

Latin America: Multi - Country capacity building for compliance with the Cartagena Protocol on Biosafety

Brazil - Colombia - Perú - Costa Rica



USO DE MARCADORES SNPs y SSR PARA LA EVALUACION DE FLUJO DE GENES EN YUCA (*Manihot esculenta* Crantz).

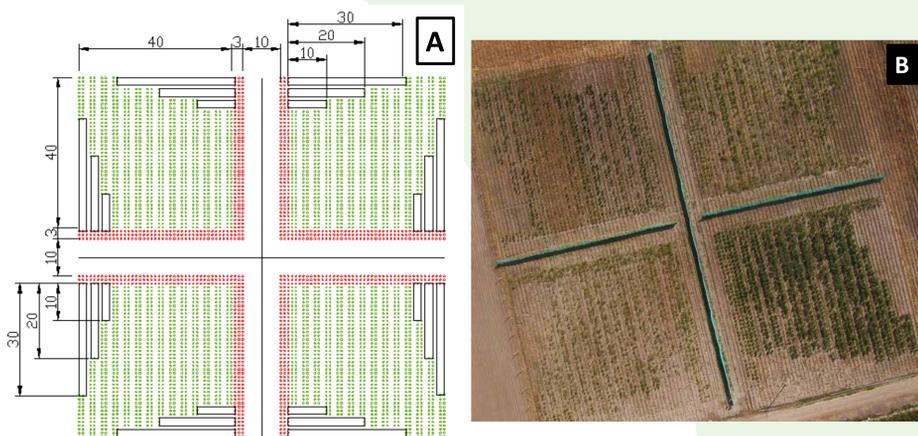
Pérez J., Fory L., Velásquez A., Duque S., Herrera P., Calle F., Morante N., Duque M., Ceballos H., Roca W., Gallego G y Tohme J. - Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. AA 6713, Cali. Colombia.

INTRODUCCION

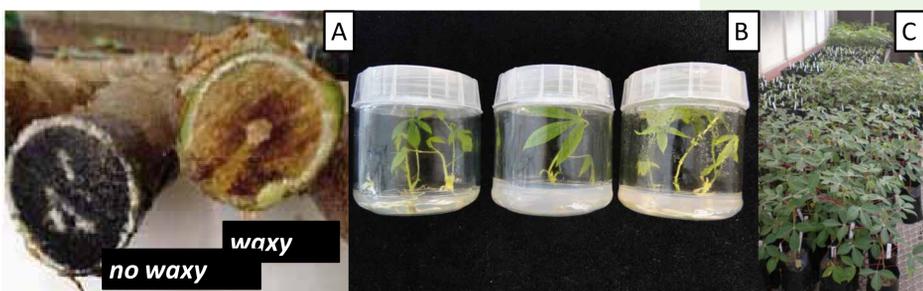
La yuca es un alimento importante para campesinos de Asia, África y América Latina por su alto contenido de almidón. El almidón está compuesto por dos polisacáridos; la amilosa, y la amilopectina y es sintetizado por enzimas sintetetas y ramificadoras. La enzima GBSS1 es una enzima responsable de la síntesis de amilosa y ha sido estudiada en variedades libres de amilosa denominadas variedades waxy en cultivos como maíz, arroz, trigo y papa (Visser y Jacobsen, 1993). En yuca el gen GBSS1 codifica una proteína de 608 aa de 58.6 Kd la cual presenta una homología mayor del 60 % con otras plantas (Salehuzzaman et al., 1993). Para comprobar el genotipo waxy, este gen ha sido introducido en yuca mediante transformación (Zhao et al., 2011). El programa de mejoramiento de yuca del CIAT ha encontrado un material con baja concentración de amilosa denominado genotipo waxy, originado por una mutación espontánea. El almidón en clones libre de amilosa, presenta cambios en la distribución y el tamaño de las partículas. Estos cambios funcionales son deseados en aplicaciones industriales ya que hace al almidón más estable. La mutación ha sido transferida a germoplasmas adaptados especialmente en Tailandia, donde la mitad de la producción de yuca es utilizada en la industria. En el gen GBSS1 se ha reportado una delección de un nucleótido en el exon 6, lo que ocasiona la formación de un codón de parada (CIAT, 2006). A partir de esta secuencia reportada en el 2006, fueron diseñados diferentes marcadores marcadores específicos SNPs sobre el gen GBSS1 para identificar los individuos homocigotos y heterocigotos del genotipo waxy (Fory et al., 2010). El objetivo de este trabajo fue evaluar flujo de genes entre variedades cultivadas utilizando estos SNPs diseñados y algunos marcadores codominantes SSR. Este estudio hace parte del proyecto "América Latina: Desarrollo de capacidad multi-país en cumplimiento del protocolo de Cartagena en Bioseguridad". El objetivo de este trabajo es generar procedimientos estandarizados para minimizar o el flujo antes de la introducción de yuca transgénica en el país.

METODOLOGIA

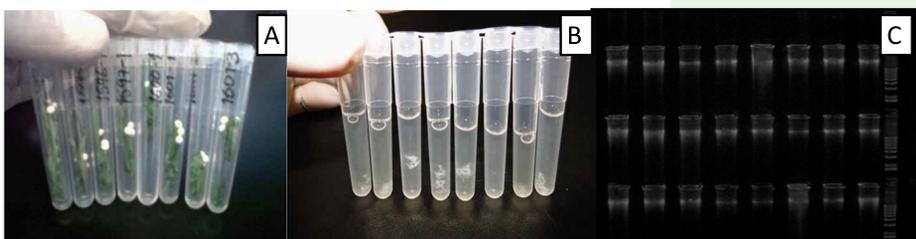
1. Figura 1 Diseño (A) y Siembra de plantas (B) bajo condiciones controladas (CIAT). Donador en rojo y los receptores se muestra en verde.



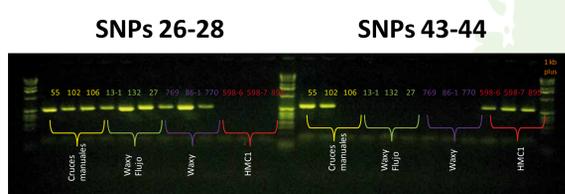
2. Confirmación del fenotipo waxy utilizando tinción de yodo en los parentales F0 (Figura 2-A) (CIAT, 2006). Plántulas obtenidas a partir del rescate de embriones inmaduros (2-B). 3 Las semillas maduras F1 fueron sembradas en invernadero (2-C).



4. Cosecha de tejido y extracción de ADN (Figura 3 A y B) utilizando método de Lorieux (2003), visualización del ADN en agarosa 0.8% (3-C).



5. PCR y visualización del marcador SNPs en gel de agarosa 2% (Figura 4)



RESULTADOS Y DISCUSION

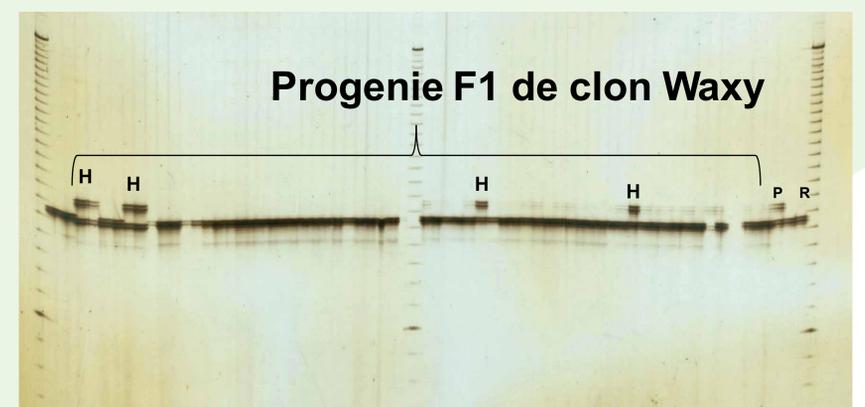


Figura 5. Visualización del marcador SSR en gel de acrilamida 4 %, en donde se observan híbridos (H), P donador de polen, R receptor de polen

Hasta el momento se han evaluado 500 plantas en las cuales se han identificado tasas de cruzamientos menores del 10% con el uso de marcadores tipo SNPs y SSR. La expresión del fenotipo Waxy será confirmada mediante la tinción de yodo. Resultados similares fueron obtenidos por el grupo de flujo de genes con la línea androesteril. Álvarez y Daza (1985) rastreó el polen con polvos fluorescentes reportaron tasa similares (6 a 22 %). Mientras que tasas superiores al 60% de cruzamiento han sido identificada siguiendo la coloración y la forma de las hojas (Silva et al., 2003). Debido a esta sobreestimación es importante validar la distancias de siembra con marcadores moleculares. El uso de estos marcadores SNPs pueden ser utilizados en programas de mejoramiento, donde se encuentre implicado el donador utilizado en los ensayos de flujo de genes. En progreso se encuentra la evaluación de 1150 planta F1 del clon Waxy. En este trabajo se realizaron modificaciones que permitieron reducir el tiempo en el proceso de extracción de ADN y facilitar el monitoreo de flujo a gran escala como la colección directamente del tejido al tubo y posterior secado en silica gel.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los marcadores SNPs permitieron identificar los individuos heterocigotos. En el momento se están secuenciando los híbridos obtenidos identificados mediante SNPs y SSR.

AGRADECIMIENTOS

R. Escobar y su equipo de trabajo, Herman Usma, Armando Patiño, Carlos Dorado, Eugenio Bolaños, Carlos Ordoñez.

REFERENCIAS

Alvarez A, Daza, P. 1985. Dinámica de la polinización natural en yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y sus implicaciones en el mejoramiento genético del cultivo. Tesis Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 58 p. --- CIAT, 2006. Gene sequence analysis of a natural Waxy Cassava variety. Chapter 12-61. Annual report IP3 2006. --- Fory L, Velásquez A, Lozano I, Pérez J, Morante N, Calle F, Ceballos H, 2010. Línea de base para la toma de decisiones en Bioseguridad: desarrollo de un modelo para la evaluación de flujo de genes en yuca IV. Brusquedad de marcadores moleculares específicos para el gen Waxy de la yuca --- Salehuzzaman, E. and Visser, R. 1993. Isolation and characterization of a cDNA encoding granule-bound starch synthase in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its antisense expression in potato. *Plant Molecular Biology* 23: 947-962. --- Silva R, Bondel G, and Martins P. 2003. Mating system in an experimental garden composed of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) ethnovarieties. *Euphytica* 134: 127-135. --- Visser, R. and Jacobsen, E. 1993. Towards modifying plants for altered starch content and composition. *Trends Biotechnol.* 11: 63-68. --- Zhao SS, Dufour O, Sánchez T, Ceballos H, Zhang P 2011. Development of waxy cassava with different biological and physico-chemical characteristics of starches for industrial applications. *Biotechnol. Bioeng.* Online First. DOI: 10.1002/bit.23120.

