

**LINEA BASE PARA LA TOMA DE DECISIONES EN BIOSEGURIDAD: DESARROLLO  
DE UN MODELO PARA LA EVALUACION DE FLUJO DE GENES EN YUCA**

***Luisa Forý***

***Alicia Velásquez,***

***Juan Guillermo Pérez***

***Sebastián Duque***

***Gerardo Gallego***

***Hernán Ceballos***

***Andy Jarvis***

***William Roca y Joe Tohme***



### **Programa de mejoramiento de yuca**

Fernando Calle  
Juan Carlos Pérez  
Nelson Morante  
Eusebio Ortega  
Jorge Lenis  
Manuel Quintero  
Eugenio Bolaños

### **Unidad de Biotecnología**

Paul Chavarriaga  
Roosevelt Escobar  
Carlos Dorado  
Tomás Agrón  
Fausto Rodríguez  
Myriam Duque  
Juan Cuasquer

### **ICESI**

Zaida Lentini

### **Recursos Genéticos**

Daniel Debouck  
Graciela Mafla

### **GIS-CIAT**

Edward Guevara  
Herlin Espinosa  
Julián Ramírez  
Silvia Castaño  
Carlos Nagles  
Johanes Signer

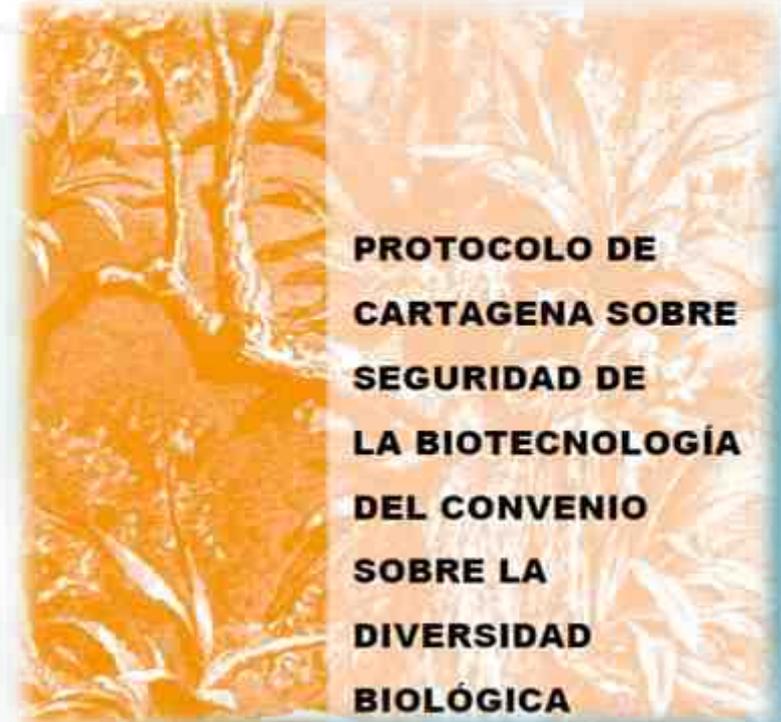
### **IvH (Instituto Alexander von Humboldt)**

Rodrigo Moreno  
Leonardo Bocanegra  
Carolina Villafañe  
Francisco Castro  
María Andrea Orjuela  
Lorena Torres  
Pedro Torrijos U. Magdalena

## Convenio de diversidad biológica

Adecuado movimiento transfronterizo de organismos vivos modificados (OVM) resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica

**EVALUACIÓN DEL RIESGO:** *posibles efectos adversos de OVM en la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica y en el probable medio receptor, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana*



**Ley 740 de 2002.** Por medio de la cual se aprueba el "Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica". **Decreto 4525 de 2005** por el cual se reglamenta la **Ley 740** de 2002

# EVALUACIÓN DEL RIESGO



Identificación del daño potencial.

Probabilidad de que esos efectos adversos ocurran realmente, teniendo en cuenta el nivel y el tipo de exposición al OVM

Evaluación de las consecuencias si esos efectos adversos ocurriesen realmente.

Recomendación sobre el nivel y manejo de riesgo con las medidas de bioseguridad



Determinación de estrategias para el manejo de esos posibles riesgos

(Análisis de ocurrencia beneficio / daño/ costo)

Medidas de bioseguridad. Plan de monitoreo

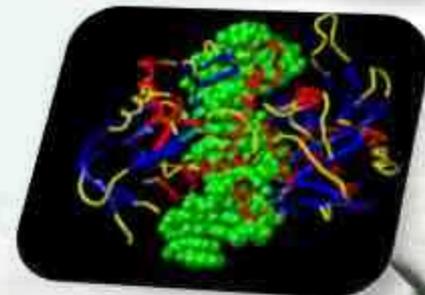
# Cual es la información necesaria?



Identidad taxonómica del OVM. Establecer si existen diferencias entre las características biológicas del OVM vs No OVM) aspectos agronómicos, sistemas de cultivo y post-cosecha.



Descripción del gen, la técnica utilizada, características del vector, origen de las secuencias insertadas, número de copias e integridad del mismo, estabilidad y niveles de expresión de la proteína, información conducente al monitoreo.



Centros de origen y centros de diversidad genética, distribución de parientes silvestres, razas criollas y especies relacionada, descripción de los hábitats, datos geográficos, climáticos y ecológicos.

Mapas de distribución real vs potencial.

Flujo génico e introgresión (caso por caso) en especies compatibles. Distancias mínima de aislamiento



# YUCA

## Silvestres

- 98 Especies (distribuidos entre Arizona y Argentina)

Tres especies silvestres  
Colombia

- 6.467 accesiones CIAT

Criollas=5.184

Silvestres=883

Mejoradas=400

## Transgénico

- Experimentación
- Contenido de carotenos
- Resistencia insectos
- Almidón modificado

## Producción (2012, FAO)

2.363.530 MT



## Origen

Todas las especies son altamente heterocigotas, presentan 36 cromosomas.

No existen barreras para el cruzamiento entre y dentro de diferentes especies

Híbridos entre *M. esculenta* y especies silvestres han sido observados (Nassar, 2008; Duputié *et al.* 2007).

***Manihot esculenta***  
**Cultivada**



*Manihot esculenta*  
*subsp. peruviana*



*Manihot esculenta subsp. flabellifolia*  
(estados de Mato Grosso, Rondonia y Acre  
Olsen y Schaal, Elias  
*et al.* 2000; Olsen 2004)

# Biología reproductiva y floración



Reproducción alogama y autogama.

Polinización por insectos

Flores masculinas y femeninas

Propagación de semilla sexual resulta en una amplia diversidad de fenotipos

Semilla botánica no es utilizada para la propagación comercial

Apomixis

Fruto es trilocular y madura después de la polinización de 1 a 3 meses



Dispersión por hormigas  
Largo periodo de dormancia



Remover flores antes de la floración, destrucción de plantas antes de la floración, cubrimiento de flores, distancia de aislamiento de 30 m

# Objetivos

1. Determinar la tasa de hibridación bajo condiciones controladas.
2. Evaluar la persistencia de plantas voluntarias durante todo el ciclo del cultivo de yuca.
3. Conocimiento de línea base. Registros de herbario, verificación de poblaciones silvestres, determinar zonas de coexistencia.
4. Conocimiento de la diversidad e identificación de marcadores para especies silvestres.



Generar estrategias de manejo de cultivo  
y guías operacionales para evitar  
minimizar el flujo de genes

## Objetivo 1: Determinar la tasa de hibridación bajo condiciones controladas



HMC1 = Alta floración

**Clon Waxy** : Mutación espontánea, bajo contenido de amilosa (Ceballos et al., 2007).

**Clon Androesteril** : Buena floración, no tiene polen viable. Buena calidad de almidón

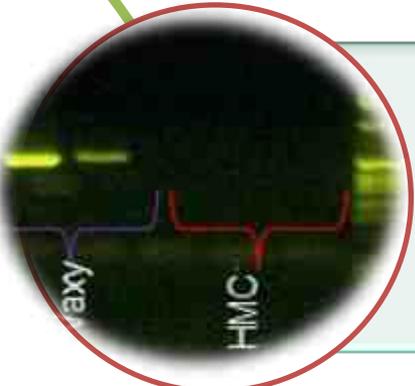


# **Objetivo 1: Determinar la tasa de hibridación bajo condiciones controladas**

Almidón

Amilopectina. Ramificada (70%) SS

Amilosa. Lineal (30%) GBSS1



**Desarrollo de marcadores  
GBSS1 (homocigotos y heterocigotos)**



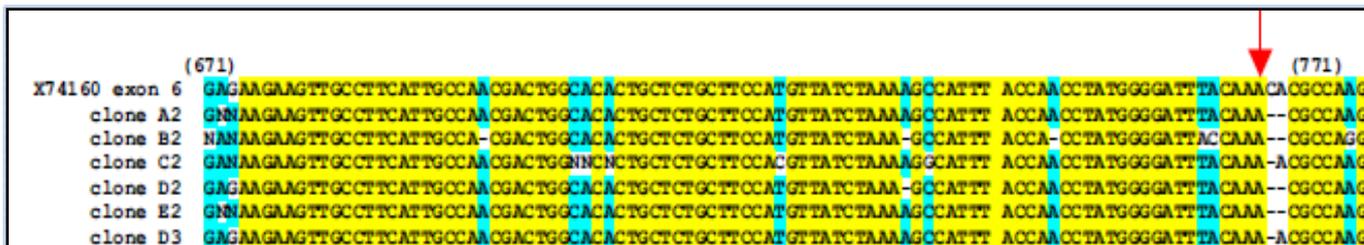
**Tasa de hibridación utilizando una línea libre  
amilosa y un clon androestéril**

No Waxy



Waxy

# Objetivo 1: Determinar la tasa de hibridación bajo condiciones controladas. Diseño de marcadores



Moreno et al. (2006)  
CIAT, 2006

Gen GBSSI: 608 aa

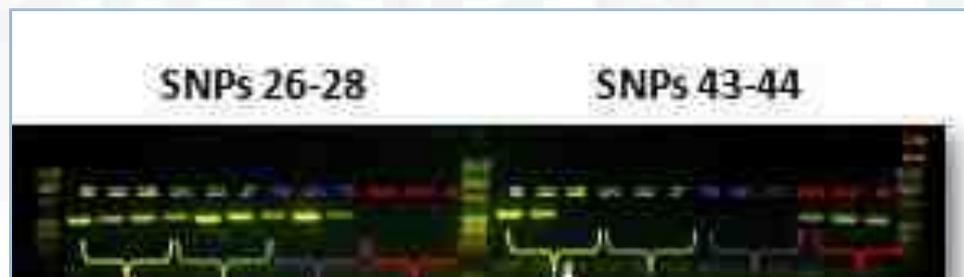
770Mb (18 ). 1,190  
SNP (Ferguson et al.  
2011)

SRR y SNPs están  
distribuidos a lo largo  
del genoma

Fenotipo	Nombre	Secuencia cebador izquierdo	Secuencia cebador derecho	Tamaño (bp)	Tm (°C)
Waxy	W 1	GCCATTTACCAACCTATGGGGAT TTACACAA	CACTCCTGGACGTCATGCCATTT	556	63
No waxy	W 2	AAAAGCCATTTACCAACCTATGG GGATTTACATAC	TCAATGTATTATCTGTAAACAGGA TTCCACTCC	587	63

Fory (2009)

	26-28	43-44
aa	+	-
AA	-	+
Aa	+	+



H. manuales Waxy Hmc1  
H. Naturales

Pérez (2012)



Tasa de hibridación  
SNPs, SSR: 7- 15 %;

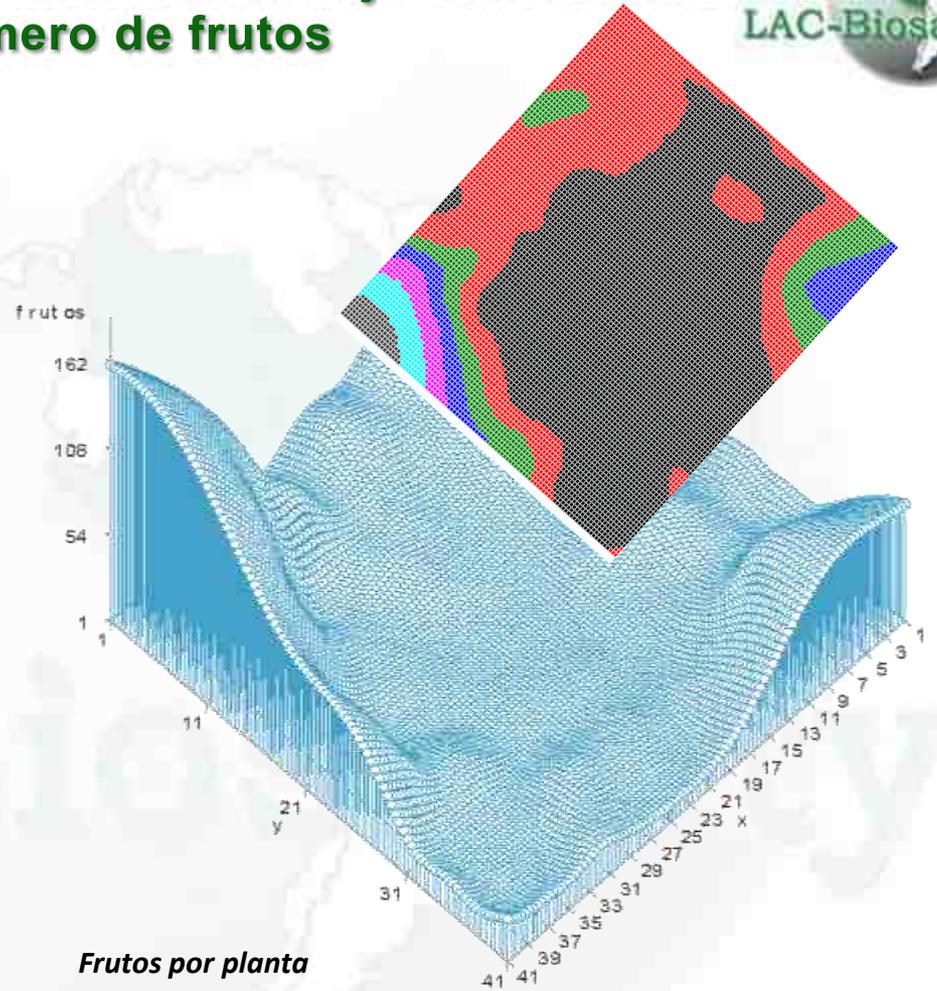


**SSR  
SNPs**



**SSR**

# Objetivo 1: Determinar la tasa de hibridación bajo condiciones controladas. Número de frutos

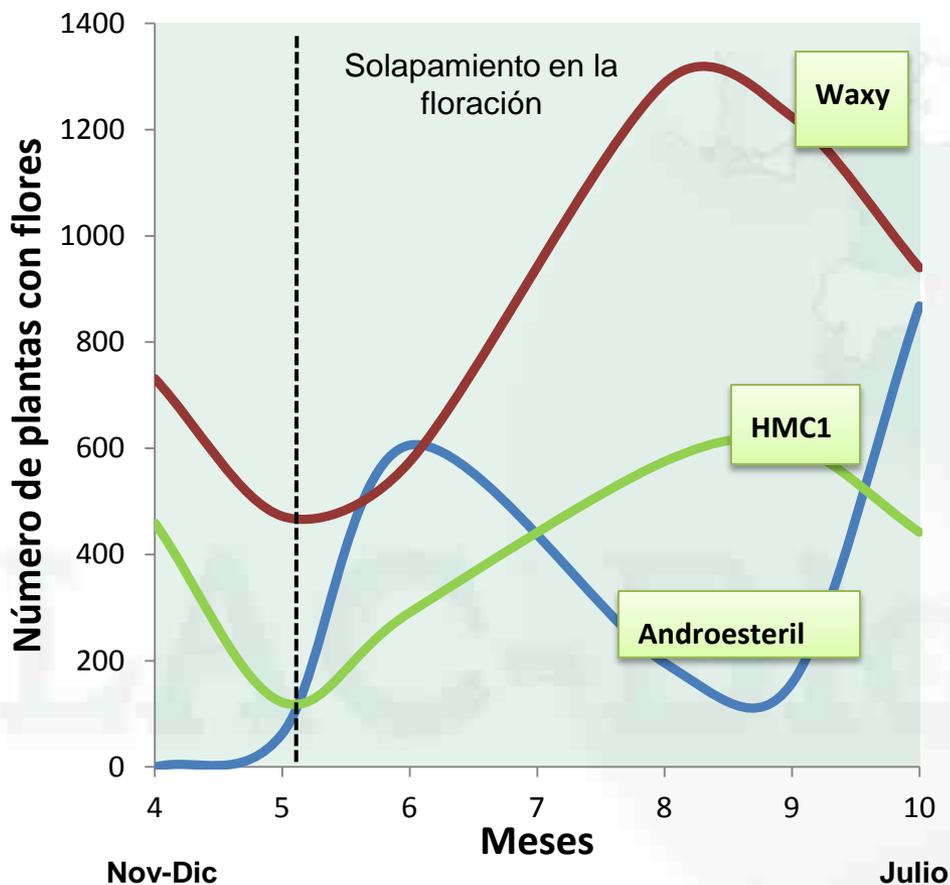


*Frutos por planta*

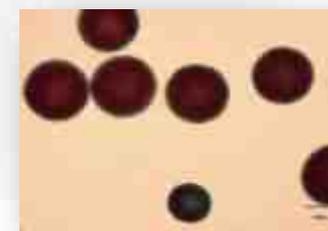
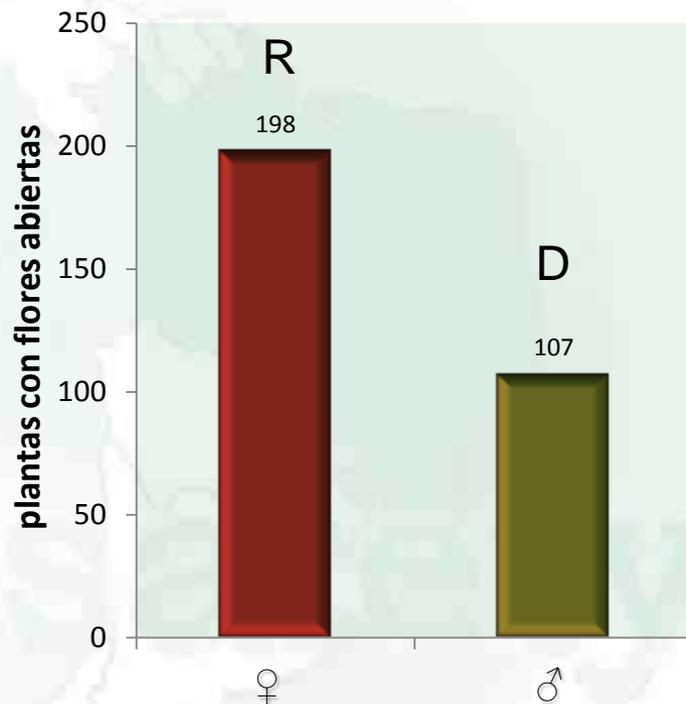
	9		57		106
	33		81		129
					154

Eventos de flujo a una distancia de 40 m.

# Objetivo 1: Determinar la tasa de hibridación bajo condiciones controladas. Fenología del cultivo (Plantas con Flores)

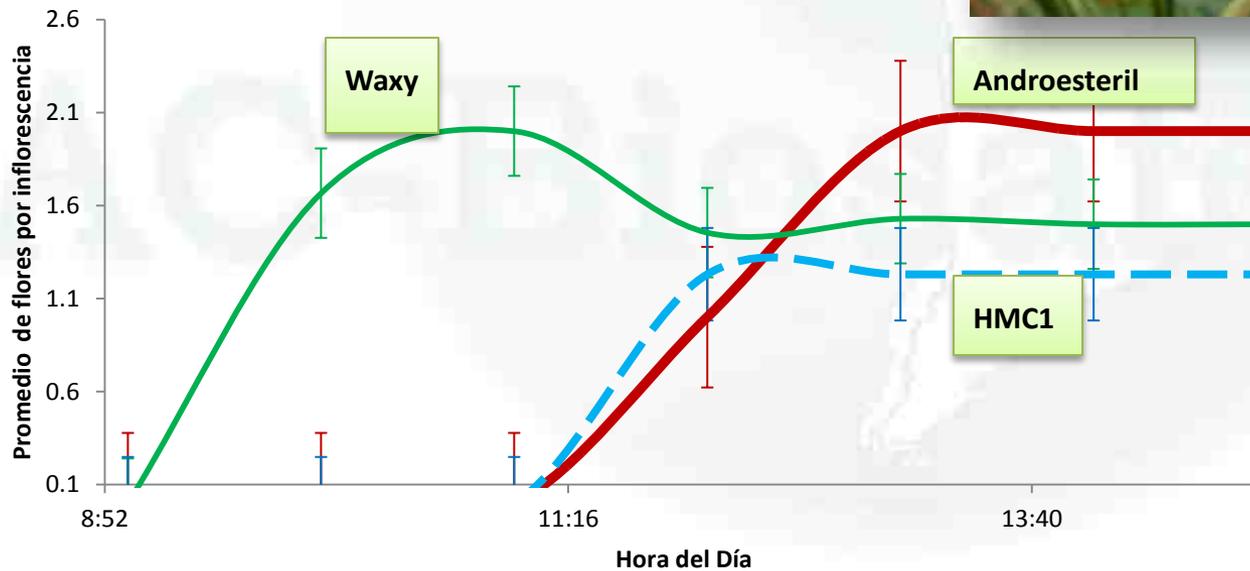


300-350 mm  
Promedio =120 mm

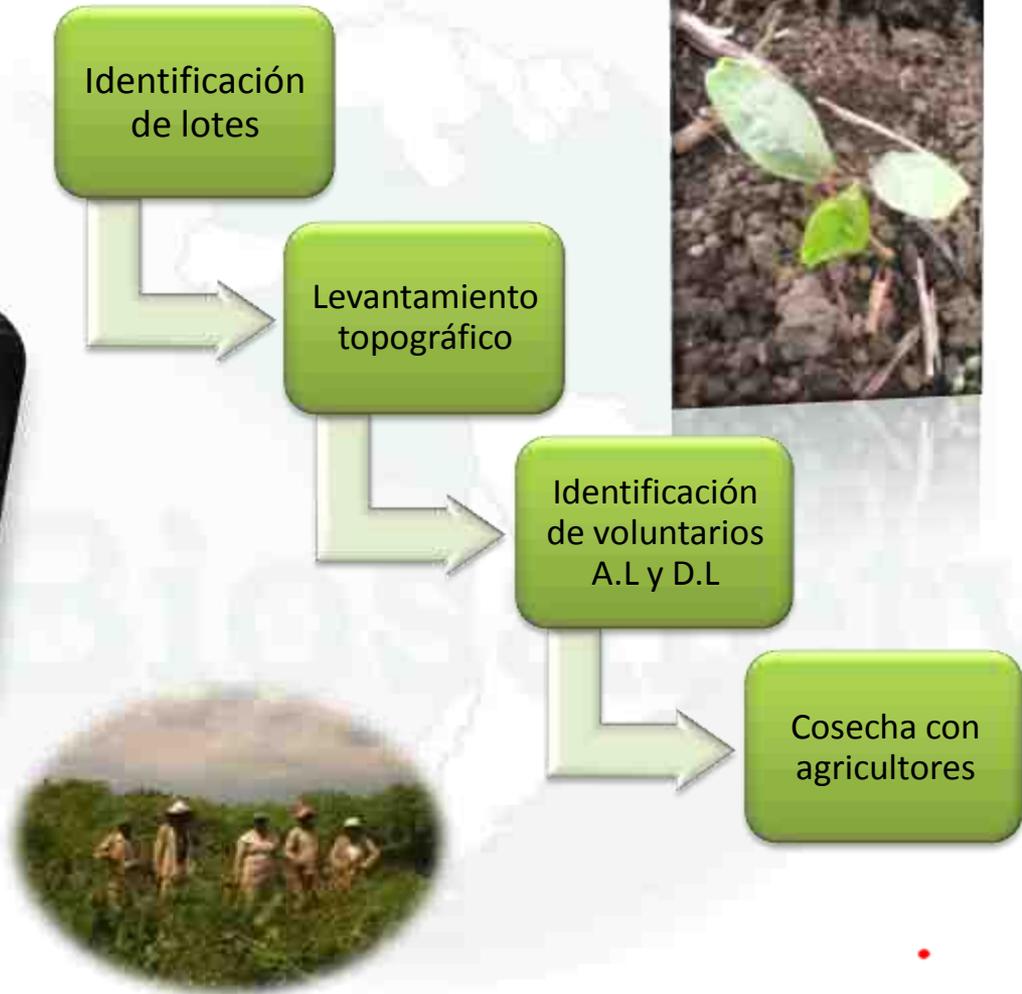


80 y 90%

# Objetivo 1: Determinar la tasa de hibridación bajo condiciones controladas. Apertura floral



## Objetivo 2: Evaluar la persistencia de plantas voluntarias (Plantas provenientes de semillas botánica)



CIAT- EMBRAPA

## Objetivo 2: Evaluar la persistencia de plantas voluntarias



**Bajo nivel de contaminación o presencia accidental por plantas voluntarias en lotes comerciales.**

## Objetivo 2: Evaluar la persistencia de plantas voluntarias

Municipio/Departamento	Área (Ha)	Plantas	#Voluntarios antes de limpieza	# Voluntarios al momento de la cosecha	# Voluntarios incorporados por el agricultor para el siguiente ciclo
Valle del Cauca	9.3	19285	512	95	2
Costa Atlántica	9,5	18784	29	1	0
Cauca	3,6	7019	8	1	0
<b>Total</b>	<b>22,4</b>	<b>45088</b>	<b>549</b>	<b>97</b>	<b>2</b>

# Conclusiones



**Identificación del daño potencial voluntarios.** Una tasa de adopción menor al 1% fue encontrada al evaluar 22.4 ha de cultivo comercial. Este resultado indica que el agricultor no selecciona las plantas voluntarias para la próxima cosecha.

**Probabilidad de ocurrencia:** Tasas entre 2 al 15 % fueron encontradas en la línea androestéril y en la línea sin amilosa. Registrándose eventos de flujo a una distancia de 40 m.

Identificamos marcadores asociados con el contenido de almidón, los cuales pueden ser utilizados para evaluaciones de flujo de genes

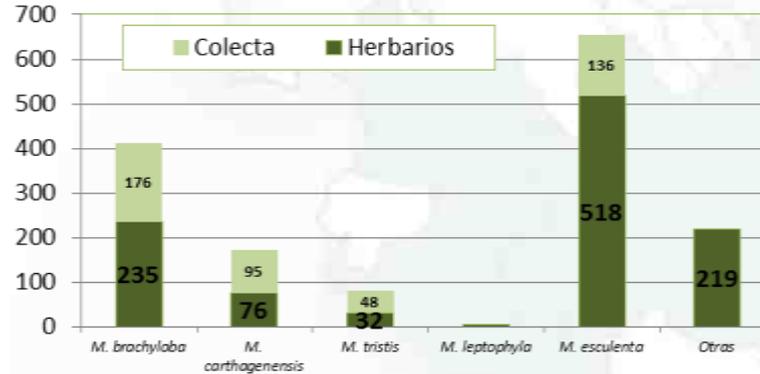
**Recomendación:** Se recomienda realizar este ensayo en diferentes condiciones ambientales con diferentes clones cultivados, incrementar la distancia de evaluación hasta 100 m. 30 metros no son suficientes

# **Objetivo 3. Conocimiento de línea base: Distribución potencial e identificación de áreas de coexistencia entre el cultivo de yuca y sus parientes silvestres**



# 1. Identificar y georeferenciar registros de *Manihot* colectados en Colombia.

## Visitas a herbarios, Jardines Botánicos y colectas.



**1470 registros  
(29 instituciones)**

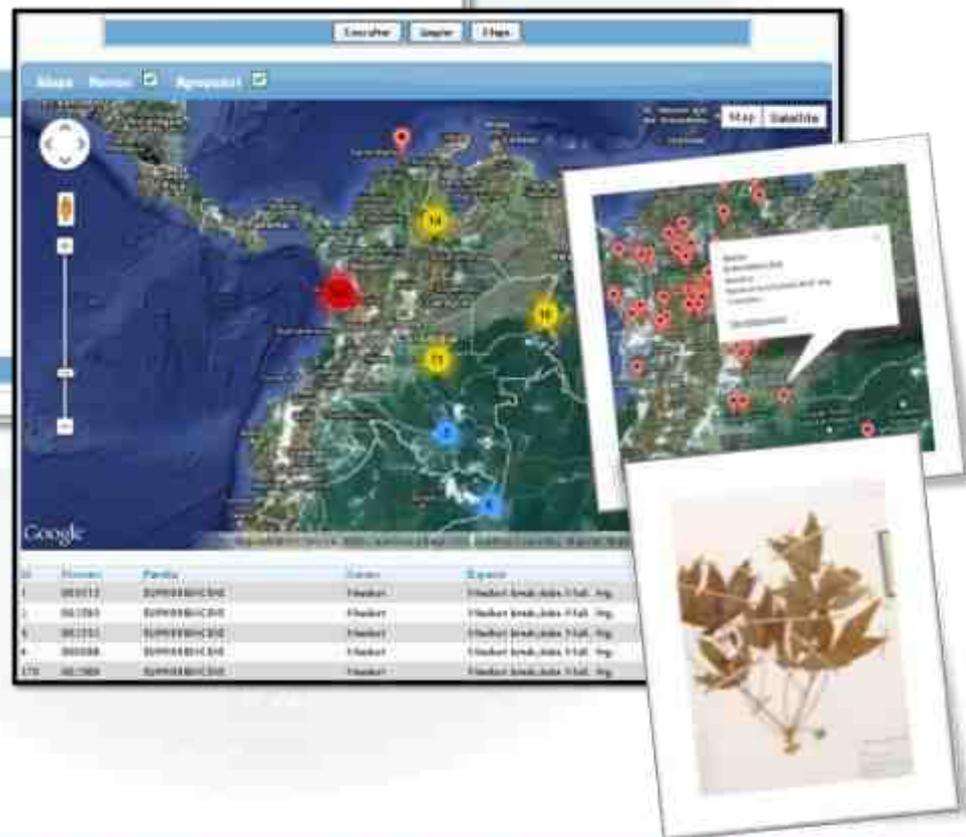
## Recuperación de información de registros de *Herbarios* y *Jardines Botánicos* para su Georeferenciación.



<http://spatanweb.ciat.cgiar.org:8008/biosafety/web/>

# Base de Datos Interactiva de Registros de *Manihot* para Colombia.

<http://spatanweb.ciat.cgiar.org:8008/biosafety/web/>



**1470 registros**

**405 fotos**

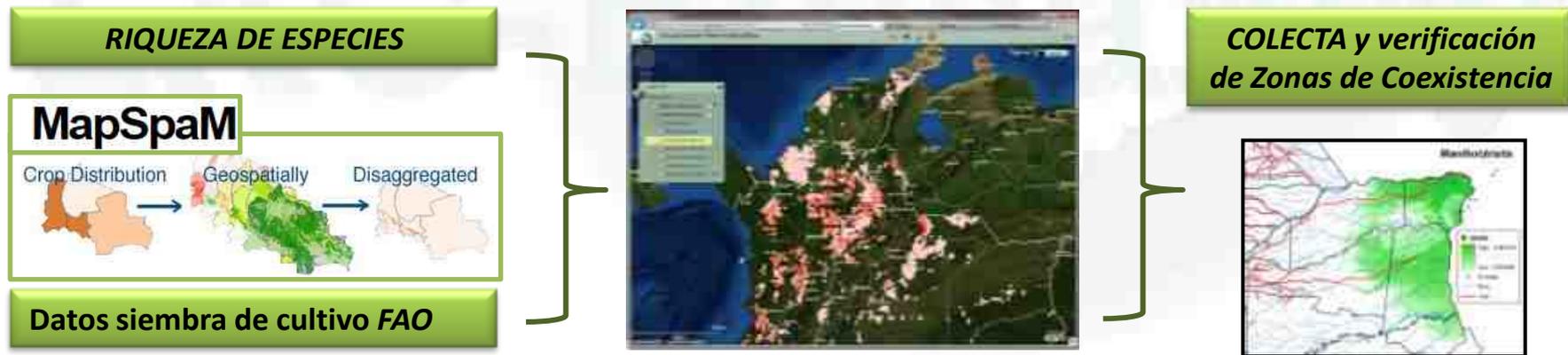
## 2. Mapas distribución potencial y zonas de coexistencia : *Manihot-EcoMap*

### Mapas de distribución potencial:



**MAXENT** Estimación de sitios potenciales de presencia , mediante el uso de variables climáticas y puntos de evidencia

### Mapas de coexistencia cultivo-silvestres de *Manihot*:



<http://spatanweb.ciat.cgiar.org/ManihotEcoMap/>

### 3. Salidas de Campo



Institución	Departamento	Municipio	Especie sugerida	Número de muestras
SINCHI	Amazonas	Leticia	<i>M. esculenta</i>	18
	Vaupés	Mitú	<i>M. esculenta</i>	55
IAvH-CIAT	Casanare	Orocué	<i>M. brachyloba</i>	1
		Sabanalarga	<i>M. esculenta</i>	41
	Vichada	Puerto Carreño	<i>M. brachyloba</i>	2
		Casuarito	<i>M. tristis</i>	7
		Santa Rita	<i>M. tristis</i>	41
	Caldas	Norcasia	<i>M. brachyloba</i>	16
		La Victoria	<i>M. brachyloba</i>	8
		La Dorada	<i>M. brachyloba</i>	15
				<i>M. brachyloba</i>
	Antioquia	San Francisco	<i>M. brachyloba</i>	1
San Luis		<i>M. brachyloba</i>	5	
			<i>M. brachyloba</i>	20
			<i>M. esculenta</i>	9
Santa Fe de Antioquia		<i>M. carthagenensis</i>	22	
Olaya		<i>M. carthagenensis</i>	20	
			<i>M. carthagenensis</i>	1
Abejorral		<i>M. esculenta</i>	2	
Unión		<i>M. esculenta</i>	2	
Sonson		<i>M. esculenta</i>	1	
Mejía	Salgar	<i>M. brachyloba</i>	20	
	Titiribi	<i>M. esculenta</i>	2	
	Puerto Berrio	<i>M. brachyloba</i>	2	
Cundinamarca			<i>M. brachyloba</i>	32
			<i>M. esculenta</i>	3
	Medina	<i>M. brachyloba</i>	10	
La Guajira	Paratebuena	<i>M. brachyloba</i>	4	
	Serranía de las Palomas	<i>M. brachyloba</i>	4	
Magdalena	Urbía	<i>M. carthagenensis</i>	3	
	Dibulla	<i>M. carthagenensis</i>	6	
			<i>M. esculenta</i>	1
Cesar	Nobolacha	<i>M. carthagenensis</i>	10	
	Santa Marta	<i>M. carthagenensis</i>	29	
Chocó	Cienega	<i>M. carthagenensis</i>	4	
	Valledupar	<i>M. carthagenensis</i>	1	
	Bahía Solano	<i>M. brachyloba</i>	24	

#### Especie sugerida

#### Características

#### *M. brachyloba*

Arbusto tipo Liana de hasta 7 m de largo, tallo liso.

**Hojas** profundamente 3-5 lobadas, lóbulos elípticos o lanceolados no peltadas en la base, glabras.

**Flores** blancas en el exterior y rojizas en el interior

**Fruto** globoso no alado, con líneas amarillas.

#### *M. carthagenensis*

Arbusto de hasta 5 m de alto, tallo ceroso.

**Hojas** con lóbulos pandurados

**Flores** de color blanco-amarillento

**Fruto** globoso, alados o levemente alados

#### *M. tristis*

Arbusto de hasta 4m de altura, con pocas hojas en sus ramas, tallo ceroso.

**Hojas** con lóbulos delgados de diferentes formas: enteros, lóbulo central pandurado ó todos los lóbulos pandurados.

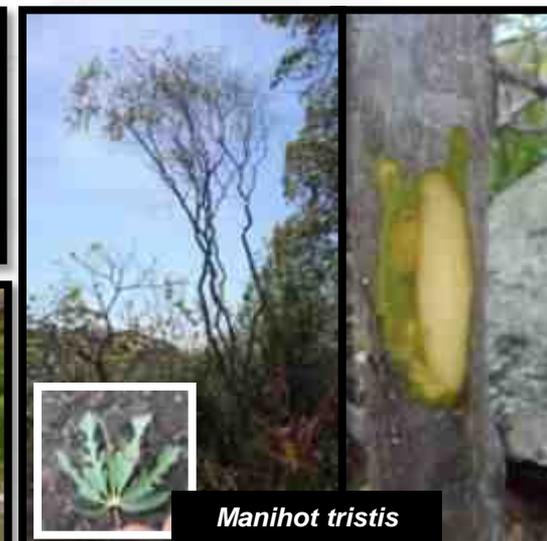
Flores y frutos no vistos



*Manihot brachyloba*

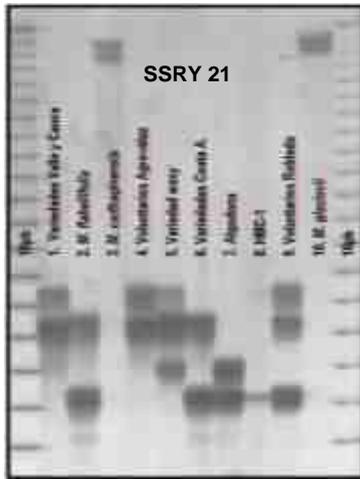


*Manihot carthagenensis*



*Manihot tristis*

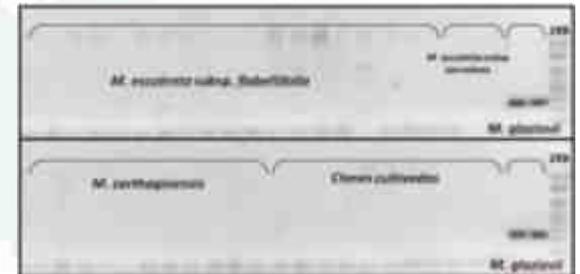
## Objetivo 4. Conocimiento de la diversidad e identificación de marcadores para especies silvestres.



1. Identificación de SSR para evaluar flujo de genes en Yuca  
100 SSR → 11 SSR

2. Creación de primers para diferenciar especies  
SNP's → *Barcode*

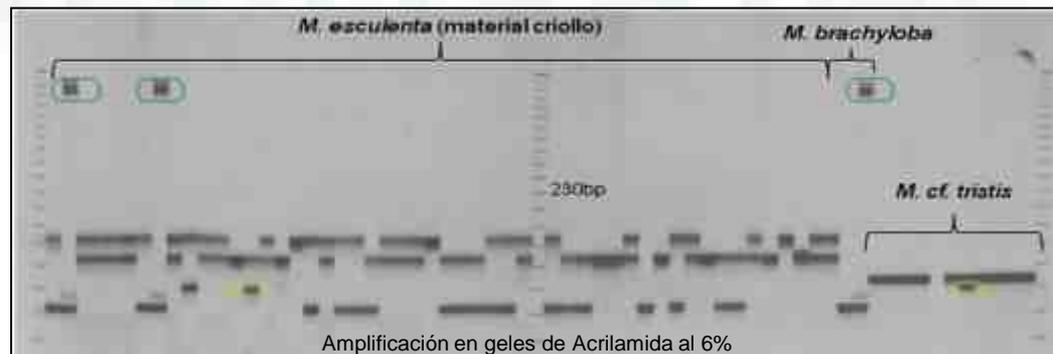
Marcador Cloroplástico GLA-1  
*M. glaziovii*  
*M. carthaginensis*



### 3. Amplificación y visualización de muestras

COLECTA  
455

CONTROLES-URG  
238



Amplificación en geles de Acrilamida al 6%

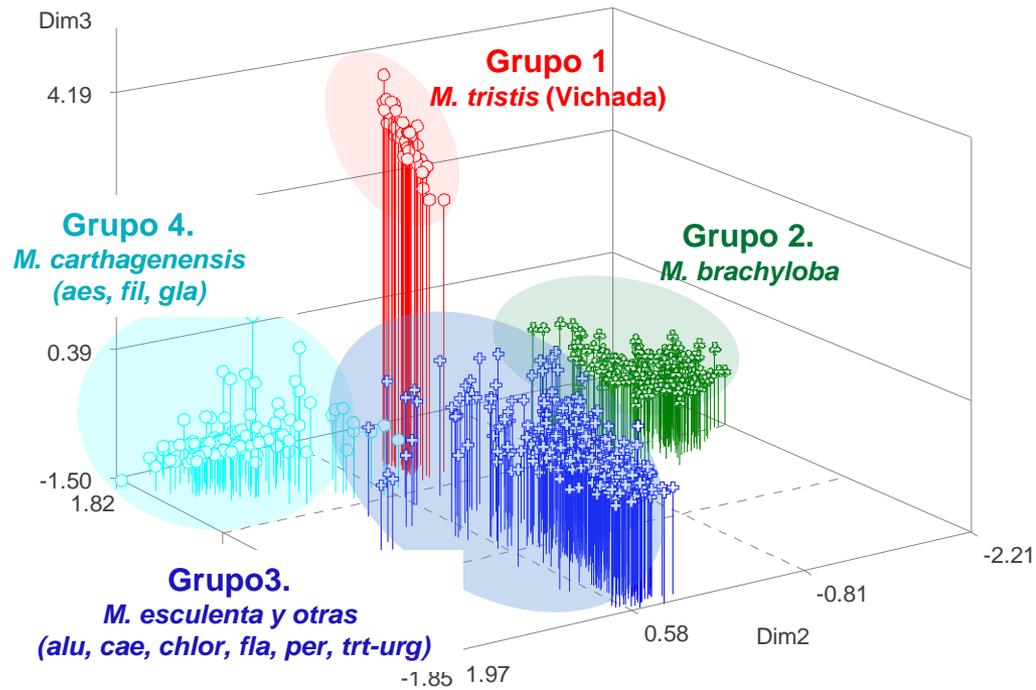
# 1. Información de diversidad

**No. de alelos: 280**  
**Alelos privados: 91**

Especie	No. alelos privados
<i>M. esculenta</i>	26
<i>M. carthagenensis</i>	20
<i>M.esc supsp. flabellifolia</i>	13
<i>M. brachyloba</i>	10
<i>M. tristis</i>	7
<i>M. esc subsp. peruviana</i>	7
<i>M. aesculifolia</i>	2
<i>M. alutacea</i>	2
<i>M. caerulescens</i>	2
<i>M. glaziovii</i>	1
<i>M. filamentosa</i>	1

SSRY	Frecuencia alelos	Rango de tamaños (pb)	Homocigotos		Heterocigotos		Nm
			Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	
ssry164	32	140-210	426	61.6498	265	38.3502	0.281
ssry161	40	162-280	443	64.11	248	35.89	0.306
ssry59	32	120-222	429	62.0839	261	37.7713	0.274
ssry21	38	140-330	362	52.3878	329	47.6122	0.252
ssry175	31	76-146	386	55.8611	305	44.1389	0.261
ssry5	31	108-176	434	62.8075	257	37.1925	0.258
ssry20	20	128-188	407	58.9001	284	41.0999	0.271
meesr15	24	138-188	451	65.2677	238	34.4428	0.255
meesr60	16	148-198	522	75.5427	162	23.4443	0.265
c283y	16	206-240	524	75.8321	167	24.1679	0.182

### ACM - Global

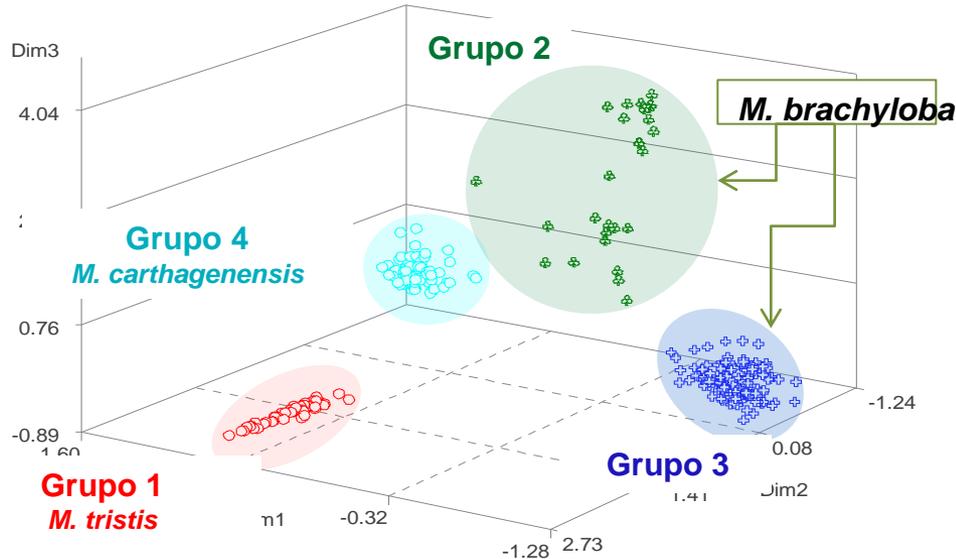


n= 681  
 $r^2 = 88.9 \%$   
# alelos; 281



# ACM - Silvestres colecta

n = 312  
 $r^2 = 93.8\%$   
 #alelos: 176



Matriz de distancia genéticas (bajo la diagonal) e Identidad genética (sobre la diagonal) de Nei (1978)							
Vichada-Vaupés	Caldas	Antioquia	Meta	Cundinamarca	Casanare	Chocó	Poblaciones
.	0.282	0.326	0.308	0.297	0.639	0.378	Vichada-Vaupés
1.264	.	0.850	0.619	0.596	0.351	0.616	Caldas
1.122	0.162	.	0.745	0.755	0.435	0.782	Antioquia
1.176	0.480	0.294	.	0.880	0.441	0.752	Meta
1.214	0.518	0.281	0.128	.	0.471	0.784	Cundinamarca
0.447	1.047	0.832	0.819	0.752	.	0.407	Casanare
0.973	0.485	0.246	0.284	0.244	0.899	.	Chocó

# Conclusiones



- Generación de base de datos (1470 registros).
- Herramienta ***Manihot-Ecomap***.
- Identificación de zonas de coexistencia.
- Conocimiento de la diversidad de especies silvestres.
- Identificación de marcadores específicos

Recomendaciones: Continuar con las expediciones botánicas