

Identificación de genes análogos de resistencia a enfermedades en yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y su relación con la resistencia a tres especies de *Phytophthora*

[G.A. Llano](#), [E. Álvarez](#), [J.E. Muñoz](#), [M. Fregene](#)

[|Compendio](#) | [| Abstract](#) | [| Introducción](#) | [| Materiales y Métodos](#) | [| Resultados y Discusión](#) | [| Conclusiones](#) | [| Agradecimientos](#) | [| Bibliografía](#) |

COMPENDIO

Los genes de resistencia se buscaron mediante dos estrategias. La primera, por medio de hibridación con sondas de maíz y arroz, utilizando RFLP. La segunda consistió en la amplificación de regiones conservadas de ADN, con cebadores degenerados NBS y Pto kinasa, en tres genotipos de yuca resistentes a *Phytophthora tropicalis* y *P. palmivora*, obteniendo clones que se secuenciaron y se homologaron con genes de resistencia conocidos. Con las secuencias se diseñaron cebadores específicos que permitieron amplificar regiones de ADN de los parentales e individuos resistentes y susceptibles. Las bandas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida denaturantes y no denaturantes (SSCP - polimorfismo en la conformación de cadenas simples). Se identificaron cinco QTLs asociados con resistencia a *Phytophthora*. La yuca tuvo muy baja homología con los genes de maíz y arroz. Se obtuvieron 28 clones NBS y 2 Pto kinasa, de los cuales 5 mostraron secuencia homóloga con RGAs (genes análogos de resistencia) NBS-LRR y cuatro de ellos mostraron marco abierto de lectura con motivos conservados de la región NBS, y se consideraron como RGAs. Se identificaron tres clases de RGAs aunque no hubo evidencia de su asociación con resistencia a *Phytophthora*.

Palabras claves: Yuca, *Phytophthora*, QTLs, RGAs, sondas, cebadores degenerados.

ABSTRACT

Identification of gene analogs for resistance to cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Diseases, and their relationship to resistance to three *Phytophthora* species. Two strategies were used to find resistance genes in cassava. The first through hybridizing probes from maize and rice, using RFLP. The second strategy consisted of amplifying conserved regions of DNA, with degenerated NBS and Pto kinase primers, in three cassava genotypes resistant to *Phytophthora tropicalis* and *P. palmivora*, obtaining clones that were sequenced and compared with known resistance genes. Specific primers were designed from the sequences, allowing DNA regions of parental material and resistant and susceptible individuals, to be amplified. Bands were separated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, and non-denaturing polyacrylamide gel (SSCP - single strand conformation polymorphism-). Five QTLs associated to *Phytophthora* spp resistance were identified. Cassava has a very low homology with the genes of the monocotyledons tested. A total of 28 NBS and 2 Pto kinase clones were obtained; of these, 5 showed homologous sequence with NBS-LRR RGAs (resistance gene analogs). Four of them had open reading frames with conserved motifs of the NBS region, and were considered as RGAs. Three different RGAs

classes were identified. It remain to be shown if there are association to resistance to *Phytophthora*.

Key words: Cassava, *Phytophthora*, QTLs, RGAs, probes, degenerated primers.

INTRODUCCIÓN

La yuca, *Manihot esculenta* Crantz, es una de las principales fuentes de carbohidratos en los trópicos y tiene importancia mundial como alimento básico para millones de personas en América y África. La yuca se cultiva en 90 países, de los cuales los principales productores son Nigeria, Brasil, Tailandia e Indonesia. En Colombia la yuca se cultiva desde el nivel del mar hasta los 2.000 m, principalmente en la costa norte y en laderas de la región andina, donde constituye parte básica de la alimentación humana (Best, 1996). Actualmente se está impulsando el cultivo de yuca para la fabricación de concentrados para animales, como también para la industria del almidón.

Según reporte de FAO para 2002, el rendimiento mundial de yuca fue de 10.65 t/ha y en Colombia de 10.63 t/ha. La producción se ve afectada por enfermedades y plagas, dentro de las cuales la pudrición en las raíces y tallos causada por *Phytophthora* spp. es una de las más importantes, porque puede causar pérdidas hasta del 80% de la producción total (Álvarez y Llano, 2002).

Varias especies de *Phytophthora* causan pudrición de raíces y tallos en yuca, como *P. drechsleri* Tucker, *P. cryptogea* Pethybr & Lafferty, *P. erythroseptica* Pethybr, y *P. nicotianae* Breda de Haan var *parasitica* (Dastur) (Lozano y Booth, 1974). Otras especies aisladas de yuca e identificadas por el doctor Duncan, de Scottish Crop Research Institute, son *P. sinensis*, *P. meadii*, *P. arecae* y *P. tropicalis* (Álvarez y Barragán, 1998; CIAT, 2000). Estos patógenos afectan el sistema radical, causando desintegración de los tejidos y producen un olor fétido (Álvarez y Llano, 2002). *Phytophthora* spp. ataca plantas jóvenes y maduras de yuca, especialmente en condiciones favorables como mal drenaje, cultivo continuo sin rotación, uso de estacas infectadas y de baja calidad y cosecha tardía (Lozano, 1991).

Teniendo en cuenta la gran variación de *Phytophthora* spp., Álvarez y Barragán (1998) y Llano y Álvarez (1999) han identificado variación en el germoplasma de yuca, por la reacción al patógeno, y encontrado fuentes de resistencia a varias especies de *Phytophthora*. Con los avances en biología molecular es posible detectar secuencias de ADN de yuca, que tengan homología con genes que se han identificado como responsables de otorgar resistencia a enfermedades en otros cultivos, con el fin de identificar marcadores asociados con la resistencia a las especies del patógeno. Para comprobar esta hipótesis se planteó como objetivo general, identificar genes análogos de resistencia a enfermedades en el genoma de yuca, y los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la resistencia de dos poblaciones de yuca a tres especies de *Phytophthora*, causantes de pudriciones de raíces y tallo.
- Identificar QTLs (loci para características cuantitativas) asociados con la resistencia de yuca a tres especies de *Phytophthora*.

- Analizar la homología de genes de yuca con genes de resistencia a enfermedades aislados de monocotiledóneas, a través de hibridización.
- Clonar y secuenciar regiones de ADN de yuca asociadas con resistencia a enfermedades.
- Buscar homología entre genes de yuca y secuencias de resistencia a enfermedades de diferentes especies, a través de amplificación con cebadores degenerados.
- Diseñar cebadores que permitan amplificar regiones asociadas con resistencia de enfermedades en yuca.
- Evaluar la asociación de las regiones amplificadas con los cebadores diseñados, y la resistencia a tres especies de *Phytophthora*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de poblaciones de yuca por su reacción a tres especies de *Phytophthora*. Se inocularon 126 individuos y los parentales de la familia K de yuca, correspondiente al cruce entre MNGA 2 (TMS 30572) y CM 2177-2 (ICA Cebucán), cultivares élite de Nigeria y Colombia respectivamente, con tres especies de *Phytophthora* spp. (P4: *P. palmivora*, P12: *P. melonis* y 44: *P. tropicalis*). La familia K se ha utilizado para la construcción del mapa genético de yuca (Fregene et al., 1997). También se evaluaron 84 individuos de la familia CM 9582 (MBRA 1045 x MCR 81).

Se inocularon fragmentos de brotes y cilindros de raíces, en ensayos diferentes para cada tejido, con arreglos de Parcelas Divididas con seis repeticiones, donde la parcela principal fue el aislamiento y la subparcela, el genotipo de yuca; la unidad experimental consistió en un brote o un cilindro de raíz, según el ensayo. El primer método consistió en inocular cortes de tallos jóvenes de 20 a 40 mm de longitud. Los tallos se colocaron en arena, fijando en la parte superior de los mismos un disco de papel filtro de 5 mm de diámetro, sobre el cual se colocó una gota de una suspensión del patógeno, 1×10^5 zoosporas/ml aproximadamente, en extracto de suelo. Los tallos inoculados se incubaron a 25°C en cajas plásticas, con papel absorbente humedecido. Las evaluaciones se hicieron a los dos, cuatro y seis días después de inocular, midiendo la longitud de la lesión.

Los cilindros de raíz, de 30 mm de diámetro y 15 mm de altura, se sumergieron en hipoclorito de sodio 1% y en alcohol 30% durante un minuto en cada uno, y se lavaron en agua destilada estéril por 30 segundos. Sobre los cilindros se colocó un disco del medio de cultivo V8, de 5 mm de diámetro, con crecimiento micelial del patógeno, incubando a 25°C en cajas con papel absorbente húmedo. El testigo consistió en un disco del medio de cultivo sin micelio. Se hicieron evaluaciones dos, cuatro y seis días después de la inoculación, midiendo el diámetro y la profundidad del tejido descompuesto y calculando el volumen afectado. Con los datos obtenidos se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE).

Teniendo en cuenta que fue necesario hacer diez inoculaciones durante varias semanas, los datos se estandarizaron al valor Z correspondiente de la curva normal estándar y se hicieron análisis de varianza simples y combinados para dos años de evaluación, y un análisis de varianza mínima de Ward ($R^2 > 0.92$), para agrupar los individuos de las progenies de acuerdo con la resistencia, mediante el paquete estadístico SAS, en resistentes (R, hasta 7.5% de volumen

afectado), moderadamente resistentes (MR, de 7.6 a 15% de volumen afectado), intermedios (I, de 15.1 a 25%), susceptibles (S, de 25.1 a 40%) y altamente susceptibles (AS, más de 40% de pudrición), escala definida mediante este análisis estadístico.
Identificación de QTLs

La identificación de QTLs asociados con resistencia a *Phytophthora* spp. se hizo con base en el mapa molecular de la madre de la familia K (MNGA 2), el cual cuenta con más de trescientos marcadores de diferentes tipos (RAPD-ADN polimórfico amplificado aleatoriamente-, RFLP - polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción-, microsátélites, isoenzimas), distribuidos en 36 grupos de ligamiento, derivados tanto del padre como de la madre (Fregene et al., 1997; Zárate, 2002). El análisis y mapeo de QTLs se hizo para la familia K para los dos años de evaluación fenotípica, utilizando el programa qGene 3.06V, por medio de una regresión simple o análisis de un solo marcador, donde la variable dependiente es la reacción al patógeno y la variable independiente es el alelo en el locus marcador. La varianza fenotípica explicada por cada QTL se estimó mediante el coeficiente de determinación (R^2), obtenido mediante el programa de computador.

Hibridización con sondas heterólogas

Se extrajo ADN a partir de cogollos de yuca, siguiendo el protocolo de Gilbertson y Dellaporta (Dellaporta et al., 1983). Se digirieron 10 mg de ADN de los padres de las familias K y CM 9582, por 16 h, en reacciones separadas, con 35 U de cada una de las enzimas Hae III, Hind III, Taq I, Dra I, EcoR I y EcoR V, identificadas como polimórficas en yuca (Ángel et al., 1993). Las bandas se separaron por electroforesis en gel de Agarosa 1.2% en buffer TBE (Trizma base, ácido bórico, Edta), durante 15 horas a 24 V y se transfirieron mediante Southern Blot a membranas de nylon (Ángel et al., 1993).

De Kansas State University se obtuvieron 10 plásmidos con genes NBS (sitios de ligamiento de nucleótidos), Kinasa-LRR (repeticiones ricas en leucina) y Peroxidasa, que confieren resistencia a enfermedades de maíz y arroz. Con dichos plásmidos se prepararon sondas marcadas con $^{32}P[dATP]$, mediante amplificación del inserto de interés a partir del plásmido donde se encuentra.

Las hibridizaciones se realizaron a 65°C durante la noche, siguiendo las indicaciones del protocolo desarrollado por el CIAT (1995). Se lavaron las membranas con las soluciones amortiguadoras SSC 0.5X y SDS al 0.1% durante 10 seg. Las membranas con el ADN hibridizado se expusieron en placa radiográfica (Green X-Ray Film de Kodak) a una temperatura de -80°C, durante 8 a 15 días.

Identificación de genes análogos de resistencia. PCR con cebadores degenerados Se amplificó ADN de MBRA 1045, MCR 81 y MBRA 532, tres genotipos de yuca con resistencia a *Phytophthora* spp., por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), utilizando cebadores degenerados diseñados a partir de genes de resistencia a enfermedades, clonados de diversas especies, con el fin de obtener secuencias conservadas, asociadas a resistencia al patógeno. El PCR se efectuó según Chen et al. (1998), en condiciones de baja temperatura de

apareamiento (45°C), con tres cebadores degenerados, dos amplifican genes NBS (5'-GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC-3' y 5'-YCTAGTTGTRAYDATDAYYYTRC-3' y el cebador KSU 5'-GGIGGIGTIGGIAAIACIAC-3' y 5'-ARIGCTARIGGIARICC-3') y otro amplifica el gen Pto kinasa (5'-ATGGGAAGCAAGTATTCAAGGC-3' y 5'-TTGGCACAAAATTCTCATCAAGC-3') que confiere resistencia a *Pseudomonas syringae* pv tomato en tomate.

Clonación de fragmentos amplificados

Una vez purificados los productos amplificados, se ligaron a los plásmidos PGEM T-Easy, y se transformaron células competentes de *Escherichia coli* cepa DH5-a, mediante un electroporador. Se utilizaron platos petri con medio LB sólido (Tripton 10g, extracto de levadura 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g, para 1 litro de medio) con ampicilina (0.1 mg por ml de medio), 20 ml de IPTG (200 mg/ml) y 20 ml de X-Gal (20 mg/ml en dimetilformamida), para seleccionar las células transformadas por su coloración blanca (con el inserto de interés), descartando las colonias azules. Se extrajo el plásmido de las células transformadas, mediante cultivo en medio LB líquido y miniprep del plásmido (CIAT, 1995) y se separó el inserto de interés, utilizando la enzima EcoR I.

Secuenciación de fragmentos

Los clones obtenidos se secuenciaron mediante el método fluorescente dideoxy terminator (www1.amershambiosciences.com/aptrix/upp01077.nsf), en un secuenciador automático ABI Prism 377-96, preparando reacciones con el kit de Applied Biosystems, con los cebadores T7 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') y SP6 (5'-TATTTAGGT GACTACTATAG-3'). La limpieza y edición de las secuencias se hizo con el programa Sequencher 4.1. Se buscó la homología con genes reportados para resistencia a enfermedades en diversos cultivos, en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov), mediante la aplicación de la herramienta BLASTx, apareando la secuencia obtenida con proteínas de resistencia registradas en la base de datos. Con la herramienta ORF del NCBI se buscó, para cada secuencia, un marco abierto de lectura (ORF), secuencia de nucleótidos que inicia con la tripleta ATG y termina en codones de parada TAA, TAG o TGA.

Las secuencias de aminoácidos obtenidas con ORF se homologaron entre sí y con proteínas de resistencia conocidos, mediante alineamiento múltiple del programa DNAMAN 4.13. También, con este programa, se construyó un árbol filogenético con los ORF, mediante Parsimonia y análisis estadístico de bootstrap con 5000 réplicas.

PCR específico

A partir de las secuencias seleccionadas por su homología con productos génicos relacionados con resistencia a enfermedades, y utilizando el programa Primer 3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3), se diseñaron cebadores para amplificar individuos resistentes y susceptibles de cada familia, mediante PCR específico, evaluando la asociación potencial de marcadores RGA con genes de resistencia a *Phytophthora* spp., utilizando el análisis de grupos segregantes. Se diluyó el ADN de 10 individuos resistentes y 10 susceptibles, a una concentración de 20 ng/ml y se mezcló el ADN de cada grupo para obtener

una sola muestra de los resistentes y una de los susceptibles, con el fin de observar polimorfismos entre ellos. Se amplificó el ADN de cada grupo mediante PCR, con hibridización a 54°C (cebadores N33 y N37) y 57°C (cebador N23). También se probaron temperaturas de hibridización de 57°C y 58°C para N37 y de 60°C y 62°C para N23. El ADN de los padres de la familia CM 9582 y de seis individuos resistentes y seis susceptibles se amplificó mediante PCR con los cebadores N37 y N38, utilizando temperaturas de hibridización de 56°C y 60°C, respectivamente. Los productos de las amplificaciones se separaron en geles de poliacrilamida 4% y 6%, con buffer TBE 0.5X, a 1600 V, 95 mA y 85 W, durante 2.5 h y se tiñeron con AgNO₃.

Restricción de productos amplificados (PCR-RFLP)

Con el fin de observar polimorfismos entre padres e individuos resistentes y susceptibles se digirieron 12 ml del producto amplificado, en reacciones separadas con 12 U de cada una de las enzimas Alu I, Dra I, EcoR I, Msp I, por 16 h a 37°C, y Taq I a 65°C por el mismo tiempo.

Electroforesis SSCP

También se hizo electroforesis SSCP, técnica útil para identificar mutaciones puntuales, basada en la migración diferencial de ADN, a través de un gel de poliacrilamida no denaturante, de acuerdo con su tamaño y secuencia (Bodenes et al., 1996). Por tanto, dos fragmentos de PCR que difieren en una base pueden desplazarse en forma diferente en el gel, mostrando polimorfismos entre individuos. La electroforesis se corrió en gel de poliacrilamida 10%, no denaturante (sin urea) y con buffer TBE 0.6%. La electroforesis se hizo a 8°C, 50 V, 10 mA y 15 W, durante 48 h y a 300 V, 40 mA y 40 W, durante 5 h.

Secuenciación para detectar polimorfismos en un nucleótido

Con el fin de detectar polimorfismos en un nucleótido (SNP) se secuenció el fragmento de ADN de los padres de las familias K y CM 9582, amplificado con los cebadores N37 y N38, como también de tres individuos resistentes y tres susceptibles, de la familia CM 9582. Se hizo alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas, mediante el programa DNAMAN.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la resistencia de yuca a *Phytophthora* spp.

En la [Tabla 1](#) se muestra el porcentaje de individuos de las familias K y CM 9582, agrupados en cada categoría de resistencia a tres especies de *Phytophthora*, con base en el análisis de cluster, correspondiente a inoculación de raíces. Aunque los padres no son contrastantes por su resistencia, las poblaciones mostraron una distribución normal y segregación en individuos resistentes, intermedios y susceptibles en número variable, dependiendo del aislamiento inoculado, debido a la heterocigosidad de la yuca, que hace que un genotipo susceptible pueda portar genes de resistencia, que transmite a su progenie, y también, debido a la diversidad genética del patógeno.

Población y resistencia	Aislamientos*		
	P4	P12	44
	Frecuencia (%)		
CM7857 – Familia K (MNGA 2 x CM 2177-2)			
Categoría de resistencia			
Resistentes	30.2	87.7	9.6
Moderadamente resistentes	41.1	10.5	53.3
Intermedios	20.2	1.8	24.5
Susceptibles	8.5	0.0	10.4
Altamente susceptibles	0.0	0.0	2.2
MNGA 2 (madre)	R ^a	R	I
CM2177-2 (padre)	R	R	S
Cuadrado medio del error: 8975877			
Pr > F entre genotipos: 0.0005			
CM9582 (MBRA 1045 x MCR 81)			
Categoría de resistencia			
Resistentes	5.7	53.6	0.0
Moderadamente resistentes	17.1	28.5	3.8
Intermedios	28.6	3.6	40.7
Susceptibles	25.7	3.6	40.7
Altamente susceptibles	22.9	10.7	14.8
MBRA 1045 (madre)	I	R	R
MCR 81 (padre)	I	R	R
Cuadrado medio del error: 2521548			
Pr > F entre genotipos: 0.0001			
HMC-1 (testigo)	R	MR	R
MBRA 12 (testigo)		S	SAS

La familia K mostró una distribución continua, con un porcentaje de individuos resistentes y moderadamente resistentes al patógeno, de 62.9%, 71.3% y 98.2%, cuando se inocularon raíces con los aislamientos 44, P4 y P12, respectivamente. Lo anterior indica que a pesar de que los padres no mostraron resistencia alta o moderada, su progenie segrega desde alta resistencia hasta alta susceptibilidad, excepto al inocular con P12, aislamiento con el cual no se observó segregación. También se vio que el 4.8% del total de individuos de la familia K mostró resistencia alta a las tres especies de *Phytophthora* inoculadas.

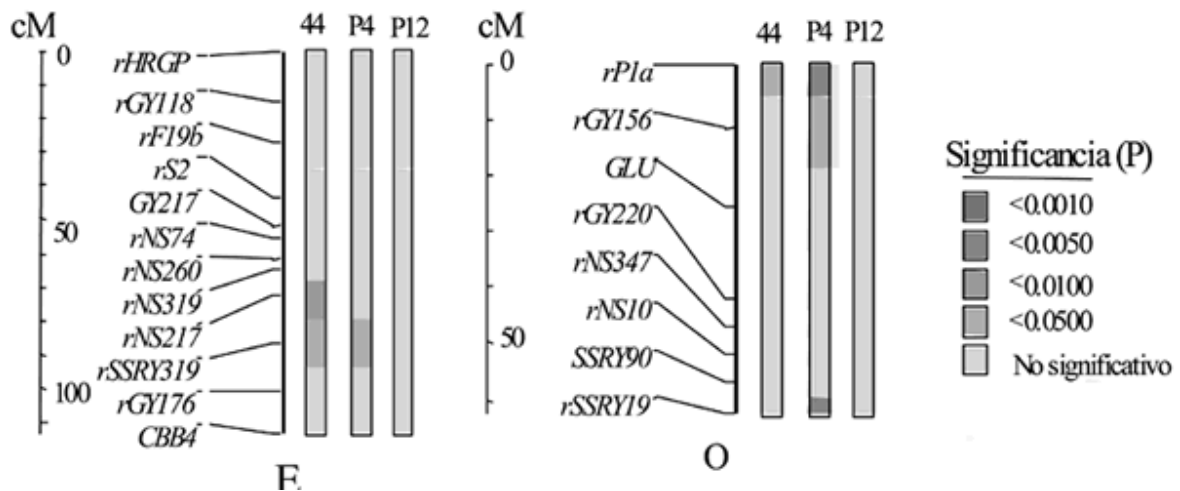
La población CM 9582 mostró alto porcentaje (82.1%) de individuos resistentes y moderadamente resistentes al aislamiento P12, mientras que se presentó bajo porcentaje (3.8% a 22.8%) de individuos resistentes y moderadamente resistentes a P4 y 44. No se observó correlación significativa (entre -0.30 y 0.45, dependiendo del aislamiento) entre la enfermedad presentada en tallos y raíces, lo que sugiere que existen mecanismos de resistencia diferentes dependiendo del tejido, probablemente por la diferenciación celular de cada órgano, o por compuestos específicos en cada uno, como lo mencionan Witsenboer et al. (1989), en su trabajo con *Alternaria* en tomate y tabaco.

Con base en los resultados, y teniendo en cuenta el agrupamiento realizado mediante el análisis de cluster, y los porcentajes de raíz afectada para cada categoría de resistencia, se sugiere utilizar la siguiente escala para evaluación rápida de resistencia de genotipos de yuca, en trabajos futuros, desarrollada en esta investigación:

Categoría de resistencia	Escala de evaluación	Volumen de raíz afectado (%)
R	1	Hasta 7.5
M R	2	7.6 a 15.0
I	3	15.1 a 25
S	4	25.1 a 40
A S	5	Más de 40

En la [Figura 1](#) se muestran los grupos de ligamiento donde se señala la presencia de un posible QTL para cada especie de *Phytophthora*, con un color que indica la significancia. A la izquierda de cada grupo se indican los marcadores moleculares mapeados y una escala de distancia entre ellos, dada en centimorgan (cM). El análisis de simple marcador, para las observaciones fenotípicas evaluadas en el 2000, permitió identificar posibles QTLs asociados con resistencia a *Phytophthora* spp. Se identificó un QTL de efecto menor, asociado con resistencia a *P. tropicalis*, en el grupo de ligamiento E, cerca del marcador microsatélite rNS217, que explica una varianza fenotípica de 7.3%, con una significancia $P < 0.01$. También se identificó un QTL de efecto menor, asociado con resistencia a *P. palmivora*, en el grupo de ligamiento O, cerca del marcador rP1a, que explica 8.3% de la varianza fenotípica con significancia $P < 0.005$ y efecto adicional del padre.

Álvarez et al. (2003) reportan otros QTLs asociados con resistencia a *P. tropicalis*, lo que indica que el control genético se debe a la acción de genes menores, con un gran efecto del ambiente. La ocurrencia en la familia K de individuos más resistentes que los dos padres, y la detección de QTLs asociados con marcadores moleculares muestran alelos de resistencia provenientes de ambos padres, que contribuyen a la resistencia en la progenie, útiles para acumular resistencia genética en el mismo genotipo. La importancia depende de la facilidad con que esos alelos se puedan introducir en variedades comerciales (Jorge et al., 2001). Al parecer la yuca cuenta con diferentes mecanismos de resistencia a *Phytophthora* spp., que se expresan dependiendo de la especie del patógeno y de las condiciones ambientales presentes.



Hibridización con sondas heterólogas

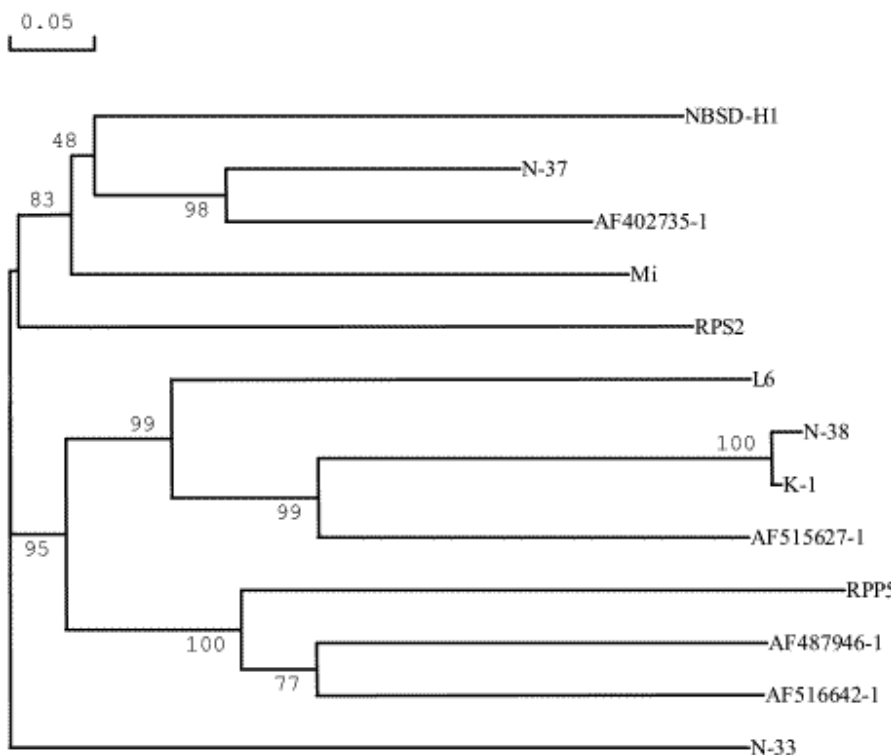
La sonda Pic 15, fragmento de un gen NBS-LRR aislado de maíz, marcada radiactivamente, hibridizó muy levemente con el ADN de los padres de la familia K, digerido con EcoR V y Hind III, por lo que no se consideró homología suficiente para evaluar la progenie.

Obtención de RGAs

Se obtuvieron 27 clones con el cebador NBS, dos con el cebador Pto y uno con el cebador KSU, mediante amplificación de ADN de MBRA 1045, MCR 81 y MBRA 532. Se secuenciaron 15 clones de tamaño superior a 380 pb, que no mostraron posibles duplicados según la restricción con EcoR I. Las secuencias de los clones N23, N33, N37, N38 y K1, todos obtenidos mediante cebadores que amplifican regiones NBS, mostraron homología con proteínas de resistencia reportadas en la base de datos NCBI. A excepción de N-23, todos mostraron ORF.

A través de alineamiento múltiple de secuencias se encontraron homologías entre las secuencias de aminoácidos putativos de los RGAs de yuca N33, N37, N38 y K1, con diferentes motivos entre P-loop y GLPL del dominio NBS del RGA de soja NBSD-H1 (Peñuela et al., 2002). Los RGAs N33 y N37 comparten aminoácidos con motivos P-loop de los genes de resistencia L6 (resistencia a *Melampsora lini* en lino), RPP5 (*Peronospora parasitica* en *Arabidopsis*), y Mi (*Meloidogyne* spp. en tomate), además de aminoácidos del motivo RNBS-A y del motivo kinasa kin-2 de los genes no TIR, RPS2 (*Pseudomonas syringae* pv. tomato) y Mi. Además, N37 tiene la secuencia LDDVW del motivo kin-2, donde un triptófano (W) al final lo ubica como proteína de la clase no TIR (López et al., 2003). Probablemente también N33 corresponda a este grupo, por la similitud de la secuencia DDLW, al final del motivo kin-2. Además, el clon N38 mostró en su ORF el dominio conservado GLPLAL, presente en los genes de resistencia RPS2, N (resistencia al virus del mosaico del tabaco), L6, entre otros.

Como se observa en el árbol filogenético (Figura 2), el RGA N37 se agrupa con el RGA de soya NBSD-H1, la secuencia AF 402735-1 (NBS/LRR de cacao) y el gen Mi, de la clase no TIR. Por su parte, los RGAs N38 y K1 muestran homologías con los genes L6 y RPP5, de la clase TIR y con la secuencia AF 515627-1 (NBS-LRR de Malus domestica), mientras que el RGA N33 se separa de los grupos anteriores. Por tanto, con base en la filogenia, se puede concluir que hay tres familias diferentes de RGAs, teniendo en cuenta que N38 y K1 son prácticamente idénticos. La presencia de familias de RGAs indica que la yuca puede evolucionar respuestas a diferentes razas de patógenos, activando un mecanismo de resistencia.



Amplificación con cebadores específicos

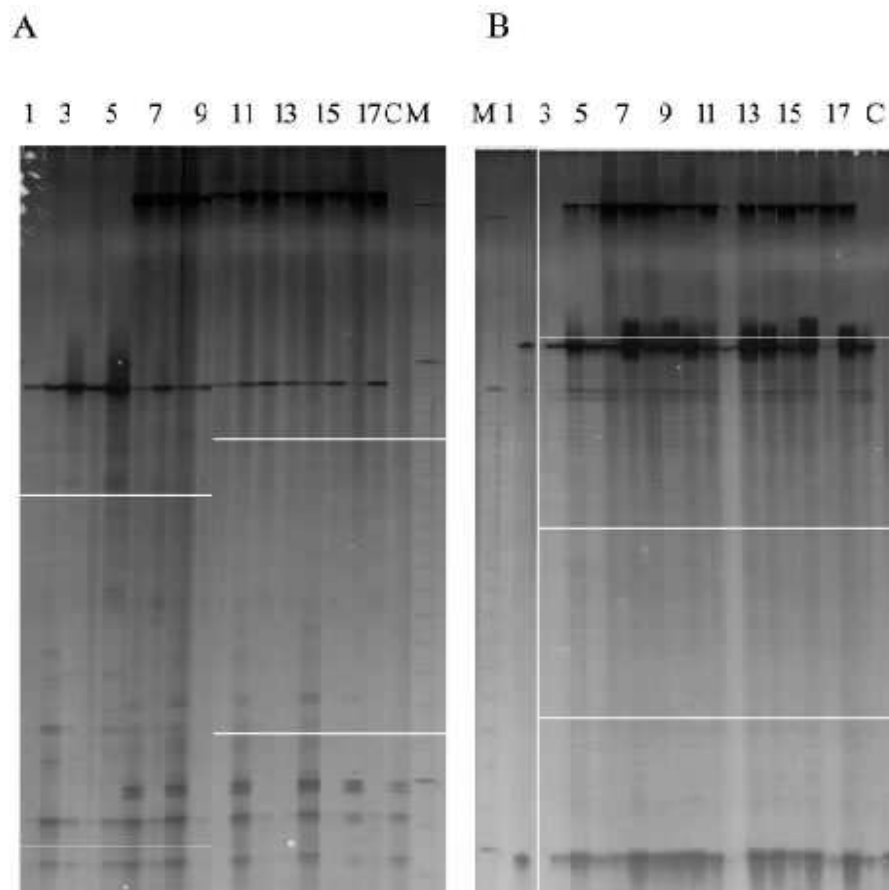
Con base en las secuencias asociadas con resistencia a enfermedades se diseñaron cuatro parejas de cebadores específicos para amplificar tales regiones en los padres e individuos resistentes de las familias K y CM 9582 (sentido 5'-3'):

N23: CGTCGGGAGAACAACACTATTGCGGAGCGCCTATGACCATGA
 N33: 5'- TGATTTAACGGCTTGGGTTTGAACAGCTATGCCCATGATT

N37: GGGGAAGACA AACTCTAGCTCAACTGATGATGATCTTGCTTTGAGGA
N38: GCCATTGGCGTAATCTACCA y TTCATCTAAAGGTGGCCTAGTCTC

Utilizando los cebadores específicos diseñados, N23, N33 y N37, se amplificó ADN de los padres de la familia K, una mezcla de un grupo de 10 individuos resistentes a *P. tropicalis* de la misma población, una mezcla de un grupo de 10 individuos susceptibles y cada uno de los individuos de estos grupos. La electroforesis en gel de poliacrilamida 6%, del producto PCR obtenido con los cebadores N23, a temperatura de hibridización de 62°C y N37, a temperaturas de hibridización de 54°C, 57°C y 58°C, no señaló polimorfismos.

Por otro lado, se amplificó ADN de los padres de la familia CM 9582, seis individuos resistentes y seis susceptibles de la misma población, con los cebadores N37 y N38, a temperaturas de 56°C y 60°C de hibridización. La separación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 6% no mostró polimorfismo entre los genotipos evaluados ([Figura 3](#)). Mediante PCR-RFLP de los fragmentos amplificados de los padres y grupos de resistentes y susceptibles, con el cebador N37, y restricción con la enzima *Dra I*, mostraron varias bandas monomórficas entre los padres. Con los otros cebadores y las otras enzimas evaluadas, *Alu I*, *EcoR I*, *Msp I* y *Taq I*, se obtuvo una sola banda monomórfica.



Los productos de amplificación obtenidos con las temperaturas más altas de hibridización se observaron en gel de poliacrilamida 6% denaturante (con urea) y no denaturante o SSCP al 10% (sin urea). En estas condiciones no fue posible observar polimorfismos entre los grupos de individuos resistentes y susceptibles, ni entre los padres de la familia K, por lo que se decidió buscar polimorfismos en nucleótidos individuales (SNP), mediante secuenciación de los padres e individuos resistentes y susceptibles de las familias evaluadas. Las secuencias obtenidas con los cebadores N37 y N38 para los padres de la familia K no permitió observar polimorfismos. La secuenciación de los fragmentos de los parentales de la familia CM 9582 y de algunos individuos resistentes y susceptibles de esta misma población, obtenidos mediante amplificación con los cebadores N37 y N38, no mostró polimorfismos entre padres.

Los resultados anteriores concuerdan con los obtenidos por López et al. en 2003 (información sin publicar). Se hace necesario aislar mayor cantidad de RGAs, con el fin de encontrar polimorfismos que permitan ubicarlos en el mapa genético, para aprovecharlos como marcadores. Además, será de gran utilidad seleccionar poblaciones en que los padres sean contrastantes en la reacción de resistencia al patógeno.

CONCLUSIONES

- Las progenies de las dos poblaciones evaluadas, K y CM 9582, segregaron en todas las categorías de resistencia a *P. tropicalis* y *P. palmivora*. El 4.8% de los individuos de la familia K mostró resistencia alta a las tres especies de *Phytophthora* evaluadas.
- La resistencia de las poblaciones de yuca K y CM 9582 a las tres especies de *Phytophthora* evaluadas, aparentemente está controlada por muchos genes.
- Se identificó un QTL asociado a resistencia a *P. tropicalis*, un QTL asociado a resistencia a *P. palmivora* y tres QTLs de menor importancia, dos de ellos asociados a resistencia a *P. melonis* y uno a resistencia a *P. palmivora*.
- No se observó correlación entre la enfermedad presentada en tallos y raíces, lo que sugiere que posiblemente existen mecanismos de resistencia diferentes, dependiendo del tejido.
- Se identificaron cinco RGAs en yuca que mostraron homología con genes y regiones asociadas a la resistencia a enfermedades. Cuatro RGAs tienen marco abierto de lectura (ORF), que codifican motivos de aminoácidos NBS-LRR conservados, presentes en genes de resistencia de otras plantas.
- En el genoma de yuca se encontraron RGAs con regiones homólogas a motivos P-loop, Kin-2, Kin-3 y GLPL del dominio NBS, como también se encontraron RGAs de las subclases TIR y no TIR, pertenecientes a la clase NBS-LRR.
- Se identificaron tres clases de RGAs: Una formada por N-38 y K-1, aislados de yuca, mostró homología con regiones conservadas de los genes L6, del lino, y RPP5 (TIR), de *Arabidopsis*; en otra se ubicó N-37, que mostró homología con el gen Mi (no TIR), que codifica para resistencia a *Meloidogyne* spp. en tomate; N-33 se separó de los anteriores, ubicándose en otra clase.
- No se encontraron polimorfismos en nucleótidos simples (SNPs), mediante secuenciación.
- No se pudo confirmar asociación de los RGAs aislados, con la resistencia a *Phytophthora* spp. en yuca, mediante las técnicas utilizadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, E., y Barragán, M.I. 1998. Evaluación de la tolerancia a la pudrición radical causada por *Phytophthora* spp. en variedades de yuca *Manihot esculenta* Crantz, en condiciones de invernadero. *Ascolfi Inf.* 24 (3): 11-12.
- _____. Llano, G.A. 2002. Enfermedades del cultivo de la yuca y métodos de control. En Ospina, B. y Ceballos, H. (Ed.): *Cultivo de la yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento utilización y comercialización.* CIAT, Cali. P. 131-147.
- _____. Loke, J., Rivera, S. y Llano, G.A. 2003. Genetics of resistance to rot caused by *Phytophthora tropicalis* in two segregating populations of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Fitopatol. Col.* 26 (2): 61-66.
- Ángel, F., Arias, D.I., Tohme, J., Iglesias, C. and Roca, W.M. 1993. Toward the construction of a molecular map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): Comparison of restriction enzymes and probe sources in detecting RFLPs. *J Biotechnol* 31: 103-113.
- Best, R. 1996. Cassava. The latest facts about an ancient crop. *Cassava Program Bulletin*, July, 1996. 10 pp.
- Bodenes, C., Laigret, F. and Kremer, A. 1996. Inheritance and molecular variations of PCR-SSCP fragments in pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *Theor Appl Genet* 93: 348-354.
- CIAT. 1995. *Protocolos para marcadores moleculares.* Cali. 82 pp.
- _____. 2000. Annual Report. Project IP-3. Improved cassava for the developing world. Cali, p 123-154.
- Chen, X.M., Line, R.F. and Leung, H. 1998. Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. *Theor Appl Genet* 97: 345-355.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.R. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol. Rep* 1: 19.
- FAO. 2002. Faostat agriculture data. <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture> Consultado en febrero 17 de 2003.
- Fregene, M., Ángel, F., Gómez, R., Rodríguez, F., Chavarriaga, P., Roca, W., Tohme, J. and Bonierbale, M. 1997. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet* 95: 431-441.
- Jorge, V., Fregene, M. Vélez, C.M., Duque, M.C., Tohme, J. and Verdier, V. 2001. QTL analysis of field resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in cassava. *Theor Appl Genet* 102: 564-571.
- López, C.E., Acosta, I.F., Jara, C., Pedraza, F., Gaitán, E., Gallego, G., Beebe, S. and Tohme, J. 2003. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. *Phytopathol* 93 (1): 88-95.
- Lozano, J.C. 1991. Control Integrado de Enfermedades en Yuca. *Fitopatol Venez.* 4 (2): 30-36.
- _____. and Booth, R.H. 1974. Diseases of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Pans* 20, 30.
- Llano, G.A. y Álvarez, E. 1999. Avances en la investigación para resistencia a *Phytophthora* spp. en yuca. Seminario presentado en la Universidad Nacional Sede Palmira. Palmira, mayo 27 de 1999.
- Peñuela, S., Danesh, D. and Young, N.D. 2002. Targeted isolation, sequence analysis, and physical mapping of non TIR NBS-LRR genes in soybean. *Theor Appl Genet* 104: 261 - 272.
- PRIMER 3. 2002. Programa para diseño de cebadores. http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi. Septiembre de 2002.
- Witsenboer, H.H.A., Griend, E.G. Van de, Tiersma, J.B., Nijkamp, H.J. and Hille, J. 1989. Tomato resistance to *Alternaria* stem canker: Localization in host genotypes and functional expression compared to non-host resistance. *Theor Appl Genet* 78: 457-462.
- Zárate, L.A. 2002. Mapeo genético de una población F1 de yuca cultivada. Trabajo de grado de Biología. Universidad del Tolima. Ibagué. 95 pp.

G.A. Llano: Ing. Agr. M. Sc. CIAT, E-mail: g.llano@cgiar.org.

E. Álvarez: Ph. D. Fitopatóloga, CIAT, E-mail: e.alvarez@cgiar.org Cali

J.E. Muñoz: Profesor Asociado Univ. Nacional de Colombia, AA 237, Palmira.

M. Fregene: Ph. D. Genetista, CIAT, E-mail: mfregene@cgiar.org.