

**Relación entre el contenido de cianuro y la expresión del gen *CYP79D* en diez variedades de hojas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)**

Danna Valentina Morantes Estévez

Trabajo de Grado para Optar el Título de Bióloga

Director

Camilo Ernesto López Carrascal  
Doctorado en Ciencias de la Vida

Codirector

Jorge Hernández Torres  
Doctorado en Ciencias

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2026

**Dedicatoria**

*A mis sobrinos Camilo y Jerónimo.*

### **Agradecimientos**

Agradezco a mis padres por darme lo que soy: el carácter, la pasión y la responsabilidad que han formado en mí durante tantos años, también por su apoyo incondicional durante toda mi carrera. Quiero seguir siendo su mayor orgullo.

A la Universidad Nacional de Colombia por brindarme la oportunidad de realizar mi pasantía y contribuir a mi formación académica, fue de las mejores experiencias durante mi formación.

Al grupo de investigación Manihot Biotec por acogerme y permitirme desarrollar este trabajo en su espacio de investigación, así como a las personas que hacen parte de él, quienes me acompañaron y brindaron su amistad. También a Iona por su disposición y apoyo, así como por sus explicaciones y orientación durante el desarrollo de este trabajo.

De manera especial, agradezco a mi director de tesis, Camilo López, por orientarme y compartir conmigo su conocimiento como biólogo, así como por su paciencia, guía y acompañamiento durante todo el desarrollo de mi tesis. Y a mi codirector, Jorge Hernández, por inculcarme el interés en la biología molecular, así como por las correcciones realizadas y el apoyo brindado.

Por último, agradezco a todas las personas que conocí durante este camino; al final, soy la mezcla de los momentos que me brindaron y me formaron, gracias por creer en mí. En mi mente y corazón siempre estarán.

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	11
1. Objetivos .....	13
1.1 Objetivo General .....	13
1.2 Objetivos Específicos.....	13
2. Competencias .....	14
3. Marco Referencial.....	15
3.1 <i>Manihot esculenta</i> .....	15
3.2 Valor nutricional de las hojas y la raíz.....	16
3.3 Compuestos cianogénicos en la yuca.....	17
3.4 Gen <i>CYP79D</i> .....	18
3.5 Metabolismo y detoxificación del cianuro en las hojas de yuca.....	19
3.6 Factores que alteran el contenido de cianuro .....	19
3.7 Diversidad de cianuro en yuca.....	20
4. Materiales y métodos .....	22
4.1 Recolección de material vegetal en campo.....	22
4.2 Cuantificación de cianuro .....	22
4.3 Expresión del gen <i>CYP79D2</i> .....	23
4.4 Análisis de correlación entre el contenido de cianuro y la expresión génica .....	26
5. Resultados .....	27
5.1 Cuantificación de cianuro en hojas de yuca.....	27
5.2 Expresión del gen <i>CYP79D2</i> .....	28
5.3 Análisis de correlación entre el contenido de cianuro (ppm) y la expresión del gen <i>CYP79D2</i> .....	34

6. Discusión.....	36
7. Conclusiones.....	39
8. Recomendaciones .....	40
Referencias Bibliográficas .....	41
Apéndices.....	47

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Composición nutricional de las hojas y raíces de yuca .....	16
Tabla 2. Valores de absorbancia (440 nm), peso seco y concentración de cianuro (ppm) en diferentes variedades de yuca .....	27
Tabla 3. Cuantificación y evaluación de pureza de ADN mediante el NanoDrop (A260/A280 y A260/A230) en variedades de yuca .....	29

**Lista de Figuras**

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Diagrama del proceso de cuantificación de cianuro.....	23
Figura 2. Diagrama del proceso de extracción de ARN .....	24
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa para la verificación de ARN extraído .....	28
Figura 4. Verificación de la pureza del ARN con tratamiento de DNAsa.....	30
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de síntesis de cDNA .....	31
Figura 6. Expresión relativa del gen <i>CYP79D2</i> en las variedades analizadas.....	33
Figura 7. Análisis de varianza (ANOVA).....	33
Figura 8. Correlación entre el contenido de cianuro (ppm) y la expresión génica relativa en las variedades analizadas.....	35

**Lista de Apéndices**

	<b>Pág.</b>
Apéndice A. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de $\beta$ -tubulina y <i>CYP79D2</i> .....	47
Apéndice B. Curva estándar de eficiencia de amplificación del gen constitutivo $\beta$ -tubulina ..	47
Apéndice C. Curva estándar de eficiencia de amplificación del gen <i>CYP79D2</i> .....	48
Apéndice D. Curva de calibración para cuantificación de cianuro y fórmula empleada.....	48
Apéndice E. Valores de Ct de los genes $\beta$ -tubulina y <i>CYP79D2</i> .....	49
Apéndice F. Resultados de la prueba de comparación múltiple de Tukey .....	50
Apéndice G. Preparación de soluciones y reactivos .....	50

### Resumen

**Título:** Relación entre el contenido de cianuro y la expresión del gen *CYP79D* en diez variedades de hojas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)<sup>1\*</sup>

**Autor:** Danna Valentina Morantes Estévez<sup>2\*\*</sup>

**Palabras Clave:** *Manihot esculenta*; glucósidos cianogénicos; gen *CYP79D2*; variedades de yuca; cianuro.

**Descripción:** La especie *Manihot esculenta* es conocida por el consumo de su raíz rica en carbohidratos; sin embargo, la planta presenta compuestos cianogénicos que pueden llegar a ser tóxicos para su consumo. Aunque la raíz es el órgano más consumido, presenta un menor valor nutricional en comparación con las hojas, las cuales contienen mayor valor nutricional. En este estudio se analiza si existe una relación entre el contenido de cianuro (HCN) y la expresión del gen *CYP79D2*, que es uno de los principales en la síntesis de glucósidos cianogénicos. Para ello, se recolectaron hojas jóvenes de diez variedades de yuca y se cuantificó el contenido de cianuro mediante un análisis espectrofotométrico y la expresión del gen *CYP79D2* mediante una PCR en tiempo real (qPCR). En los resultados obtenidos se evidencia una alta variabilidad en el contenido de cianuro en las hojas de las variedades analizadas, con una expresión relativa del gen *CYP79D2* con baja variación. El análisis de correlación mostró una relación débil entre ambas variables, lo que sugiere que la acumulación de compuestos cianogénicos en hojas de yuca no depende exclusivamente de la expresión del gen *CYP79D2*, sino que podría estar influenciada por otros factores ambientales, fisiológicos y participación de otros genes de la misma familia.

---

<sup>1\*</sup> Trabajo de Grado

<sup>2\*\*</sup> Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Camilo Ernesto López Carrascal . Doctorado en Ciencias de la Vida. Codirector: Jorge Hernández Torres. Doctorado en Ciencias

### Abstract

**Title:** Relationship between Cyanide Content and Expression of the *CYP79D* Gene in Ten Cassava Leaf Varieties (*Manihot esculenta* Crantz) <sup>3\*</sup>

**Author:** Danna Valentina Morantes Estévez<sup>4</sup>

**Key Words:** *Manihot esculenta*; cyanogenic glucosides; *CYP79D2* gene; cassava varieties; cyanide.

**Description:** The species *Manihot esculenta* is known for the consumption of its carbohydrate-rich root; however, the plant contains cyanogenic compounds that can be toxic if ingested. Although the root is the most widely consumed organ, it has lower nutritional value compared to the leaves, which are richer in nutrients. In this study, we analyzed whether there is a relationship between cyanide (HCN) content and the expression of the *CYP79D2* gene, one of the main genes involved in the biosynthesis of cyanogenic glucosides. To this end, young leaves from ten cassava varieties were collected, and cyanide content was quantified using spectrophotometric analysis, while *CYP79D2* gene expression was measured through real-time PCR (qPCR). The results revealed high variability in cyanide content among the leaves of the analyzed varieties, with relatively low variation in *CYP79D2* expression. Correlation analysis showed a weak relationship between the two variables, suggesting that the accumulation of cyanogenic compounds in cassava leaves does not depend exclusively on *CYP79D2* expression, but may also be influenced by environmental and physiological factors, as well as the involvement of other genes within the same family.

---

<sup>3\*</sup>Degree Work

<sup>4\*</sup> Faculty of Sciences. School of Biology. Director: Camilo Ernesto López Carrascal, Ph.D. in Life Sciences. Co-director: Jorge Hernández Torres, Ph.D. in Sciences.

## Introducción

La yuca (*Manihot esculenta*) es uno de los cultivos más importantes para la alimentación por su valor nutricional representado en una fuente importante de carbohidratos, con una producción aproximada de dos millones de toneladas por año en Colombia (Pérez et al., 2022). Se caracteriza por su resistencia a condiciones como sequía y capacidad para crecer en suelos con baja fertilidad (Costa et al., 2021). La yuca suele clasificarse tradicionalmente como dulce amarga, de acuerdo con su contenido de compuestos cianogénicos en sus raíces (Oloya, 2017).

Además de su raíz, las hojas de yuca representan un recurso nutricional relevante debido a su alto contenido proteico, vitamínico y mineral (Díaz-Tatis & López, 2021). Sin embargo, tanto las hojas como raíces contienen glucósidos cianogénicos, principalmente linamarina y lotaustralina, metabolitos secundarios que pueden liberar ácido cianhídrico (HCN) cuando el tejido vegetal es dañado (Jørgensen et al., 2010). Este mecanismo constituye una estrategia de defensa química contra herbívoros y estrés osmótico que se puede presentar en la planta, pero representa un riesgo toxicológico para el consumo humano si no se aplican procesos adecuados de detoxificación como cocción, fermentación o secado (Pičmanová et al., 2015). Aunque los dos órganos acumulan glucósidos cianogénicos, su contenido en las hojas suele ser hasta veinte veces mayor que en la raíz (Díaz-Tatis & López, 2021).

La biosíntesis de estos glucósidos cianogénicos está regulada por genes específicos, entre ellos *CYP79D*, el cual participa en las etapas iniciales de la ruta metabólica responsable de la formación de linamarina (Andersen et al., 2000). En este trabajo, aunque el título hace referencia general a la familia génica *CYP79D*, el análisis experimental se centró específicamente en el gen

*CYP79D2*, debido a su papel clave en la biosíntesis de glucósidos cianogénicos en *Manihot esculenta*.

Se ha reportado que el contenido total de cianuro en raíces puede oscilar entre 10 y 500 mg/kg de materia seca, dependiendo de la variedad y las condiciones ambientales (FAO., 1990). El contenido de glucósidos cianogénicos puede verse afectado por diferentes factores como la genética, el estrés ambiental, la edad de la planta y las condiciones del suelo (Oloya, 2017).

La diversidad de yuca mantenida por las comunidades tradicionales es un ejemplo de la riqueza genética que hay en los cultivos y del conocimiento acumulado por las generaciones. A pesar de que el principal método de reproducción de la yuca es asexual por la propagación a través de estacas, la planta sigue conservando la capacidad de producir flores y generar semillas sexuales que aunque presentan baja viabilidad son capaces de generar nuevas plantas (Pérez et al., 2019). La colección de germoplasma del CIAT reporta 5.700 entradas de diferentes variedades de yuca a nivel mundial (Ferguson et al., 2019). Esta fuente de variación contribuye al mejoramiento genético y desarrollo de nuevas variedades con mayor producción de yuca frente a los cambios climáticos y enfermedades.

El estudio de la relación entre el contenido de cianuro y la expresión del gen *CYP79D2* en diferentes variedades de yuca cultivadas en una misma región permite evaluar si existe una correlación entre la expresión del gen y la acumulación de compuestos cianogénicos en las hojas de yuca. El objetivo de este trabajo es determinar la relación entre el contenido de cianuro y la expresión del gen *CYP79D2* en diez variedades de hojas de yuca cultivadas en la vereda Ucrania (La Vega, Cundinamarca). Se planteó la hipótesis de que las variedades con mayor expresión del gen *CYP79D2* presentarán mayores concentraciones de cianuro en sus tejidos foliares.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Determinar la relación del contenido de cianuro y la expresión del gen *CYP79D2* en hojas de diez variedades de yuca.

### 1.2 Objetivos Específicos

- Cuantificar el contenido de cianuro en hojas de yuca.
- Medir la expresión del gen *CYP79D2*
- Correlacionar los niveles de expresión génica con el contenido de cianuro entre variedades.

## **2. Competencias**

Adquirir habilidades en el manejo de técnicas de biología molecular (extracción de ARN, tratamiento con DNasa, síntesis de cADN, qPCR).

Desarrollar habilidades en el análisis estadístico e interpretación de datos biológicos.

Habilidades en la determinación bioquímica de compuestos cianogénicos en tejidos vegetales.

### 3. Marco referencial

#### 3.1 *Manihot esculenta*

La yuca (*Manihot esculenta*) es una planta herbácea, la cual es conocida por la producción de raíz comestible, con un alto contenido de almidón pero bajo en proteína. Por otro lado, sus hojas presentan un alto contenido en proteínas y minerales. Las hojas al ser trituradas liberan ácido cianhídrico (HCN) como defensa el cual es tóxico (Nyirenda, 2020).

El centro de origen genético de la yuca es la Cuenca Amazónica. Durante su domesticación los agricultores le asignaron a ciertas variedades nombres sencillos, generalmente asociados a características visibles de la planta o a su lugar de procedencia (Olsen & Schaal, 1999). La clasificación tradicional entre yucas dulces y amargas, la cual está basada en el contenido de cianuro en las raíces, no siempre es precisa, ya que el contenido de glucósidos cianogénicos puede variar dentro de una misma variedad por diferentes factores (Oloya, 2017).

En términos de distribución, las yucas amargas son más comunes en la región amazónica, mientras que las variedades dulces se encuentran con mayor frecuencia en los cultivos de producción comercial (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007).

La morfología de esta planta se caracteriza principalmente por el almacenamiento de carbohidratos en su raíz, presentando además una parte aérea compuesta por tallos, hojas, flores y frutos, en la cual se observa variabilidad entre las diferentes variedades (Alves, 2002).

El método de reproducción predominante es mediante estacas en los cultivos a través de tallos maduros (Pérez et al., 2019). Las raíces cuando maduran son leñosas y cilíndricas con un contenido de reservas nutritivas representadas en almidón (Rosero et al., 2025). Por otro lado, las hojas son multilobulares variando entre 3 a 9 por hoja dependiendo de la variedad (Rosero et al.,

2025). Las plantas de yuca presentan flores masculinas y femeninas en el mismo individuo, pero son asincrónicas en su apertura favoreciendo la polinización cruzada y diversidad genética mediante la reproducción sexual (Perera et al., 2012).

### 3.2 Valor nutricional de las hojas y raíces

La yuca es un cultivo en donde tanto la raíz como las hojas presentan diferentes valores nutricionales. Mientras que su raíz es reconocida como una fuente de carbohidratos, las hojas destacan por su presencia en micronutrientes y proteínas. Como se ve en la tabla 1, las hojas tienen valores más altos de mg, zinc, proteína. Mientras que las raíces poseen valores altos de almidón.

**Tabla 1.**

Composición nutricional de las hojas y raíces de yuca

Componente	Hojas de yuca	Raíces de yuca	Fuente
Hierro (mg/kg)	61.5 – 151	7.7 – 12.6	Chávez et al., 2005
Manganeso (mg/kg)	50.3 – 87.2	0.8 – 3.2	Chávez et al., 2005
Cobre (mg/kg)	6.2 – 8.1	1.4 – 3.0	Chávez et al., 2005
Zinc (mg/kg)	39.2 – 63.7	4.4 – 8.6	Chávez et al., 2005
Calcio (mg/kg)	8,233 – 14,295	379 – 691	Chávez et al., 2005
Magnesio (mg/kg)	4,786 – 9,735	806 – 1,479	Chávez et al., 2005
Sodio (mg/kg)	9.2 – 15.8	25.8 – 173.1	Chávez et al., 2005
Potasio (mg/kg)	8,465 – 13,387	5,754 – 10,389	Chávez et al., 2005
Fósforo (mg/kg)	2,631 – 3,564	1,012 – 1,556	Chávez et al., 2005
Proteína (% base seca)	20 – 30 %	—	Tatís y Carrascal (2021)
Proteína (% peso fresco)	—	0.7 – 1.3 %	Tatís y Carrascal (2021)
Carotenoides (mg/100 g fresco)	23 – 86	Mucho menores que hojas	Tatís y Carrascal (2021)
HCN (ppm)	hasta 100	menor que hojas	Tatís y Carrascal (2021)

*Nota: Elaboración propia con datos de Chávez et al. (2005) y Díaz-Tatís & López (2021).*

Las hojas de yuca poseen un contenido proteico superior al de sus raíces. Sin embargo, su consumo directo se ve limitado por la alta concentración de glucósidos cianogénicos la cual puede ser 5 a 20 veces superior que el que se encuentra en las raíces (Díaz-Tatís & López, 2021). Por ello, para aprovechar las hojas de forma segura, es importante emplear técnicas de procesamiento que reduzcan estos compuestos cianogénicos para evitar intoxicaciones.

### **3.3 Compuestos cianogénicos en la yuca**

La linamarina es el glucósido cianogénico más abundante en la yuca, representando aproximadamente el 95% del contenido total de compuestos cianogénicos de la planta. La lotaustralina, aunque en menor proporción que la linamarina, representa aproximadamente el 5% de los glucósidos cianogénicos en la yuca (Jorgensen et al., 2005). Los glucósidos cianogénicos se encuentran almacenados en las vacuolas de las células vegetales de la yuca. Estas vacuolas son organelos que almacenan no sólo compuestos tóxicos sino también nutrientes y metabolitos importantes para la planta (Moraes et al., 2011).

La biosíntesis de estos glucósidos cianogénicos se inicia con la conversión de aminoácidos como la valina e isoleucina en aldoximas, reacción catalizada por enzimas pertenecientes a la familia del citocromo P450, particularmente las del grupo CYP79 (Andersen et al., 2000). En este contexto, la linamarina se sintetiza a partir de valina, mientras que la lotaustralina se deriva de isoleucina, mediante una serie de reacciones enzimáticas específicas dentro de la ruta metabólica de los glucósidos cianogénicos (Jørgensen et al., 2010).

La primera etapa clave de esta ruta metabólica es catalizada por enzimas pertenecientes a la familia del citocromo P450, específicamente las enzimas *CYP79*, entre ellas *CYP79D*, las cuales convierten los aminoácidos en aldoximas, constituyendo el paso inicial y determinante en la biosíntesis de los glucósidos cianogénicos (Pičmanová et al., 2015). Posteriormente, las aldoximas generadas son transformadas mediante reacciones adicionales que conducen a la formación del glucósido cianogénico final, como la linamarina. Para su síntesis participan otras enzimas, entre ellas las glucosiltransferasas, encargadas de la adición de residuos de azúcares a los compuestos intermedios, estabilizando así la molécula y permitiendo su almacenamiento en los tejidos vegetales (Jørgensen et al., 2010).

### **3.4 Gen *CYP79D***

Los genes de la familia *CYP79*, particularmente el *CYP79D*, desempeñan un papel fundamental al catalizar las primeras etapas de esta ruta metabólica. (Andersen et al., 2000). En yuca, los genes *CYP79D1* y *CYP79D2*, pertenecientes a esta familia, codifican enzimas del citocromo P450 responsables del primer paso en la síntesis de glucósidos cianogénicos (Gomez et al., 2023).

Este gen es un regulador clave para la producción de estas toxinas. En algunos trabajos de edición genética mediante CRISPR/Cas9 se asoció la pérdida de función del gen con la disminución de linamarina y de la producción de HCN, evidenciando que su rol si puede causar efecto en la ruta metabólica de la producción glucósidos (Gomez et al., 2023).

### 3.5 Metabolismo y detoxificación del cianuro en las hojas de yuca

El cianuro de hidrógeno (HCN) es un compuesto tóxico que puede liberarse de las hojas de yuca como resultado de la degradación de glucósidos cianogénicos como la linamarina almacenados en las vacuolas, mientras que la enzima linamarasa (una  $\beta$ -glucosidasa) se localiza en compartimentos celulares separados (McMahon et al., 2022). Cuando el tejido se rompe, se pierde esta compartimentalización y la linamarasa entran en contacto con la linamarina, en donde se cataliza su hidrólisis para formar acetona cianohidrina, siendo un compuesto inestable y posteriormente liberando HCN (McMahon et al., 2022). La enzima linamarasa participa en la degradación de los glucósidos cianogénicos cuando hay daño en el tejido vegetal. Existen diferentes estrategias para la detoxificación a través de la descomposición de la linamarina y la volatilización del HCN (Kuliahari et al., 2021). La fermentación contribuye a disminuir el contenido de cianuro mediante la acción de microorganismos que degradan estos compuestos y, adicionalmente, pueden mejorar el perfil nutricional del alimento (Petrova et al., 2022). El secado también representa una estrategia efectiva, siempre que se realice bajo condiciones adecuadas de temperatura y tiempo, permitiendo la reducción progresiva del cianuro residual (Moraes et al., 2011). Estos procesos son fundamentales para garantizar la seguridad alimentaria en poblaciones que consumen hojas y raíces de yuca.

### 3.6 Factores que alteran el contenido de cianuro

#### 1. Factores ambientales

El contenido de cianuro en las hojas puede ser influenciado por condiciones ambientales, como sequía y estrés abiótico (Burns et al., 2012). Por ejemplo, se ha encontrado que el estrés hídrico puede incrementar los niveles de cianuro, complicando aún más la gestión de su contenido a través de prácticas agrícolas adecuadas (Shehab et al., 2020). También algunos nutrientes en el

suelo como el nitrógeno pueden generar variaciones en el contenido de glucósidos, siendo importante tener las plantas en condiciones de fertilización adecuadas (Imakumbili et al., 2019).

## 2. Factores genéticos

La genética de la planta es un factor importante relacionado con una variabilidad y alteración en el contenido de HCN, por su proceso de biosíntesis, transporte y almacenamiento de estos compuestos cianogénicos en los que se puede dar la expresión de la linamarina y linamarasa en hojas y raíces a lo largo de su desarrollo (Jorgensen et al., 2005). Estas diferencias se pueden observar en las variedades de yuca.

### 3.7 Diversidad de cianuro en yuca

En las variedades de yuca se ha logrado identificar diferentes concentraciones de compuestos cianogénicos, lo cual se observa en una variabilidad significativa en el contenido de cianuro (Ospina et al., 2023). Diversos estudios han cuantificado el contenido de cianuro en bancos de germoplasma, como el del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). El análisis de 50 genotipos representativos de América Latina mostró niveles promedio de 655 ppm en las hojas y 305 ppm en la raíz (Ospina et al., 2023). Estos hallazgos permitieron identificar variedades específicas para distintas necesidades; por ejemplo, genotipos como COL1108 y PER297 se recomiendan para consumo fresco por sus bajos niveles de compuestos cianogénicos, mientras que otros con contenidos superiores a 1000 ppm en el parénquima de las raíces requieren procesos de desintoxicación más rigurosos. El mismo estudio encontró que los rangos de HCN varían drásticamente según el grupo genético y su origen geográfico. Se evidenció que las variedades de la región Amazónica presentan las concentraciones de cianuro más altas en todas las partes de la planta evaluadas, con promedios de 886 ppm en hojas y 639 ppm en la raíz (Ospina et al., 2023).

En contraste, el grupo Andino mostró los niveles más bajos. Estos resultados confirman que al tener una amplia gama de variedades de yuca, se cuenta también con una variedad en la concentración de cianuro.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Recolección de material vegetal en campo

Se tomaron estacas de las siguientes variedades de yuca: 1. Jacta Perro, 2. Mona Blanca, 3. Yema de huevo, 4. Venezolana, 5. Chiroso, 6. Monteriana, 7. Secundina, 8. Gines, 9. SM 2828 10. Ica Costeña, provenientes de un banco *in vivo* de yuca ubicado en el municipio de San Cayetano, Bolívar, Colombia, para después ser sembradas en una finca ubicada en la vereda Ucrania en el municipio de La Vega, Cundinamarca, Colombia. El criterio de selección de estas variedades fue la adopción de los campesinos de la costa caribe.

Se empleó un diseño experimental propuesto por Ospina et al. (2020), el cual es una referencia importante del CIAT, centro de alta relevancia mundial en investigación de yuca. Este diseño consiste en el cultivo de plantas en bloques al azar. Debido a limitaciones económicas y de espacio, se sembraron entre 3 y 5 plantas por variedad en un área total de 50 m<sup>2</sup>. En algunos casos no hubo germinación o las plantas murieron poco tiempo después de la siembra. Se tomaron hojas de tres individuos por variedad para realizar un único análisis por variedad, obteniendo así una muestra representativa para la medición del contenido de cianuro y la expresión del gen. La mayoría de ellas son producto de los programas de fitomejoramiento del CIAT y distribuidas por Agrosavia.

### 4.2 Cuantificación de cianuro

#### 1. Proceso de secado de la muestra

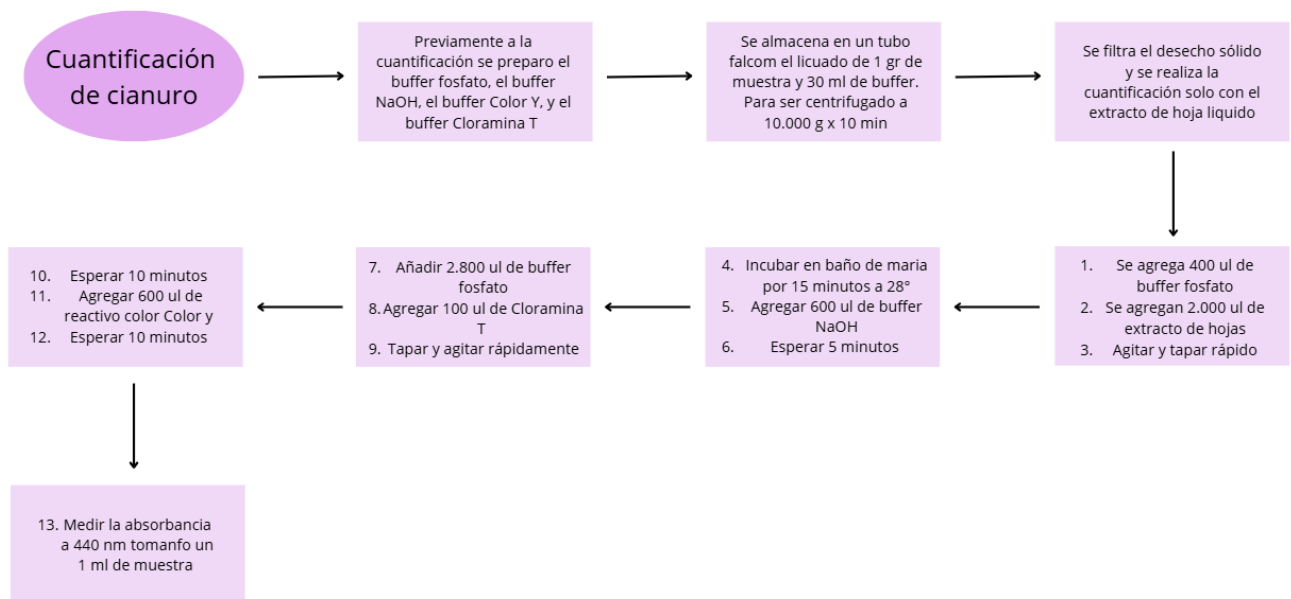
Después de la recolección de las 10 variedades en campo, se tomó 1 gramo de hojas de yuca y se llevaron al horno por 24 horas a 68 °C para obtener el peso seco y correlacionar con el resultado de la técnica de colorimetría (ver más adelante).

2. Técnica de análisis colorimétrico y espectrofotométrico

Igualmente se tomó 1 gramo de hoja de yuca y se licuó con 30 ml de buffer fosfato (0,1 M) a pH 6 y se procedió a llevar a cabo el procedimiento descrito en la Figura 1, con las respectivas soluciones y reactivos (Apéndice G). Una vez obtenido el valor de absorbancia se determinó la concentración de HCN en ppm empleando la curva de calibración con la fórmula para el cálculo de la concentración de cianuro en ppm tomada de Mahecha (2023).

**Figura 1.**

Diagrama del proceso de cuantificación de cianuro.



*Nota: Adaptado de Mahecha (2023)*

**4.3 Expresión del gen *CYP79D2***

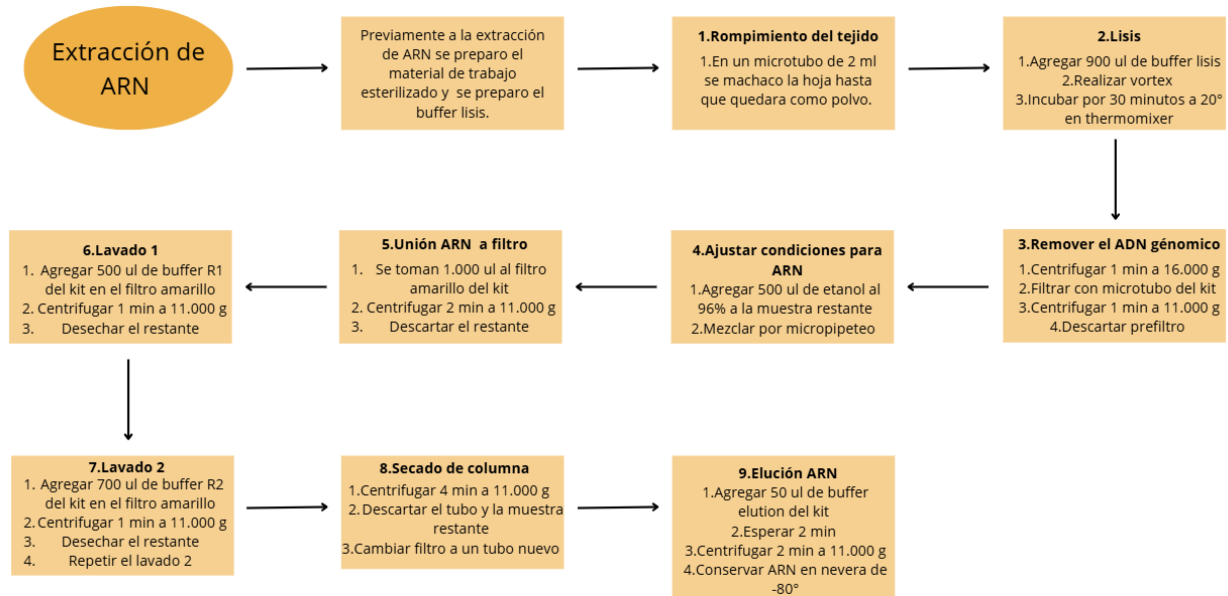
1. Extracción de ARN

El ARN se extrajo utilizando el kit InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit (Figura 2), a partir de 20 mg de tejido vegetal. Al finalizar la extracción se cuantificó la concentración del ARN en el

NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y la calidad del ARN a través de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%.

**Figura 2.**

Diagrama del proceso de extracción de ARN



*Nota: Adaptado de Invitex Molecular GmbH (2024)*

## 2. Tratamiento con DNAsa

Se tomó 1  $\mu\text{g}$  (aproximadamente 10  $\mu\text{L}$ ) de ARN total para ser tratado con la enzima DNase I (RNase free) de New England Biolabs. La muestra fue incubada a 37° durante 25 minutos. Seguido de esto se realizó una PCR utilizando el kit DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), con los primers del gen constitutivo  $\beta$ - tubulina (Apéndice A). La mezcla de reacción contenía una concentración final de 0,2  $\mu\text{M}$  de cada primer, 0,01 U de Taq en un volumen de 10  $\mu\text{L}$ . La reacción se llevó a cabo en el Termociclador Bio-Rad C1000 programado con un ciclado de desnaturalización inicial a 94 °C (2 min), seguida de 30 ciclos de 94 °C (30 seg), 55 °C (30 seg) y 60 °C (45 seg), con una extensión final a 68 °C (5 min) y mantenimiento a 4 ° (10 min).

Finalmente los productos de PCR se corrieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para visualizar los amplicones.

### 3. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit LunaScript® RT SuperMix Kit (New England Biolabs), tomando 10  $\mu$ L de ARN tratado con DNasa. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en el Termociclador Bio-Rad C1000 con el siguiente programa: 25 °C durante 2 min, 55 °C durante 20 min y 95 °C durante 1 min. Posteriormente se llevó a cabo una PCR con los primers del gen constitutivo  $\beta$ -tubulina (Apéndice A), tal como se describió anteriormente con el protocolo de el kit DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific).

### 4. PCR en tiempo real

La expresión génica se analizó mediante PCR en tiempo real (qPCR) utilizando el kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, con el equipo qTOWER<sup>3</sup> G touch (Analytik Jena, Alemania). Inicialmente se realizó una curva de calibración utilizando los primers del gen constitutivo  $\beta$ -tubulina (Apéndice A) como control, con el fin de verificar la correcta amplificación y expresión del cDNA. Posteriormente, se realizó también una curva de calibración utilizando los primers del gen de interés *CYP79D2*.

El gen  $\beta$ -tubulina fue utilizado como gen de referencia para la normalización de la expresión génica debido a su uso ampliamente reportado como gen constitutivo en estudios de expresión en plantas, incluyendo *Manihot esculenta*.

Las amplificaciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones de ciclaje: activación de UDG a 50 °C por 2 min, activación de la polimerasa a 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s y alineamiento a 60 °C por 1 min. Para cada

reacción se realizaron tres réplicas técnicas, y se incluyeron diluciones seriadas del cDNA para la construcción de las curvas de calibración y la verificación de la eficiencia de amplificación.

Para el análisis estadístico se hizo un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple de Tukey respecto a la cuantificación relativa de la expresión génica que se determinó a partir de los valores de Ct (cycle threshold) obtenidos para cada muestra. Los análisis se corrieron en una hoja de cálculo en el software Microsoft Excel.

#### **4.4 Análisis de correlación entre el contenido de cianuro y la expresión génica**

Para evaluar la posible relación entre el contenido de cianuro (ppm) y la expresión relativa del gen obtenida mediante qPCR, se realizó un análisis de correlación de Pearson. Este análisis permite determinar el grado de asociación lineal entre dos variables cuantitativas, sin asumir una relación de dependencia entre ellas. El coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fueron calculados mediante el software Microsoft Excel.

## 5. Resultados

### 5.1 Cuantificación de cianuro en hojas de yuca

A partir de las 10 variedades de yuca, se logró cuantificar el contenido de cianuro de las hojas como se observa en la Tabla (2). En los resultados se observa una variabilidad importante entre las variedades. La variedad Venezolana presentó la mayor concentración de cianuro (942.19 ppm), mientras que variedades como Gines (149.58 ppm), Secundina (175.69 ppm) y Monteriana (251.96 ppm) mostraron concentraciones considerablemente menores. Por otro lado variedades como SM 2828 y Chirosa tuvieron resultados similares.

**Tabla 2.**

Valores de absorbancia (440 nm), peso seco y concentración de cianuro (ppm) en diferentes variedades de yuca.

Variedad	Absorbancia (440 nm)	Peso seco (g)	Cianuro (ppm)
Jacta Perro	0.494	0.301	649.26
Sucrefña	0.628	0.260	674.59
Yema huevo	0.561	0.303	573.47
SM 2828	0.469	0.298	366.70
Mona Blanca	0.585	0.284	671.07
Gines	0.372	0.276	149.58
Venezolana	0.672	0.267	942.19
Chirosa	0.444	0.279	328.86
Monteriana	0.408	0.264	251.96
Secundina	0.371	0.231	175.69

*Nota: Elaboración propia.*

## 5.2 Expresión del gen *CYP79D2*

### 1. Extracción de ARN

En la figura 3 se logra observar la calidad de la extracción de ARN de las 10 variedades de yuca. Se observan 2 bandas bien definidas en los 10 carriles del gel de agarosa, que representan el ARNr de las subunidades ribosomales 28S y 18S. En términos generales la calidad y concentración de ARN fue similar en las 10 variedades.

#### **Figura 3.**

Electroforesis en gel de agarosa para la verificación de ARN extraído.



Los carriles 1–10 corresponden a las diez variedades de yuca analizadas: 1. Jacta Perro, 2. Mona Blanca, 3. Yema de huevo, 4. Venezolana, 5. Chirosa, 6. Monteriana, 7. Secundina, 8. Gines, 9. SM 2828 y 10. Ica Costeña.

Los valores de concentración, pureza y calidad se determinaron mediante análisis en el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop . Las concentraciones más altas se registraron en las variedades Yema de huevo y Blanca Mona, y las de menor concentración se observaron en Monteriana. En cuanto a la pureza, evaluada mediante la relación A260/A280, la mayoría de las muestras presentaron valores cercanos al rango óptimo para ADN (1,8–2,0).

**Tabla 3.**

Cuantificación y evaluación de pureza de ADN mediante el NanoDrop (A260/A280 y A260/A230) en variedades de yuca.

Variedad	Ácido nucleico	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
Jacta Perro	203.6	5.090	2.875	1.77	0.76
Sucreña	139.4	3.485	2.174	1.60	0.59
Yema de huevo	648.5	16.213	8.312	1.95	1.05
SM 2828	108.6	2.715	1.235	2.20	0.51
Blanca Mona	605.4	15.136	7.754	1.95	0.95
Gines	377.4	9.434	5.565	1.70	0.50
Venezolana	269.0	6.725	3.683	1.83	0.43
Chirosa	243.5	6.087	2.681	2.27	1.49
Monteriana	15.0	0.374	0.381	0.98	0.06
Secundina	327.0	8.175	4.783	1.71	0.42

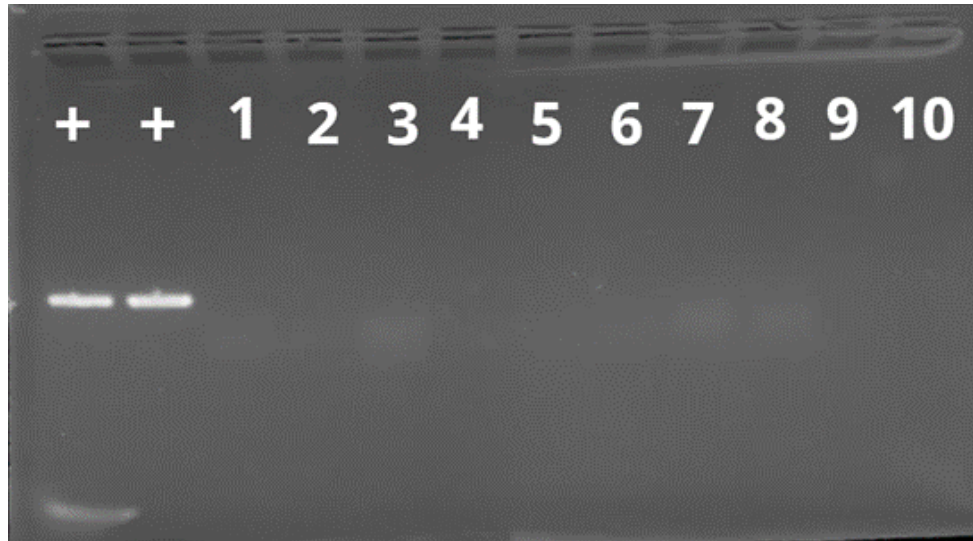
*Nota: Elaboración propia.*

## 2. Tratamiento con DNAsa

Una vez obtenido el ARN se procedió a realizar el tratamiento con DNAsa para eliminar cualquier posible contaminación con ADN genómico. Para confirmar el tratamiento con DNAsa la muestra se sometió a una reacción de PCR con los primers del gen constitutivo  $\beta$ -tubulina (Apéndice A). Como se observa en la figura 4, no se observó ninguna amplificación en las muestras, confirmando la eliminación del ADN genómico. Por otro lado se observó una banda aproximadamente de 800 - 850 bp en la muestra control positivo en el pozo 1 y 2, que representa el ADN genómico confirmando las correctas condiciones de la PCR.

**Figura 4.**

Verificación de la pureza del ARN con tratamiento de DNAsa.



*El carril 1 y 2 corresponde a el control positivo y del 3- 12 corresponden a las diez variedades de yuca analizadas. Siendo 1. Jacta Perro, 2. Mona Blanca, 3. Yema de huevo, 4. Venezolana, 5. Chiroso, 6. Monteriana, 7. Secundina, 8. Gines, 9. SM 2828 10. Ica Costeña*

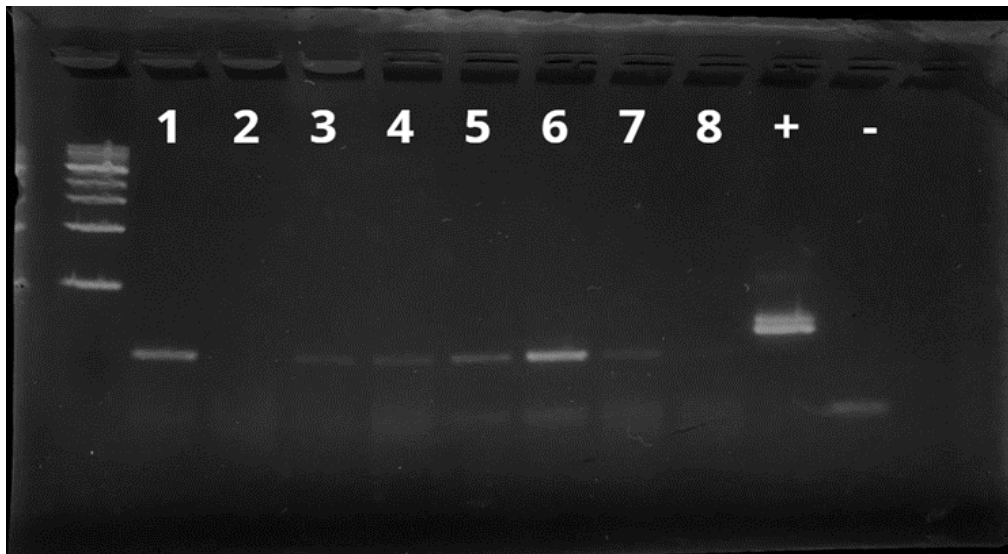
### 3. Síntesis de cDNA

Una vez confirmada la ausencia de ADN genómico después del tratamiento con DNAsa, se realizó la síntesis de cDNA. La síntesis fue verificada con una reacción de PCR con los primers del gen constitutivo (Housekeeping)  $\beta$ - tubulina (Apéndice A). Se realizó un gel de agarosa para evaluar la correcta síntesis de cDNA (Figura 5). En el gel se observa la síntesis exitosa en 8 muestras correspondientes a Gines, Mona Blanca, Jacta Perro, Chiroso, Venezolana, Secundina, SM 2828 y Sucreña. El amplicón obtenido corresponde a un tamaño aproximado de 220 pb para las muestras en las que hubo amplificación. Por otro lado, en el control positivo que corresponde a ADN genómico la banda obtenida tiene un tamaño aproximado de 285 pb. La diferencia en el tamaño de los amplicones confirma la ausencia de ADN genómico contaminante en las muestras de cDNA ya que el amplicón generado sobre ADN genómico incluye un intrón el cual es eliminado

durante el splicing en la síntesis de ARN. A pesar de varios ensayos de amplificación, repetición de la extracción de ARN y síntesis de cDNA no fue posible obtener amplificación de las muestras correspondientes a las variedades Monteriana y Yema de huevo.

### Figura 5.

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de síntesis de cDNA.



*El carril 1 corresponde al marcador molecular, seguido de la muestra 1. Gines, 2. Mona Blanca, 3. Jacta Perro, 4. Chiroso, 5. Venezolana, 6. Secundina, 7. Sm 2828, 8. Sucreña. El carril 10 corresponde al positivo y el 11 al negativo.*

## 4. PCR en tiempo real.

### 1. Validación de curva

Para evaluar la eficiencia de amplificación del gen constitutivo  $\beta$ -tubulina, se generó una curva estándar utilizando diluciones seriadas del cDNA. La curva estándar presentó un coeficiente de determinación de  $R^2 = 0.9933$  y una pendiente de  $-3.59$ , correspondiente a una eficiencia de amplificación aproximada del 90 %, dentro del rango aceptable para análisis de qPCR (Apéndice B).

De manera similar, se evaluó la eficiencia de amplificación del gen *CYP79D2* se generó una curva estándar utilizando diluciones seriadas del cDNA. La relación entre el logaritmo de la cantidad de cDNA y los valores de Ct mostró una alta linealidad ( $R^2 = 0.9992$ ), con una pendiente de  $-3.32$ , correspondiente a una eficiencia de amplificación cercana al 100 %. Estos resultados indican una amplificación eficiente y reproducible del gen de interés. (Apéndice C)

### 2. Valores de Ct obtenidos del gen $\beta$ -tubulina y *CYP79D2*

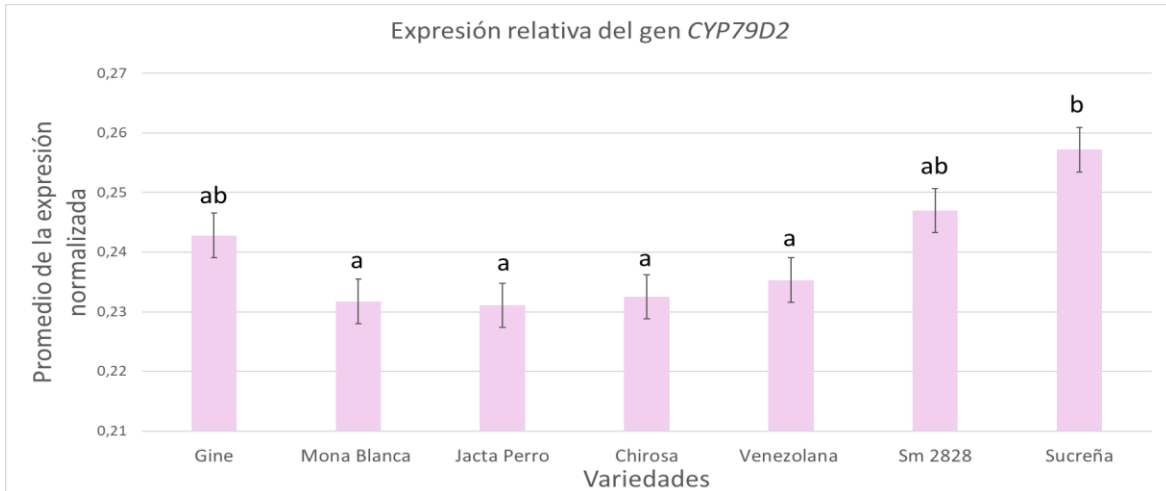
Los valores de Ct obtenidos para el gen constitutivo  $\beta$ -tubulina presentó valores cercanos a 21–23 ciclos, mientras que en el gen *CYP79D2* en las variedades analizadas oscilaron entre aproximadamente 27 y 29 ciclos. Lo cual confirma su expresión estable en todas las muestras analizadas (Apéndice E).

### 3. Expresión relativa del gen *CYP79D2*

La expresión relativa del gen *CYP79D2*, normalizada con respecto al gen de referencia  $\beta$ -tubulina, mostró valores entre 0.231 y 0.257 en las variedades analizadas. La variedad Sucreña presentó el mayor nivel de expresión relativa, mientras que la variedad Jacta Perro mostró el valor más bajo. Por otro lado no se pudo hacer el análisis de Secundina por falta de muestra. En general, se observaron niveles de expresión similares entre las variedades evaluadas.

**Figura 6.**

Expresión relativa del gen *CYP79D2* en las variedades analizadas.



Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre variedades ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Análisis estadístico de la expresión génica

Se realizó un análisis estadístico de la expresión génica para determinar si existen diferencias en los niveles de expresión génica entre las variedades analizadas, para ello se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

**Figura 7.**

Análisis de varianza (ANOVA) de los niveles de expresión génica entre variedades.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,001728395	6	0,000288066	9,270717918	0,000325162	2,847725996
Dentro de los grupos	0,000435017	14	3,10727E-05			
Total	0,002163412	20				

Los resultados obtenidos (Figura 7) mostraron un valor de  $F = 9,27$ , superior al valor crítico de  $F = 2,85$ , y un valor de  $p = 0,000325$ , menor que el nivel de significancia establecido ( $\alpha = 0,05$ ).

Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) que plantea que todas las medias de expresión génica de las variedades son iguales, y se acepta la hipótesis alternativa ( $H_1$ ), indicando que al menos una de las medias difiere significativamente entre las variedades evaluadas.

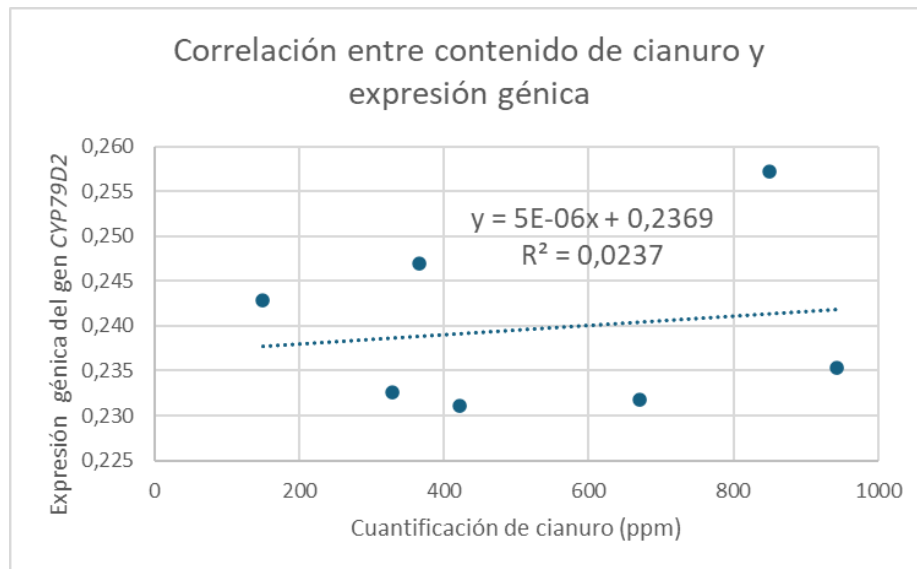
Para determinar específicamente entre cuales variedades hay diferencia. Se realizó una prueba post hoc de Tukey (Tukey HSD/Kramer). Los resultados (Apéndice F) indicaron diferencias estadísticamente significativas entre las variedades Mona Blanca, Jacta Perro, Chiroso y Venezolana, con respecto a Sucreña ( $p < 0,05$ ). Las comparaciones entre otras variedades no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

### **5.3. Análisis de correlación entre el contenido de cianuro (ppm) y la expresión del gen *CYP79D2***

Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre el contenido de cianuro (ppm) y la expresión relativa del gen obtenida mediante qPCR en las variedades analizadas. El coeficiente de correlación obtenido fue  $R = 0,154$ , indicando una correlación positiva muy débil entre ambas variables. El  $R^2$  obtenido fue de  $=0,0237$ , lo que indica que únicamente el 2,37 % de contenido de cianuro puede explicarse por la expresión génica.

**Figura 8.**

Correlación entre el contenido de cianuro (ppm) y la expresión génica relativa en las variedades analizadas.



## 6. Discusión

En este estudio se pudo encontrar una amplia variación en el contenido de cianuro entre las variedades analizadas, mientras que la expresión del gen *CYP79D2* fue relativamente baja. Esta variabilidad en el contenido de cianuro coincide con lo reportado en estudios previos, en los que se ha reportado que el contenido de glucósidos cianogénicos puede variar entre variedades de *Manihot esculenta* debido tanto a factores genéticos como ambientales (Ospina et al., 2023).

Los valores de HCN cuantificados para las diferentes variedades (175.69 - 942.19 ppm) se encuentran dentro de los rangos de variación reportados en estudios previos realizados en hojas de diferentes variedades (Ospina et al., 2023; Mahecha et al., 2023; Lozano, 2025). En el presente trabajo la variedad con mayor contenido de cianuro es Venezolana, lo cual contrasta con los resultados de Mahecha (2023). Esto podría explicarse por diferencias en condiciones ambientales, o por el estado fisiológico de la planta (Imakumbili et al., 2019). También se encontró que en los resultados de Ospina, las plantas más jóvenes (3 meses) presentan mayores concentraciones de cianuro, las cuales disminuyen con la madurez. Sin embargo, en el presente estudio se trabajó con plantas de 6 meses, por lo que se debe tener en cuenta la diferencia en la edad.

Las variedades Venezolana y Sucreña presentaron los valores más altos de cianuro, siendo una información muy relevante para futuras recomendaciones del potencial consumo de las hojas de yuca, ya que si se desea usar para consumo las hojas de estas variedades se deben seguir protocolos de detoxificación mencionados anteriormente. Es importante destacar que los resultados obtenidos en este estudio son para dirigir estrategias futuras de mejoramiento y reducir a niveles aceptables el contenido de cianuro pero no para recomendar ciertas variedades para el consumo humano directo.

En cuanto al análisis molecular, la mayoría de las variedades presentaron concentraciones adecuadas en la calidad de ARN. Respecto a la síntesis de cDNA, la mayoría de las muestras tuvo una amplificación exitosa al utilizar los primers del gen constitutivo  $\beta$ - tubulina como control, lo que indica que el proceso de retrotranscripción se llevó a cabo de manera adecuada. Sin embargo, en dos variedades no hubo amplificación después de varios intentos, lo cual podría estar relacionado con inhibidores enzimáticos presentes en las muestras o una posible degradación del ARN durante el proceso de extracción o almacenamiento.

A pesar de que el gen *CYP79D2* participa en las etapas iniciales de la biosíntesis de compuestos cianogénicos, en los resultados obtenidos su expresión fue similar entre las variedades, mientras que el contenido de cianuro presentó una alta variabilidad. El análisis de correlación evidenció una relación positiva muy débil ( $R = 0.154$ ;  $R^2 = 0.0237$ ), lo que indica que la expresión del gen no explica la variación observada en la concentración de cianuro.

La ausencia de una correlación significativa entre la expresión del gen *CYP79D2* y el contenido de cianuro sugiere que la acumulación de compuestos cianogénicos en hojas de yuca no está determinada únicamente por la expresión de este gen. Este resultado puede explicarse por la participación de múltiples procesos fisiológicos y moleculares adicionales.

En primer lugar, se ha reportado que los glucósidos cianogénicos pueden ser transportados a través del floema desde las hojas hacia otros órganos como las raíces (Jørgensen et al., 2005), lo que implica que la concentración medida en el tejido foliar no necesariamente refleja la tasa de biosíntesis local. Diferencias en la tasa de transporte entre variedades podrían contribuir a la variabilidad observada en el contenido de cianuro.

Adicionalmente, la biosíntesis de estos compuestos involucra más de un gen dentro de la familia CYP79. En particular, el gen *CYP79D1*, parálogo de *CYP79D2*, también participa en la ruta metabólica de los glucósidos cianogénicos, por lo que su expresión no evaluada en este estudio podría influir en los niveles de cianuro observados.

Es importante considerar que la regulación de esta vía metabólica puede ocurrir a diferentes niveles, incluyendo mecanismos postranscripcionales y postraduccionales que afectan la actividad enzimática (McMahon et al., 2022), lo cual podría desacoplar la relación directa entre los niveles de ARN mensajero y la acumulación de metabolitos.

En este estudio se empleó  $\beta$ -tubulina como gen constitutivo, el cual ha sido ampliamente utilizado en estudios de expresión génica en plantas. Sin embargo, no se realizó una validación específica de su estabilidad bajo las condiciones experimentales evaluadas. Variaciones en la expresión de este gen entre variedades podrían introducir un sesgo en la estimación de la expresión relativa de *CYP79D2*.

Estos resultados no necesariamente contradicen estudios en los que la eliminación del gen *CYP79D2* ha reducido significativamente el contenido de cianuro en raíces de yuca (Gomez et al., 2023). Sin embargo en esos casos se elimina completamente la expresión génica, mientras que lo que se observa en este trabajo son variaciones cuantitativas de la expresión. De igual manera hasta el momento no hay estudios que hayan correlacionado el contenido de cianuro con la expresión del gen en diferentes variedades de yuca, de tal manera que no es posible contrastar los resultados con estudios previos. Sin embargo nuestros resultados sugieren que los niveles de expresión génica no son los determinantes más relevantes de la acumulación de cianuro en las hojas y que otros

procesos como los de almacenamiento, transporte o degradación pueden estar implicados.

## 7. Conclusiones

El contenido de cianuro en las hojas de las diez variedades de yuca analizadas presentó una alta variabilidad, con valores entre 149.58 ppm y 942.19 ppm, lo que evidencia diferencias importantes entre variedades de *Manihot esculenta*. Esta variación coincide con lo reportado en estudios previos y sugiere que hay diferentes factores que influyen en la acumulación de compuestos cianogénicos en esta especie.

En la expresión del gen *CYP79D2*, evaluada mediante qPCR y normalizada con el gen de control  $\beta$ -tubulina, se obtuvieron niveles relativamente similares entre las variedades analizadas, con valores de expresión relativa entre aproximadamente 0.231 y 0.257, indicando una baja variación en la expresión de este gen entre los genotipos evaluados.

La correlación de la concentración de cianuro con la expresión del gen presentó una relación no significativa entre las variedades evaluadas con un  $R^2 = 0.0237$ , rechazando la hipótesis en la que se propone que entre mayor concentración de cianuro en las hojas había una mayor expresión del gen *CYP79D2*. La acumulación de compuestos cianogénicos probablemente está regulada por una red más compleja de procesos en la que intervienen otros genes de la ruta metabólica, y otros factores tanto fisiológicos como ambientales.

## 8. Recomendaciones

El presente trabajo constituye un estudio de carácter exploratorio, lo cual implica ciertas limitaciones en el diseño experimental. Se recomienda que en futuras investigaciones incorporen un mayor número de réplicas biológicas analizadas de manera independiente, con el fin de mejorar de los análisis estadísticos en los resultados. Adicionalmente, sería relevante evaluar estas variables en diferentes etapas de desarrollo de la planta, ya que el contenido de compuestos cianogénicos y la expresión génica pueden estar influenciados por la edad.

También se recomienda que futuros estudios incluyan la validación de genes de referencia mediante el uso de múltiples genes constitutivos y herramientas como geNorm o NormFinder, con el fin de asegurar la estabilidad de la normalización en análisis de expresión génica.

### Referencias Bibliográficas

- Alves, A. A. C. (2002). Cassava botany and physiology. En R. J. Hillocks, J. M. Thresh & A. C. Bellotti (Eds.), *Cassava: Biology, Production and Utilization* (pp. 67–89). CABI Publishing.
- Andersen, M. D., Busk, P. K., Svendsen, I., & Møller, B. L. (2000). Cytochromes P-450 from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(3), 1966–1975. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.1966>
- Burns, A. E., Gleadow, R. M., Zacarias, A. M., Cuambe, C. E., Miller, R. E., & Cavagnaro, T. R. (2012). Variations in the Chemical Composition of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Leaves and Roots As Affected by Genotypic and Environmental Variation. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 60(19), 4946-4956. <https://doi.org/10.1021/jf2047288>
- Costa, A. G., Da S Souza, L., Da S Xavier, F. A., Cova, A. M. W., Da Silva, E. F., & Bonfim, M. R. (2021). Characterization of soils cultivated with cassava under different managements. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 25(11), 764–771. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v25n11p764-771>
- Ferguson, M. E., Shah, T., Kulakow, P., & Ceballos, H. (2019). A global overview of cassava genetic diversity. *PLOS ONE*, 14(11), e0224763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224763>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2007). Capítulo 1: La yuca. En *Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca* (pp. 1–18). FAO.

<https://www.fao.org/4/a1028s/a1028s01.pdf>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1990). *Roots, tubers, plantains and bananas in human nutrition*. FAO Food and Nutrition Series No. 24. Rome: FAO.

Gomez, M. A., Berkoff, K. C., Gill, B. K., Iavarone, A. T., Lieberman, S. E., Schultink, A., Karavolias, N. G., Wyman, S. K., Chauhan, R. D., Taylor, N. J., Staskawicz, B. J., Cho, M., Rokhsar, D. S., & Lyons, J. B. (2023). CRISPR-Cas9-mediated knockout of *CYP79D1* and *CYP79D2* in cassava attenuates toxic cyanogen production. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1079254. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1079254>

Imakumbili, M. L. E., Semu, E., Semoka, J. M. R., Abass, A., & Mkamilo, G. (2019). Soil nutrient adequacy for optimal cassava growth, implications on cyanogenic glucoside production: A case of konzo-affected Mtwara region, Tanzania. *PLOS ONE*, 14(5), e0216708.

Invitek Molecular GmbH. (2024). *Instructions for use: InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit (EN-v3-2024)*. Invitek Molecular GmbH.

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(1), 363–374. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065904>

- Jørgensen, K., Morant, A. V., Morant, M., Jensen, N. B., Olsen, C. E., Kannangara, R., Motawia, M. S., Møller, B. L., & Bak, S. (2010). Biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin in cassava: Isolation, biochemical characterization, and expression pattern of CYP71E7, the oxime-metabolizing cytochrome P450 enzyme. *Plant Physiology*, 155(1), 282–292. <https://doi.org/10.1104/pp.110.164053>
- Kuliah Sari, D. E., Sari, I. N. I., & Estiasih, T. (2021). Cyanide detoxification methods in food: A review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 733(1), 012099. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/733/1/012099>
- Lozano Lozano, I. L. (2025). *Efecto del estado de desarrollo de la planta en el contenido de cianuro y expresión de CYP79D1 y CYP79D2 en hojas de yuca* [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional de Colombia.
- Mahecha, I. (2023). *Evaluación del cianuro total de hojas de yuca (Manihot esculenta) y propuesta de métodos de eliminación en diferentes variedades de Colombia* [Tesis de maestría]. Universidad Nacional de Colombia.
- McMahon, J., Sayre, R., & Zidenga, T. (2022). Cyanogenesis in cassava and its molecular manipulation for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 73(7), 1853–1867. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab545>
- Moraes, L. A. C., Moreira, A., & Tsai, S. M. (2011). Estado nutricional e teor de glicosídeos cianogênicos em plantas de seringueira. *Bragantia*, 70(2), 402–408. <https://doi.org/10.1590/s0006-87052011000200022>

- Nyirenda, K. K. (2020). Toxicity Potential of Cyanogenic Glycosides in Edible Plants. In *Medical Toxicology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91408>
- Oloya, B. (2017). Cyanogenic potential of selected cassava varieties in Zombo District, Uganda. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 6(3), 144. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20170603.16>
- Olsen, K. M., & Schaal, B. A. (1999). Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5586–5591. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5586>
- Ospina, M. A., Pizarro, M., Tran, T., Ricci, J., Belalcazar, J., Luna, J. L., Londoño, L. F., Salazar, S., Ceballos, H., Dufour, D., & Lopez-Lavalle, L. A. B. (2020). Cyanogenic, carotenoids and protein composition in leaves and roots across seven diverse population found in the world cassava germplasm collection at CIAT, Colombia. *International Journal Of Food Science & Technology*, 56(3), 1343-1353. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14888>
- Ospina, M. A., Tran, T., Pizarro, M., Luna, J., Salazar, S., Londoño, L., Ceballos, H., López-Lavalle, L. A. B., & Dufour, D. (2023). Content and distribution of cyanogenic compounds in cassava roots and leaves in association with physiological age. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104(8), 4851–4859. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13123>
- Pérez, D., Duputié, A., Vernière, C., Szurek, B., & Caillon, S. (2022). Biocultural drivers responsible for the occurrence of a cassava bacterial pathogen in small-scale farms of Colombian Caribbean. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 841915. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.841915>

- Pérez, D., Mora, R., & Carrascal, C. L. (2019). Conservación de la diversidad de yuca en los sistemas tradicionales de cultivo de la Amazonía. *Acta Biológica Colombiana*, 24(2), 202–212. <https://doi.org/10.15446/abc.v24n2.75428>
- Perera, P. I. P., Quintero, M., Dedicova, B., Kularatne, J. D. J. S., & Ceballos, H. (2012). Comparative morphology, biology and histology of reproductive development in three lines of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae: Crotonoideae). *AoB Plants*, 5, pls046. <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls046>
- Petrova, P., Arsov, A., Tsvetanova, F., Parvanova-Mancheva, T., Vasileva, E., Tsigoriyna, L., & Petrov, K. (2022). The complex role of lactic acid bacteria in food detoxification. *Nutrients*, 14(10), 2038. <https://doi.org/10.3390/nu14102038>
- Pičmanová, M., Neilson, E. H., Motawia, M. S., Olsen, C. E., Agerbirk, N., Gray, C. J., Flitsch, S., Meier, S., Silvestro, D., Jørgensen, K., Sánchez-Pérez, R., Møller, B. L., & Bjarnholt, N. (2015). A recycling pathway for cyanogenic glycosides evidenced by comparative metabolic profiling in three cyanogenic plant species. *Biochemical Journal*, 469(3), 375–389. <https://doi.org/10.1042/bj20150390>
- Rosero, A., Ceballos, H., León, R., García, J., Orozco, A., Silva, G., Montes, M., Martínez, R., Cordero, C., De la Ossa, V., Gallego-Castillo, S., Lenis, J. I., Salazar, S., Belalcazar, J., & Barragán-Hernández, W. (2025). Technical and consumer preferences integrated for the development of cassava varieties with high nutritional quality adapted to Colombian Caribbean coast. *Plants*, 14(21), 3238. <https://doi.org/10.3390/plants14213238>

- Shehab, A. A., Yao, L., Wei, L., Wang, D., Li, Y., Zhang, X., & Guo, Y. (2020). The increased hydrocyanic acid in drought-stressed sorghums could be alleviated by plant growth regulators. *Crop and Pasture Science*, 71(5), 459–468. <https://doi.org/10.1071/cp20057>
- Tatis, P. D., & Carrascal, C. E. L. (2021). Yuca: pan y carne, una alternativa potencial para hacer frente al hambre oculta. *Acta Biológica Colombiana*, 26(2), 235–246. <https://doi.org/10.15446/abc.v26n2.84569>

Apéndices

Nombre Oligo	5' - Oligo Seq - 3'	Amplitud del amplicón (cDNA)	Temperatura de anillamiento
β-Tubulina fwd	GACAGTCTGGTGCAG GAAATA	220 pb	55.0 °C
β-Tubulina rev	CGGTGAAGGGAATAC AGAGAAA	220 pb	55.0 °C
CYP79D2 fwd	TGGCCTGATCTCAAGT ACGAC	225 pb	55.0 °C
CYP79D2 rev	GAGTAAGCTCATCGAT ATTCTCAC	225 pb	55.0 °C

Apéndice A. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de β-tubulina y *CYP79D2*, tamaño esperado del amplicón y temperatura de anillamiento empleada en PCR.

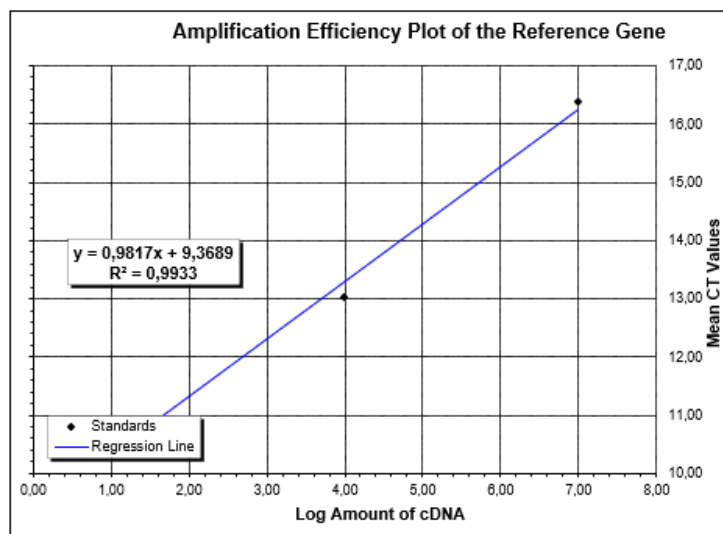
Amplification Efficiency Plot of the Reference Gene

Slope: -3,5874

E<sub>ref</sub> = 1,9000

Description	CT Values	Amount of cDNA	Mean CT Values	Log Amount of cDNA
	10,50 10,55 10,42	0,01	10,49	-1,89
	13,01 13,08 12,96	0,00	13,02	-2,89
	16,67 16,09	0,00	16,38	-3,89

To view the amplification efficiency plot of the target gene scroll up!



Apéndice B. Curva estándar de eficiencia de amplificación del gen del gen constitutivo β-tubulina

Amplification Efficiency Plot of the Target Gene

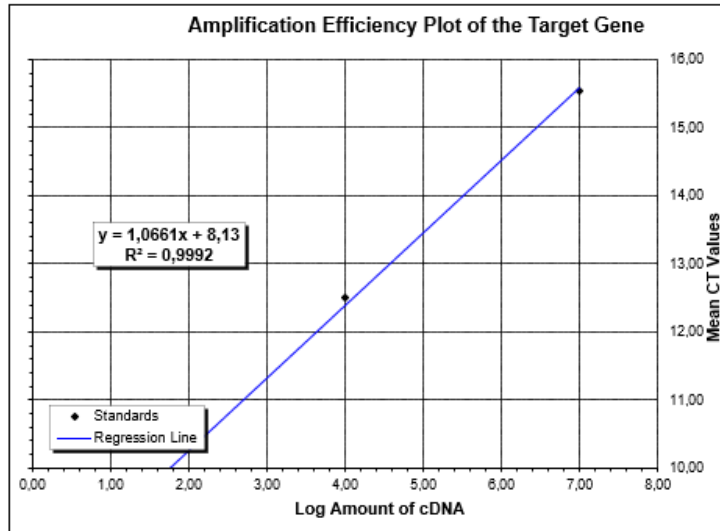
Slope:

$E_{\text{target}} =$

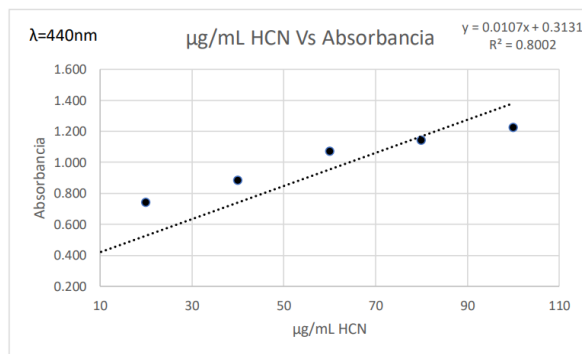
Description	CT Values	Amount of cDNA	Mean CT Values	Log Amount of cDNA
-------------	-----------	----------------	----------------	--------------------

To view the amplification efficiency plot of the reference gene scroll down!

	9,10	0,02	9,14	-1,80
	8,99			
	9,34			
	12,45	0,00	12,50	-2,80
	12,52			
	12,53			
	15,47	0,00	15,54	-2,80
	15,46			
	15,69			



Apéndice C. Curva estándar de eficiencia de amplificación del gen *CYP79D2* gen constitutivo  $\beta$ -tubulina



Donde:

$$m_{HCN} = \frac{A - b}{m}$$

$$F_{d1} = \frac{V_{total}}{V_{extracto}}$$

$$F_{d2} = \frac{V_{solvente}}{V_{extracto}}$$

$$HCN (ppm) = \frac{m_{HCN} F_{d1} F_{d2}}{m_{ps}}$$

$m_{HCN}$ :  $\mu\text{g/mL}$  HCN leído de la curva de calibración, usando lecturas de absorbancia a 440 nm  
 $V_{total}$ : Volumen final del tubo (4.7 mL)  
 $F_{d1}$ : Factor de dilución 1  
 $F_{d2}$ : Factor de dilución 2  
 $V_{solvente}$ : Volumen de la solución del extracto  
 $V_{extracto}$ : Volumen utilizado del extracto  
 $m_{ps}$ : Masa de la muestra en peso seco

Apéndice D. Curva de calibración para cuantificación de cianuro y fórmula empleada para cuantificar la concentración de cianuro de las muestras a partir de la absorbancia a 440 nm y el peso seco de las hojas de yuca. (Mahecha, 2023)

Variedad	Ct gen <i>CYP79D2</i>	Ct gen constitutivo $\beta$ -tubulina
Gine	27,5	21,3
Gine	27,61	21,07
Gine	27,67	20,54
Mona Blanca	28,37	21,09
Mona Blanca	28,48	21,16
Mona Blanca	28,66	21,43
Jacta Perro	29,69	23
Jacta Perro	28,1	22,4
Jacta Perro	27,93	22,7
Chirosa	28,54	21,14
Chirosa	28,9	21,21
Chirosa	27,88	21,95
Venezolana	28,1	25,73
Venezolana	27,78	25,82
Venezolana	28,74	25,86
Sm 2828	27,08	24,96
Sm 2829	27,39	24,74
Sm 2830	27,31	25,17
Sucreña	26,64	22,21
Sucreña	26,54	22,78
Sucreña	26,24	21,9

Apéndice E. Valores de Ct de los genes  $\beta$ -tubulina y *CYP79D2* en las variedades analizadas

TUKEY HSD/KRAMER				alpha	0,05	
group	mean	n	ss	df	q-crit	
Gine	2,43E-01	3	2,30924E-06			
Mona Blanca	2,32E-01	3	6,04698E-06			
Jacta Perro	2,31E-01	3	0,000257368			
Chirosa	2,33E-01	3	7,67078E-05			
Venezolana	2,35E-01	3	6,90876E-05			
Sm 2828	2,47E-01	3	8,34486E-06			
Sucreña	2,57E-01	3	1,51527E-05			
		21	0,000435017	14	4,829	

Q TEST									
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
Gine	Mona Blanca	0.011071173	0.003218315	3.440052906	-0.004470069	0.026612415	0.254904669	0.015541242	1.986115472
Gine	Jacta Perro	0.011716993	0.003218315	3.640722982	-0.003824249	0.027258235	0.205769259	0.015541242	2.101972394
Gine	Chirosa	0.010266728	0.003218315	3.190094424	-0.005274514	0.02580797	0.327827708	0.015541242	1.841801875
Gine	Venezolana	0.007472792	0.003218315	2.321958183	-0.00806845	0.023014034	0.660586221	0.015541242	1.340583182
Gine	Sm 2828	0.004191543	0.003218315	1.302402959	-0.011349699	0.019732785	0.962766855	0.015541242	0.751942699
Gine	Sucreña	0.014366821	0.003218315	4.464082094	-0.001174421	0.029908063	0.078713964	0.015541242	2.577338998
Mona Blanca	Jacta Perro	0.000645819	0.003218315	0.200670076	-0.014895423	0.016187062	0.999998995	0.015541242	0.115856922
Mona Blanca	Chirosa	0.000804445	0.003218315	0.249958482	-0.014736797	0.016345687	0.999996285	0.015541242	0.144313597
Mona Blanca	Venezolana	0.003598381	0.003218315	1.118094723	-0.011942861	0.019139623	0.982177654	0.015541242	0.645532289
Mona Blanca	Sm 2828	0.015262716	0.003218315	4.742455866	-0.000278526	0.030803958	0.055735802	0.015541242	2.738058171
Mona Blanca	Sucreña	0.025437995	0.003218315	7.904135	0.009896752	0.040979237	0.001012167	0.015541242	4.56345447
Jacta Perro	Chirosa	0.001450265	0.003218315	0.450628558	-0.014090978	0.016991507	0.999880336	0.015541242	0.260170519
Jacta Perro	Venezolana	0.0042442	0.003218315	1.318764799	-0.011297042	0.019785442	0.960540216	0.015541242	0.761389212
Jacta Perro	Sm 2828	0.015908535	0.003218315	4.943125942	0.000367293	0.031449777	0.043288685	0.015541242	2.853915093
Jacta Perro	Sucreña	0.026083814	0.003218315	8.104805076	0.010542572	0.041625056	0.000793959	0.015541242	4.679311392
Chirosa	Venezolana	0.002793936	0.003218315	0.868136241	-0.012747306	0.018335178	0.995194805	0.015541242	0.501218692
Chirosa	Sm 2828	0.0144458271	0.003218315	4.492497384	-0.001082971	0.029999513	0.076014751	0.015541242	2.593744574
Chirosa	Sucreña	0.024633549	0.003218315	7.654176518	0.009092307	0.040174792	0.001374629	0.015541242	4.419140873
Venezolana	Sm 2828	0.011664335	0.003218315	3.624361143	-0.003676907	0.027205577	0.20946973	0.015541242	2.092525881
Venezolana	Sucreña	0.021839614	0.003218315	6.786040277	0.006298372	0.037380856	0.00407475	0.015541242	3.917922181
Sm 2828	Sucreña	0.010175279	0.003218315	3.161679134	-0.005365963	0.025716521	0.336939853	0.015541242	1.825396299

Apéndice F. Resultados de la prueba de comparación múltiple de Tukey (HSD/Kramer) para la expresión génica entre variedades.

Apéndice G. Preparación de soluciones y reactivos

Solución / Reactivo	Volumen final	Preparación	Observaciones
Buffer acetato 0,1 M pH 5,5	1000 mL	Añadir 5,7 mL de ácido acético glacial (100%) a 994,3 mL de agua destilada. Ajustar a 1 L.	Mezclar completamente antes de su uso.
Hidróxido de sodio (NaOH) 5 M	1000 mL	Disolver 200 g de NaOH en 1 L de agua destilada y agitar hasta obtener una solución homogénea.	Preparar con precaución debido a la liberación de calor y gases.
Reactivo de color Y	15 mL	Disolver 0,28 g de hidróxido de sodio en 15 mL de agua destilada (primero). Luego disolver 0,525 g de ácido 1,3-dimetilbarbitúrico y finalmente 0,43 g de ácido isonicotínico.	Es fundamental respetar el orden de disolución.
Cloramina T	3 mL	Disolver 30 mg de cloramina T en cristales en 3 mL de agua destilada.	Mantener refrigerado hasta su uso.