

Identificación de polimorfismos en genes candidatos de resistencia en yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

Identification of polymorphisms in resistance gene candidates in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

Andrea Vásquez^{1†}, y Camilo E. López^{2*}

¹Estudiante de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 No 45-03, Bogotá, Colombia. ²Profesor Asociado, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 No 45-03, Bogotá, Colombia.

*Autor para correspondencia: celopezc@unal.edu.co; †andreavasquez.c@gmail.com

Rec.: 02.09.11 Acept.: 05.06.12

Resumen

La yuca (*Manihot esculenta*) es la base de la alimentación para más de 1000 millones de personas en el mundo. La producción es severamente afectada por enfermedades ocasionadas por diferentes patógenos. Las plantas de yuca han desarrollado una serie de proteínas de resistencia (R) para defenderse de infecciones virales, bacterianas y fúngicas, las cuales son capaces de reconocer moléculas específicas de los patógenos. Un repertorio amplio de estas proteínas ha sido identificado en varias especies vegetales, no obstante, a pesar de conferir resistencia a patógenos diversos, presentan unos pocos dominios conservados. A partir de la reciente liberación de la secuencia completa del genoma de yuca se identificaron secuencias similares a proteínas R en este genoma. Con esta información se diseñaron cebadores para amplificar 13 genes R, logrando la amplificación de 10 de ellos en las variedades TMS30572 y CM2177-2, las cuales representan los parentales empleados en la construcción del mapa genético de yuca. A partir de la secuenciación de los amplicones obtenidos se identificaron 37 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) de los cuales 18 (48.6%) corresponden a transiciones y 19 (45.9%) a transversiones. El restante corresponde a inserciones/deleciones. Este conocimiento permitirá desarrollar estrategias adecuadas para marcadores moleculares tipo CAPs (del inglés Cleaved Amplified Polymorphism) para posteriormente evaluar su segregación en la población F1 y permitir de esta manera, posicionar estos marcadores en el mapa genético de yuca.

Palabras clave: Genomas, *Manihot esculenta*, mapas genéticos, marcadores moleculares, resistencia a patógenos, yuca.

Abstract

Cassava production can be detrimentally affected by diseases caused for different pathogens. To defend against viral, bacterial and fungal diseases, plants have developed a group of resistance proteins (R), which are able to recognize pathogen's molecules. A wide repertoire of R proteins has been identified in a large group of plants. Even though conferring resistance to different pathogens, these R proteins have a few conserved domains. Taking advantage of the recent release of complete cassava genome sequence, we identified cassava R-like proteins in this genome. With this information, primers were designed to amplify 13 genes showing similarity to known R genes. For 10 of them we obtained amplification in the varieties TMS30572 and CM2177-2, which represent the parents used in the construction of the cassava genetic map. After sequencing the amplicons obtained, we identified 37 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) between these two cassava varieties, which represent 18

(48.6%) transitions and 19 (45.9%) transversions. The remaining are insertions/deletions (indels). This knowledge will help to develop appropriate strategies for the generation of CAPs (Cleaved Amplified Polymorphisms) markers to assess their segregation in the F1 population, allowing the localization of these markers on the cassava genetic map.

Key words: Cassava, genetic maps, genomes, *Manihot esculenta*, molecular markers, resistance.

Introducción

La yuca (*Manihot esculenta*) representa la fuente de carbohidratos para más de 1000 millones de personas que la consumen a diario, principalmente en las regiones tropicales de América Latina, África y Asia (FAO, 2009). A pesar de que es un cultivo rústico, altamente tolerante a condiciones de estrés abiótico (salinidad, sequía, suelos ácidos) y bióticos, hay algunas enfermedades que comprometen de manera considerable su producción (Ceballos, 2002). Dentro de las principales enfermedades fungosas figuran las manchas foliares causadas por especies de *Cercosporidium henningsii* o por *Phaeoramularia manihotis*. Las enfermedades virales son básicamente el mosaico común de la yuca (CsCMD) y el mosaico de las nervaduras de la yuca (CVMD) las cuales se presentan en América del Sur, pero que no ocasionan pérdidas económicas importantes en el cultivo (Ceballos, 2002). Una de las mayores limitantes del cultivo en el continente africano es el virus del mosaico africano (CMV) causado por un geminivirus (Ceballos, 2002). La principal enfermedad de origen bacteriano es la bacteriosis vascular producida por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, la cual se presenta en todas las regiones donde se cultiva yuca (López *et al.*, 2006). A pesar de su importancia, no se ha logrado identificar el primer gen de resistencia a enfermedades en yuca. Contar con genes de resistencia permite desarrollar estrategias de mejoramiento genético convencional o por transformación, con el fin de obtener variedades con resistencia durable a un amplio espectro de enfermedades. La reciente liberación de la secuencia del genoma de yuca permite identificar posibles genes candidatos de resistencia en yuca.

Las proteínas de resistencia tienen como función el reconocimiento de moléculas del patógeno y la activación de una vía de transducción de señales que permiten restringir

el crecimiento y colonización de aquel (Zipfel, 2009). En los últimos veinte años se han clonado y caracterizado más de cincuenta genes *R* de diferentes especies vegetales que confieren resistencia a diversos patógenos como virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos (Hammond-Kosack y Kanyuka, 2007). La gran mayoría de proteínas *R* presentan un dominio de unión a nucleótidos (NBS, Nucleotide Binding Site) y repeticiones ricas en leucina o LRR (Leucine Rich Repeats) con dominios adicionales en el extremo amino terminal (Meyers *et al.*, 2003). Se cree que la función de estos dominios es monitorear el estado de las proteínas de la planta que son blanco de los factores de virulencia de los patógenos. La mayoría de estas proteínas carecen de péptidos señal o de regiones hidrófobas de anclaje transmembranal. Proteínas con dominios LRR están presentes en formas tan divergentes como virus y eucariotes. Parece ser que la función de su parte amino-terminal se relaciona con modulación de la activación proteica, mientras la parte carboxi-terminal está implicada en interacciones proteicas, ya sea con otra proteína o con un ligando (Jones y Dangl, 2006). Las proteínas NBS-LRR se subclasifican en CC o TIR por la presencia de dominios tipo 'coiled-coil' (CC) o dominios con similitud a las proteínas Toll de *Drosophila* y a las interleukinas IL-1 de mamíferos (dominios TIR) (McHale *et al.*, 2006). Otro tipo de proteínas *R* se caracteriza porque sus miembros poseen solamente un dominio LRR extracelular, como las proteínas de la familia Cf de tomate que confieren resistencia al hongo *Cladosporium fulvum* (Stergiopoulos *et al.*, 2010). Otras proteínas de resistencia presentan, además del dominio LRR extracelular, un dominio transmembranal y pueden presentar un dominio Ser/Tre kinasa (STK) como el caso de Xa21 de arroz que confiere resistencia de amplio espectro frente a diferentes cepas de *Xanthomonas oryzae* (Song *et al.*, 1995). Teniendo en cuenta que la re-

sistencia es la única función asignada hasta el momento para proteínas de tipo NBS-LRR (McHale *et al.*, 2006) y tomando como base la permanencia de los dominios conservados en las proteínas de resistencia, se pueden identificar proteínas similares en especies de plantas poco estudiadas.

La disponibilidad de genomas completamente secuenciados permite, mediante estrategias de bioinformática, la identificación de genes *R* candidatos que codifican para proteínas que presenten este tipo de dominios conservados. Sin embargo, es necesario realizar estudios funcionales para determinar la especificidad de estas proteínas candidatas. Alternativamente, mediante análisis de mapeo es posible ubicar estas secuencias en mapas genéticos, para asociarlos con loci genéticamente identificados como de resistencia a un patógeno particular o con QRLs (Quantitative Resistance Loci) (López *et al.*, 2007).

En este trabajo se aprovechó la naturaleza conservada de las proteínas *R* para buscar en el genoma de yuca los homólogos de las proteínas previamente descritas en otras especies vegetales. Estas secuencias se amplificaron y secuenciaron en los dos parentales empleados en la construcción del mapa genético para detectar polimorfismos de tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Se espera que los resultados fundamenten las bases para el desarrollo de estrategias que permitan mapear estas secuencias en el mapa genético de yuca.

Materiales y métodos

Material vegetal y extracción de ADN

La variedad de yuca empleada en la secuenciación del genoma fue AM560-2. Con el objetivo de reducir la heterocigocidad propia de la yuca y facilitar la secuenciación del genoma se entrecruzó por tres generaciones la variedad MCOL1505, dando origen a AM560-2. La secuencia del genoma de esta variedad representa la secuencia de referencia a la cual se tuvo acceso desde www.phytozome.com.

Las variedades de yuca CM2177-2 y TMS30572 fueron provistas por el Banco de Germoplasma de Yuca existente en el CIAT en condiciones *in vitro*. Estas variedades fue-

ron propagadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biología de la Universidad Nacional, en Bogotá. Hojas de plantas *in vitro* fueron maceradas en nitrógeno líquido y el ADN se extrajo según el protocolo modificado descrito previamente por Dellaporta *et al.*, (1983). Ambas variedades son los parentales de una progenie F1 compuesta por 150 individuos, previamente desarrollada en el CIAT a partir del cual se desarrolló el primer mapa genético de yuca (Fregene *et al.*, 1997).

Identificación de genes *R*

Se construyó una base de datos que incluyó la información de la secuencia y estructura de proteínas *R* previamente reportadas en diferentes especies de plantas. A partir de esta base de datos se seleccionaron algunos genes *R* que han sido ampliamente caracterizados (Cuadro 1). Partiendo de las secuencias de las proteínas codificadas por los genes *R* seleccionados (Cuadro 1) se realizó un TBLASTN contra el genoma de *Manihot esculenta* (www.phytozome.com), con el fin de identificar las proteínas homólogas en yuca. Se utilizaron los parámetros estándar para el TBLASTN: umbral de valor E esperado = -1, matriz de comparación = Blosum62 y tamaño de palabra = 3. Con base en los resultados obtenidos y a partir de las secuencias de nucleótidos respectivas, se diseñaron cebadores con ayuda del programa Primer3 (Cuadro 2) (Rozen y Skaletsky, 2000). Los parámetros de diseño se modificaron, de manera que los productos de amplificación esperados se encontrarán preferiblemente en los intrones o en los UTRs (Untranslated region) mediante la ayuda de la función target del programa. Los demás parámetros utilizados fueron: rango del tamaño del producto = 200 - 1000, tamaño de primer: min. = 18 pb, óptimo = 20 pb, máx. = 27 pb, Tm del primer: min. = 57 óptimo = 60 máx. = 63 y %GC del primer: min. = 20, máx. = 80. Los cebadores se emplearon en las amplificaciones a partir de los ADN de las variedades TMS30572 y CM2177-2.

Amplificación y secuenciación

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 10 μ l que contenían 10 ng

Cuadro 1. Proteínas de resistencia utilizadas para los alineamientos en el genoma de yuca y regiones génicas elegidas para la amplificación por PCR.

Nombre proteína	Planta	Patógeno	Estructura	Región diseño cebadores
L6	Lino	<i>Melampsora lini</i>	TNL*	UTR 5'
M	Lino	<i>Melampsora lini</i>	TNL*	UTR 5'
RPP5	<i>Arabidopsis</i>	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	TNL*	Intron
RPP1	<i>Arabidopsis</i>	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	TNL*	Corriente abajo del gen
N	Tabaco	Virus del mosaico del tabaco (TMV)	TNL*	Intron
Xa1	Arroz	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	NL**	Corriente abajo del gen
RPS5	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	NL**	Corriente abajo del gen
RPM1	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	NL**	Corriente abajo del gen
RPS2	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	NL**	Corriente abajo del gen
RGC2	Lechuga	<i>Bremia lactuca</i>	NL**	Intron
I2		<i>Fusarium oxysporum</i> sp <i>licopersicum</i>	NL**	Corriente abajo del gen
Cf2		<i>Cladosporium fulvum</i>	NL**	Corriente abajo del gen
Pto	Tomate	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i>	STK***	UTR 5' y UTR 3'

*TNL: TIR-NBS-LRR. **NL: NoTIR-NBS-LRR. ***STK: Serina/TreoninaKinasa.

Cuadro 2. Cebadores diseñados a partir de secuencias del genoma de yuca similares a genes de resistencia.

Nombre	Cebador derecho	Cebador izquierdo	Tamaño del producto	Temperatura de anillamiento
S_L6	TTTCAGAGGTGGAGATACCCGCAA	AAGCTCGTCTAGGCACCATCTTGA	211	52°C
S_RPP5	AAGGCCTAGAAAGGCACTAAGCGA	TGTCGACACGGTTAAGGTATGGCA	493	50°C
S_RPP1	TTCCTTACCACAACACCTGGTGGGA	ACGCCAACTCTCCATGATGTACCA	390	52°C
S_N	GAGCTAAGCACTTCGGAGCTTTCA	TCTGACGAGCTTGTTCGATATTGT	428	52°C
S_Xa1	TGGGCCAAGATTTCTCATATCCCT	GCTCGTATATGCAGTGCTCCACTT	666	54°C
S_RPS5	TGAAGCAGAGAAAACACTGGTGGGA	AGGGTAGTGTAATGGGAGGAAATGGG	304	58°C
S_RPM1	AAATTGTAGTCCGCGTTGCACCAG	GCTTCTGCTTCTGGCTTGCTTGAT	420	
S_RPS2	AGACAGGCTTCCAACCTCCAACCTCA	TAAGTCATTGGACATTGCCGTGC	480	54°C
S_RGC2	TGATGTGTTGATGTGCTTCGTCCC	GGTATTTCTATGGACTAGCCGTGC	253	50°C
S_I2	CTTTGCACAAGGCATGAGCAGGAT	TGACCATGCCAAGGCGACATGTAT	635	52°C
S_Cf2	GCCTGCATGGTTTGTGATGATGGT	CTCCCTTCTTGTGGATGTTGTGC	772	60°C
S_Pto 3'	AGACTGTGGATCAAGCAGTGAAAC	AGGCGAATCCAATGTCTCCAGGT	257	54°C
S_Pto 5'	GTTTGACAAACAAAGAGAAGGTGT	CATCCAAATCAAGCAAGGATTGCC	222	54°C

de ADN y concentraciones finales de 1X de Buffer (DreamTaq Buffer, Fermentas), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada uno de los deoxynucleotidos, 0.5 μM de cada cebador y 0.2 U de Taq polimerasa (DreamTaq, Fermentas). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador iCycler (BioRad). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: denaturación inicial a 95°C por 3 min y 45 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a la temperatura de anillamiento calculada para cada pareja de cebadores y 1 min de extensión a 72 °C. Las reacciones terminaron con una extensión final de 5 min a 72 °C. Fue necesario estanda-

rizar las temperaturas de anillamiento para cada pareja de cebadores. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa a 1.2% y teñidos con bromuro de etidio. Se confirmó el tamaño del fragmento amplificado con empleo del marcador de peso molecular 1Kb Plus Ladder ® (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)

Los productos de amplificación fueron enviados a un laboratorio de servicios certificados (Macrogen) para su secuenciación. Las secuencias provenientes de ambas variedades fueron editadas e inspeccionadas empleando el programa Sequencher (Genecodes, Inc) y

alineadas con la ayuda del programa MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation). A partir de los alineamientos obtenidos se identificaron manualmente los SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms).

Resultados

Amplificación de homólogos de genes *R* en yuca

En total se diseñaron trece parejas de cebadores, correspondientes a los diferentes homólogos de genes *R* (Cuadro 2). Para 12 cebadores (92.3%) se logró obtener productos de amplificación en las variedades de yuca CM2177-1 y TMS30572, después de realizar diferentes cambios en las temperaturas de

anillamiento de los cebadores, las cuales variaron desde 50°C hasta 60°C (Figura 1). Para el gen con similitud a *Cf2* no se logró obtener producto de amplificación. En el caso de las amplificaciones obtenidas empleando los cebadores diseñados a partir del gen *RPP1* se presentó un producto del tamaño esperado sólo para la variedad CM2177-2. Para el caso de los cebadores diseñados a partir de la secuencia con similitud a *RPM1* hubo una amplificación de varios fragmentos, lo que sugiere la presencia de varias copias de este gen en el genoma de yuca. De esta manera, los amplicones obtenidos a partir de estos genes no fueron analizados por secuenciación y, por ende, se obtuvieron secuencias de alta

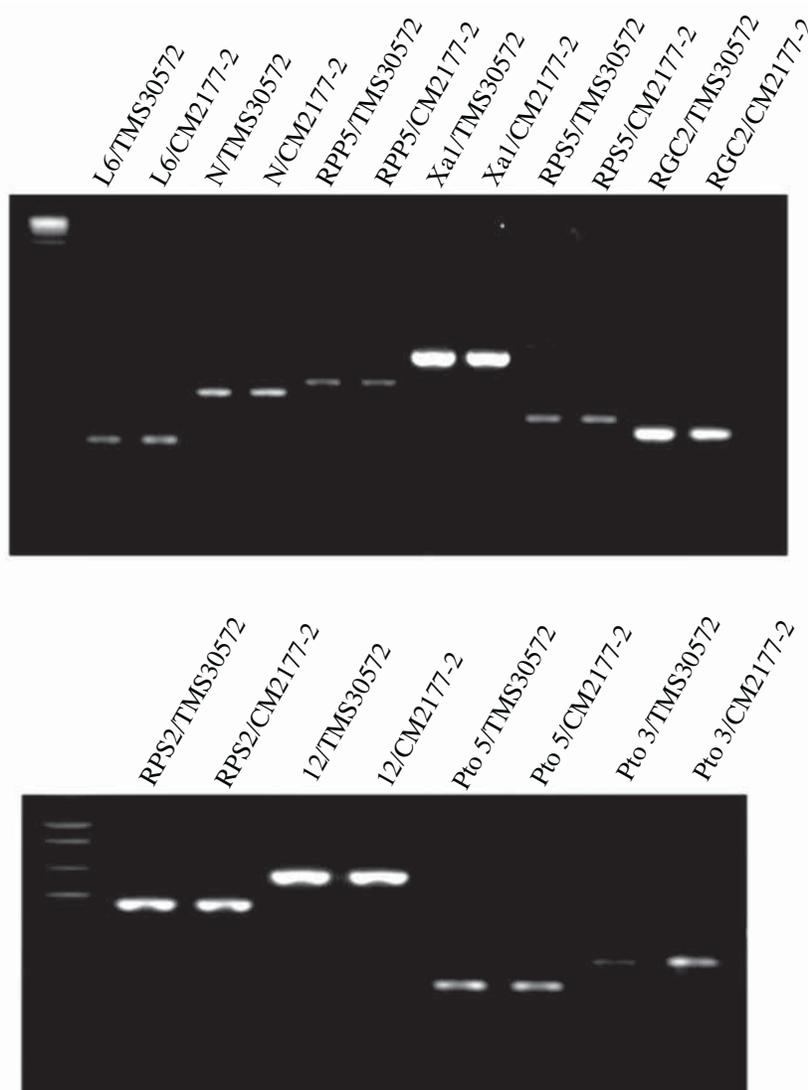


Figura 1. Amplificación de los genes homólogos en las variedades de yuca CM2177-2 y TMS30572.

calidad para los diez ampliaciones restantes (Cuadro 1).

Identificación de SNPs e indels

La comparación de las secuencias obtenidas para los diez genes entre las variedades secuenciadas y la del genoma de referencia, permitió la identificación de un total de 50 SNPs presentes en cuatro genes de yuca, que presentan similitud con los genes *RPP5*, *RPS5*, *RPS2* y *Xa1*. En los alineamientos de las secuencias obtenidas para los genes restantes no se observaron polimorfismos. De estos SNPs, 24 corresponden a transiciones y 26 a transversiones. Se detectaron adicionalmente cinco inserciones/deleciones (indels) presentes únicamente en los alineamientos de los genes homólogos a los genes *Xa1* y *RPP5*.

SNPs intra-varietales

La yuca, por ser un cultivo tetraploide y heterocigoto, puede presentar hasta cuatro diferentes alelos en algunos genes (Fregene *et al.*, 1997), por lo cual puede haber SNPs dentro de una variedad. En este estudio se identificaron 4 SNPs dentro de la variedad CM2177-2 y 10

dentro de la variedad TMS30572 (Cuadro 3). Para ambas variedades se encontró que 50% de los SNPs son transiciones, el 50% restante corresponden a transversiones.

SNPs entre variedades

El número de SNPs para cada uno de los genes entre las tres variedades se presenta en el Cuadro 4. Cuando se compararon las secuencias de las variedades CM2177-2 y TMS30572 se identificaron claramente 37 SNPs de los cuales el 48.6% (18) corresponde a transiciones, el 45.9% (19) son transversiones. En la Figura 2 se observa un ejemplo de uno de los SNPs detectados entre ambas variedades. También se detectaron cuatro indels de uno, dos y cuatro pares de bases para el gen homólogo a *RPP5* y un indel de tres pares de bases para el gen homólogo a *Xa1*. Estos polimorfismos representan una herramienta valiosa en la medida que pueden ser empleados para el desarrollo de estrategias que permitan mapear estas secuencias en el mapa genético de yuca. En general, se observó mayor número de SNPs en la variedad AM560-2 con respecto a las variedades

Cuadro 3. Determinación de SNPs intravarietales en las variedades de yuca en el estudio.

Proteína	Cultivar	Total (no.)	Transiciones	Transversiones
	CM2177-2	0	0	0
RPS2	TMS30572	4	2	2
	CM2177-2	0	0	0
	TMS30572	5	2	3
RPS5	CM2177-2	0	0	0
Xa1	TMS30572	0	0	0
	CM2177-2	4	2	2
Total		14	7	7

Cuadro 4. Determinación de polimorfismos en las diferentes variedades de yuca en el estudio.

Proteína	Variedad	Variedades							
		TMS30572				AM560-2			
		Total (no.)	Transiciones	Transversiones	Indels	No Total	Transiciones	Transversiones	Indels
RPP5	CM2177-2	9	3	6	0	12	4	5	3
	TMS30572	-	-	-	-	13	4	6	3
RPS2	CM2177-2	1	0	1	0	1	0	1	0
	TMS30572	-	-	-	-	0	0	0	0
RPS5	CM2177-2	5	0	0	0	1	0	1	0
	TMS30572	-	-	-	-	0	0	0	0
Xa1	CM2177-2	5	2	3	0	7	3	3	1
	TMS30572	-	-	-	-	1	0	0	1

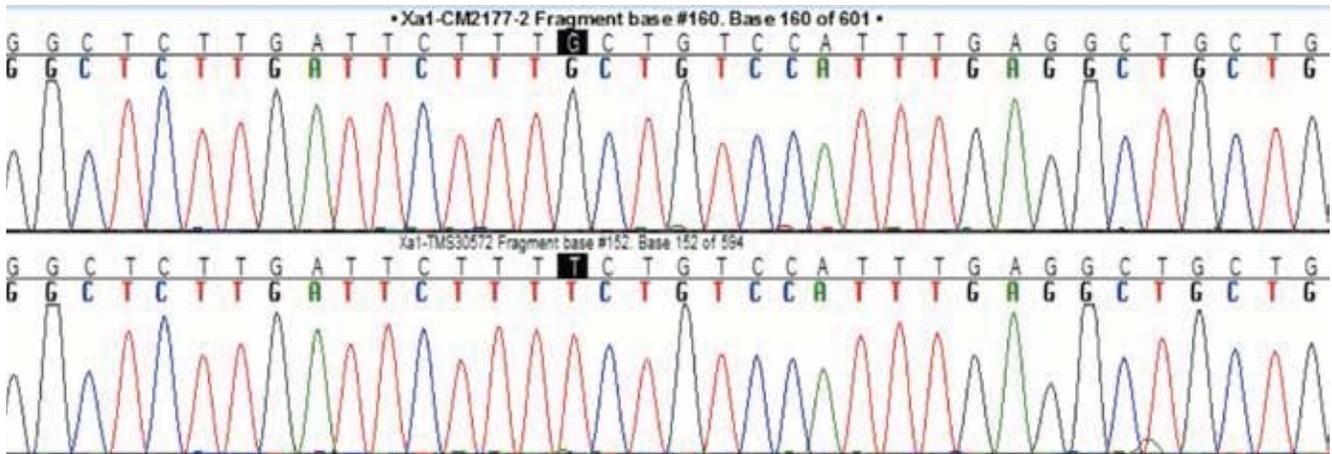


Figura 2. Ejemplo de un cromatograma para el gen homólogo a *Xa1* amplificado en las variedades de yuca CM2177-2 y TMS30572. La posición resaltada corresponde a uno de los SNPs encontrados entre estas variedades.

CM2177-2 y TMS30572, que entre ellas. La mayoría de diferencias entre estas últimas variedades y la variedad cuyo genoma fue secuenciado se encuentra en el gen homólogo a *RPP5* donde se obtuvo el 71.4% de estos polimorfismos.

Discusión

El desarrollo de mapas genéticos ha sido de gran utilidad para el aislamiento de genes (Keller *et al.*, 2005; Nagamura *et al.*, 1997). La mayoría de mapas genéticos se han construido con base en la utilización de marcadores moleculares de regiones genómicas anónimas, es decir, sin conocer si estas secuencias corresponden a regiones codificantes o no (Fregene *et al.*, 1997; Mba *et al.*, 2001; van Os *et al.*, 2006). Sin embargo en los últimos años, con las amplias colecciones de secuencias expresadas así como la disponibilidad de genomas completos, se ha incluido la utilización de marcadores desarrollados a partir de secuencias codificantes (Blair *et al.*, 2011; Gujaria *et al.*, 2011). Una estrategia que también se ha empleado para identificar y mapear genes de interés es la aproximación de genes candidatos, la cual se basa en la presencia de secuencias génicas conservadas entre especies (Hu *et al.*, 2008; Muchero *et al.*, 2010). La presencia de dominios conservados en las proteínas R permite, a través de la estrategia de genes candidatos,

identificar secuencias codificantes para estos dominios en otras especies vegetales. No obstante, su sola presencia no permite establecer una asociación entre un determinado gen y la resistencia de una planta a una especie o cepa particular de patógeno, lo cual puede ser posible a través del mapeo de los genes candidatos y su asociación con loci de resistencia o QRLs previamente identificados.

En este trabajo se logró la identificación de genes de yuca que presentan alta similitud con proteínas de resistencia provenientes de diferentes especies de plantas. Estos genes se amplificaron y secuenciaron en los dos parentales empleados en la construcción del mapa genético de yuca, lo cual permitió identificar, para algunos genes, polimorfismos de tipo SNP. Esta información permitirá diseñar estrategias para mapearlos. La secuenciación directa de los amplicones permite la identificación directa de los polimorfismos sin necesidad de una previa clonación y secuenciación de un número de clones. Este hecho es significativo, dado que la alta heterocigocidad de la yuca y su naturaleza tetraploide exigen la secuenciación de un relativo alto número de clones para incrementar la probabilidad de cubrir todas las variantes alélicas posibles presentes en una variedad de yuca particular. Los mapas genéticos de *M. esculenta* están basados principalmente en marcadores anónimos de tipo RFLPs, RAPDs, SSRs

(Fregene *et al.*, 1997; Mba *et al.*, 2001; López *et al.*, 2007). De esta manera, la inclusión de marcadores generados a partir de genes candidatos en los mapas genéticos contribuirá a asociar marcadores con fenotipos. Adicionalmente, por tratarse de genes es más probable que estén asociados con fenotipos particulares y pueden, por tanto, ser el punto de partida hacia el desarrollo de marcadores para ser empleados en los programas de mejoramiento genético asistido por marcadores. Sin embargo, este tipo de estrategias deben ser complementadas con la fenotipificación en respuesta a diferentes cepas o especies de patógenos, para incrementar la probabilidad de asociar genes con fenotipo.

Como una alternativa al mapeo genético, en los últimos años se han desarrollado estrategias basadas en mapeo por asociación donde, a partir de polimorfismos en genes candidatos dentro de un grupo de individuos particulares —no necesariamente poblaciones producto de cruzamientos dirigidos— se puede establecer una asociación con el fenotipo (Hall *et al.*, 2010). Este tipo de alternativas son valiosas en plantas como la yuca que presentan un ciclo de vida largo, tienen baja producción de semillas y por tanto la elaboración de cruces exige largos periodos. De esta manera, los genes de yuca que revelan similitud con los genes *RPP5*, *RPS2*, *RPP5* y *Xa1*, para los cuales se obtuvo un buen número de polimorfismos, constituyen buenos candidatos para iniciar la genotipificación en un grupo grande de variedades con el fin de hacer mapeo por asociación.

Aunque hay características que están gobernadas por varios genes, es posible encontrar marcadores de tipo SNP relacionados con un fenotipo de interés. Por ejemplo, el fenotipo de fragancia que presenta alta complejidad se pudo asociar a un único SNP (Jin, *et al.*, 2003). La resistencia a patógenos en plantas no es una excepción y aunque se encuentran muchos casos en que este fenotipo es gobernado por varios genes, hay ejemplos donde se han puesto en evidencia los cambios en la secuencia de algunos genes que pueden explicar la diferencia entre cultivares resistentes y susceptibles (Bryan *et al.*, 2000; Krattinger *et al.*, 2009). También es importante destacar

que otros tipos de polimorfismos, como los indels, pueden explicar diferencias entre los fenotipos. Para una especie como *M. esculenta* se esperan bajas frecuencias de SNPs debido a su endogamia y a que el principal medio de propagación es asexual por estacas.

Con el fin de incrementar la probabilidad de encontrar SNPs se secuenciaron regiones correspondientes a intrones o secuencias corriente abajo de los genes seleccionados que posiblemente pueden corresponder a los 3'UTR, donde se ha demostrado que la frecuencia de polimorfismos puede ser hasta tres veces mayor que la de otras regiones (Ganal *et al.*, 2009; Rafalski, 2002). El intrón del gen de yuca que revelan similitud con *RPP5* resultó ser la secuencia donde se encontraron más polimorfismos, demostrando que estas regiones representan un potencial importante para la búsqueda de marcadores.

La frecuencia de SNPs en yuca estimada en este trabajo fue de 1 SNP cada 164.14 pb. En *Arabidopsis*, por ejemplo, se ha estimado 1 SNP cada 2.2 kb para regiones intrónicas; mientras que en los exones se ha estimado 1 SNP cada 3.1 kb (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). En maíz se han reportado frecuencias de SNPs más alta: 1 cada 31 pb en secuencias no-codificantes y de 1 cada 124 pb en regiones codificantes (Ching *et al.*, 2002). En soya la frecuencia aproximada es de 1 SNP cada 270 pb (Zhu *et al.*, 2003). Obviamente la frecuencia de SNPs varía entre especies y no es homogénea a lo largo del genoma. En este sentido, es importante considerar regiones cercanas a los genes *R* que puedan tener menos presiones selectivas y por tanto la probabilidad de encontrar polimorfismos se incrementaría. Actualmente esta posibilidad es una realidad, ya que se cuenta con la secuencia del genoma de yuca. La identificación de este tipo de marcadores, aunque no directamente asociados a genes *R*, sí permitiría reducir el intervalo donde se han localizado previamente QTLs o loci de resistencia.

La metodología utilizada en este trabajo se propone como una estrategia para identificar SNPs en un mayor número de genes candidatos y/o regiones genómicas ubicadas en la proximidad de genes homólogos a genes de resistencia. Los polimorfismos obtenidos en

este trabajo son un recurso valioso, ya que a partir de ellos se pueden diseñar marcadores CAPs para, de esta manera, genotipificar la F1 del cruce entre CM2177-2 y TMS30572 y así ubicar estos genes en el mapa genético de yuca y establecer asociaciones con regiones implicadas en resistencia.

Conclusiones

Se amplificaron varios genes de yuca que presentan similitud con genes *R* previamente reportados en otras plantas. La secuencia obtenida de los amplicones en las variedades de yuca CM2177-2 y TMS30572 permitió la detección de varios SNPs e indels, los cuales pueden ser empleados para genotipificar la población F1 de este cruce y mapearlos en el mapa genético de yuca.

Agradecimientos

El proyecto de este trabajo fue financiado por el Banco de la República (Proyecto 2747) y Colciencias (proyecto 110152128403), a cuyos directivos los autores expresan sus agradecimientos.

Referencias

- Blair, M.; Hurtado, C.; Chavarro, M.; Munoz-Torres, M.; Giraldo, F.; Pedraza, J.; Tomkinsy, R.; y Wing, R. 2011. Gene-based SSR markers for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) derived from root and leaf tissue ESTs. *BMC Plant Biol.* 11:50.
- Bryan, G. T.; Wu, K. S.; Farrall, L.; Jia, Y.; Hershey, H. P.; McAdams, S. A.; Faulk, K. N.; Donaldson, G. K.; Tarchiniy, R.; y Valent, B. 2000. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta. *Plant Cell.* 12:2033 - 2046.
- Ceballos, H. 2002. La yuca en Colombia y el mundo: nuevas perspectivas para un cultivo milenario. En: CIAT (eds.). La yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. 586 p.
- Ching, A.; Caldwell, K. S.; Jung, M.; Dolan, M.; Smith, O. S.; Tingey, S.; Morgantey, M.; y Rafalski, A. J. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genet.* 3:19.
- Dellaporta, S.; Woody, J.; y Hicks, J. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19 - 21.
- Fregene, M.; Angel, F.; Gomez, R.; Rodriguez, F.; Chavarriaga, P.; Roca, W.; Tohme J.; y Bonierbale, M. 1997. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor. Appl. Genet.* 95:431 - 441.
- Ganal, M. W.; Altmann, T.; y Roder, M. S. 2009. SNP identification in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:211 - 217.
- Gujaria, N.; Kumar, A.; Dauthal, P.; Dubey, A.; Hiremath, P.; Bhanu, A.; Farmer, A.; Bhide, M.; Shah, T.; Gaur, P.; Upadhyaya, H.; Bhatia, S.; Cook, D.; Mayy, G.; y Varshney, R. 2011. Development and use of genic molecular markers (GMMs) for construction of a transcript map of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 122:1577 - 1589.
- Hall, D.; Tegstromy, C.; e Ingvarsson, P. K. 2010. Using association mapping to dissect the genetic basis of complex traits in plants. *Brief. Funct. Genom.* 9:157 - 165.
- Hammond-Kosack, K. E.; y Kanyuka, K. 2007. Resistance genes (R genes) in plants. En: *Encyclopedia of Life Sciences*, J.W. Sons, ed. (Londres). p. 1 - 21.
- Hu, K. M.; Qiu, D. Y.; Shen, X. L.; Liy, X. H.; y Wang, S. P. 2008. Isolation and manipulation of quantitative trait loci for disease resistance in rice using a candidate gene approach. *Mol. Plant.* 1:786 - 793.
- Jin, Q.; Waters, D.; Cordeiro, G. M.; Henry, R. J.; y Reinke, R. F. 2003. A single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 165:359 - 364.
- Jones, J. D. y Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature.* 444:323 - 329.
- Keller, B.; Feuillet, C.; y Yahiaoui, N. 2005. Map-based isolation of disease resistance genes from bread wheat: cloning in a superset genome. *Genet. Res.* 85:93 - 100.
- Krattinger, S. G.; Lagudah, E. S.; Spielmeier, W.; Singh, R. P.; Huerta-Espino, J.; McFadden, H.; Bossolini, E.; Selter, L. L.; y Keller, B. 2009. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science.* 323:1360 - 1363.
- López, C. E.; Restrepo, S.; y Verdier, V. 2006. Limitations of cassava bacterial blight: New advances. *Acta Biol. Col.* 11:21 - 45.
- López, C. E.; Quesada-Ocampo, L. M.; Bohorquez, A.; Duque, M. C.; Vargas, J.; Tohme, J.; y Verdier, V. 2007. Mapping EST-derived SSRs and ESTs involved in resistance to bacterial blight in *Manihot esculenta*. *Genome* 50:1078 - 1088.
- Mba, R. E.; Stephenson, P.; Edwards, K.; Melzer, S.; Nkumbira, J.; Gullberg, U.; Apel, K.; Gale, M.; Tohme, J.; y Fregene, M. 2001. Simple sequen-

- ce repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. *Theor. Appl. Genet.* 102:21 - 31.
- McHale, L.; Tan, X.; Koehly, P.; y Michelmore, R. W. 2006. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genet. Biol.* 7:212.
- Meyers, B. C.; Kozik, A.; Griego, A.; Kuangy, H.; y Michelmore, R. W. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 15:809 - 834.
- Muchero, W.; Ehlersy J. D.; y Roberts, P. A. 2010. Restriction site polymorphism-based candidate gene mapping for seedling drought tolerance in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Theor. Appl. Genet.* 120:509 -518.
- Nagamura, Y.; Antonioy, B. A.; y Sasaki, T. 1997. Rice molecular genetic map using RFLPs and its applications. *Plant Mol. Biol.* 35:79 - 87.
- Rafalski, A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:94 - 100.
- Rozen, S.; y Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Meth. Mol. Biol.* 132:365 - 386.
- Song, W. Y.; Wang, G. L.; Chen, L. L.; Kim, H. S.; Pi, L. Y.; Holsten, T.; Gardner, J.; Wang, B.; Zhai, W. X.; Zhu, L. H.; Fauquet, C.; y Ronald, P. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*. 270:1804 - 1806.
- Stergiopoulos, I.; van den Burg, H. A.; Okmen, B.; Beenen, H. G.; van Liere, S.; Kemay, G. H.; y de Wit, P. J. 2010. Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Procc. Nat. Acad. Sci.* 107:7610 - 7615.
- The genome *Arabidopsis* Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408:796 - 815.
- van Os, H.; Andrzejewski, S.; Bakker, E.; Barrena, I.; Bryan, G.J.; Caromel, B.; Ghareeb, B.; e Isidore, E. *et al.* 2006. Construction of a 10,000-Marker ultradense genetic recombination map of potato: providing a framework for accelerated gene isolation and a genomewide physical map. *Genetics*. 173:1075 - 1087.
- Zhu, Y. L.; Song, Q. J.; Hyten, D. L.; Van Tassell, C. P.; Matukumalli, L. K.; Grimm, D. R.; Hyatt, S. M.; Fickus, E. W.; Youngy, N.D.; y Cregan, P. B. 2003. Single-nucleotide polymorphisms in soybean. *Genetics*. 163:1123 - 1134.
- Zipfel, P. F. 2009. Complement and immune defense: from innate immunity to human diseases. *Immunology letters*. 126:1 - 7.