

Mandioca, biotecnología, tolerancia a herbicidas y otras características de alto valor

Hernán Ceballos, Paul Chavarriga, Luisa Fory y Juan Carlos Pérez
(Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT)

1. Introducción

La globalización de las economías iniciada a partir del año 1990 ha abierto una gran oportunidad para que la mandioca asuma un papel más importante como fuente de materia prima para distintos usos industriales. Este es el caso, particularmente, de regiones tropicales donde la competitividad respecto a regiones templadas para cultivos como el maíz se ve grandemente afectada. Como consecuencia de ello, gobiernos de numerosos países donantes y el mismo sector privado han iniciado un vigoroso incremento de la inversión para posicionar a este cultivo en el lugar que debería ocupar dentro de la agricultura y agro-industria de esos países.

Para que la mandioca pueda satisfacer las necesidades de alimento así como las del sector productivo numerosas estrategias pueden y deben ser implementadas. Características de alto valor en las raíces fueron reportadas en 2004 por Carvalho y colaboradores¹. Seguidamente otras características tales como una mutación con almidón libre de amilosa² o con el doble de la amilosa de lo normal y tamaño de gránulo mucho más pequeño³ también han sido reportadas. Otras estrategias que son importantes para una producción competitiva de la mandioca giran en torno a una fertilización adecuada, mecanización de la siembra y la cosecha y un adecuado control de las malezas, pestes y enfermedades. Significativos progresos se han hecho en estos temas y muchas de ellas se han desarrollado o han beneficiado al Brasil^{4,5}.

Esta transformación que se viene dando en la mandioca se enfrenta a las incertidumbres que el cambio climático seguramente ofrecerá en el futuro cercano. El incremento previsto de las temperaturas durante los próximos años resultará en un aumento de las precipitaciones en muchas regiones del mundo y reducción en otras. En general, las áreas productoras de mandioca más importantes tenderán a recibir mayores precipitaciones según los estimados actuales realizados por el CIAT⁶. El cambio climático tendrá una influencia drástica en el comportamiento de plagas, enfermedades y puede también cambiar los patrones típicos de malezas que afectan al cultivo. Algunas evidencias comienzan a acumularse que ello ya está ocurriendo en el Sudeste de Asia. El aumento de las precipitaciones y cambios en los problemas relacionados a plagas, enfermedades y malezas tiene también un impacto importante en la sostenibilidad de la producción de mandioca. Las tendencias modernas apuntan siempre a prácticas más amigables con el ambiente y esta tendencia seguramente se verá fortalecida en el futuro.

Este artículo describe algunas de las estrategias disponibles desde el punto de vista técnico que podrían en el futuro ofrecer nuevas alternativas para mejorar aún más la competitividad y la rentabilidad del cultivo y/o procesamiento de la mandioca.

2. La conveniencia de desarrollar mandioca tolerante a herbicidas.

El desarrollo de cultivares comerciales tolerantes a herbicidas se ha constituido en un objetivo central de la investigación en mandioca del CIAT y de otras instituciones de investigación. Existen numerosas razones para que éste sea un objetivo importante para la investigación. Por una parte, los objetivos que hasta hace poco tiempo eran sólo una ilusión son ahora una realidad (mutantes para calidad de raíz, resistencia a mosca blanca, aumento en la calidad nutricional de la raíz). Esto deja la tolerancia herbicidas como uno de las únicas características que aún faltan por ser identificadas.

Tolerancia a herbicidas ofrece grandes ventajas. El manejo de los herbicidas se puede hacer de una manera más eficiente aplicándolos en el momento óptimo de susceptibilidad de las malezas, lo que reduce el uso total de herbicidas. Esto, a su vez, implica menores costos productivos y, sobre todo, menor impacto en el ambiente. Pero aún más importante es posiblemente la alternativa de la siembra directa que la disponibilidad de tolerancia a herbicidas ofrece. Esta tecnología permite mantener continuamente un manto de vegetación viva o muerta protegiendo el suelo y evitando así pérdidas de suelo por erosión hídrica y mejorando también la utilización del agua y los nutrientes. La reducción de los costos en el control de malezas es uno de los mayores insumos en la producción de mandioca de modo que un aumento en la eficiencia es crítico para el futuro del cultivo.

3. Transformación genética de mandioca.

La tecnología de modificación genética mediante inserción de genes se utiliza en mandioca desde los años 80. La primera evidencia para la producción de embriones somáticos y plantas transgénicas fue reportada entre 1993 y 1995⁷. Desde entonces se han introducido características novedosas en la planta que van desde la resistencia a herbicidas⁸ (Figura 1), pasando por la disminución del contenido de cianuro en la planta^{9,10}, hasta la modificación de la cantidad¹¹ y la calidad¹² del almidón que se acumula en la raíz. Recientemente se ha demostrado que es posible silenciar genes específicos de rutas biosintéticas en mandioca para, por ejemplo, disminuir la cantidad de glucósidos cianogénicos que produce la planta usando la tecnología de interferencia del ARN (ARNi)¹³. La introducción de nueva información genética en plantas de mandioca se ha hecho esencialmente utilizando el *Agrobacterium tumefaciens* como vector natural de los genes de interés. Comúnmente se utilizan dos tipos de tejidos que pueden generar plantas *de novo*, las células “*totipotentes*” (capaces de de-diferenciarse y regenerar un organismo completo) que se derivan de los embriones somáticos, también conocidas como Callo Embriogénico Friable –CEF-, y los cotiledones de los embriones somáticos¹⁴. La vía de regeneración de plantas transgénicas generalmente se hace a través de la inducción de embriones y/o la inducción de órganos directamente (organogénesis) a partir de células totipotentes. Es común utilizar como agentes de selección de células transgénicas antibióticos, herbicidas, fluorescencia y azúcares como la manosa.

En el CIAT se trabaja con transformación genética de mandioca desde hace más de 20 años. El trabajo de Sarria y colaboradores⁸ fue producido en el CIAT. Más recientemente se hicieron trabajos para mejorar sustancialmente la eficiencia de transformación de mandioca y para detectar y cuantificar la expresión de transgenes en mandioca^{15,16}. La

eficiencia de transformación, la proporción de plantas comprobadas como transgénicas respecto al número total de plantas regeneradas, es dependiente del genotipo (variedad o clon de mandioca que se transforma). En la actualidad, para el genotipo modelo 60444, la eficiencia supera el 50%. Lamentablemente este material no tiene relevancia comercial. De modo que su papel principal (al menos mientras los protocolos de transformación genética no se mejoren para poder ser aplicados a variedades de mandioca comercialmente relevantes) podría ser la de recibir el “trans-gene” y luego ser utilizada en cruzamientos con variedades comerciales. En otras palabras se podría utilizar la variedad 60444 como un puente para introducir genes deseables en cultivares importantes de mandioca.



Figura 1. Ilustración de la resistencia al herbicida BASTA mediante transformación genética en mandioca. Este trabajo fue realizado con fines puramente investigativos y la explotación comercial de este producto no era permitida.

Uno de los programas bandera del CIAT en el mejoramiento genético de la mandioca lo constituye el HarvestPlus (<http://www.harvestplus.org/>). Este programa pretende mejorar la calidad nutricional de la raíz de mandioca aumentando el contenido de β -caroteno en la raíz.

Una de las estrategias para alcanzar este propósito es la transformación genética de la mandioca para lograr la sobre-expresión de genes envueltos en la síntesis de carotenoides, idealmente, en tejidos específicos (la raíz). El gen bacterial de la enzima que cataliza la producción de fitoeno (Phytoene Synthase *crtB*), la primera etapa en la síntesis de carotenoides¹⁷. En el trabajo realizado en CIAT se transformó mandioca utilizando el gen *crtB* fusionado al promotor CPI+. Este promotor fue la proteína rica en Acido Glutámico (GARP por sus siglas en Inglés). Se ha realizado el análisis de la expresión génica en las raíces de ocho líneas transgénicas lo que ha permitido demostrar que el promotor es efec-

tivo y permite la expresión del gen *crtB* en las raíces de mandioca. Esta evaluación preliminar acaba de ser realizada en plantas crecidas en el campo y con sólo seis meses de edad. Una de las plantas transgénicas sugiere que es posible incrementar el contenido total de carotenoides hasta 41 veces respecto al clon no transformado. La cantidad de β -caroteno (que tiene mejor capacidad en ser convertido en vitamina A por el cuerpo humano) aumentó 17 veces. La diferencia entre total de carotenoides y β -caroteno demuestra que hay un incremento de otros pigmentos (por ejemplo fitoeno, fitoflueno, etc.). Existen otros genes que podrían introducirse como el que codifica para la desaturasa del fitoeno o la β -ciclasa del licopeno. En consecuencia el trabajo actual del CIAT en el tema de transformación genética de la mandioca se centra en la combinación de tres genes (*crtB*, *crtY* y *crtI*) extraídos de *E. urodevora*. Estos genes se encuentran bajo el control de promotores específicos para la raíz aislados de mandioca, remolacha azucarera, papa y ñame. Basados en la experiencia con otros cultivos se espera que este trabajo resulte un proceso eficiente para la acumulación de carotenoides pro-vitamina A en las raíces de mandioca. Plantas de mandioca transformada con la introducción de los tres genes ya han sido producidas y se ha podido confirmar que los tres genes están incorporados al genoma. Pronto se podrá obtener resultados de la cantidad de carotenoides en las raíces de estas plantas.

El CIAT cuenta además con permiso del gobierno Colombiano, expedido por el Instituto Colombiano Agropecuario, para hacer pruebas de campo con mandioca modificada genéticamente (Resolución 01369 del 2 de Julio del 2004). En la actualidad se cultiva un lote con un área aproximada de 2000 m². En el lote se tienen sembradas plantas de mandioca transformadas genéticamente con el gen *ipt* de *Agrobacterium*, bajo el control del promotor SAG₁₂ inducible por senescencia para prolongar la duración de las hojas¹⁸. También se tienen sembradas plantas con genes que reducen el contenido de cianuro¹⁹, que modifican la calidad del almidón²⁰ y con genes marcadores. Todos estos genotipos se mantienen también como réplicas *in vitro* y/o en invernaderos de bioseguridad. Recientemente se ha publicado un artículo describiendo las actividades relacionadas a la transformación genética de la yuca para distintas características¹⁴.

4. Problemas relacionados a la transformación genética de los cultivos en general y la mandioca en particular.

La explotación comercial de cultivos transgénicos ofrece enormes ventajas económicas para el agricultor y, en el caso específico de la tolerancia a herbicidas o el la incorporación del gen Bt para la tolerancia a insectos, también ventajas para el ambiente. Sin embargo, también implica problemas que se describen sumariamente en esta sección.

Brasil ha registrado un crecimiento económico durante los últimos años, desde que definió el marco de comercialización de sus productos, al incluirse en la Organización Mundial del Comercio (OMC) y adoptar la ley de Bioseguridad, la ley de protección de variedades de las obtenciones vegetales (UPOV) y la ley de patentes industriales, siendo ahora considerado como el tercer productor de cultivos transgénicos, después de Estados Unidos y Argentina, en cultivos como soya, maíz y algodón²¹. La explotación comercial de cultivos transgénicos ofrece enormes ventajas económicas para el agricultor y brinda

ventajas para el ambiente como el caso específico de la tolerancia a herbicidas o la incorporación del gen Bt para la tolerancia a insectos.

El problema más importante con la transformación genética es la sobre regulación de las plantas transgénicas. En Brasil la ley de bioseguridad N° 11.105 del 24 marzo de 2005 fue creada con el fin de “proteger la vida humana animal y vegetal, estableciéndose de esta manera normas de seguridad y mecanismos de fiscalización sobre la construcción, el cultivo, la producción, la manipulación, la exportación, el consumo, la liberación en el medio ambiente y el descarte de organismos genéticamente modificados (OGM) y sus derivados”²². Todos las plantas transgénicas y sus respectivos estudios deben ser sometidas para su aprobación ante el Consejo Nacional de Bioseguridad (CNBS), la Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad (CTNBio), la Comisión Interna de Bioseguridad (CIBio), al igual que algunos ministerios del gobierno quienes son los encargados de orientar e implementan la política de bioseguridad siguiendo la evaluación de riesgo caso por caso²². No obstante existe una preocupación pública respecto a la bioseguridad de los cultivos transgénicos, los cuales se describen sumariamente a continuación.

4.1 Problemas de propiedad intelectual.

La propiedad intelectual en su contexto legal incluye los derechos de exclusividad, al autor natural o jurídico, a la propiedad industrial y el derecho económico por la obtención de una nueva variedad vegetal a través del método clásico de mejoramiento o mediante procesos de transformación genética. También se pueden relacionar al uso de los recursos genéticos²³. Es importante que se beneficien los países centro de diversidad de mandioca como es el caso Brasil. En la cuenca del Amazonas se presentan alrededor de 80 de las 98 especies silvestres de mandioca²⁴, además es necesario que se establezcan acuerdos transparentes donde se especifiquen claramente las restricciones y obligaciones en cuanto al uso del material silvestre acorde con la convención de biodiversidad biológica. Existen indicadores como las marcas (etiquetas que informan a los consumidores sobre condiciones sociales o cultural del producto) y los indicadores geográficos (no solo informan sobre el origen del producto si no sobre la cultura y medio ambiente donde se encuentra el producto), que pueden ser utilizados por la comunidades locales e indígenas como herramientas legales para la conservación y el uso sostenible de biodiversidad incluyendo el conocimiento local²⁵.

Las semillas son de hecho un buen ejemplo de cómo se puede ejercer la propiedad intelectual, la cual recae sobre las patentes y el derecho de obtentor; el problema es cómo monitorear el producto OGM y hacer cumplir la propiedad intelectual, un ejemplo de esto sucedió con la soya transgénica introducida en Brasil donde se tuvo que autorizar la producción y comercialización de soya resistente a glifosato en el 2005 después de que los agricultores la habían sembrado sin un adecuado monitoreo ni soporte técnico. Sin embargo, los productores tienen el derecho para su uso propio pero no para la comercialización²² ya que la compañía Monsanto, productora de semillas, puede ejercer el derecho de obtentor el cual está controlado por Unión de Protección de Obtentores (UPOV) y puede cobrar regalías.

En el caso de la transformación genética las limitaciones impuestas por los derechos de propiedad intelectual van desde los procedimientos para realizar la transformación, organismos y/o procesos que están sujetos a derechos de patente por ejemplo, hasta la disponibilidad de genes o su secuencia.

4.2 Problemas regulatorios para garantizar inocuidad en la cadena alimenticia.

Según la FAO se han realizado importantes avances para realizar acuerdos internacionales sobre normas que permitan evaluar la inocuidad de los alimentos transgénicos. Estas evaluaciones se llevan a cabo siguiendo los criterios de seguridad alimentaria establecidos en el *Codex Alimentarius* con el fin proteger la salud de los consumidores. Desde la liberación de los OGM hasta la fecha se ha encontrado que no representan un riesgo mayor que los alimentos convencionales. El Codex se aplica principalmente a entidades químicas, como residuos de plaguicidas o sustancias químicas que representen un riesgo. Son pocos los alimentos que se han evaluado de una manera rigurosa y los análisis pedidos para las plantas transgénica de equivalencia nutricional son costosos ²⁶.

En Brasil es necesario que los alimentos OGM estén debidamente etiquetados para que el consumidor tenga la información y el poder de decisión sobre la compra del alimento que va a consumir con la información comparable a su homólogo convencional y así como las propiedades derivadas de dichas diferencias. En el año 2003 se estableció por ley (Decreto N° 4680, 24/04/2003) que debían rotularse los alimentos que tuvieran más del 1% de sus ingredientes transgénicos. En general el consumidor se ha preocupado por la transferencia de genes alérgicos, la presencia de organismos modificados en la cadena alimentaria y por la transferencia de resistencia a los antibióticos y, además se pretende involucrar al consumidor en todo el ciclo de decisiones sobre los posibles riesgos del OGM..

4.3 Problemas regulatorios en áreas donde existe de manera endémica parientes silvestres del cultivo transgénico.

Considerar las relaciones de los cultivos transgénicos con los parientes silvestres es uno de los requerimientos para la evaluación de plantas transgénicas bajo los parámetros de bioseguridad, entre los cuales también se incluyen la descripción del organismo hospedero, descripción de la plantas transgénica, efectos adversos a organismo no blanco, así como su posible interacción en el medio ambiente. Los estudios de flujo de genes hacia los parientes silvestres tomaron gran importancia a partir de la liberación de plantas transgénicas en el mercado. Es así como diferentes estudios de evaluación de flujo de genes en cultivos como maíz, arroz, canola han sido realizados mientras que en mandioca no hay suficiente información para establecer guías en bioseguridad ante la liberación de plantas transgénica, ni tampoco para programas de mejoramiento convencional especialmente en centros de diversidad ²⁷.

La Cuenca Amazónica, México y Centro América son considerados centro de origen de mandioca debido a que presentan la mayor concentración de especies silvestres ^{26, 27}. La hipótesis con mayor aceptación respecto a su origen es que la mandioca tradicional se derivó de poblaciones de la subespecie *Manihot esculenta* subsp. *flabellifolia* que se ubicaban a lo largo del sur del Amazonas ²⁸⁻³¹. Estudios recientes sobre biogeografía mues-

tran que la mandioca fue probablemente producida por radiación rápida que tomó lugar en Brasil hace 6.6 millones de años aproximadamente. Este período es muy corto para producir y aislar las especies, de ahí que mandioca presente barreras débiles de aislamiento reproductivo y se puede cruzar con muchas especies relacionadas las cuales tienen la misma constitución genética de 36 cromosomas. Sin embargo, no existe un conocimiento claro sobre la taxonomía del género *Manihot*³².

Respecto a la biología reproductiva se conoce que mandioca es una planta monoica, es decir con flores unisexuadas, masculinas y femeninas en una misma planta, y generalmente en la misma inflorescencia, y puede presentar auto polinización o polinización cruzada. El flujo podría ser a través del polen o de la semilla. La polinización es mediada por insectos principalmente por abejas y avispas y las abejas transportan el polen en un radio de 10 m³³ y se ha establecido que 30 m es considerado una distancia suficiente para minimizar la polinización cruzada³⁴. Aunque el polen permanece viable por 2 a 6 días, la viabilidad declina rápidamente después de una hora.

En general, la probabilidad de flujo desde las especies silvestres hacia el cultivo es baja, ya que las variedades de mandioca se propagan vegetativamente, la mayoría florece poco o no florece y la supervivencia de las plántulas derivadas de semilla voluntaria es baja. El flujo se originaría entre las variedades y el intercambio de información sería con las plantas voluntarias (semilla sexual), la cual puede permanecer en los campos varios años. Estos voluntarios pueden florecer e intercambiar información genética con la variedad o ser incorporados dentro del stock o reservorio de clones del agricultor de tal manera que pueden coexistir, así aumentan la heterocigocidad y diversidad genética,^{27,35-37}.

El flujo entre las especies cultivadas y las silvestres se podría originar con las especies silvestres genéticamente y morfológicamente más similares a *M. esculenta*, las cuales se han clasificado en el pool primario (*Manihot pruinosa* y dos subespecies de *Manihot esculenta*, *Manihot subsp. flabellifolia* y *Manihot subsp. peruviana*). Algunas de estas especies o subespecies son encontradas en sitios de coexistencia con cultivos y se ha determinado la incorporación de características desde el silvestre hacia el cultivado³⁸. Diferentes especies pertenecientes al pool secundario y terciario han sido utilizadas en programas de mejoramiento obteniéndose híbridos con diferente grado de fertilidad³⁹⁻⁴³. Es necesario realizar más investigaciones para identificar las relaciones de compatibilidad y se deben utilizar más especies silvestres, debido a que pocas han sido evaluadas, estudiar aspectos básicos como la viabilidad del polen, la fenología de especies silvestres para establecer si realmente son consideradas como un riesgo potencial. Todos estos conocimientos nos podrían ayudar establecer normas de bioseguridad ante la liberación de plantas transgénicas de mandioca.

El CIAT está actualmente desarrollando investigación para determinar frecuencia de polinización cruzada utilizando andro-esterilidad, marcadores morfológicos y marcadores moleculares. También está cuantificando la tasa de supervivencia de plántulas originadas en semilla voluntaria. Combinando estos dos parámetros se podrá tener una idea más clara sobre los riesgos de flujo de genes de un material transgénico de mandioca y especies cultivadas no transgénicas o silvestres.

4.4 Problemas técnicos.

El primer evento de transformación genética de mandioca tuvo lugar en CIAT, hace ya más de 20 años^{7,8}. Si bien son numerosos los eventos de mandioca transgénica reportados en la literatura y que fueron sumariamente descritos en la sección 3 de este documento, tal como se mencionó, existe actualmente un cuello de botella en cuanto al número de clones que pueden ser transformados eficientemente y que básicamente se reduce al genotipo 60444 procedente de Nigeria y de poca relevancia comercial salvo el hecho que puede ser utilizado como puente para introducir el transgene dentro del pool genético de *M. esculenta*, y luego, mediante cruces y selección transferirlo a una variedad comercial.

5. Alternativas tecnológicas para la producción de mandioca con tolerancia a herbicidas.

La transformación genética ofrece grandes ventajas para lograr cultivos comerciales con tolerancia a herbicidas. De hecho, la enorme área sembrada con soya transgénica tolerante al herbicida *glifosato* (Round Up) es una prueba contundente de ello²². Sin embargo, también, existen numerosos problemas que han sido descritos en la sección anterior, lo que hace que otras tecnologías sean atractivas. A continuación se describe brevemente otras opciones que están actualmente siendo implementadas por el CIAT.

La resistencia o tolerancia a herbicidas en cultivos puede ser lograda a través de tres mecanismos básicos: a) resistencia en el lugar de acción del herbicida; b) detoxificación metabólica del herbicida; y c) previniendo que el herbicida llegue a su sitio de acción⁴⁴. Esta situación es importante porque en algunos casos es posible incluso encontrar tolerancia a herbicidas que está controlada por factores genéticos que pueden ser semi-dominantes, recesivos o, incluso, de herencia materna⁴⁵. Los tres ejemplos más importantes de cultivos tolerantes a los herbicidas son las tolerancias a imidazolinonas, glifosato y glufosinatos (cuyas marcas de comercialización son respectivamente, Clearfield, RoundUp Ready y Liberty Link)⁴⁶.

Existen numerosos ejemplos de cultivos en los que se ha logrado encontrar resistencia natural a herbicidas, por ejemplo del grupo de las imidazolinonas⁴⁵. Tolerancia a herbicidas (imidazolinonas, sulfonilurea, ciclohexanediona, y/o triazinas) por medios diferentes a la transformación genética ha sido desarrollada en maíz (*Zea mays*), arroz (*Oriza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), canola (*Brassica napus*), girasol (*Helianthus annuus*), lentejas (*Lens culinaris*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), algodón (*Gossypium hirsutum*), soya (*Glycine max*), lechuga (*Lactuca sativa*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) and tabaco (*Nicotiana tabacum*)⁴⁵⁻⁴⁷. En la mayoría de los casos la tolerancia a las imidazolinonas proviene de modificaciones en el gen codificando para AHAS (acetohydroxyacid synthase). La resistencia al maíz a la ciclohexanediona proviene de cambios en la carboxilasa Acetil-CoA y la tolerancia a las triazinas se origina en un cambio en el gen psbA que codifica para la proteína D1 relacionada a la fotosíntesis⁴⁶.

5.1 Autofecundación para exponer genes recesivos que confieren tolerancia a herbicidas.

En casos donde la tolerancia a herbicidas está basada en genes recesivos o bien parcialmente dominantes, la autofecundación aumenta la ocurrencia de genes en estado homocigota, lo que facilita la identificación de fuentes de tolerancia a herbicidas. Las autofecundaciones han permitido identificar progenies segregantes para genes recesivos que existen en las poblaciones de mandioca pero que, debido a su estado típicamente heterocigota, no se expresan. El proyecto de mejoramiento genético de la mandioca del CIAT, por ejemplo, haciendo una sistemática evaluación de materiales segregantes, y luego de autofecundaciones, logró identificar una mutación natural con almidón sin amilosa (almidón "waxy") de alto valor comercial ⁴⁸. Éxitos similares pueden encontrarse si se busca adecuadamente para identificar potenciales individuos que manifiesten tolerancia a herbicidas como las descritas anteriormente. Pero para ello es necesario un proceso sistemático donde se autofecunden miles de genotipos de yuca, y luego se realicen las evaluaciones en el campo. Este proceso implica costos relativamente altos.

Actualmente el CIAT está implementando un sistema en el que primero se autofecundan materiales élite o bien razas criollas par producir progenies S₁ segregantes. Estas progenies son evaluadas por características de calidad de raíz u otros aspectos agronómicos de relevancia. Por ejemplo recientemente se encontró un fenotipo de planta cuyas hojas no tienen pecíolo y que ofrece algunas ventajas potenciales que podrían conducir a una revolución verde en la mandioca ⁴⁹. Una vez que se han evaluado las plantas derivadas de la semilla botánica, proveniente de las autofecundaciones (una sola planta por genotipo), las mismas se clonarán para obtener 12-15 micro-estacas para la multiplicación vegetativa. Estas micro-estacas serán plantadas en el campo (Julio 2009) y una vez que las plántulas tengan un crecimiento vigoroso serán tratadas inicialmente con herbicidas relacionadas a las imidazolinas en busca de fuentes naturales de tolerancia.

5.2 Inducción de mutaciones.

La mayoría de las fuentes de tolerancia a herbicidas está determinada por una sustitución de un nucleótido simple en las enzimas o proteínas que son blanco de los herbicidas ⁴⁶. La inducción de mutaciones por medios físicos como por ejemplo los rayos gama o químicos como el uso de ethyl methanesulfonate (EMS) o ethyl nitrosourea ha producido numerosos resultados de tolerancia a herbicidas en distintos cultivos ⁴⁷. Para el caso de la resistencia al glifosato (RoundUp), sin embargo, no se ha logrado identificar fuentes naturales ni inducir mutaciones que confieran resistencia a este herbicida, de modo que la única forma de producir cultivos resistentes ha sido la transformación genética.

Es importante anotar que al producir mandioca mutagénica resistente a herbicidas no presentaría ningún inconveniente para su liberación ya que no son contemplados en la ley de Bioseguridad de Brasil ²². Sin embargo, aunque no son plantas modificadas genéticamente, tendrían que ser cultivadas con ciertas restricciones o precauciones para evitar la transferencia del gen (o genes) de resistencia al herbicida a malezas o especies silvestres. Algunas de estas estrategias se basan en la compra de semilla registrada con alto grado de control para evitar contaminación con semilla de malezas; la prohibición para que el agricultor siembre su propia semilla o la rotación de cultivos ⁴⁷.

5.3 Eco-tilling como alternativa para la identificación de fuentes de tolerancia

Alternativas para una identificación más rápida y económica, sobre todo para fuentes de tolerancia a herbicidas controladas por factores genéticos recesivos ha sido desarrollada y utilizada exitosamente^{50,51}. Este método se basa en el uso de marcadores moleculares y metodologías para evaluar gran número de muestras de DNA de manera automatizada. Para que esta tecnología sea posible es necesario conocer exactamente la secuencia genética del gen que quiere mutarse. Por ejemplo, en el caso de la resistencia a imidazolionas, el gen de interés es el AHAS ya descrito anteriormente. Esta metodología podría permitir la extracción de DNA de la colección completa de genotipos del banco de germoplasma del CIAT y analizarlos por eco-TILLING. El análisis permite identificar qué genotipo de la colección tiene cambios en la secuencia del gen AHAS. Este conocimiento obviamente permitiría reducir drásticamente el número de individuos a evaluar. No todos los cambios genéticos resultan en cambios estructurales y/o funcionales de la enzima que se quiere cambiar. Pero este método facilita grandemente la búsqueda de mutaciones espontáneas o inducidas y puede ser una alternativa muy atractiva para la generación de genotipos de mandioca tolerantes a herbicidas.

Referencias

1. Carvalho, L.J.C.B.; de Souza, C.R.B.; Cascardo, J.C.M.; Junior, C.B.; Campos, L. (2004). Identification and characterization of a novel cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clone with high free sugar content and novel starch. *Plant Molecular Biology* 56: 643-659.
2. Ceballos, H.; Sánchez, T.; Chávez, A.L.; Iglesias, C.; Debouck, D.; Mafla, G.; Tohme, J. (2006). Variation in crude protein content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:589-593.
3. Ceballos, H.; Sánchez T.; Denyer K.; Tofiño A. P.; Rosero E. A.; Dufour D.; Smith A.; Morante N.; Pérez J. C.; Fahy B. (2008). Induction and identification of a small-granule, high-amylose mutant in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(16): 7215-7222.
4. Bellotti, A.C. (2002). Arthropod pests. In: Hillocks, R.J., Thresh, J.M. and Bellotti, A.C. (Eds.). *Cassava: biology, production and utilization*. CABI Publishing pp 209-235.
5. Bellotti, A.C.; Arias V.B.; Vargas H.O.; Reyes Q.J.A.; Guerrero, J.M. (2002). Insectos y ácaros dañinos a la mandioca y su control. In: Ospina B. and Ceballos, H. (eds.) *La mandioca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*. CIAT Publication No. 327. Apartado Aéreo 6713, Cali, Colombia, pp 160-203.
6. Jarvis, A.; Lane, A.; Hijmans, R.J. (2008). The effect of climate change on crop wild relatives. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 126:13-23.
7. Sarria, R.; Torres, E.; Balcazar, M.; Destafano-Beltran, I.; Roca, W.M. (1995). Progress in *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: *Proceedings of the Second International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network*, 22-26 August 1994, Bogor, Indonesia, pp. 241-244. Working document. 150. CIAT, Cali.

8. Sarria, R.; Torres, E.; Angel, F.; Chavarriaga, P.; Roca, W.M. (2000). Transgenic plants of cassava (*Manihot esculenta*) with resistance to Basta obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.* 19: 339-344.
9. Siritunga, D.; Sayre, R.T. (2003). Generation of cyanogen-free transgenic cassava. *Planta* 217: 367-373.
10. Siritunga, D.; Arias-Garzón, D.; White, W.; Sayre, R. (2004). Over-expression of hydroxynitrile lyase in transgenic cassava roots accelerates cyanogenesis and food detoxification. *Plant Biotechnology Journal* 2: 37-44.
11. Ihemere, U.; Arias-Garzón, D.; Lawrence, S.; Sayre, R. (2006). Genetic modification of cassava for enhanced starch production. *Plant Biotechnology Journal* 4, pp.453-465.
12. Raemakers K.; Schreuder, M.; Suurs, I.; Furrer-Verhorst, H.; Vincken, J.P.; de Vetten, N.; Jacobsen, E.; Visser R.G.F. (2005). Improved cassava starch by antisense inhibition of granule-bound starch synthase I. *Molecular Breeding* 16: 163-172.
13. Jørgensen, K.; Bak, S.; Busk, P.K.; Sørensen, C.; Olsen, C.E.; Puonti-Kaerlas, J.; Møller, B.L. (2005). Cassava plants with a depleted cyanogenic glucoside content in leaves and tubers. Distribution of cyanogenic glucosides, their site of synthesis and transport, and blockage of the biosynthesis by RNA Interference technology. *Plant Physiology* 139: 363-374.
14. Taylor, N.; Chavarriaga, P.; Raemarkers, K.; Siritunga, D.; Zhang P. (2004). Development and application of transgenic technologies in cassava. *Plant Molecular Biology* 56: 671-688.
15. Jaimes, H.A. (2005). Mejora del protocolo para la transformación genética de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* usando callo embriogénico friable. Tesis, Universidad del Valle, Departamento de Biología. 92 p.
16. Beltrán, J.A.; Jaimes, H.; Echeverri, M.; Ladino, Y.; López, D.; Duque, M.C.; Chavarriaga, P.; Tohme, J. (2008). Quantitative analysis of transgenes in cassava plants using real-time PCR technology. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 45:48-56. Online version DOI 10.1007/s11627-008-9159-5.
17. Cunningham F.; Grant, E. (2002). Regulation of carotenoids synthesis and accumulation in plants. *Pure Appl. Chem.* 74(8): 1409-1417.
18. Zhang, P.; Gruissem, W. (2004). Extension of cassava leaf life by autoregulatory inhibition of senescence. Sixth International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. Cali, Colombia March 8-14, 2004.
19. Siritunga, D.; Sayre, R.T. (2003). Generation of cyanogen-free transgenic cassava. *Planta B.* 217: 367-373.
20. Puentes, Y.J. (2003). Ensayos preliminares para la transformación genética con orientación antisentido del gen waxy en mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) para la obtención de un almidón 100% amilopectina. Tesis, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira. 95 p.
21. Clive, J. (2008). Global status of commercialized Biotech/GM Crops: 2008. ISAAA Brief No 39. ISAAA: Ithaca, NY.
22. Valle; Barreira (2007). Biossegurança- Engenharia Genética legislação Brasileira. Rio de Janeiro. Publicación Editora Ltda. Brasil. 144 pp.

23. Calle, R. (2000). El conocimiento tradicional y la propiedad intelectual. In: Quiceno, P. (ed.). Biocomercio Estrategias para el desarrollo sostenible en Colombia. Instituto de Investigación de recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá. 433 p.
24. Rogers, D.; Appan, S. (1973). Flora Neotropica Monograph No. 13. *Manihot Manihotoides* (Euphorbiaceae). New York, Hafner Press. 272 p.
25. Downes, D.; Laird, S. (2000). Mecanismos innovadores para la distribución equitativa de beneficios de los conocimientos de biodiversidad y otros conocimientos relacionados In Instituto de Investigación de recursos Biológicos Alexander von Humboldt. In Quiceno, P. (ed.). Biocomercio Estrategias para el desarrollo sostenible en Colombia. Instituto de Investigación de recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá. 433 p.
26. Hodson, D.E.; Jaramillo, E.; Carrizosa P.M. (2007). Normatividad relacionada con bioseguridad de organismos genéticamente modificados (OGM). Instituto de investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C., Colombia.
27. Halsey, M.; Olsen, K.; Taylor, N.; Chavarriaga-Aguirre, J. (2008). Reproductive biology of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and isolation of experimental field trials. *Crop Science*. 48: 49-58.
28. Allem, A.C. (1994). The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 41: 133-150.
29. Roa, C.; Maya, M.; Duque, M.C.; Tohme, J.; Allem, A.; Bonierbale, M. (1997). AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. *Theor. Appl. Genet.* 95, 741–750.
30. Olsen, K.; Schaal, B. (1999). Evidence on the Origin of Cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 5586-5591.
31. Olsen, K. (2004). SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. *Plant Mol. Biol.* 56: 517–526.
32. Chacon, J.; Madriñán, S.; Debouck, D.; Rodriguez, F.; Tohme, J. (2008). Phylogenetic patterns in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae) inferred from analyses of nuclear and chloroplast DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 260–267.
33. Alvarez, A.; Daza, P. (1985). Dinámica de la polinización natural en yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y sus implicaciones en el mejoramiento genético del cultivo. Tesis Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 58 p.
34. Kawano, K. (1980). Cassava. In: hybridization of crop plants. Madison, Amer. Soc. Agron. And Crop sci. soc Amer. pp 225-233.
35. Elias, M.; Penet, L.; Vindry, P.; Mckey, D.; Panaud, O.; Robert, T. (2001). Unmanaged sexual reproduction and the dynamics of genetic diversity of a vegetatively propagated crop plant, Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), in a traditional farming system. *Molecular Ecology* 10: 1895-1907.
36. Pujol, B.; Gigot, G.; Laurent, G.; Pinheiro-Kluppel, M.; Elias, M.; Hossaert-McKey, M.; Mckey, D. (2002). Germination ecology of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in traditional ecosystems: seed and seedling biology of a vegetatively propagated domestic plant. *Economic Botany* 56: 366-379.

37. Pujol, B.; David, P.; Mckey, D. (2005). Microevolution in agricultural environments: how a traditional Amerindian farming practice favors heterozygosity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae). *Ecology Letters* 8: 138-147.
38. Duputié, A.; David, P.; Debain, C.; McKey, D. (2007). Natural hybridization between a clonally propagated crop, cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and a wild relative in French Guiana. *Mol. Ecol.* 16: 3025–3038.
39. Nassar, N. M. A. (2003). Gene flow between cassava, *Manihot esculenta* Crantz and wild relatives. *Genetics and Molecular Research* 2: 334-347.
40. Nassar, N. M. A. (2007). Wild and indigenous cassava diversity: an untapped genetic resources. *Genet. Res. and Crop Evol.* 54: 01-10.
41. Nassar, N. M. A. (1989). Broadening the genetic base of cassava, *Manihot esculenta* Crantz by interspecific hybridization. *Can. J. Plant Sci.* 69: 1071-1073.
42. Nassar, N.; Hashimoto, D.; Gomes, P. (2008). Predicting *Manihot* species compatibility by molecular analysis. 480-486.
43. Nassar, N., Ortiz, R. (2008). Genetic resources: Manipulation for crop improvement. *Plant Breeding Reviews*, v. 31, p. 01-50, 2008. Wiley Publ. NJ.
44. Sherman, T.D.; Vaughn, K.C.; Duke, S.O. (1996). Mechanisms of action and resistance to herbicides. En: Duke, S.O. (ed.) *Herbicide resistant crops*. CRC Press, Boca Ratón p. 13-35.
45. Tan, S.Y.; Bowe, S. (2008). Developing herbicide-tolerant crops from mutations. *FAO/IAEA International Symposium on Induced Mutations in Plants*. 12-15 August, Vienna, Austria. p. 134.
46. Tan, S.; Evans, R.; Singh, B. (2006). Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* 30: 195-204.
47. Tan, S.; Evans, R.R.; Dahmer, M.L.; Singh, B.K.; Shaner, D.L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag. Sci.* 61:246-257.
48. Ceballos, H.; Sánchez, T.; Morante, N.; Fregene, M.; Dufour, D.; Smith, A. M.; Denyer, K.; Pérez, J.C.; Calle, F.; Mestres, C. (2007). Discovery of an Amylose-free Starch mutant in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(18): 7469-7476.
49. CIAT (2009). *Improved Cassava for the Developing World-Annual Report 2008*. Chapter 2. pp 11-12.
50. Till, B.J.; Reynolds, S.H.; Greene, E.A.; Codomo, C.A.; Enns, L.C.; Johnson, J.E.; Burtner, C.; Odden, A.R.; Young, K.; Taylor, N.E.; Henikoff, J.G.; Comai, L.; Henikoff, S. (2003). Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res.*13: 524–530.
51. Guang-Xi W.; Tan, M-K.; Rakshit, S.; Saitoh, H.; Terauchi, R.; Imaizumi, T.; Ohsako, T.; Tominaga T. (2007). Discovery of single-nucleotide mutations in acetolactate synthase genes by Ecotilling. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88: 143-148.