Manes.12G020100
Crom10	17104319	Manes.10G083900	Crom12	1601489	Manes.12G021100
Crom10	18832757	Manes.10G090600	Crom12	1709505	Manes.12G022900
Crom10	18914194	Manes.10G091300	Crom12	1709535	Manes.12G022900
Crom10	18923970	Manes.10G091400	Crom12	1940140	Manes.12G025300
Crom10	18923981	Manes.10G091400	Crom12	2338298	Manes.12G030300
Crom10	19108442	Manes.10G092300	Crom12	5930908	Manes.12G064400
Crom10	20024826	Manes.10G098900	Crom12	8809134	Manes.12G079200
Crom10	20518319	Manes.10G104400	Crom12	9818771	Manes.12G082100
Crom10	21662155	Manes.10G110000	Crom12	15356349	Manes.12G094300
Crom10	21668380	Manes.10G110100	Crom12	15356359	Manes.12G094300
Crom10	22296749	Manes.10G113600	Crom12	15359091	Manes.12G094300
Crom11	785544	Manes.11G007300	Crom12	15359148	Manes.12G094300
Crom11	785610	Manes.11G007300	Crom12	15633619	Manes.12G094400
Crom11	973377	Manes.11G009200	Crom12	15633639	Manes.12G094400
Crom11	1052088	Manes.11G010500	Crom12	15633660	Manes.12G094400
Crom11	1102072	Manes.11G011000	Crom12	15889997	Manes.12G094600
Crom11	1102082	Manes.11G011000	Crom12	17971981	Manes.12G096700
Crom11	1102126	Manes.11G011000	Crom12	17972030	Manes.12G096700
Crom11	1102140	Manes.11G011000	Crom12	18009273	Manes.12G096700
Crom11	1102150	Manes.11G011000	Crom12	18100224	Manes.12G096800
Crom11	2772218	Manes.11G033200	Crom12	18100252	Manes.12G096800
Crom11	3307345	Manes.11G039000	Crom12	18100292	Manes.12G096800
Crom11	4328595	Manes.11G047700	Crom12	18841878	Manes.12G097500
Crom11	6398437	Manes.11G062800	Crom12	19264962	Manes.12G098000
Crom11	6399232	Manes.11G062900	Crom12	19409782	Manes.12G098300
Crom11	6399245	Manes.11G062900	Crom12	19414055	Manes.12G098300
Crom11	12954620	Manes.11G089200	Crom12	19482663	Manes.12G098600

Continuación anexo E: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>	<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>
Crom12	19500941	Manes.12G098600	Crom13	25436348	Manes.13G127800
Crom12	19500944	Manes.12G098600	Crom13	25546898	Manes.13G128100
Crom12	19583921	Manes.12G098700	Crom13	25588756	Manes.13G128700
Crom12	19583929	Manes.12G098700	Crom13	25626618	Manes.13G129000
Crom12	19583938	Manes.12G098700	Crom13	25626637	Manes.13G129000
Crom12	20390361	Manes.12G100100	Crom13	25635999	Manes.13G129100
Crom12	20390367	Manes.12G100100	Crom13	26372060	Manes.13G136000
Crom12	20390373	Manes.12G100100	Crom13	26392715	Manes.13G136200
Crom12	20886772	Manes.12G100700	Crom13	26392761	Manes.13G136200
Crom12	21073441	Manes.12G101400	Crom13	26468823	Manes.13G137300
Crom12	21147094	Manes.12G101600	Crom13	26541538	Manes.13G137800
Crom12	21150371	Manes.12G101600	Crom14	2581941	Manes.14G031400
Crom12	21199825	Manes.12G101800	Crom14	2581942	Manes.14G031400
Crom12	21199841	Manes.12G101800	Crom14	2683307	Manes.14G032600
Crom12	21199902	Manes.12G101800	Crom14	2683309	Manes.14G032600
Crom12	21272697	Manes.12G102000	Crom14	3032285	Manes.14G038300
Crom12	21536451	Manes.12G102300	Crom14	3056166	Manes.14G038400
Crom12	21536631	Manes.12G102300	Crom14	3165321	Manes.14G040500
Crom12	21536639	Manes.12G102300	Crom14	3675759	Manes.14G046000
Crom12	21536661	Manes.12G102300	Crom14	3675760	Manes.14G046000
Crom12	21536671	Manes.12G102300	Crom14	3675761	Manes.14G046000
Crom12	21781695	Manes.12G102600	Crom14	3675784	Manes.14G046000
Crom12	22000070	Manes.12G102700	Crom14	3913470	Manes.14G048900
Crom12	22516928	Manes.12G103100	Crom14	3942405	Manes.14G049500
Crom12	22631747	Manes.12G103200	Crom14	4359533	Manes.14G055300
Crom12	23110863	Manes.12G104200	Crom14	4488144	Manes.14G057900
Crom12	23110933	Manes.12G104200	Crom14	4704089	Manes.14G058500
Crom12	23532685	Manes.12G105100	Crom14	5603993	Manes.14G068800
Crom13	889916	Manes.13G009200	Crom14	5671838	Manes.14G069200
Crom13	889918	Manes.13G009200	Crom14	5679179	Manes.14G069300
Crom13	889922	Manes.13G009200	Crom14	5741220	Manes.14G070200
Crom13	1364294	Manes.13G013700	Crom14	5932552	Manes.14G073400
Crom13	3321369	Manes.13G036000	Crom14	6333221	Manes.14G077800
Crom13	4737654	Manes.13G043400	Crom14	6374169	Manes.14G078500
Crom13	15058965	Manes.13G086800	Crom14	6374998	Manes.14G078500
Crom13	25345100	Manes.13G126700	Crom14	6375042	Manes.14G078500
Crom13	25405399	Manes.13G126700	Crom14	6391992	Manes.14G079000

Continuación anexo E: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>	<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>
Crom14	6462829	Manes.14G080200	Crom14	8730012	Manes.14G107600
Crom14	6523549	Manes.14G080700	Crom14	8747821	Manes.14G107800
Crom14	6530529	Manes.14G080700	Crom14	8747890	Manes.14G107800
Crom14	6594366	Manes.14G081600	Crom14	8747891	Manes.14G107800
Crom14	6596549	Manes.14G081600	Crom14	8747951	Manes.14G107800
Crom14	6634126	Manes.14G082200	Crom14	8824062	Manes.14G108600
Crom14	6659005	Manes.14G082400	Crom14	8829770	Manes.14G108800
Crom14	6679556	Manes.14G082600	Crom14	8829801	Manes.14G108800
Crom14	6695383	Manes.14G082900	Crom14	8829823	Manes.14G108800
Crom14	6700666	Manes.14G083000	Crom14	8829866	Manes.14G108800
Crom14	6700695	Manes.14G083000	Crom14	8856583	Manes.14G108900
Crom14	7252263	Manes.14G090100	Crom14	8884329	Manes.14G109200
Crom14	7256276	Manes.14G090200	Crom14	8884332	Manes.14G109200
Crom14	7256293	Manes.14G090200	Crom14	8884338	Manes.14G109200
Crom14	7748085	Manes.14G095900	Crom14	8888903	Manes.14G109200
Crom14	7748112	Manes.14G095900	Crom14	8900717	Manes.14G109300
Crom14	7748141	Manes.14G095900	Crom14	8907290	Manes.14G109500
Crom14	7750523	Manes.14G095900	Crom14	8966452	Manes.14G109900
Crom14	7819351	Manes.14G096800	Crom14	8966486	Manes.14G109900
Crom14	7819358	Manes.14G096800	Crom14	8986688	Manes.14G110300
Crom14	7873013	Manes.14G097400	Crom14	9126037	Manes.14G111200
Crom14	7901748	Manes.14G097900	Crom14	9129216	Manes.14G111200
Crom14	7906355	Manes.14G097900	Crom14	9297378	Manes.14G111400
Crom14	7906414	Manes.14G097900	Crom14	9486323	Manes.14G112600
Crom14	8428885	Manes.14G104000	Crom14	9486467	Manes.14G112600
Crom14	8464497	Manes.14G104500	Crom14	10275723	Manes.14G117200
Crom14	8507297	Manes.14G104900	Crom14	10416793	Manes.14G118300
Crom14	8572064	Manes.14G105500	Crom14	10483984	Manes.14G118800
Crom14	8578599	Manes.14G105600	Crom14	10529546	Manes.14G119300
Crom14	8594163	Manes.14G105700	Crom14	10568355	Manes.14G119800
Crom14	8594235	Manes.14G105700	Crom14	10629702	Manes.14G120300
Crom14	8603538	Manes.14G105800	Crom14	10638648	Manes.14G120500
Crom14	8674131	Manes.14G106500	Crom14	10686263	Manes.14G121100
Crom14	8692003	Manes.14G107000	Crom14	10686303	Manes.14G121100
Crom14	8702493	Manes.14G107200	Crom14	10706940	Manes.14G121300
Crom14	8729982	Manes.14G107600	Crom14	10800365	Manes.14G122000
Crom14	8729983	Manes.14G107600	Crom14	10923459	Manes.14G123000

Continuación anexo E: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>	<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>
Crom14	8730012	Manes.14G107600	Crom14	8730012	Manes.14G107600
Crom14	8747821	Manes.14G107800	Crom14	8747821	Manes.14G107800
Crom14	8747890	Manes.14G107800	Crom14	8747890	Manes.14G107800
Crom14	8747891	Manes.14G107800	Crom14	8747891	Manes.14G107800
Crom14	8747951	Manes.14G107800	Crom14	8747951	Manes.14G107800
Crom14	8824062	Manes.14G108600	Crom14	8824062	Manes.14G108600
Crom14	8829770	Manes.14G108800	Crom14	8829770	Manes.14G108800
Crom14	8829801	Manes.14G108800	Crom14	8829801	Manes.14G108800
Crom14	8829823	Manes.14G108800	Crom14	8829823	Manes.14G108800
Crom14	8829866	Manes.14G108800	Crom14	8829866	Manes.14G108800
Crom14	8856583	Manes.14G108900	Crom14	8856583	Manes.14G108900
Crom14	8884329	Manes.14G109200	Crom14	8884329	Manes.14G109200
Crom14	8884332	Manes.14G109200	Crom14	8884332	Manes.14G109200
Crom14	8884338	Manes.14G109200	Crom14	8884338	Manes.14G109200
Crom14	8888903	Manes.14G109200	Crom14	8888903	Manes.14G109200
Crom14	8900717	Manes.14G109300	Crom14	8900717	Manes.14G109300
Crom14	8907290	Manes.14G109500	Crom14	8907290	Manes.14G109500
Crom14	8966452	Manes.14G109900	Crom14	8966452	Manes.14G109900
Crom14	8966486	Manes.14G109900	Crom14	8966486	Manes.14G109900
Crom14	8986688	Manes.14G110300	Crom14	8986688	Manes.14G110300
Crom14	9126037	Manes.14G111200	Crom14	9126037	Manes.14G111200
Crom14	9129216	Manes.14G111200	Crom14	9129216	Manes.14G111200
Crom14	9297378	Manes.14G111400	Crom14	9297378	Manes.14G111400
Crom14	9486323	Manes.14G112600	Crom14	9486323	Manes.14G112600
Crom14	9486467	Manes.14G112600	Crom14	9486467	Manes.14G112600
Crom14	10275723	Manes.14G117200	Crom14	10275723	Manes.14G117200
Crom14	10416793	Manes.14G118300	Crom14	10416793	Manes.14G118300
Crom14	10483984	Manes.14G118800	Crom14	10483984	Manes.14G118800
Crom14	10529546	Manes.14G119300	Crom14	10529546	Manes.14G119300
Crom14	10568355	Manes.14G119800	Crom14	10568355	Manes.14G119800
Crom14	10629702	Manes.14G120300	Crom14	10629702	Manes.14G120300
Crom14	10638648	Manes.14G120500	Crom14	10638648	Manes.14G120500
Crom14	10686263	Manes.14G121100	Crom14	10686263	Manes.14G121100
Crom14	10686303	Manes.14G121100	Crom14	10686303	Manes.14G121100
Crom14	10706940	Manes.14G121300	Crom14	10706940	Manes.14G121300
Crom14	10800365	Manes.14G122000	Crom14	10800365	Manes.14G122000
Crom14	10923459	Manes.14G123000	Crom14	10923459	Manes.14G123000

Continuación anexo E: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>	<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>
Crom14	10996058	Manes.14G134600	Crom14	11632431	Manes.14G130800
Crom14	11018750	Manes.14G123900	Crom14	11664455	Manes.14G131400
Crom14	11018802	Manes.14G123900	Crom14	11664461	Manes.14G131400
Crom14	11040585	Manes.14G124100	Crom14	11672305	Manes.14G131500
Crom14	11042945	Manes.14G124100	Crom14	11685606	Manes.14G131800
Crom14	11054384	Manes.14G124200	Crom14	11685620	Manes.14G131800
Crom14	11152054	Manes.14G125300	Crom14	11688265	Manes.14G131800
Crom14	11183390	Manes.14G125700	Crom14	11688273	Manes.14G131800
Crom14	11183394	Manes.14G125700	Crom14	11706900	Manes.14G132000
Crom14	11187213	Manes.14G125700	Crom14	11706921	Manes.14G132000
Crom14	11197620	Manes.14G125900	Crom14	11706927	Manes.14G132000
Crom14	11197645	Manes.14G125900	Crom14	11714420	Manes.14G132200
Crom14	11197676	Manes.14G125900	Crom14	11714431	Manes.14G132200
Crom14	11198115	Manes.14G125900	Crom14	11714434	Manes.14G132202
Crom14	11198145	Manes.14G125900	Crom14	11742050	Manes.14G132600
Crom14	11198307	Manes.14G125900	Crom14	11742090	Manes.14G132600
Crom14	11198385	Manes.14G125900	Crom14	11950123	Manes.14G134300
Crom14	11204349	Manes.14G126000	Crom14	11950146	Manes.14G134300
Crom14	11276201	Manes.14G126800	Crom14	11950161	Manes.14G134300
Crom14	11280552	Manes.14G126900	Crom14	12005295	Manes.14G134600
Crom14	11334649	Manes.14G127300	Crom14	12011923	Manes.14G134700
Crom14	11334664	Manes.14G127300	Crom14	12011956	Manes.14G134700
Crom14	11399454	Manes.14G127700	Crom14	12096463	Manes.14G136200
Crom14	11412382	Manes.14G128100	Crom14	12159209	Manes.14G136600
Crom14	11419502	Manes.14G128200	Crom14	12179465	Manes.14G136800
Crom14	11442459	Manes.14G128600	Crom14	12682866	Manes.14G141100
Crom14	11485770	Manes.14G129000	Crom14	12705711	Manes.14G141400
Crom14	11491920	Manes.14G129000	Crom14	15375716	Manes.14G151100
Crom14	11537407	Manes.14G129500	Crom14	16100730	Manes.14G152300
Crom14	11537448	Manes.14G129500	Crom14	16100745	Manes.14G152300
Crom14	11538682	Manes.14G129500	Crom14	16100877	Manes.14G152300
Crom14	11550492	Manes.14G129600	Crom14	16191876	Manes.14G152600
Crom14	11550498	Manes.14G129600	Crom14	16243742	Manes.14G152800
Crom14	11550588	Manes.14G129600	Crom14	16243788	Manes.14G152800
Crom14	11586652	Manes.14G130100	Crom14	16301249	Manes.14G153400
Crom14	11594525	Manes.14G130300	Crom14	16366938	Manes.14G153600
Crom14	11614567	Manes.14G130500	Crom14	16411156	Manes.14G153800

Continuación anexo E: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>	<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>
Crom14	16411189	Manes.14G153800	Crom14	20017300	Manes.14G160800
Crom14	16470876	Manes.14G154000	Crom14	20052857	Manes.14G161100
Crom14	16470913	Manes.14G154000	Crom14	20186199	Manes.14G161500
Crom14	16477599	Manes.14G154000	Crom14	20186202	Manes.14G161500
Crom14	16503115	Manes.14G154000	Crom14	20186226	Manes.14G161500
Crom14	16534300	Manes.14G154000	Crom14	20186238	Manes.14G161500
Crom14	16562214	Manes.14G154000	Crom14	20734919	Manes.14G162100
Crom14	16562224	Manes.14G154000	Crom14	21063543	Manes.14G162900
Crom14	16562338	Manes.14G154000	Crom14	21176427	Manes.14G163100
Crom14	16642079	Manes.14G154100	Crom14	21176480	Manes.14G163100
Crom14	17179769	Manes.14G154800	Crom14	21217488	Manes.14G163200
Crom14	17322503	Manes.14G155000	Crom14	21217547	Manes.14G163200
Crom14	17376863	Manes.14G155100	Crom14	21217559	Manes.14G163200
Crom14	17376913	Manes.14G155100	Crom14	21286195	Manes.14G163400
Crom14	17500360	Manes.14G155500	Crom14	21286204	Manes.14G163400
Crom14	17500420	Manes.14G155500	Crom14	21313915	Manes.14G163500
Crom14	17500460	Manes.14G155500	Crom14	21313982	Manes.14G163500
Crom14	17523064	Manes.14G155500	Crom14	21320427	Manes.14G163500
Crom14	17742211	Manes.14G156000	Crom14	21320431	Manes.14G163500
Crom14	17798285	Manes.14G156200	Crom14	21343787	Manes.14G163600
Crom14	17802022	Manes.14G156300	Crom14	21382050	Manes.14G163700
Crom14	17802055	Manes.14G156300	Crom14	22603966	Manes.14G167000
Crom14	17802108	Manes.14G156300	Crom14	22603980	Manes.14G167000
Crom14	17802115	Manes.14G156300	Crom14	22724247	Manes.14G167500
Crom14	18293833	Manes.14G157500	Crom14	23456453	Manes.14G169900
Crom14	18305419	Manes.14G157600	Crom15	5509784	Manes.15G075500
Crom14	18795842	Manes.14G158400	Crom15	5509839	Manes.15G075500
Crom14	18874295	Manes.14G158800	Crom15	6801036	Manes.15G092300
Crom14	18874323	Manes.14G158800	Crom15	6801071	Manes.15G092300
Crom14	19029046	Manes.14G159000	Crom15	7934797	Manes.15G105500
Crom14	19222659	Manes.14G159400	Crom15	11315901	Manes.15G145400
Crom14	19222967	Manes.14G159400	Crom15	12057648	Manes.15G153100
Crom14	19418319	Manes.14G159800	Crom15	13807424	Manes.15G169000
Crom14	19418369	Manes.14G159800	Crom15	15479967	Manes.15G175400
Crom14	19423827	Manes.14G159800	Crom15	15813109	Manes.15G175600
Crom14	19826573	Manes.14G160600	Crom15	16203710	Manes.15G176300
Crom14	20017299	Manes.14G160800	Crom15	19882349	Manes.15G182100



Continuación anexo E: Cromosoma, localización de SNP y gen correspondiente en las familias CPDCR1B y CPDCR5B

<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>	<b>Crom</b>	<b>Loc</b>	<b>Gen</b>
Crom16	1928735	Manes.16G019400	Crom16	27179316	Manes.16G118500
Crom16	1938223	Manes.16G019500	Crom16	27179350	Manes.16G118500
Crom16	1941988	Manes.16G019500	Crom16	27213298	Manes.16G118700
Crom16	3083003	Manes.16G029700	Crom16	27220597	Manes.16G118800
Crom16	3123317	Manes.16G029800	Crom16	27252534	Manes.16G119400
Crom16	3123363	Manes.16G029800	Crom16	27357669	Manes.16G121100
Crom16	3176666	Manes.16G030000	Crom16	27357676	Manes.16G121100
Crom16	3176697	Manes.16G030000	Crom16	27437342	Manes.16G122400
Crom16	8079168	Manes.16G048100	Crom16	27469344	Manes.16G122800
Crom16	8185245	Manes.16G048200	Crom16	27495547	Manes.16G123100
Crom16	24401356	Manes.16G086500	Crom16	27498167	Manes.16G123200
Crom16	24427817	Manes.16G087000	Crom16	27569018	Manes.16G124000
Crom16	24492308	Manes.16G087800	Crom16	27569023	Manes.16G124000
Crom16	24715358	Manes.16G090100	Crom16	27575466	Manes.16G124100
Crom16	24741442	Manes.16G090500	Crom16	27698353	Manes.16G125800
Crom16	24741505	Manes.16G090500	Crom17	1202380	Manes.17G005600
Crom16	25305590	Manes.16G097000	Crom17	1202388	Manes.17G005600
Crom16	25341546	Manes.16G097500	Crom17	24274809	Manes.17G101500
Crom16	25343879	Manes.16G097600	Crom17	25232931	Manes.17G112100
Crom16	26111329	Manes.16G105400	Crom17	25435951	Manes.17G113600
Crom16	26147287	Manes.16G105800	Crom17	25441940	Manes.17G113700
Crom16	26267278	Manes.16G106900	Crom18	1247414	Manes.18G015900
Crom16	26337851	Manes.16G107800	Crom18	1610370	Manes.18G020900
Crom16	26395985	Manes.16G108500	Crom18	1696255	Manes.18G021600
Crom16	26396034	Manes.16G108500	Crom18	2542241	Manes.18G027300
Crom16	26513433	Manes.16G109800	Crom18	4730019	Manes.18G056000
Crom16	26530589	Manes.16G110000	Crom18	5063481	Manes.18G058200
Crom16	26536255	Manes.16G110000	Crom18	5533653	Manes.18G063800
Crom16	26546905	Manes.16G110000	Crom18	5546042	Manes.18G064000
Crom16	26688884	Manes.16G111600	Crom18	5546060	Manes.18G064000
Crom16	26688960	Manes.16G111600	Crom18	5546086	Manes.18G064000
Crom16	26881640	Manes.16G113200	Crom18	5571629	Manes.18G064600
Crom16	27061196	Manes.16G116200	Crom18	5593698	Manes.18G064700
Crom16	27103868	Manes.16G116800	Crom18	5621423	Manes.18G065100
Crom16	27145081	Manes.16G117400	Crom18	9252848	Manes.18G104100
Crom16	27168937	Manes.16G118200	Crom18	9253219	Manes.18G104100
Crom16	27169139	Manes.16G118200	Crom18	9410230	Manes.18G104600
Crom16	27169141	Manes.16G118200	Crom18	9572368	Manes.18G105700



