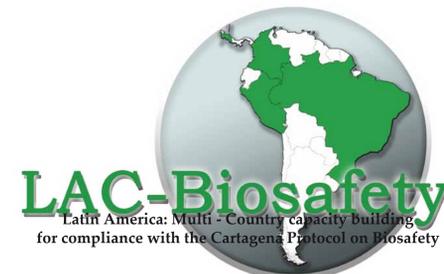


Latin America: Multi - Country capacity building for compliance with the Cartagena Protocol on Biosafety

Brazil - Colombia - Perú - Costa Rica



LINEA DE BASE PARA LA TOMA DE DECISIONES EN BIOSEGURIDAD: DESARROLLO DE UN MODELO PARA LA EVALUACION DE FLUJO DE GENES Caracterización Molecular De La Diversidad De Yuca Usando Marcadores SSRs, ESTs Y SNPs

Alicia Velásquez, Luísa Fory, Juan Guillermo Pérez, Myriam Duque,
Juan Cuasquer, Gerardo Gallego, William Roca y Joe Tohme
Proyecto LAC-Biosafety, CIAT

José L. Bocanegra, Lorena Torres, Carolina Villafañe, Diana López,
Francisco Castro, Pedro Torrijos y Rodrigo Moreno
IAVH-Colombia

Introducción

La yuca es una especie alogama y presenta cruzamientos con las diferentes especies de *Manihot*. Debido a la reciente evolución del grupo, este género presenta barreras genéticas ó fisiológicas débiles para prevenir cruzamientos. Mediante cruzamientos naturales se producen plantas voluntarias provenientes de semilla botánica que pueden aumentar la diversidad del cultivo (Pujol et al., 2005). De igual forma, mediante cruzamientos artificiales, es posible obtener híbridos interespecíficos entre la yuca cultivada (*M. esculenta* Crantz) y algunas especies silvestres (*M. pseudoglaziovii*, *M. neusana*, *M. dichotoma* y *M. caerulescens*) con fines de mejoramiento (Nassar, 2003).

En este estudio se busca identificar marcadores moleculares tipo SSRs y SNPs que permitan evaluar la diversidad de las variedades criollas de yuca y las formas silvestres de *Manihot* presentes en Colombia, (*M. brachyloba*, *M. carthaginensis*, y *M. tristis*). Se busca además determinar la presencia de alelos específicos con potencial para identificar especies de *Manihot*. Este conocimiento es útil en la evaluación y el seguimiento del riesgo potencial del flujo de genes desde yuca mejorada, hacia parientes silvestres, cultivares nativos o plantas voluntarias, en centros de origen y diversidad de la yuca.

Materiales y métodos

Se realizó la extracción de ADN de 693 accesiones de *Manihot* (Qiagen® DNeasy® Plant Mini Kit), entre los que se incluyen muestras de yuca tipo silvestres, criollas y plantas voluntarias, colectadas en diferentes regiones de Colombia; así como muestras control de especies silvestres y clones cultivados de Colombia y otros países, depositados en la Unidad de Recursos Fitogenéticos del CIAT (Figura 1). La amplificación de los 10 SSRs en las muestras se visualizó mediante tinción en plata de geles de poliacrilamida al 6%. Los datos obtenidos fueron sometidos a un Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM) en el programa SAS (SAS Institute Inc.)

Tipo de marcador	No Alelos por locus en estandarización	No Alelos por locus en criollos y <i>M. tristis</i>	Rango de tamaños (pb)	Anotación	Cromosoma	Ubicación en el genoma
SSRY 5	5	13	108 - 164	UBIQUITIN TFIIF - interacting CTD phosphatase, including NLI - interacting factor (involved in RNA polymerase II regulation)	J	19631 - 19561
SSRY 20	9	10	128 - 158	Nuclear pore complex, Nup88/rNup84 component	L	679830 - 679734
SSRY 21	9	12	162 - 316	HELICASE - RELATED dsRNA - specific nuclease Dicer and related ribonucleases	D	605510 - 605194
SSRY 59	12	14	130 - 208	NUCLEAR LIM INTERACTOR - INTERACTING FACTOR - RELATED TFIIF - interacting CTD phosphatase, including NLI - interacting factor (involved in RNA polymerase II regulation)	M	145465 - 145608
SSRY 161	15	11	120 - 258	NO DETERMINADO	E	18910 - 19045
SSRY 164	10	11	140 - 186	SBP domain nucleus DNA binding	H	95805 - 95424
SSRY 175	7	18	76 - 130	SUPPRESSION OF TUMORIGENICITY 5 (ST5)	C	318211 - 318567
SSRY 180	19	21	98 - 220	MITOCHONDRIAL IMPORT RECEPTOR SUBUNIT TOM40	ND	18640 -

Tabla 1. Marcadores seleccionados para el estudio de diversidad. Estos marcadores fueron desarrollados por Mba et al. (2001) y López et al. (2007).

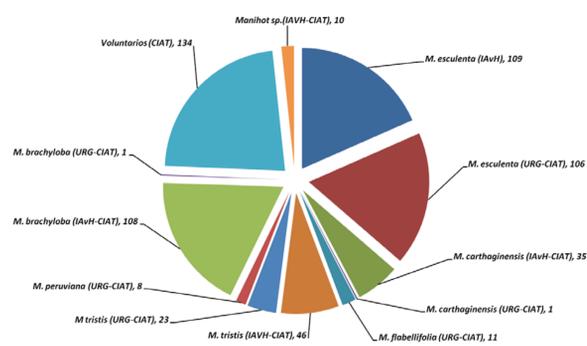


Figura 1. Número de muestras de yuca silvestres, criollas, voluntarias y controles. CIAT: Centro internacional de Agricultura Tropical; IAVH: Instituto Alexander von Humboldt; URG: Unidad de Recursos Genéticos CIAT.

Resultados y discusión

Los marcadores escogidos fueron altamente polimórficos para la amplificación de las muestras de yuca evaluadas (Figura 2). La heterocigocidad esperada estuvo entre 82% y 92%.

Figura 2. Amplificación de alelos de las diferentes especies de yuca evaluadas con el marcador SSRY 21

El ACM reunió los genotipos de yuca en cuatro grupos. La especie sugerida *M. tristis* colectada en Vichada se agrupa en el primer grupo. Estos resultados sugieren la presencia de polimorfismos derivados del aislamiento geográfico y se necesita la apreciación e identificación de un taxónomo especializado en el género. Este estudio se observó un alto

grado de similaridad entre las especies *M. tristis*, *M. esculenta* y *M. esculenta subsp. flabellifolia* y *M. esculenta subsp. peruviana*; lo cual indica que estas tres formas silvestres de *Manihot* son las más relacionadas a la especie cultivada (Olsen y Schall, 1999; Roa et al., 2000).

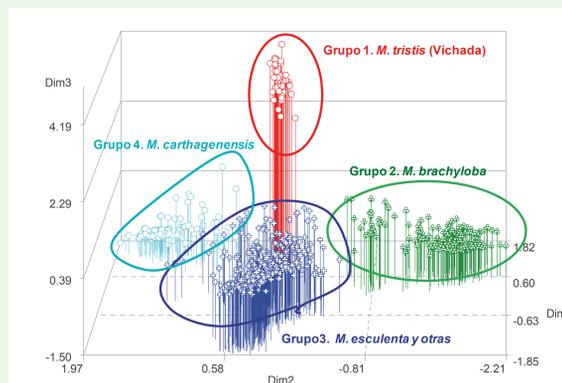


Figura 3. Representación tridimensional del agrupamiento de muestras de yuca evaluadas según su perfil molecular en 4 grupos, mediante el análisis con el paquete estadístico SAS.

Las muestras de la especie *M. esculenta* se encuentran agrupados en los grupos 2, el cual sugiere una alta diversidad de yucas cultivares y especies criollas en Colombia respectivamente.

Los alelos reportados para las poblaciones de yuca silvestre *M. carthaginensis* (Grupo 4) y *M. brachyloba* (Grupo 2), permiten confirmar la identidad genética de cada especie dentro del género *Manihot* y demuestran su separación evolutiva con la yuca cultivada. Las muestras de la especie *M. brachyloba* fueron colectadas en los departamentos de Antioquia, Caldas, Cundinamarca, Meta y Casanaré donde se evidencian diferentes ecosistemas, mostrando una amplia adaptación de la especie.

El cebador CAR-1 de tipo SNP permite diferenciar la especie *M. carthaginensis* de las especies de *Manihot* evaluadas; así mismo, el cebador GLA-1 diseñado sobre una delección de 19 pares de bases en el genoma del cloroplasto, permite amplificar específicamente las accesiones de *M. glaziovii*.

Conclusiones

Los marcadores SSR utilizados permitieron la identificación de alelos específicos que diferencian las especies silvestres, criollas y cultivadas de yuca. Estos marcadores serán utilizados en la evaluación de flujo de genes entre especies del género *Manihot*, así como en estudios de diversidad, caracterización de germoplasma, aplicaciones de mejoramiento y conservación de especies silvestres. Las secuencias cloroplásticas son altamente específicas y por su herencia maternal pueden ser utilizadas para rastrear la dirección del flujo de genes. Dado que los marcadores de tipo SNP son fáciles de trabajar y están ampliamente distribuidos en el genoma, son un soporte valioso en estudios de flujo de genes basados en otros tipos de marcadores.

Bibliografía

- Elias, M., Penet, L., Vindry, P., McKey, D., Panaud, O. and Robert T. 2001. *Molecular Ecology* 10: 1895-1907.
López, C., Quesada-Ocampo, Lina., Bohórquez, A., Duque, M. C., Vargas, J., Tohme, J. and Verdier, V. 2007. *Genome* 50: 1078-1088.
Mba, R. C., Stephenson, P., Edwards, K., Melzer, S., Nkumbira, J., Gullberg, U., Apel, K., Gale, M., Tohme, J. and Fregene, M. 2001. *Theor Appl Genet* 102: 21-31.
Nassar, N. 2003. *Genetics and Molecular Research* 2: 334-347.
Olsen, K. M. and Schaal, B. 1999. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 5586-5591.
Pujol, B., Patrice, D. and McKey, D. 2005. *Ecology Letters* 8: 138-147.
Roa, A., Chavarriaga-Aguirre, P., Duque, M.C., Maya, M., Bonierbale, M, W., Iglesias, C. and Tohme, J. 2000. *American Journal of Botany* 87: 1647-1655.

