

Hitos y retos en la biofortificación de cassava

Trabajo de fin de Grado

Junio 2022

Dpto. Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

Ángela Peláez Fernández

Grado en Bioquímica. Universidad de Sevilla y Universidad de Málaga

Índice

1. Resumen	3
2. Introducción	3
2.1 Importancia de los micronutrientes y enfermedades asociadas a sus deficiencias .	3
2.2 Biofortificación de cultivos.....	5
3. La cassava como cultivo de interés para la biofortificación	6
3.1 Valor nutricional de la cassava.....	7
4. Vitamina A	8
4.1 Deficiencia de vitamina A.....	9
4.2 Biofortificación en cassava de vitamina A: BioCassava+	9
5. Vitamina B6	11
5.1 Deficiencia de vitamina B6.....	12
5.2 Biofortificación en cassava de vitamina B6	12
6. Hierro y zinc.....	13
6.1 Funciones e implicaciones de la deficiencia de hierro.....	13
6.2 Funciones e implicaciones de la deficiencia de zinc.....	14
6.3 Biofortificación en cassava de hierro y zinc.....	14
7. Proteínas	15
7.1 Deficiencia de proteínas	15
7.2 Biofortificación en cassava de proteínas	16
8. Eliminación de cianuro de hidrógeno	16
9. Resistencia a enfermedades.....	18
9.1 Virus del mosaico de la cassava.....	18
9.2 Enfermedad de la raya parda de la cassava	19
10. Mejora de la cantidad y la calidad del almidón.....	21
11. Reducción del deterioro tras la recolección	23
12. Retos y perspectivas de futuro en la investigación	24
13. Conclusiones.....	25
14. Bibliografía	26

1. Resumen

La cassava es uno de los pilares fundamentales de la dieta en muchos países tropicales, especialmente en países del tercer mundo, pues es un cultivo muy productivo y que supone un gran aporte de energía. A pesar de esto, es un cultivo con un valor nutricional pobre, con un contenido bajo en proteínas y algunos minerales y vitaminas, y del que además depende la seguridad alimentaria de muchos países. Todo esto hace que la cassava sea una planta en estudio para desarrollar estrategias de biofortificación que pasan por la modificación genética del cultivo. En este trabajo se recogen las principales aproximaciones que se han realizado al respecto, desde la mejora de su calidad nutricional, su resistencia a estrés biótico y la eliminación de compuestos tóxicos potencialmente nocivos para los consumidores. También se detallan las perspectivas de estas investigaciones en un futuro próximo para mejorar tanto el consumo como la seguridad de este cultivo.

2. Introducción

La OMS recoge el concepto de malnutrición como aquel que “abarca la desnutrición (emaciación, retraso del crecimiento e insuficiencia ponderal), los desequilibrios de vitaminas o minerales, el sobrepeso y la obesidad, y las enfermedades no transmisibles relacionadas con la alimentación”. Esta misma organización afirma que las carencias de micronutrientes más relevantes en cuanto a salud pública mundial son de hierro, vitamina A y yodo, que suponen una grave amenaza especialmente para los niños y las mujeres embarazadas en países considerados del tercer mundo (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>). En este trabajo vamos a revisar las principales carencias de micronutrientes asociadas a las dietas basadas en cassava, uno de los pilares fundamentales de la nutrición en países subdesarrollados y las soluciones que ofrece la biotecnología vegetal. Las carencias de micronutrientes son referidas como “el hambre silenciosa” (“hidden hunger”), término introducido por UNICEF y la OMS (UNICEF, 1990). Se le denomina así porque son carencias que en principio no tienen implicaciones inmediatas ni especialmente evidentes, pero a largo plazo producen graves problemas, e incluso la muerte, dado que los micronutrientes tienen un papel esencial en la coordinación y el buen funcionamiento del metabolismo (Bailey et al., 2015).

2.1 Importancia de los micronutrientes y enfermedades asociadas a sus deficiencias

El concepto de micronutriente incluye las vitaminas y los minerales requeridos por el organismo en pequeñas cantidades, pero cuya presencia en la dieta es esencial ya que están implicados en procesos vitales, de forma que la deficiencia de cualquier micronutriente puede producir enfermedades graves. Sus implicaciones en el cuerpo son muy variadas, ya que son

necesarios para la actividad enzimática y la producción de hormonas y otras moléculas vitales para el crecimiento y el desarrollo. Las deficiencias pueden causar problemas de salud poco evidentes, como la pérdida de energía, de claridad mental o de coordinación, y problemas más graves, como abortos, problemas del desarrollo físico y cognitivo o diarreas que pueden llevar a la muerte (Zea & Ochoa, 2013), cuando las carencias se producen a largo plazo (https://www.who.int/health-topics/micronutrients#tab=tab_1).

Dentro de los micronutrientes más conocidos están las vitaminas, que se dividen en dos grupos: las liposolubles (vitaminas A, D, E y K) y las hidrosolubles, que actúan como precursores de coenzimas vitales para procesos metabólicos, por ejemplo, la vitamina B1 es precursor de la tiamina pirofosfato (TPP), la B2 del flavin adenin dinucleótido (FAD) y la niacina del nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), la vitamina B6 es precursor del piridoxal fosfato y la B9 del tetrahidrofolato. A su vez, los minerales son en muchos casos cofactores para enzimas antioxidantes: el cobre es cofactor de las citocromo oxidasa y, junto al zinc, de la superóxido dismutasa (SOD) citosólica, el manganeso de la SOD mitocondrial, el selenio de la glutatión peroxidasa y el hierro de la catalasa. Estas enzimas antioxidantes son necesarias para la eliminación de los radicales libres producidos normalmente por el metabolismo, que también pueden ser neutralizados por algunas vitaminas con papel antioxidante: A, C, E y K. Por último, hay un tercer tipo de micronutriente, los polifenoles, que son fitoquímicos o compuestos activos que se encuentran en los vegetales como metabolitos secundarios protectores (Opara & Rockway, 2006). Las vitaminas también pueden actuar como cofactores, como es el caso de la vitamina K que actúa como cofactor en reacciones de carboxilación de residuos de glutamato para formar el aminoácido γ -carboxiglutamato (Gla) (Cranenburg et al., 2007).

En los países considerados del tercer mundo son más prevalentes las deficiencias de micronutrientes y los problemas de salud asociados a estas: en el mundo, 161 millones de niños padecen retrasos en el desarrollo debidos a carencias de micronutrientes (Figura 1), y la mitad de ellos vive en Asia y un tercio en África (de Onis & Branca, 2016). Las deficiencias de micronutrientes más importantes, tanto por su incidencia como por la gravedad de su impacto en la salud, son las deficiencias de hierro, vitamina A, yodo, folato y zinc (Bailey et al., 2015).

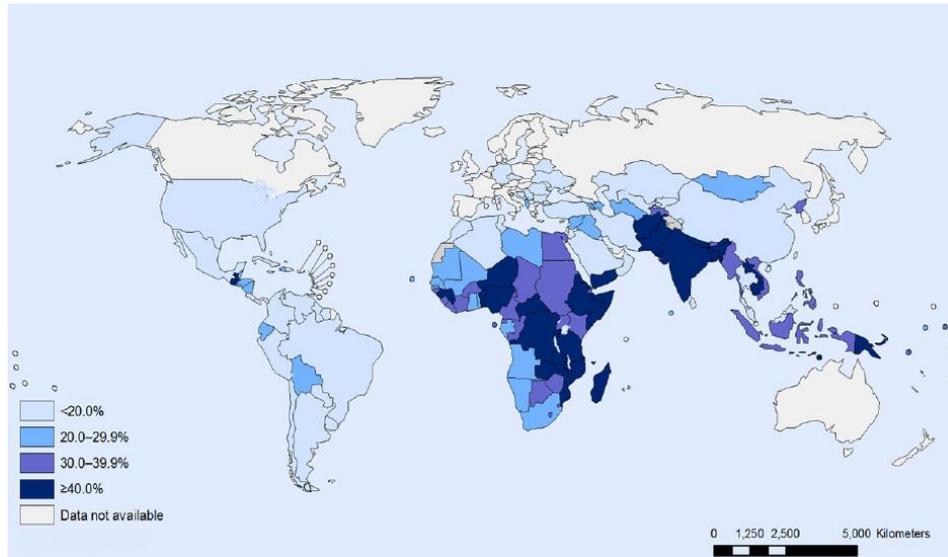


Figura 1. Prevalencia del retraso en el crecimiento en niños menores de 5 años por países. Figura tomada del artículo “Childhood stunting: a global perspective” (de Onis & Branca, 2016).

La malnutrición es la causa subyacente de un 30% de las muertes de niños menores de 5 años, y alcanza un 35% si se tiene en cuenta la alimentación deficiente por amamantamiento (WHO, 2008). Un ejemplo de área geográfica con un importante problema de malnutrición y hambre silenciosa es Nigeria, donde el 75% de los niños menores de 5 años tiene anemia de hierro y un 20% de los niños en dicha franja de edad sufren deficiencia de zinc. Para las mujeres en edad reproductiva, el 22% está por debajo de su normopeso y el 47,8% tiene unos niveles de hemoglobina en sangre por debajo de lo normal (<12 g/L) (Olumakaiye et al., 2021).

Siendo tales las implicaciones de las deficiencias de micronutrientes, se hace necesario buscar posibles soluciones o estrategias que mejoren el estado nutricional de las poblaciones más vulnerables a estos problemas. De ahí el interés de la modificación genética de cultivos, que puede ser una herramienta útil para introducir características que permitan garantizar la seguridad alimentaria en aquellos cultivos que suponen un pilar de la dieta en los países del tercer mundo.

2.2 Biofortificación de cultivos

La biofortificación es una estrategia muy útil para tratar de paliar estas deficiencias. Se define como el proceso de incrementar el contenido de micronutrientes de un cultivo a través de “breeding” selectivo, modificaciones genéticas o el uso de fertilizantes enriquecidos. En concreto, con respecto a las modificaciones genéticas, un transgénico u organismo genéticamente modificado (GMO por sus siglas en inglés) es un organismo en el que se han introducido mejoras heredables para usos específicos por ingeniería genética (<https://www.usda.gov/topics/biotechnology/biotechnology-glossary>).

3. La cassava como cultivo de interés para la biofortificación

Dentro de los cultivos que actualmente se encuentran en estudio para su mejora mediante biofortificación se encuentra la cassava (Figura 2). La cassava (*Manihot esculenta* Cranz), también conocida como yuca, mandioca o tapioca, es un arbusto (Figura 2a) capaz de alcanzar los 2-3 metros de altura, de hojas anchas y palmadas y cuya raíz de almacenamiento presenta una piel marrón y suberosa de aproximadamente 1,5 mm (Figura 2b), que envuelve la parte comestible firme, de color blanco y rica en almidón (Cartay, 2004). Pertenece a la familia de las euforbiáceas, dentro de la subfamilia *Crotonoideae*. Se reproduce más rápidamente por esquejes que por semillas (Figura 2c). Es originaria de América del Sur y su cultivo se ha extendido a otras zonas tropicales y subtropicales de Asia y África, de condiciones climáticas similares, en las que supone la tercera fuente de carbohidratos de la dieta (tras el arroz y el maíz). Debido a las adaptaciones adquiridas por el tipo de clima de su origen, no resiste las heladas y requiere bastante humedad y luz solar para crecer en condiciones óptimas. El momento óptimo para la recolección de su raíz es al alcanzar la edad de un año; pasado este tiempo, la raíz se endurece y pierde su valor gastronómico.

El interés de la cassava para la biofortificación reside en varios factores: en algunas zonas tropicales de recursos limitados es común que la dieta dependa fuertemente de este cultivo, por lo que introducir mejoras que le confieran valor nutricional añadido podría contribuir a la mejora de la salud de sus consumidores; además, dada la fuerte dependencia de estos países del cultivo de cassava, favorecer mediante la generación de transgénicos la productividad y la resistencia a condiciones adversas del cultivo supondría una mayor accesibilidad a este alimento y un mayor beneficio para quienes lo cultivan.



Figura 2. (a) Arbusto de casava, (b) raíces y tallos, (c) esquejes para propagación. Figura adaptada del artículo “The biocassava plus program: Biofortification of cassava for sub-Saharan Africa” (Sayre et al., 2011).

Las estrategias generales para la biofortificación de este cultivo se centran en mejorar su calidad nutricional (Leyva-Guerrero et al., 2012; Narayanan et al., 2011, 2015, 2019; Sayre et al., 2011) reducir la cantidad de glucósidos cianogénicos tóxicos (Gómez, Berkoff, et al., 2019;

Siritunga & Sayre, 2004, 2003), mejorar la calidad y cantidad de almidón (Bull et al., 2018; Koehorst-van Putten et al., 2012; Raemakers et al., 2005), reducir el tiempo que tarda en deteriorarse tras la cosecha (Liu et al., 2017; Wu et al., 2022) o conferirle resistencia a plagas como el virus del mosaico (Chellappan et al., 2004) o el de la raya parda (Beyene et al., 2017; Gómez, Lin, et al., 2019), entre otras. La mejora a través de la obtención de transgénicos de todos estos aspectos supone un gran avance para garantizar la optimización del cultivo de cassava (Cock & Connor, 2020).

3.1 Valor nutricional de la cassava

La cassava es un alimento con un alto contenido energético, además es un cultivo muy eficiente en cuanto a su productividad por hectárea, con 71 toneladas/hectárea al año y 1045 kJ/hectárea al día (Montagnac et al., 2009). La raíz de almacenamiento, que es la parte más ampliamente consumida, presenta un alto contenido de carbohidratos y agua, y supone poco aporte de grasas y proteínas. Aporta bastante vitamina C, pero de otras vitaminas y minerales supone un porcentaje mínimo de la RDA (Recommended Dietary Allowance). De hecho, carece de ciertos nutrientes (o posee una cantidad tan mínima que ni siquiera se tiene en cuenta en su valor nutricional), por ejemplo, de pigmentos como el licopeno, la luteína y la zeaxantina; de vitaminas D y B12, y de ácidos grasos trans y colesterol. En las tablas I y II se recogen los datos publicados por United States Department of Agriculture (USDA) sobre el valor nutricional tanto de macronutrientes como de micronutrientes (<https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169985/nutrients>).

Tabla 1. Valor nutricional (macronutrientes y agua) de la raíz de cassava, datos publicados por el USDA.

Macronutrientes	Valor nutricional (por 100 g)
Carbohidratos	38,1 g
Azúcares	1,7 g
Fibra	1,8 g
Grasas	0,28 g
Proteínas	1,36 g
Agua	59,7 g

Tabla 2. Valor nutricional (micronutrientes) de la raíz de cassava, información publicada por el departamento de agricultura de los EEUU (USDA)

Micronutrientes	Cantidad por cada 100 gramos
Vitamina A (retinol)	13 µg
beta-caroteno	0,8 µg

Vitamina B1 (tiamina)	0,087 mg
Vitamina B2 (riboflavina)	0,048 mg
Vitamina B3 (niacina)	0,854 mg
Vitamina B5 (ácido pantoténico)	0,107 mg
Vitamina B6	0,088 mg
Vitamina C (ácido ascórbico)	20,6 mg
Vitamina E (alfa-tocoferol)	0,19 mg
Vitamina K	1,9 µg
Folato	27 µg
Ácidos grasos saturados	0,074 g
Ácidos grasos monoinsaturados	0,075 g
Ácidos grasos poliinsaturados	0,048 g
Potasio	271 mg
Fósforo	27 mg
Magnesio	21 mg
Calcio	16 mg

Como podemos ver en los datos recogidos en la tabla II, la cassava tiene un alto contenido de vitamina C, que contrasta con el bajo contenido en vitaminas del grupo B y en vitaminas A, E y K, suponiendo un aporte muy insuficiente de estos micronutrientes para el requerimiento diario (RDA) (Montagnac et al., 2009).

En este trabajo se van a revisar diversas investigaciones en las que se ha modificado genéticamente la planta de cassava para conseguir una mayor acumulación de micronutrientes, una mayor seguridad alimentaria para los consumidores de este alimento (por ejemplo, eliminando tóxicos) además de una mayor productividad del cultivo mejorando su resistencia a plagas, así como la reducción del deterioro post-cosecha, etc. El principal objetivo de este trabajo es comprender los avances que se han realizado en ese sentido y también plantear los retos que se han encontrado en el proceso de mejora del cultivo de cassava y cuáles son las posibles vías para solucionarlos.

4. Vitamina A

La cassava es el quinto cultivo más extendido en el mundo (Parmar et al., 2017) y el tercero en los trópicos, representando una de las principales fuentes de calorías en los países del tercer mundo. Es la mayor fuente de calorías para unos 500 millones de personas, muchos de ellos en África (Bayata, 2019), pero como ya se ha mencionado no supone un aporte suficiente de ciertos nutrientes, en particular de vitamina A. Una ración típica de adulto de

cassava, 500 gramos, sólo aporta un 10% del requerimiento diario de vitamina A (WHO & FAO, 2001).

La vitamina A engloba retinol (-OH), ácido retinoico (-COOH) y retinal (-CHO). Cabe destacar el papel de los carotenoides presentes en los vegetales: algunos, como el β -caroteno, son precursores de 40 carbonos capaces de formar moléculas de 20 carbonos que producen vitamina A por la acción de la enzima 15-15'-dioxigenasa. Los carotenoides cumplen una importante función como antioxidantes (Opara & Rockway, 2006). Esta vitamina liposoluble se une en el núcleo celular a receptores dimerizados para modificar la expresión génica, aunque también tiene funciones mediadas por cambios conformacionales (rodopsina de los bastones retinales) y por su actuación como cofactor (Carazo et al., 2021). Se requieren unos 1000 μ g de vitamina A diarios para suplir las necesidades del organismo. La vitamina A participa en el mantenimiento de la integridad epitelial (McCullough et al., 1999) y la función inmune (Stephensen, 2001), en la espermatogénesis (Hogarth & Griswold, 2010) y las migraciones celulares de la morfogénesis embriogénica (Zile, 2010), en la función neurológica al mediar procesos que participan en la plasticidad sináptica (Olson & Mello, 2010), en el crecimiento óseo regulando el equilibrio entre osteoblastos y osteoclastos (Herschel Conaway et al., 2013) y en la visión en oscuridad y el mantenimiento de la córnea (Dowling, 2020).

4.1 Deficiencia de vitamina A

La carencia de vitamina A produce problemas de gravedad variable para la salud al verse afectadas las funciones llevadas a cabo por esta vitamina. Es especialmente prevalente dentro del grupo de los menores de 5 años por encima de cualquier otro rango de edad. La prevalencia geográfica es mayor en la zona central de la región del África subsahariana, con 25905,22 casos por cada 100000 habitantes, seguido por la zona este (23500,02/100000) y la zona oeste (15570,91/100000) de la misma región (Zhao et al., 2022).

4.2 Biofortificación en cassava de vitamina A: BioCassava+

En el contexto de la búsqueda de una mejora genérica de cultivos como la cassava nació en 2004 el programa BioCassava+ (BC+) financiado por la fundación Bill y Melinda Gates dentro de los grandes retos para la salud global, con una financiación de más de 20 millones de dólares. Centrándose en el África sub-Sahariana, el programa ha tratado de mejorar el contenido nutricional (zinc, hierro, proteína y vitamina A) de la cassava; así como conferirle características que mejoren su productividad y por ello la aceptabilidad por parte de los agricultores y los consumidores (resistencia a virus, aumento de la durabilidad y reducción de los componentes tóxicos) (Sayre et al., 2011).

En esta investigación (Sayre et al., 2011) se usa la variedad de *Manihot esculenta* 60444, una de las más comúnmente utilizadas en estudios de modificación genética. Sobre esta variedad

existe mucha información y protocolos de transformación para la obtención de transgénicos, así como germoplasma para la producción de los transgénicos. Los plásmidos pCAMBIA (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/>) se utilizaron para integrar cassettes de expresión utilizando la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Li et al., 1996). Uno de los promotores más usados en este proyecto fue el promotor de la *patatina* de clase II para la expresión selectiva de transgenes en la raíz de almacenamiento (Kim et al., 1994). Todas estas herramientas y el protocolo de transformación había sido utilizada de forma exitosa en investigaciones similares anteriores (Ihemere et al., 2006; Siritunga & Sayre, 2003).

La estrategia biotecnológica con la que abordar la biofortificación con provitamina A se basa en el all-trans- β -caroteno, producido por la vía de isoprenoides metil-eritritol fosfato (MEP) del cloroplasto. Por investigaciones en otras especies se sabe que el incremento de β -caroteno puede obtenerse incrementando el flujo hacia su vía de biosíntesis o reduciendo su reciclaje, siendo los ejemplos más famosos los del Golden Rice y Golden Rice 2 (Beyer et al., 2002; Ye et al., 2000) en los que se consiguió la coexpresión de los transgenes para fitoeno sintasa (*ctrB*), que media el paso indispensable para la mencionada vía de síntesis de carotenoides, y fitoeno desarutasa bacteriana (*ctrI*). La expresión de estos transgenes bajo el control de promotores constitutivos (fuertes) incrementa el flujo de precursores isoprenoides hacia la síntesis de β -caroteno y otros carotenoides. También se ha usado la expresión de genes de fitoeno sintasa de plantas (*psy*) y bacterias (*ctrB*) para incrementar la acumulación de carotenoides en tubérculos de patata (Diretto et al., 2007) y frutos de tomate (Fraser et al., 2002). El programa BC+ se ha centrado en incrementar el flujo hacia la biosíntesis de carotenoides (Figura 3) a través de dos estrategias (Sayre et al., 2011):

1. Expresión del gen *crtB* que codifica la fitoeno sintasa bacteriana bajo el control del promotor de patatina específico para el tubérculo. Se unió a *crtB* un péptido para poder localizar la enzima en los compartimentos subcelulares.
2. Co-expresión de fitoeno sintasa bacteriana (*crtB*) y 1-deoxixilulosa-5-fosfato sintasa (*DXS*) de *Arabidopsis thaliana*, colocadas individualmente bajo el control de promotores de patatina. La enzima DXS sirve para incrementar el influjo total a la vía de isoprenoides del plástido a través del aumento de GGDP, el sustrato de la fitoeno sintasa.

Como resultado de la expresión transgénica de *crtB* se incrementó la concentración total de carotenoides entre 10 y 20 veces con respecto a la concentración de los controles sin transformar. En las raíces modificadas llegaron a cuantificarse concentraciones de carotenoides totales de 25 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, siendo en las raíces sin transformar de 1-2,5 $\mu\text{g/g}$ de peso seco. Con la segunda estrategia de coexpresión de *crtB* y *DXS* la concentración

en raíces de almacenamiento de plantas transformadas era de 15 a 30 veces mayor que en aquellas no transformadas, alcanzando concentraciones de carotenoides totales de más de 50 µg/g de peso seco. En las raíces con mayor tasa de producción de carotenoides, el all-trans- β-caroteno suponía un 85-90% del total de carotenoides, y en mucha menor proporción otros como luteína, 9-cis- β-caroteno y 13-cis- β-caroteno.

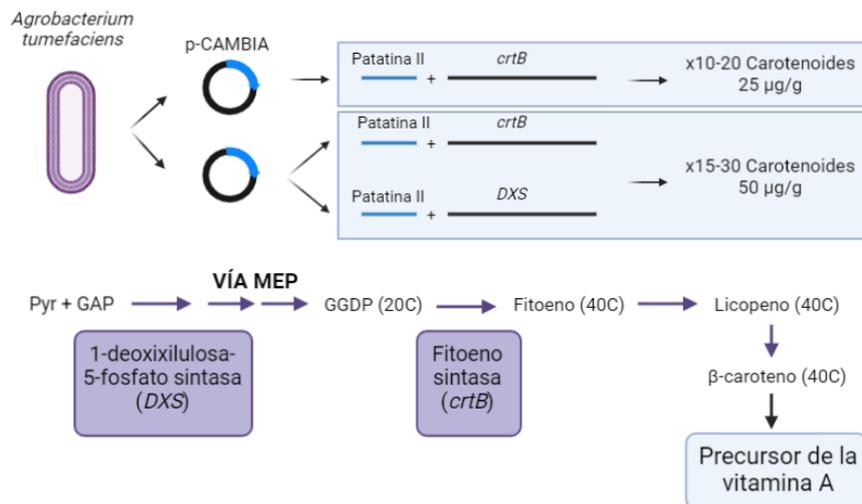


Figura 3. Resumen gráfico del artículo “The biocassava plus program: Biofortification of cassava for sub-Saharan Africa” (Sayre et al., 2011).

Estos estudios probaron la validez de la estrategia para la biofortificación de provitamina A en cassava, así como la mayor efectividad de la estrategia de coexpresión de *crtB* y *DXS*. Al contrario que en el arroz dorado, no se requiere la expresión transgénica de la fitoeno desaturasa bacteriana (*crtI*) para aumentar la producción de β-caroteno. Posteriormente cultivaron las plantas transgénicas en Puerto Rico para evaluar su aptitud para el cultivo y confirmaron la efectividad de esta estrategia más allá de las condiciones controladas de invernadero. Además, en las plantas que coexpresan *crtB* y *DXS* no se vió afectada la concentración de vitamina E, algo anticipable dado que las rutas tienen intermediarios comunes (Sayre et al., 2011).

5. Vitamina B6

Este micronutriente se puede encontrar en varias formas: piridoxal, piridoxina, piridoxamina y piridoxal fosfato. Algunas de sus funciones más destacadas son la de cofactor enzimático, por la cual media la síntesis de nucleótidos y proteínas y la proliferación celular (Rall & Meydani, 1993), la síntesis de neurotransmisores como dopamina, histamina, serotonina y GABA (Hellmann & Mooney, 2010), la síntesis de grupos hemo (Bird, 2018), la neutralización de homocisteína (un aminoácido tóxico) por metilación o metabolización por la vía de trans-

sulfuración (Ubbink et al., 1996). Además, actúa como antioxidante y antiinflamatorio porque posee un grupo hidroxilo en la posición 3 de la estructura de piridina (Bird, 2018).

5.1 Deficiencia de vitamina B6

La RDA de vitamina B6 es de 2 mg por día. Su deficiencia tiene implicaciones muy variadas sobre el organismo. Se ha asociado con la depresión y con disfunciones neurológicas (Hellmann & Mooney, 2010); así como con un metabolismo anormal de homocisteína que conlleva un aumento del riesgo de estenosis vascular, enfermedad coronaria y defectos del tubo neural (Ubbink et al., 1996) y con anemia (Bird, 2018). También afecta enormemente al estado del sistema inmune, aumenta la síntesis de mediadores proinflamatorios y se desajusta el balance de linfocitos Th1-Th2 hacia una respuesta excesiva de los Th2, lo cual puede producir alergias (Stach et al., 2021).

5.2 Biofortificación en cassava de vitamina B6

La biosíntesis “de novo” de vitamina B6 en las plantas requiere dos dominios de la enzima glutamina amidotransferasa: *PDX1* (sintasa) y *PDX2* (glutaminasa). En la siguiente investigación (Li et al., 2015) se construyeron cassettes para la expresión heteróloga de los genes *PDX1.1* y *PDX2* de *A. thaliana* tanto de forma ubicua (introduciendo los genes en un vector con el promotor de *CaMV35S* controlando independientemente ambos genes) como específica en la raíz (siguiendo la misma estrategia pero usando el promotor de *patatina*) (Figura 4), buscando reducir el riesgo de silenciamiento génico por mecanismos epigenéticos asociado con la expresión de transgenes (Fagard & Vaucheret, 2000). Se seleccionaron cinco líneas transgénicas de cassava de expresión ubicua y cuatro de expresión en la raíz (llamadas 35S y PAT, respectivamente) y se cultivaron en invernadero. Encontraron que la transformación no suponía perjuicio alguno para la altura de la planta de cassava ni para la cantidad de peso fresco excepto en el caso de 35S-1 y PAT-7, que tenían un aumento significativo de altura a veces observado en plantas de cassava cultivadas a partir de callos. La cantidad de vitamina B6 era varias veces mayor en las líneas transgénicas respecto a las silvestres y se correlacionaba con los niveles de expresión más altos de *AtPDX1.1* y *AtPDX2*. Además, identificaron tres genes ortólogos de *AtPDX1.1* y uno de *AtPDX2* en el genoma de la cassava, y comprobaron que su expresión se mantenía igual en los transgénicos y los silvestres, excepto el gen *PDX1.3a* de *M. esculenta* que veía su expresión levemente reducida en las hojas de la línea 35S-2. Estos resultados indican que la expresión de los transgenes *AtPDX1.1* y *AtPDX2* no tiene un efecto significativo sobre la expresión de genes endógenos de cassava pero incrementa la cantidad total de vitamina B6 en hojas y raíces (Li et al., 2015).

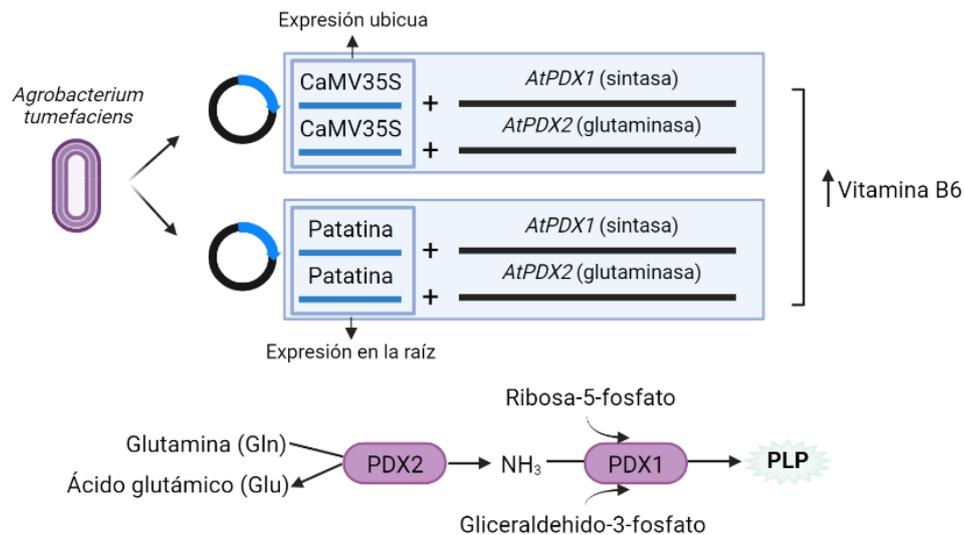


Figura 4. Resumen gráfico del artículo “Increased bioavailable Vitamin B6 in field-grown transgenic cassava for dietary sufficiency” (Li et al., 2015).

6. Hierro y zinc

6.1 Funciones e implicaciones de la deficiencia de hierro

El hierro, como otros minerales, actúa como cofactor de enzimas indispensables para el correcto funcionamiento del organismo. De especial interés es la catalasa, que es una hemoproteína encargada de descomponer H₂O₂, una de las especies reactivas de oxígeno que se genera naturalmente en las reacciones fisiológicas y que ha de ser neutralizada para no causar daño oxidativo (Opara & Rockway, 2006). El hierro forma parte del grupo hemo presente en múltiples proteínas imprescindibles como la hemoglobina encargada del transporte de oxígeno y la mioglobina que lo almacena, el citocromo *c* de la cadena de transporte electrónico, etc. Además, se ha descrito otro tipo de hemoproteínas, los sensores hemo-sensibles, que participan en procesos como la regulación transcripcional, la síntesis de tRNA, el splicing de mRNA, la autofosforilación o las interacciones entre proteínas (Shimizu et al., 2019).

La RDA de hierro es de 15 mg al día para adolescentes y mujeres adultas y 10 para hombres adultos y mujeres pasada la menopausia (National Research Council. et al., 1989). Su deficiencia puede producir una amplia variedad de síntomas clínicos: fatiga, letargo, dificultad para concentrarse, mareos, tinnitus (zumbido en el oído), palidez y dolor de cabeza. En algunos individuos puede llegar a producir síndrome de piernas inquietas, alopecia, piel o pelo secos, coiloniquia (uñas débiles y planas) y glositis atrófica (proyecciones a partir de las papilas de la lengua). Al alcanzar el estado de anemia se empeoran los síntomas, llegando a darse graves problemas cardíacos e inestabilidad hemodinámica (Pasricha et al., 2021). Suele deberse a deficiencias nutricionales, especialmente de hierro pero también de

vitaminas A, B12 y folato, y también pueden deberse a hemoglobinopatías o infecciones. Afecta particularmente a niños y mujeres embarazadas: la OMS calcula que un 42% de los menores de 5 años en el mundo padece anemia, y un 40% de las embarazadas (https://www.who.int/es/health-topics/anaemia#tab=tab_1). En casos graves en niños se producen anomalías y fragilidad óseas, hepatomegalia y esplenomegalia, retraso del crecimiento y la pubertad, problemas cognitivos y cardíacos (Allali et al., 2017).

6.2 Funciones e implicaciones de la deficiencia de zinc

El zinc es un micronutriente esencial implicado en muchas rutas bioquímicas en las células humanas. La mayor parte del zinc se encuentra en los músculos esqueléticos y en los huesos. La RDA de zinc es de 8-11 mg al día. La deficiencia severa de zinc conlleva retraso del crecimiento, anemia y disfunciones neurológicas, y casos menos graves implican un amplio espectro de patologías, especialmente cardiovasculares y relacionadas con la edad. El zinc es esencial para la activación de más de 300 enzimas y se une para mantener la estabilidad y funcionalidad de más de 2500 proteínas, como la óxido nítrico sintasa, factores de transcripción que contienen dedos de zinc, la superóxido dismutasa de cobre/zinc y proteínas de reparación del DNA. Además puede regular quinasas, fosfatasas y canales directamente. Tiene especial interés su papel en evitar el estrés oxidativo y la inflamación (Choi et al., 2018).

6.3 Biofortificación en cassava de hierro y zinc

En una primera aproximación a la biofortificación de hierro en cassava se sobreexpresó el gen *VIT1* de *Arabidopsis thaliana* bajo el control del promotor de *patatina* tipo 1 (Narayanan et al., 2015), utilizando para ello una transformación mediada por *Agrobacterium* sobre plantas del cultivar TME204 (Figura 5). El gen *VIT1* codifica un transportador vacuolar de hierro. Al comparar los niveles de hierro de plantas transformadas con los niveles del silvestre, observaron un aumento de 2-4 veces en la concentración de hierro en los tubérculos de las plantas transgénicas, de 4 veces en tallos jóvenes y de 16 veces en la base del tallo (Narayanan et al., 2015). Posteriormente, el mismo grupo obtuvo plantas de cassava del mismo cultivar (TME204) que coexpresaban los transgenes *IRT1* de *A. thaliana* bajo control del promotor de *A14*, gen que codifica la familia de proteínas con dominio C1 rico en Cys/His, ya que este gen se expresa sólo en las raíces, y *FER1* de *A. thaliana* bajo control del promotor de *patatina* tipo 1 (Figura 5). Al estudiar las concentraciones de hierro y zinc de las líneas transgénicas de cassava mediante un análisis elemental realizado por espectroscopía de plasma (ICP-OES) encontraron que había un aumento bastante significativo de la concentración de ambos elementos. En los tubérculos de las plantas transgénicas las concentraciones de hierro y zinc eran 5-6 veces mayor que en las plantas silvestres, llegando a alcanzar valores de 55 ± 13 µg de hierro/g peso seco (PS) en comparación con los 10 ± 2

$\mu\text{g Fe/g PS}$ de los tubérculos de los controles; y $26 \pm 12 \mu\text{g Zn/g PS}$ en los transgénicos comparado con $5 \pm 1 \mu\text{g Zn/g PS}$ en los no transgénicos. El aumento de hierro era un poco menor en el tejido foliar pero no se observó incremento en la concentración de zinc, lo cual no es especialmente relevante dado que la parte de la yuca más ampliamente consumida es el tubérculo. Además, midieron las concentraciones de ambos elementos en hojas, peciolo, tallos, raíces fibrosas y raíces de almacenamiento para comprobar que el aumento en unos tejidos no se debía a la disminución en otros, y comprobaron que efectivamente las líneas transgénicas tenían una concentración total de hierro y zinc bastante superior a las silvestres (Narayanan et al., 2019).

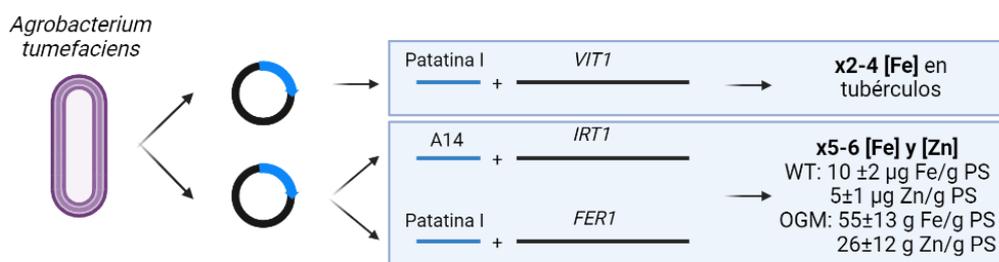


Figura 5. Resumen gráfico de los artículos “Overexpression of Arabidopsis VIT1 increases accumulation of iron in cassava roots and stems” (Narayanan et al., 2015) y “Biofortification of field-grown cassava by engineering expression of an iron transporter and ferritin” (Narayanan et al., 2019).

7. Proteínas

Es el único macronutriente que se ha descrito en estrategias de biofortificación de cassava, ya que el consumo de una dieta demasiado pobre en proteínas tiene implicaciones graves para la salud. Teniendo en cuenta que la cassava tiene un contenido mínimo de proteínas, se han realizado investigaciones en las que se ha abordado el problema en busca de transgénicos con un mayor contenido proteico para tratar de paliar los efectos de esta carencia nutricional.

7.1 Deficiencia de proteínas

La condición clínica derivada de una dieta deficiente en proteínas se conoce como “kwashiorkor”, fue estudiada durante los años 50 (Brock & Autret, 1952) y se llegó a la conclusión de que los principales síntomas eran edemas asociados a hipoalbuminemia, pelo y piel despigmentados, desórdenes gastrointestinales, atrofia de los acinos pancreáticos, infiltraciones grasas, necrosis o fibrosis en el hígado y una alta tasa de mortalidad si no se aborda el problema (Brock & Autret, 1952). En plasma bajan los niveles de glutatión, metionina, vitamina E y zinc y suben los de hierro libre y ferritina, por lo que también afecta a los niveles de micronutrientes en el organismo. En este sentido, bajan también los niveles de

enzimas, proteínas y vitaminas antioxidantes, con lo que se deduce que la patología surge de un exceso de radicales libres y una carencia de mecanismos antioxidantes. Se ralentiza el metabolismo de proteínas y se reduce el catabolismo de lípidos (limitando la generación de energía), se producen alteraciones hormonales (insulina, T3 y T4, TSH, leptina, etc.), aumenta la proliferación de patógenos en la microbiota y aparecen concentraciones anormalmente altas de citoquinas proinflamatorias (Pham et al., 2021).

7.2 Biofortificación en cassava de proteínas

Con el objetivo de incrementar la concentración de proteínas en la raíz de cassava se ha desarrollado la estrategia de sobreexpresar enzimas del metabolismo de proteínas bajo el control de promotores específicos para promover la acumulación en las raíces. Se consiguió la sobreexpresión del gen que codifica la hidroxinitrilo liasa (*HNL*, que participa en el metabolismo de glucósidos cianogénicos) bajo el control del promotor de *patatina* (Figura 6). Tanto el gen como el promotor se clonaron en el vector pCambia2300, que se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* para llevar a cabo la transformación de plantas de cassava del cultivar TMS60444. Con esta aproximación se multiplicó por tres el contenido de proteínas totales en la raíz y se aceleró la cianogénesis tras el procesamiento del tubérculo, y por tanto se obtuvo un alimento mucho más seguro. Tras 90 minutos desde el procesamiento, las raíces transgénicas presentaban una reducción del 80-90% del contenido de acetona cianohidrina (un metabolito tóxico). En ellas también se producía una reducción del 53-74% del contenido de linamarina (que producirá acetona cianohidrina). Como la enzima HNL contiene un 50% de aminoácidos esenciales, el consumo de tubérculos de cassava que acumulan esta proteína supondrá un incremento en el aporte proteico de la raíz (Narayanan et al., 2011).



Figura 6. Resumen gráfico del artículo “Overexpression of hydroxynitrile lyase in cassava roots elevates protein and free amino acids while reducing residual cyanogen levels” (Narayanan et al., 2011).

8. Eliminación de cianuro de hidrógeno

En la cassava hay dos componentes, linamarina y lotaustralina, que al ser hidrolizados generan cianuro de hidrógeno, un compuesto muy tóxico que se une a la enzima citocromo c oxidasa impidiendo el correcto funcionamiento de la cadena transportadora de electrones. Su

función parece ser la de proteger frente al estrés biótico, pues la separación espacial entre el sustrato (linamarina) y la enzima linamarasa que lo hidroliza hace que sólo interacciones y por tanto se produzcan metabolitos tóxicos cuando ocurre un daño en los tejidos debido a la acción de herbívoros u hongos o frente a un daño mecánico, aunque no se descarta que sea un recurso para la movilización en la planta de formas reducidas de nitrógeno. Otras plantas que producen estos glucósidos cianogénicos son los almendros, el sorgo o las cañas de bambú (Ndubuisi & Chidiebere, 2018). Esto supone un importante peligro asociado al consumo de este alimento, especialmente en las variantes amargas que tienen un contenido mucho más alto de glucósidos cianogénicos (Tshala-Katumbay et al., 2016). En estas variantes se requieren procesamientos más exhaustivos que pueden implicar la pérdida de nutrientes, por lo que obtener variantes de cassava con un contenido menor de glicósidos cianogénicos permitiría reducir la cantidad de procesamientos a llevar a cabo y por ello mantener más nutrientes en las elaboraciones culinarias.

Para eliminar estos compuestos cianogénicos se han generado plantas transgénicas de cassava en las que se ha inhibido la expresión de los genes *CYP79D1* y *CYP79D2* del citocromo P450 bajo el control del promotor *Cab1*, específico de las hojas (Sirtunga & Sayre, 2003) (Figura 7). Los resultados demostraron una reducción del 99% de la cantidad de linamarina en las raíces, con lo que no solo se consigue una variante sin glucósidos cianogénicos sino que además se demuestra que estos compuestos se sintetizan en las hojas y posteriormente se distribuyen al resto de la planta. En el mismo sentido, se han obtenido también transgénicos de cassava con un metabolismo y volatilización acelerada de los cianogénicos (hasta tres veces más rápido) durante el procesamiento mediante la sobreexpresión de *HNL* (hidroxinitrilo liasa), la enzima involucrada en el último paso de la cianogénesis (Figura 7). En estas plantas transgénicas, la acetona cianohidrina se transforma en acetona y cianuro volátil en las raíces, lo cual supone una ventaja importante sobre el silvestre que sólo expresa *HNL* en hojas, y tiende a acumular ese metabolito tóxico en las raíces (Sirtunga & Sayre, 2004). Más recientemente y usando la técnica de CRISPR-Cas9 para impedir la actividad de *CYP79D1* y *CYP79D2* de forma individual y conjunta (Figura 7), encontraron que el “knockout” de *CYP79D2* reduce casi totalmente la producción de cianogénicos, por lo que contribuye más a la cianogénesis que *CYP79D1*, cuyo “knockout” presenta una reducción menor del contenido de compuestos cianogénicos. El doble “knockout” de ambos genes elimina al completo la presencia de cianogénicos (Gómez, Berkoff, et al., 2019), con el consiguiente beneficio económico que esto supone.

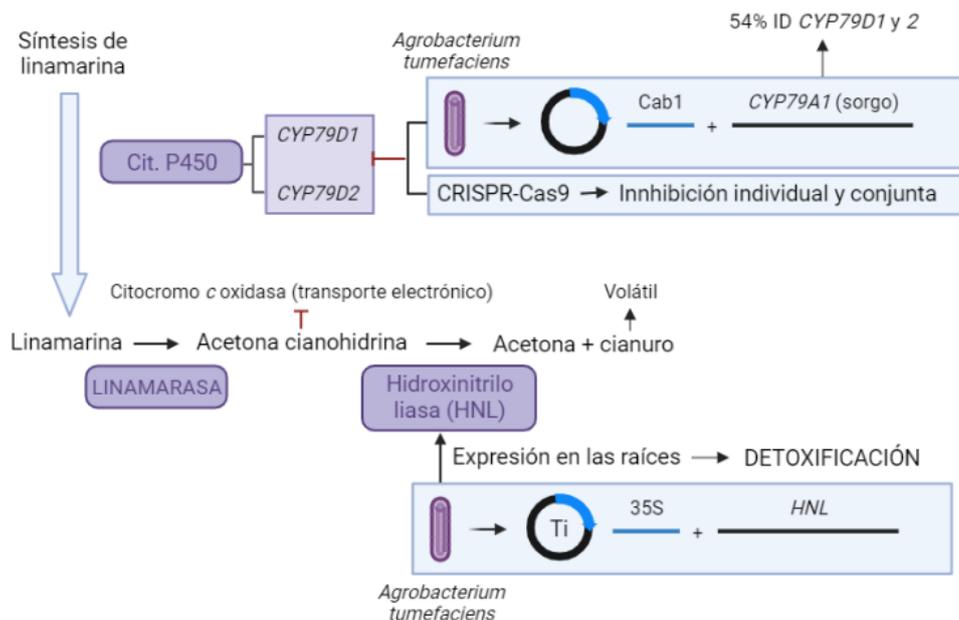


Figura 7. Resumen gráfico de los artículos “Generation of cyanogen-free transgenic cassava” (Siritunga & Sayre, 2003), “Engineering cyanogen synthesis and turnover in cassava (*Manihot esculenta*)” (Siritunga & Sayre, 2004) y “CRISPR-Cas9-mediated knockout of CYP79D1 and CYP79D2 in cassava attenuates toxic cyanogen production” (Gómez, Berkoff, et al., 2019).

9. Resistencia a enfermedades

9.1 Virus del mosaico de la cassava

El virus del mosaico de la cassava es el patógeno más ampliamente distribuido en África, y es transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y por la acción del hombre al tomar esquejes infectados. El síntoma más común es el mosaico clorótico característico de la hoja (que afecta especialmente a plantas jóvenes), y la sintomatología varía desde casi imperceptible hasta un retraso extremo del crecimiento y reducción del tamaño de la hoja (Fauquet & Fargette, 1990). Se han conseguido obtener diversas variedades de plantas resistentes a virus mediante la resistencia derivada de patógenos que consiste en la expresión de ciertos genes virales que pueden conferir resistencia o atenuar la susceptibilidad de la planta. El mecanismo que media estos procesos de resistencia es el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS por sus siglas en inglés), que es un mecanismo de degradación específica de mRNAs desencadenado por la formación de un intermediario de RNA de doble cadena que es cortado y procesado por proteínas DICER y el complejo RISC, respectivamente, para formar siRNAs (“small interfering RNA”) que llevan a cabo el silenciamiento.

Al diseñar transgénicos de cassava con el gen *AC1* modificado del virus del mosaico de la cassava africano (ACMV) expresado de forma constitutiva bajo el control del promotor de

CsVMV (Figura 8); se obtuvo resistencia a dicho virus por el desencadenamiento del mecanismo PTGS (Chellappan et al., 2004). No se han realizado grandes esfuerzos en esta línea de investigación desde entonces, no sólo porque ya se consiguió un transgénico resistente, sino también porque no puede usarse la técnica de mutagénesis dirigida CRISPR/Cas9 ya que no se conocen los genes de susceptibilidad ante el virus del mosaico en la cassava (Lin et al., 2019).

9.2 Enfermedad de la raya parda de la cassava

La enfermedad de la raya parda de la cassava (“Cassava Brown Streak Disease”, CBSD) es causada por el virus homónimo (CBSV) y la variante de Uganda del mismo (UCBSV). Se describe por primera vez en los años 30 en Tanzania (Storey, 1936) por los síntomas característicos en las hojas viejas de cassava y la putrefacción de las raíces, aunque luego se observó que los síntomas podían aparecer en cualquier parte de la planta (Nichols, 1950). Se caracteriza por la necrosis de los tubérculos, la clorosis foliar, la aparición de constricciones radiales en las raíces y rayas o lesiones marrones en los tallos (Figura 8). No se distorsiona la morfología de la hoja como en CMD y además los síntomas son muy variables en gravedad, inicio y partes afectadas, por lo que resulta muy difícil identificar las plantas infectadas (Tomlinson et al., 2018).

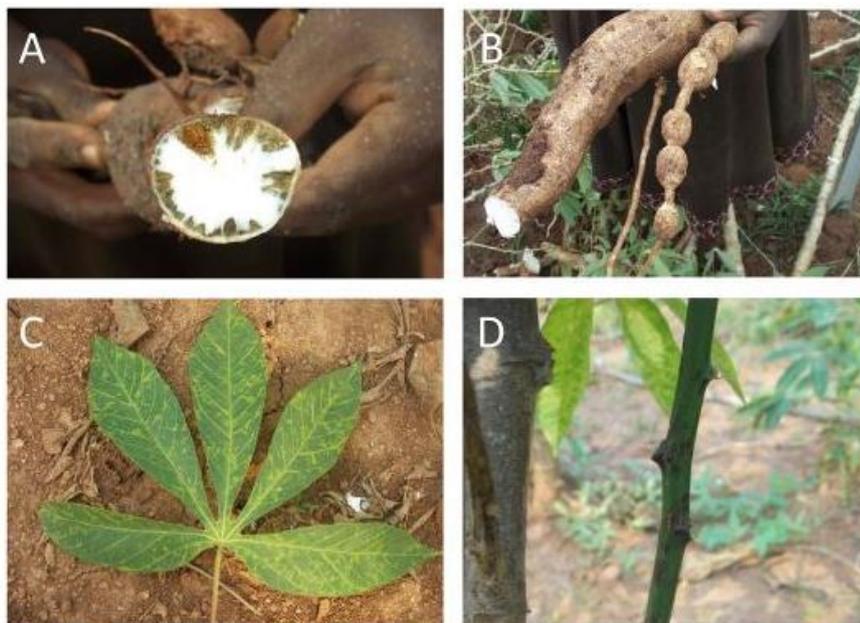


Figura 8. Síntomas de CBSD: necrosis de las raíces (A) y constricciones en las mismas (B), clorosis de las hojas (C) y lesiones en los tallos (D). Figura tomada del artículo “Cassava brown streak disease: historical timeline, current knowledge and future prospects” (Tomlinson et al., 2018).

Se estima que al año se pierden una media de 750 millones de dólares (US\$) por el efecto del CBSD sobre los cultivos de cassava de Kenia, Tanzania, Uganda y Malawi (Hillocks &

Maruthi, 2015). De ahí la importancia de evitar este tipo de enfermedades en el cultivo: tanto por las pérdidas económicas como por la pérdida de alimento para comercializar que causan.

Al introducir en un transgénico una secuencia viral repetitiva invertida de CBSV se puede desencadenar el proceso de PTGS, confiriendo a la planta resistencia al virus. Para comprobarlo se expresaron de forma constitutiva (usando el promotor de *CsVMV*) tres tipos de RNAi diseñados a partir del gen *CP* (Coat Protein), usando su secuencia completa o los fragmentos C- o N-terminal (Figura 9) (Patil et al., 2011). Esta proteína participa en la encapsulación y la replicación del ADN del virus. Primero, estas construcciones se expresaron en *Nicotiana benthamiana*, por su simplicidad de estudio y rapidez de crecimiento con respecto a la cassava, y confirmaron que la resistencia máxima se producía al expresar la secuencia *CP* completa, siendo un 85% de los transgénicos totalmente resistentes, y que en las otras dos tipos de líneas donde sólo se expresaban los fragmentos C o N terminal también se producía resistencia, aunque algo menor. A su vez, confirmaron la protección cruzada contra otras cepas del mismo virus en aquellos transgénicos que expresaban la secuencia completa del gen *CP* (Patil et al., 2011). Las mismas construcciones se expresaron posteriormente en cassava (Figura 9), y se encontró que los transgénicos presentaban resistencia total a los síntomas o un importante retraso en la aparición de estos, así como resistencia cruzada a otras cepas (UCBSV, CBSV) (Ogwok et al., 2012). Para asegurar la resistencia a estas cepas del virus (CBSV y UCBSV) se transformaron plantas de cassava con una construcción de repeticiones en tándem de la proteína CP de ambos virus, obteniendo resistencia a ambos (Beyene et al., 2017).

Para que los virus de la familia *Potyviridae* puedan infectar, la proteína VPg (“genome-linked protein”) tiene que unirse a un factor de iniciación de la traducción E4 del organismo hospedante. En cassava hay cinco isoformas de E4: eIF4E, eIF4E-1, eIF4E-2, novel cap-binding protein-1 (nCBP-1) y 2 (nCBP-2). Al obtener mediante CRISPR/Cas9 “knock-outs” para los genes de *nCBP-1* y 2 (Figura 9) encontraron que los mutantes de *nCBP-2* ven reducida la intensidad de los síntomas del virus CBSV en la raíz con respecto al silvestre y al mutante *nCBP-1*, lo cual puede deberse a que *nCBP-2* sea la isoforma de expresión dominante, por lo que su inactivación obligaría al virus a interactuar con isoformas de menor afinidad, atenuando la gravedad de la infección. El doble mutante ve reducidos los síntomas tanto en la zona aérea como en las raíces, así como la incidencia de la enfermedad (Gómez et al., 2019).

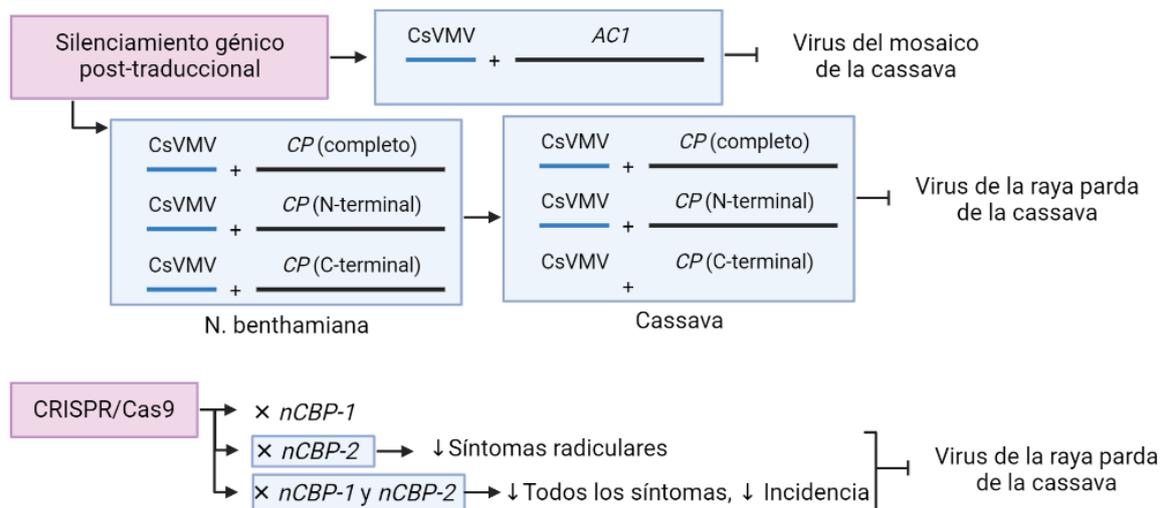


Figura 9. Resumen gráfico de los artículos “RNAi-mediated resistance to diverse isolates belonging to two virus species involved in Cassava brown streak disease” (Patil et al., 2011), “Transgenic RNA interference (RNAi)-derived field resistance to cassava brown streak disease” (Ogwok et al., 2012) y “Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava eIF4E isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence” (Gómez, Lin, et al., 2019).

Actualmente, el principal problema de los transgénicos de cassava resistentes a enfermedades es que es difícil obtener transgénicos con una resistencia duradera, porque para ello habría que combinar varias modificaciones en el mismo organismo, hoy en día las estrategias son limitadas. Además, es imposible deducir cuál va a ser la aceptación de los productos modificados biotecnológicamente por los agricultores, si habrá problemas con la regulación de la comercialización, etc. (Bart & Taylor, 2017).

10. Mejora de la cantidad y la calidad del almidón

Potenciando la síntesis de carbohidratos en los tejidos sumidero (como los tubérculos) se pretende obtener un contenido mayor de biomasa, con lo que se aumentaría la productividad del cultivo ya sea por acelerar su recolección o por incrementar la cantidad de alimento que contiene. La síntesis de almidón puede ser incrementada mediante la expresión del gen de la enzima AGPasa (ADP-glucosa pirofosforilasa), en este caso una modificación del gen *glgC* bacteriano, bajo el control del promotor de *patatina* tipo I (Figura 10) (Ihemere et al., 2006). Esta enzima media el paso limitante de la síntesis de almidón, por lo que el incremento en la actividad dará lugar al incremento del flujo hacia esta ruta. En este sentido, se obtuvieron plantas transgénicas con hasta un 70% más de actividad AGPasa y un incremento de la biomasa de hasta 2.6 veces más que en las plantas silvestres de cassava (Ihemere et al., 2006).

El almidón está formado por dos tipos de polímeros de glucosa, la amilosa y la amilopectina. La amilopectina está ramificada por enlaces α -1,6, mientras que la amilosa es solo la cadena central α -1,4 sin estas ramificaciones. El consumo de almidón con una proporción alta de amilosa es beneficioso ya que reduce la probabilidad de sufrir alteraciones metabólicas y además ese almidón puede ser digerido por la microbiota para producir compuestos beneficiosos para nuestro organismo (Li et al., 2019). En un estudio reciente, se ha llevado a cabo una mutagénesis dirigida sobre el gen que codifica SBE2, la enzima ramificante del almidón 2 (*sbe2*) usando CRISPR/Cas9 (Figura 10) (Luo et al., 2022). La desregulación de esta enzima en las plantas mutantes hizo que acumularan hasta un 56% más de amilosa. De forma simultánea, otro grupo ha publicado resultados similares en el incremento del contenido de amilosa del almidón en el tubérculo de la cassava mediante la inhibición de algunos de los genes de la enzima ramificante del almidón: *sbe1*, *sbe2a* y *sbe2c* (Figura 10). La transformación se llevó a cabo mediante *Agrobacterium tumefaciens*, introduciendo cDNAs que dieron lugar a RNAi contra cada uno de estos genes, de forma que se suprimió su expresión (Utsumi et al., 2022).

La diferencia de estructuras entre amilopectina y amilosa tiene implicaciones más allá de la salud de los consumidores. En cuanto a sus aplicaciones biotecnológicas, la amilopectina es muy soluble en agua, mientras que la amilosa tiende a recristalizarse tras la dispersión en agua perdiendo la estabilidad de su viscosidad al producirse la recristalización o retrogradación (Koehorst-van Putten et al., 2012). El aumento de la estabilidad del almidón con menos amilosa mejora su funcionalidad en aplicaciones industriales. Se ha conseguido transformar plantas de cassava usando plásmidos con el gen de la luciferasa (gen reportero) bajo el control del promotor y el terminador de *CaMV35S* y el cDNA del gen *GBSSI* de cassava parcialmente en orientación antisentido entre el promotor de *GBSSI* de patata y el terminador del gen de la nopalina sintasa (Figura 10) (Raemakers et al., 2005), con lo que consiguieron plantas transgénicas de cassava del cultivar TMS60444 cuyos tubérculos acumulaban almidón libre de amilosa por la inhibición antisentido del gen que codifica la enzima GBSSI, la almidón sintasa unida a gránulo (Granule Bound Starch Synthase en inglés) que media la biosíntesis de almidón. En otra investigación generaron construcciones con una repetición invertida del gen *GBSSI* de cassava bajo el control del promotor de *GBSSI* de patata, y un marcador selectivo que permite el crecimiento en medios con PPT (fosfotricina) y la resistencia a herbicidas en cultivo (Koehorst-van Putten et al., 2012); y con ellos se transformaron plantas de cassava del cultivar Adira4. Los resultados obtenidos fueron similares a los de la investigación mencionada previamente (Raemakers et al., 2005). Además estudiaron en profundidad las características organolépticas y de textura de elaboraciones realizadas a partir de los transgénicos, concluyendo que las características introducidas les

confieren propiedades beneficiosas para su uso en la industria (Koehorst-van Putten et al., 2012). También mediante la técnica CRISPR/Cas9 ha podido mejorarse esta característica de la cassava: la mutagénesis dirigida de dos de los genes implicados en la síntesis de amilosa, *PTST1* y *GBSS*, reduce enormemente el contenido de amilosa del almidón de los tubérculos (Bull et al., 2018).

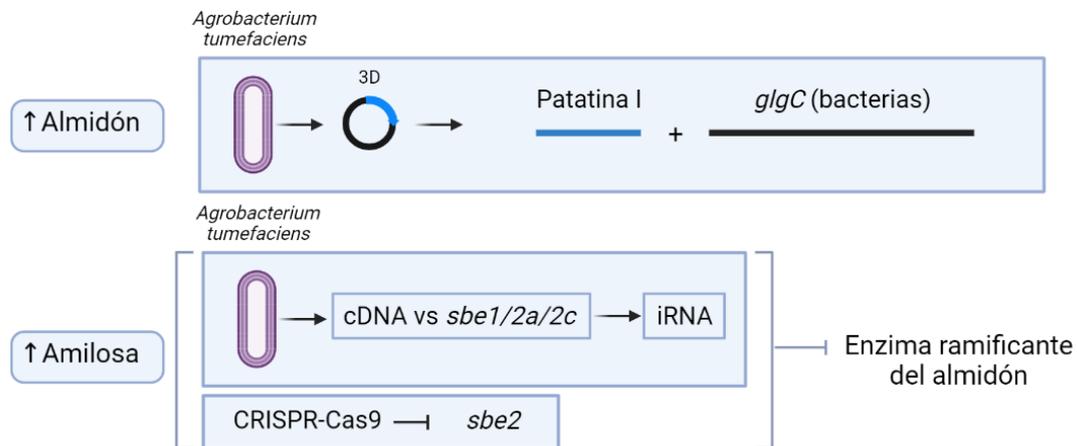


Figura 10. Resumen gráfico de los artículos “Genetic modification of cassava for enhanced starch production” (Ihemere et al., 2006), “Suppressed expression of starch branching enzyme 1 and 2 increases resistant starch and amylose content and modifies amylopectin structure in cassava” (Utsumi et al., 2022) y “Editing of the starch branching enzyme gene SBE2 generates high-amylose storage roots in cassava” (Luo et al., 2022).

11. Reducción del deterioro tras la recolección

Uno de los problemas que surgen durante el cultivo a gran escala de cassava es que se deteriora muy rápidamente tras la recolecta, pasando por un proceso llamado deterioro fisiológico post-cosecha (“Physiological Post-harvest deterioration”, PPD) en sólo 48 horas, llegando a ser incomedible tras 72 horas. El proceso se desencadena por las lesiones mecánicas en la recolección, con lo que se desata la cianogénesis que inhibe a la citocromo oxidasa mitocondrial, de forma que se acumulan especies reactivas de oxígeno (ROS). Al sobreexpresar enzimas antioxidantes, cabe esperar un retraso en el inicio del PPD (Uarrotta et al., 2016). Por este motivo, un intento de limitar el PPD se basó en la expresión transgénica de *AOX1A* (*Arabidopsis thaliana*) bajo el promotor de *patatina*. Esta es una enzima mitocondrial insensible a cianuro que reduce oxígeno, por lo que devuelve los complejos mitocondriales I y III a su estado reducido para evitar que produzcan ROS (Zidenga et al., 2012). En los tubérculos de estos transgénicos tuvo lugar un retraso en el inicio del PPD de al menos dos semanas. El problema de esta aproximación es que puede reducirse la síntesis de ATP al cambiar el potencial de membrana, lo cual supondría un detrimento a la productividad del cultivo.

Durante el PPD se producen compuestos fenólicos a través de la vía biosintética de la hidroxycumarina en la que participa la polifenol oxidasa dependiente de O₂ (PPO) (Uarrota et al., 2016). Por ello, la inhibición de la actividad PPO puede evitar el proceso de PPD. Usando un vector con los genes para la superóxido dismutasa (*MeCu/ZnSOD*) bajo el promotor de *p54* y para la catalasa (*MeCAT1*) bajo el control del promotor de *CaMV35S* se transformaron plantas de cassava para la expresión transgénica de estas dos enzimas que eliminan ROS (Xu et al., 2013). En ellas, sin perder productividad el cultivo, se obtuvo un retraso de la aparición de PPD de 10 días, observándose los síntomas claros en los tubérculos pasados 14 días desde la cosecha. La escopoletina, una de las cumarinas involucradas en el proceso de PPD, es sintetizada por una vía de biosíntesis controlada por la feruloil-CoA 6'-hidroxilasa. El genoma de la cassava contiene una familia de genes de esta enzima de la cual cuatro miembros se expresan en el tubérculo. Para una región altamente conservada de tres de ellos se crearon construcciones de RNAi para transformar las plantas de cassava y reducir significativamente la expresión de la feruloil-CoA 6'-hidroxilasa (Liu et al., 2017).

En la investigación llevada a cabo por el Dr. Wu y colaboradores (Wu et al., 2022), comprobaron primero la capacidad inhibitoria de la lisozima de la clara de huevo sobre la actividad oxidativa de los tubérculos de cassava, y una vez confirmada generaron los transgénicos del cultivar TMS60444 con expresión de *HEWL* (lisozima de la clara del huevo) bajo el control del promotor de *p54/1.0* específico del sistema vascular. Confirmaron tras el cultivo y la cosecha de los transgénicos que se reducía enormemente e incluso se eliminaba en algunas líneas la descoloración vascular, así como que la acumulación de ROS estaba sustancialmente inhibida, lo cual indica que el desarrollo de PPD fue reprimido, y no empezaron a desarrollarse los síntomas de PPD hasta pasados 14 días desde la cosecha (Wu et al., 2022).

12. Retos y perspectivas de futuro en la investigación

Las variedades transgénicas de cassava pueden llevar asociadas desventajas importantes, a menudo porque la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* puede llevar asociada una alteración del balance de expresión génica normal (Ceballos et al., 2020). Se puede destacar la pérdida de contenido de almidón en los tubérculos de las plantas de cassava modificadas para sobreexpresar la fitoeno sintasa (Sayre et al., 2011), la pérdida de la resistencia natural a CMD-2 al desarrollar transgénicos resistentes a CBSD (Cassava Brown Streak Disease) (Beyene et al., 2016) o la reducción del contenido de materia seca de los tubérculos en variantes biofortificadas en provitamina A (Beyene et al., 2018).

En los últimos años han tenido lugar importantes avances en la modificación genética, siendo uno de ellos el sistema CRISPR/Cas9, pero el hecho de no conocer en profundidad el genoma

de la cassava limita su uso, por lo que los hallazgos que se produzcan en los próximos años abrirán la puerta a nuevas aplicaciones (Otun et al., 2022), como la obtención por CRISPR/Cas9 de transgénicos de cassava resistentes a CMV, actualmente no factibles por el desconocimiento de los mecanismos que median la resistencia natural de algunos cultivares (Rybicki, 2019).

Aún así, este sistema no está exento de problemas: a veces se observan efectos distintos al deseado y pueden verse afectados genes vecinos al gen diana, por ejemplo en el caso de la afección en el desarrollo de los tubérculos en plantas con floración inducida por sobreexpresión de *MeFT1* para la aceleración de su maduración (Odipto et al., 2020). Es importante que en el futuro se trabaje en eliminar o al menos reducir estos problemas asociados a la técnica, para que su aplicación sea lo más efectiva posible (Bicko et al., 2021). Además, hay otras características que pueden mejorarse a parte de las que se han tratado en este trabajo, especialmente en el ámbito nutricional. Algunas vitaminas para las cuales la cassava no supone un aporte suficiente son la vitamina B9 (ácido fólico y folato) y la E (tocoferoles y tocotrienoles). La deficiencia de vitamina B9 puede provocar anemia, deterioro del tracto gastrointestinal, alteraciones de la división celular y defectos en el desarrollo del tubo neural durante el embarazo, entre otros. En otros cultivos, como el tomate, ya se han llevado a cabo investigaciones de biofortificación de esta vitamina con éxito (Díaz De La Garza et al., 2007). Por su parte, la vitamina E es un antioxidante lipídico que protege membranas celulares y evita la oxidación de LDL. En este caso, se ha investigado la posibilidad de biofortificación en soja (Sattler et al., 2004). Para estos y otros micronutrientes y características beneficiosas, y con ayuda de la ampliación del conocimiento del genoma de la cassava, podrán desarrollarse estrategias de biofortificación útiles para garantizar la seguridad alimentaria en las zonas dependientes del cultivo de cassava.

Uno de los principales retos en la incorporación de transgénicos de cassava al cultivo y al mercado es el aspecto legislativo. En muchos países aún no se ha legislado el uso de cultivos transgénicos, y es probable que el desarrollo biotecnológico supere las limitaciones en la producción de transgénicos de cassava antes de que se establezca la legislación que permita su uso (Bart & Taylor, 2017).

13. Conclusiones

Debido al crecimiento exponencial de la población mundial en las últimas décadas se busca incrementar la productividad de los cultivos para abastecer la demanda de alimentos. El amplio consumo de cultivos como la cassava, sobre todo en países del tercer mundo, y la regulación de la seguridad alimentaria que supone, han incentivado tanto la investigación de las características propias de la planta como de las posibilidades de modificación de éstas, por lo que en los últimos años se ha generado mucha información al respecto y se han dado

avances tecnológicos que facilitan la continuación de la investigación en este cultivo (Ceballos et al., 2020).

Actualmente, con el enorme impacto que están teniendo las ómicas en el desarrollo científico, estamos ante una época de descubrimientos científicos que permitirán el conocimiento en profundidad del genoma de la cassava (Lyons et al., 2021; Mansfeld et al., 2021) y por tanto el desarrollo de nuevas estrategias para potenciar que el cultivo sea lo más seguro y productivo posible. La aplicación de la técnica CRISPR/Cas9 ya ha supuesto importantes avances en la investigación de biofortificación de cassava (Gómez, Berkoff, et al., 2019; Gómez, Lin, et al., 2019; Odipio et al., 2017), con lo que los avances que están teniendo lugar actualmente tendrán aplicación en la optimización de estrategias futuras. Las mejoras genéticas que ya se han conseguido en el cultivo de cassava son un gran avance para el control de la seguridad alimentaria de los países del tercer mundo, pero es importante continuar la investigación para limitar las posibles desventajas asociadas (Apartado 11) y para conseguir modificar otras características que le confieran al cultivo de cassava aún más garantías de éxito.

14. Bibliografía

- Allali, S., Brousse, V., Sacri, A. S., Chalumeau, M., & de Montalembert, M. (2017). Anemia in children: prevalence, causes, diagnostic work-up, and long-term consequences. *Expert Review of Hematology*, *10*(11), 1023–1028. <https://doi.org/10.1080/17474086.2017.1354696>
- Bailey, R. L., West, K. P., & Black, R. E. (2015). The epidemiology of global micronutrient deficiencies. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *66*, 22–33. <https://doi.org/10.1159/000371618>
- Bart, R. S., & Taylor, N. J. (2017). New opportunities and challenges to engineer disease resistance in cassava, a staple food of African small-holder farmers. *PLoS Pathogens*, *13*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006287>
- Bayata, A. (2019). Review on Nutritional Value of Cassava for Use as a Staple Food. *Science Journal of Analytical Chemistry*, *7*(4), 83–91. <https://doi.org/10.11648/j.sjac.20190704.12>
- Beyene, G., Chauhan, R. D., Ilyas, M., Wagaba, H., Fauquet, C. M., Miano, D., Alicai, T., & Taylor, N. J. (2017). A virus-derived stacked RNAi construct confers robust resistance to cassava brown streak disease. *Frontiers in Plant Science*, *7*(2052). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02052>
- Beyene, G., Chauhan, R. D., Wagaba, H., Moll, T., Alicai, T., Miano, D., Carrington, J. C., & Taylor, N. J. (2016). Loss of CMD2-mediated resistance to cassava mosaic disease in plants regenerated through somatic embryogenesis. *Molecular Plant Pathology*, *17*(7), 1095–1110. <https://doi.org/10.1111/mpp.12353>
- Beyene, G., Solomon, F. R., Chauhan, R. D., Gaitán-Solis, E., Narayanan, N., Gehan, J., Siritunga, D., Stevens, R. L., Jifon, J., van Eck, J., Linsler, E., Gehan, M., Ilyas, M., Fregene, M., Sayre, R. T., Anderson, P., Taylor, N. J., & Cahoon, E. B. (2018). Provitamin A biofortification of cassava enhances shelf life but reduces dry matter content of storage roots due to altered carbon partitioning into starch. *Plant Biotechnology Journal*, *16*(6), 1186–1200. <https://doi.org/10.1111/pbi.12862>

- Beyer, P., Al-Babili, S., Ye, X., Lucca, P., Schaub, P., Welsch, R., & Potrykus, I. (2002). Golden Rice: Introducing the-Carotene Biosynthesis Pathway into Rice Endosperm by Genetic Engineering to Defeat Vitamin A Deficiency 1. *American Society for Nutritional Sciences*, 506–510. <https://academic.oup.com/jn/article/132/3/506S/4687202>
- Bicko, S. J., Cecilia, M., Mathew, P., & Wilton, M. (2021). CRISPR/Cas genome editing: A frontier for transforming precision cassava breeding. *African Journal of Biotechnology*, 20(6), 237–250. <https://doi.org/10.5897/ajb2021.17344>
- Biorender (<https://app.biorender.com/>). Figuras 3-10.
- Bird, R. P. (2018). The Emerging Role of Vitamin B6 in Inflammation and Carcinogenesis. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 83, pp. 151–194). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.11.004>
- Brock, J. F., & Autret, M. (1952). *Kwashiorkor in Africa*.
- Bull, S. E., Seung, D., Chanez, C., Mehta, D., Kuon, J.-E., Truernit, E., Hochmuth, A., Zurkirchen, I., Zeeman, S. C., Gruissem, W., & Vanderschuren, H. (2018). Accelerated ex situ breeding of GBSS-and PTST1-edited cassava for modified starch. *Science Advances*, 4(9).
- Carazo, A., Macáková, K., Matoušová, K., Krčmová, L. K., Protti, M., & Mladěnka, P. (2021). Vitamin A update: Forms, sources, kinetics, detection, function, deficiency, therapeutic use and toxicity. *Nutrients*, 13(5), 1703–1739. <https://doi.org/10.3390/nu13051703>
- Cartay, R. (2004). Difusión y comercio de la yuca (Manihot esculenta) en Venezuela y en el mundo. *Agroalimentaria*, 13–22.
- Ceballos, H., Rojanaridpiched, C., Phumichai, C., Becerra, L. A., Kittipadakul, P., Iglesias, C., & Gracen, V. E. (2020). Excellence in Cassava Breeding: Perspectives for the Future. *Crop Breeding, Genetics and Genomics*, 2(e200008). <https://doi.org/10.20900/cbagg20200008>
- Chellappan, P., Vanitharani, R., & Fauquet, C. M. (2004). Short Interfering RNA Accumulation Correlates with Host Recovery in DNA Virus-Infected Hosts, and Gene Silencing Targets Specific Viral Sequences. *Journal of Virology*, 78(14), 7465–7477. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7465-7477.2004>
- Choi, S., Liu, X., & Pan, Z. (2018). Zinc deficiency and cellular oxidative stress: Prognostic implications in cardiovascular diseases review-article. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(7), 1120–1132. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.25>
- Cock, J. H., & Connor, D. J. (2020). Cassava. In *Crop Physiology Case Histories for Major Crops* (pp. 588–633). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819194-1.00019-0>
- Cranenburg, E. C. M., Schurgers, L. J., & Vermeer, C. (2007). Vitamin K: The coagulation vitamin that became omnipotent. *Thrombosis and Haemostasis*, 98(1), 120–125. <https://doi.org/10.1160/TH07-04-0266>
- Daniel Lin, Z. J., Taylor, N. J., & Bart, R. (2019). Engineering disease-resistant cassava. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034595>
- de Onis, M., & Branca, F. (2016). Childhood stunting: A global perspective. *Maternal and Child Nutrition*, 12, 12–26. <https://doi.org/10.1111/mcn.12231>
- Díaz De La Garza, R. I., Gregory Iii, J. F., & Hanson, A. D. (2007). Folate biofortification of tomato fruit. *PNAS*, 104(10), 4218–4222. www.pnas.org/cgi/content/full/
- Diretto, G., Welsch, R., Tavazza, R., Mourgues, F., Pizzichini, D., Beyer, P., & Giuliano, G. (2007). Silencing of beta-carotene hydroxylase increases total carotenoid and beta-carotene levels in potato tubers. *BMC Plant Biology*, 7(11). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-11>
- Dowling, J. E. (2020). Vitamin A: its many roles—from vision and synaptic plasticity to infant mortality. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 206(3), 389–399. <https://doi.org/10.1007/s00359-020-01403-z>

- Fagard, M., & Vaucheret, H. (2000). (TRANS)GENE SILENCING IN PLANTS: How Many Mechanisms? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, *51*, 167–194. www.annualreviews.org
- Fauquet, C., & Fargette, D. (1990). African Cassava Mosaic Virus: Etiology, Epidemiology, and Control. *Plant Disease*, *74*(6), 404–411.
- Fraser, P. D., Romer, S., Shipton, C. A., Mills, P. B., Kiano, J. W., Misawa, N., Drake, R. G., Schuch, W., & Bramley, P. M. (2002). Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *22*(99), 1092–1097. <https://doi.org/10.1073/pnas.241374598>
- Gómez, M. A., Berkoff, K. C., Gill, B. K., Iavarone, A. T., Lieberman, S. E., Ma, J. M., Schultink, A., Wyman, S. K., Chauhan, R. D., Taylor, N. J., Staskawicz, B. J., Cho, M.-J., Rokhsar, D. S., & Lyons, J. B. (2019). CRISPR-Cas9-mediated knockout of CYP79D1 and CYP79D2 in cassava attenuates toxic cyanogen production. *Plant Biotechnology*, *17*(2), 421–434. <https://doi.org/10.1101/2021.10.08.462827>
- Gómez, M. A., Lin, Z. D., Moll, T., Chauhan, R. D., Hayden, L., Renninger, K., Beyene, G., Taylor, N. J., Carrington, J. C., Staskawicz, B. J., & Bart, R. S. (2019). Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava eIF4E isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. *Plant Biotechnology Journal*, *17*(2), 421–434. <https://doi.org/10.1111/pbi.12987>
- Hellmann, H., & Mooney, S. (2010a). Vitamin B6: A molecule for human health? *Molecules*, *15*(1), 442–459. <https://doi.org/10.3390/molecules15010442>
- Hellmann, H., & Mooney, S. (2010b). Vitamin B6: A molecule for human health? In *Molecules* (Vol. 15, Issue 1, pp. 442–459). <https://doi.org/10.3390/molecules15010442>
- Herschel Conaway, H., Henning, P., & Lerner, U. H. (2013). Vitamin a metabolism, action, and role in skeletal homeostasis. *Endocrine Reviews*, *34*(6), 766–797. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1071>
- Hillocks, R. J., & Maruthi, M. N. (2015). Post-harvest impact of cassava brown streak disease in four countries in eastern Africa. *Food Chain*, *5*(1–2), 116–122. <https://doi.org/10.3362/2046-1887.2015.008>
- Hogarth, C. A., & Griswold, M. D. (2010). The key role of vitamin A in spermatogenesis. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 120, Issue 4, pp. 956–962). <https://doi.org/10.1172/JCI41303>
- Ihemere, U., Arias-Garzon, D., Lawrence, S., & Sayre, R. (2006). Genetic modification of cassava for enhanced starch production. *Plant Biotechnology Journal*, *4*(4), 453–465. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00195.x>
- Kim, S. Y., May, G. D., & Park, W. D. (1994). Nuclear protein factors binding to a class I patatin promoter region are tuber-specific and sucrose-inducible. *Plant Molecular Biology*, *26*, 603–615.
- Koehorst-van Putten, H. J. J., Sudarmonowati, E., Herman, M., Pereira-Bertram, I. J., Wolters, A. M. A., Meima, H., de Vetten, N., Raemakers, C. J. J. M., & Visser, R. G. F. (2012). Field testing and exploitation of genetically modified cassava with low-amylose or amylose-free starch in Indonesia. *Transgenic Research*, *21*(1), 39–50. <https://doi.org/10.1007/s11248-011-9507-9>
- Leyva-Guerrero, E., Narayanan, N. N., Ihemere, U., & Sayre, R. T. (2012). Iron and protein biofortification of cassava: Lessons learned. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 23, Issue 2, pp. 257–264). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.12.009>
- Li, H., Gidley, M. J., & Dhital, S. (2019). High-Amylose Starches to Bridge the “Fiber Gap”: Development, Structure, and Nutritional Functionality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(2), 362–379. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12416>

- Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, L., & Puonti-Kaerlas, J. (1996). Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *NATURE BIOTECHNOLOGY*, *14*, 736–740. <http://www.nature.com/naturebiotechnology>
- Li, K. te, Moulin, M., Mangel, N., Albersen, M., Verhoeven-Duif, N. M., Ma, Q., Zhang, P., Fitzpatrick, T. B., Gruissem, W., & Vanderschuren, H. (2015). Increased bioavailable Vitamin B 6 in field-grown transgenic cassava for dietary sufficiency. *Nature Biotechnology*, *33*(10), 1029–1032. <https://doi.org/10.1038/nbt.3318>
- Liu, S., Zainuddin, I. M., Vanderschuren, H., Doughty, J., & Beeching, J. R. (2017). RNAi inhibition of feruloyl CoA 6'-hydroxylase reduces scopoletin biosynthesis and post-harvest physiological deterioration in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) storage roots. *Plant Molecular Biology*, *94*(1–2), 185–195. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0602-z>
- Luo, S., Ma, Q., Zhong, Y., Jing, J., Wei, Z., Zhou, W., Lu, X., Tian, Y., & Zhang, P. (2022). Editing of the starch branching enzyme gene SBE2 generates high-amylose storage roots in cassava. *Plant Molecular Biology*, *108*(4–5), 429–442. <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01215-y>
- Lyons, J. B., Bredeson, J. v., Mansfeld, B. N., Bauchet, G. J., Berry, J., Boyher, A., Mueller, L. A., Rokhsar, D. S., & Bart, R. S. (2021). Current status and impending progress for cassava structural genomics. *Plant Molecular Biology*, *109*, 177–191. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01104-w>
- Mansfeld, B. N., Boyher, A., Berry, J. C., Wilson, M., Ou, S., Polydore, S., Michael, T. P., Fahlgren, N., & Bart, R. S. (2021). Large structural variations in the haplotype-resolved African cassava genome. *Plant Journal*, *108*(6), 1830–1848. <https://doi.org/10.1111/tpj.15543>
- McCullough, F. S. W., Northrop-Clewes, C. A., & Thurnham, D. I. (1999). The effect of vitamin A on epithelial integrity. *Proceedings of the Nutrition Society*, *58*(2), 289–293. <https://doi.org/10.1017/S0029665199000403>
- Montagnac, J. A., Davis, C. R., & Tanumihardjo, S. A. (2009). Nutritional Value of Cassava for Use as a Staple Food and Recent Advances for Improvement. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *8*, 181–194. <http://faostat.fao.org/site/609/>
- Narayanan, N., Beyene, G., Chauhan, R. D., Gaitán-Solís, E., Gehan, J., Butts, P., Siritunga, D., Okwuonu, I., Woll, A., Jiménez-Aguilar, D. M., Boy, E., Grusak, M. A., Anderson, P., & Taylor, N. J. (2019). Biofortification of field-grown cassava by engineering expression of an iron transporter and ferritin. *Nature Biotechnology*, *37*(2), 144–151. <https://doi.org/10.1038/s41587-018-0002-1>
- Narayanan, N., Beyene, G., Chauhan, R. D., Gaitán-Solis, E., Grusak, M. A., Taylor, N., & Anderson, P. (2015). Overexpression of Arabidopsis VIT1 increases accumulation of iron in cassava roots and stems. *Plant Science*, *240*, 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.09.007>
- Narayanan, N., Ihemere, U., Ellery, C., & Sayre, R. T. (2011). Overexpression of hydroxynitrile lyase in cassava roots elevates protein and free amino acids while reducing residual cyanogen levels. *PLoS ONE*, *6*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021996>
- National Research Council., Commission on Life Sciences., Food and Nutrition Board., & Subcommittee on the Tenth Edition of the Recommended Dietary Allowance. (1989). *Recommended Dietary Allowances (10th Edition)*. National Academies Press.
- Ndubuisi, N. D., & Chidiebere, U. (2018). Cyanide in Cassava: A Review. *International Journal of Genomics and Data Mining*, *1*, 118–128. <https://doi.org/10.29011/IJGD-118>
- Nichols, R. F. W. (1950). The Brown Streak Disease of Cassava. *The East African Agricultural Journal*, *15*(3), 154–160. <https://doi.org/10.1080/03670074.1950.11664727>

- Odipto, J., Alicai, T., Ingelbrecht, I., Nusinow, D. A., Bart, R., & Taylor, N. J. (2017). Efficient CRISPR/cas9 genome editing of phytoene desaturase in cassava. *Frontiers in Plant Science*, 8(1780). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01780>
- Odipto, J., Getu, B., Chauhan, R. D., Alicai, T., Bart, R., Nusinow, D. A., & Taylor, N. J. (2020). Transgenic overexpression of endogenous FLOWERING LOCUS T-like gene MeFT1 produces early flowering in cassava. *PLoS ONE*, 15(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227199>
- Ogwok, E., Odipto, J., Halsey, M., Gaitán-Solís, E., Bua, A., Taylor, N. J., Fauquet, C. M., & Alicai, T. (2012). Transgenic RNA interference (RNAi)-derived field resistance to cassava brown streak disease. *Molecular Plant Pathology*, 13(9), 1019–1031. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00812.x>
- Olson, C. R., & Mello, C. v. (2010). Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. In *Molecular Nutrition and Food Research* (Vol. 54, Issue 4, pp. 489–495). <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900246>
- Olumakaiye, M., Owojuyigbe, T., Bakare, K., Bisiriyu, L., Fadeyiye, E., Adeloye, A., & Popoola, B. (2021). Iron Deficiency, Nutritional Status and Food Consumption Pattern of Apparently Healthy Women of Reproductive Age in a Nigeria Setting Stechnolock Hum Nutr Diet. *Stechnolock Human Nutrition and Dietetics*, 1, 1–12. www.stechnolock.com
- Opara, E. C., & Rockway, S. W. (2006). Antioxidants and Micronutrients. *Disease-a-Month*, 52(4), 151–163. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2006.05.002>
- Otun, S., Eschrich, A., Achilonu, I., Rauwane, M., Lerma-Escalera, J. A., Morones-Ramírez, J. R., & Rios-Solis, L. (2022). The future of cassava in the era of biotechnology in Southern Africa. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1–19. <https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2048791>
- Parmar, A., Sturm, B., & Hensel, O. (2017). Crops that feed the world: Production and improvement of cassava for food, feed, and industrial uses. *Food Security*, 9(5), 907–927. <https://doi.org/10.1007/s12571-017-0717-8>
- Pasricha, S. R., Tye-Din, J., Muckenthaler, M. U., & Swinkels, D. W. (2021). Iron deficiency. *The Lancet*, 397(10270), 233–248. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32594-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32594-0)
- Patil, B. L., Ogwok, E., Wagaba, H., Mohammed, I. U., Yadav, J. S., Bagewadi, B., Taylor, N. J., Kreuze, J. F., Maruthi, M. N., Alicai, T., & Fauquet, C. M. (2011). RNAi-mediated resistance to diverse isolates belonging to two virus species involved in Cassava brown streak disease. *Molecular Plant Pathology*, 12(1), 31–41. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00650.x>
- Pham, T. P. T., Alou, M. T., Golden, M. H., Million, M., & Raoult, D. (2021). Difference between kwashiorkor and marasmus: Comparative meta-analysis of pathogenic characteristics and implications for treatment. *Microbial Pathogenesis*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104702>
- Raemakers, K., Schreuder, M., Suurs, L., 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(2), 163–172. <https://doi.org/10.1007/s11032-005-7874-8>
- Rall, L. C., & Meydani, S. N. (1993). *Vitamin B, and Immune Competence*.
- Rybicki, E. P. (2019). CRISPR–Cas9 strikes out in cassava. *Nature Biotechnology*, 37(7), 727–728. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0169-0>
- Sattler, S. E., Cheng, Z., & DellaPenna, D. (2004). From Arabidopsis to agriculture: engineering improved Vitamin E content in soybean. *Trends in Plant Science*, 9(8), 368–370. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.06.005>
- Sayre, R., Beeching, J. R., Cahoon, E. B., Egesi, C., Fauquet, C., Fellman, J., Fregene, M., Gruissem, W., Mallowa, S., Manary, M., Maziya-Dixon, B., Mbanaso, A., Schachtman, D. P., Siritunga, D., Taylor, N., Vanderschuren, H., & Zhang, P. (2011). The biocassava plus

- program: Biofortification of cassava for sub-Saharan Africa. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 251–272. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103751>
- Shimizu, T., Lengalova, A., Martínek, V., & Martínková, M. (2019). Heme: Emergent roles of heme in signal transduction, functional regulation and as catalytic centres. *Chemical Society Reviews*, 48(24), 5624–5657. <https://doi.org/10.1039/c9cs00268e>
- Siritunga, D., & Sayre, R. (2004). Engineering cyanogen synthesis and turnover in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Molecular Biology*, 56(4), 661–669.
- Siritunga, D., & Sayre, R. T. (2003). Generation of cyanogen-free transgenic cassava. *Planta*, 217(3), 367–373. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1005-8>
- Stach, K., Stach, W., & Augoff, K. (2021). Vitamin B6 in health and disease. *Nutrients*, 13(9), 3229–3240. <https://doi.org/10.3390/nu13093229>
- Stephensen, C. B. (2001). Vitamin A, Infection and immune function. *Annual Review of Nutrition*, 21, 167–192. www.annualreviews.org
- Storey, H. H. (1936). Virus diseases of East African plants. VI. A progress report on studies of disease of cassava. *East African Agricultural Journal*, 2, 34–39.
- Tomlinson, K. R., Bailey, A. M., Alicai, T., Seal, S., & Foster, G. D. (2018). Cassava brown streak disease: historical timeline, current knowledge and future prospects. In *Molecular Plant Pathology* (Vol. 19, Issue 5, pp. 1282–1294). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/mpp.12613>
- Tshala-Katumbay, D. D., Ngombe, N. N., Okitundu, D., David, L., Westaway, S. K., Boivin, M. J., Mumba, N. D., & Banea, J. P. (2016). Cyanide and the human brain: perspectives from a model of food (cassava) poisoning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1378(1), 50–57. <https://doi.org/10.1111/nyas.13159>
- Uarrota, V. G., Nunes, E. da C., Peruch, L. A. M., Neubert, E. de O., Coelho, B., Moresco, R., Domínguez, M. G., Sánchez, T., Meléndez, J. L. L., Dufour, D., Ceballos, H., Becerra Lopez-Lavalle, L. A., Hershey, C., Rocha, M., & Maraschin, M. (2016). Toward better understanding of postharvest deterioration: biochemical changes in stored cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. *Food Science and Nutrition*, 4(3), 409–422. <https://doi.org/10.1002/fsn3.303>
- Ubbink, J. B., van der Merwe, A., Delport, R., Allen, R. H., Stabler, S. P., Riezler, R., & Vermaak, W. J. H. (1996). The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, 98(1), 177–184. <https://doi.org/10.1172/JCI118763>
- UNICEF. (1990). *First call for children. World Declaration and 1990-2000 Plan of Action on the Survival, Protection and Development of Children.*
- Utsumi, Y., Utsumi, C., Tanaka, M., Takahashi, S., Okamoto, Y., Ono, M., Nakamura, Y., & Seki, M. (2022). Suppressed expression of starch branching enzyme 1 and 2 increases resistant starch and amylose content and modifies amylopectin structure in cassava. *Plant Molecular Biology*, 108(4–5), 413–427. <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01209-w>
- WHO. (2008). *The global burden of disease: 2004 update.*
- WHO, & FAO. (2001). *Human Vitamin and Mineral Requirements.*
- Wu, X., Xu, J., Ma, Q., Ahmed, S., Lu, X., Ling, E., & Zhang, P. (2022). Lysozyme inhibits postharvest physiological deterioration of cassava. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(3), 621–624. <https://doi.org/10.1111/jipb.13219>
- Xu, J., Duan, X., Yang, J., Beeching, J. R., & Zhang, P. (2013). Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots. *Plant Physiology*, 161(3), 1517–1528. <https://doi.org/10.1104/pp.112.212803>
- Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., & Potrykus, I. (2000). Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice

- endosperm. *Science*, 287(5451), 303–305. <https://doi.org/doi:10.1126/science.287.5451.303>.
- Zea, A., & Ochoa, T. J. (2013). Diarrea y micronutrientes Diarrhea and micronutrients. *Rev Med Hered*, 24, 62–67.
- Zhao, T., Liu, S., Zhang, R., Zhao, Z., Yu, H., Pu, L., Wang, L., & Han, L. (2022). Global Burden of Vitamin A Deficiency in 204 Countries and Territories from 1990–2019. *Nutrients*, 14(5), 950–965. <https://doi.org/10.3390/nu14050950>
- Zidenga, T., Leyva-Guerrero, E., Moon, H., Siritunga, D., & Sayre, R. (2012). Extending cassava root shelf life via reduction of reactive oxygen species production. *Plant Physiology*, 159(4), 1396–1407. <https://doi.org/10.1104/pp.112.200345>
- Zile, M. H. (2010). Vitamin A-not for your eyes only: Requirement for heart formation begins early in embryogenesis. In *Nutrients* (Vol. 2, Issue 5, pp. 532–550). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu2050532>