



WAGENINGEN UNIVERSITY
WAGENINGEN UR



CURSO SOBRE: USO DE MARCADORES MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO GENETICO DE LAS PLANTAS

Organizado por

Departamento de Mejoramiento Genético
Universidad de Wageningen Holanda

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias
INIAP, Ecuador

Fundación PREDUZA-WU

Abril 16 a Mayo 11 2007
Quito, Ecuador

PREDUZA, es una fundación sin fines de lucro, establecida por la Universidad de Wageningen, Holanda, dedicada a mejorar las condiciones de vida y bienestar de las comunidades agrícolas andinas y a la capacitación de técnicos de las instituciones nacionales vinculados al sector agrícola. PREDUZA es ejecutado por el Laboratorio de Mejoramiento de Plantas de la Universidad de Wageningen

Dirección de la Fundación PREDUZA
Avs. Eloy Alfaro y Amazonas.
Edificio del Ministerio de Agricultura y Ganadería, cuarto piso, oficina 401
Quito, Ecuador
Tel-fax: 593-2-2500316
e-mail: angela@preduza.org web: www.preduza.org

**CURSO SOBRE:
USO DE MARCADORES MOLECULARES
EN EL MEJORAMIENTO GENETICO
DE LAS PLANTAS**

Organizado por

Departamento de Mejoramiento Genético
Universidad de Wageningen, Holanda

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias
INIAP, Ecuador

Ejecutado por
Fundación PREDUZA-WU

Abril 16 a Mayo 11, 2007
Quito, Ecuador

ESTUDIO DE INTROGRESIONES EN LA YUCA (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ.)

Eduardo Morillo^{1,2}, Jean Louis Pham² y Gérard Second²

¹ Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología (DENAREF). INIAP. Quito, Ecuador

² UMR Diversidad y Genoma de Plantas Cultivadas (DGPC), IRD (Instituto de Investigaciones para el Desarrollo). Montpellier, Francia. <http://www.dgpc.org/>

Resumen

Varios tipos de marcadores moleculares sugieren que cultivares tradicionales de yuca serían introgresados del complejo de especies *M. carthaginensis* s.l. Este trabajo incluye dos fases, una primera basada en la utilización de marcadores microsatélites (SSR) con el fin de precisar la estructura genética de este complejo de especies y sus relaciones genéticas respecto a la yuca, y una segunda que busca reconstruir la filogenia de tres locus SSR donde ciertos alelos observados son candidatos de introgresión. El análisis de diversidad con SSR permitió detectar nuevas evidencias de introgresión, esto es la existencia de alelos ausentes en la forma ancestral directa de la yuca (*M. e. ssp. flabellifolia*) y compartidas con las especies del complejo *M. carthaginensis* s.l. y sus formas intermediarias (árboles yuca). Para confirmar la introgresión, reconstruimos filogenias a partir del polimorfismo de secuencia de las regiones flanqueantes de tres locus SSR donde estos alelos son observados y las comparamos con una variedad artificialmente introgresada. Nuestro análisis se restringió a tres locus pertenecientes a un mismo grupo de ligación (del cromosoma D) con el fin de centrarnos en un mismo fragmento cromosómico. La metodología utilizada consistió en aplicar la técnica de "Marcha Genómica" para extender el tamaño original del clon SSR y aumentar así la cantidad de información para la filogenia. Los resultados permitieron determinar el origen de los alelos de cada locus analizado confirmando en ciertos casos la introgresión. Así mismo demostramos que la introgresión es recíproca ya que alelos de la yuca son encontrados en especies silvestres lejanas. Nuestro trabajo tiene implicaciones respecto al impacto potencial de la presencia de plantas transgénicas en agrosistemas tradicionales y aporta al conocimiento de la evolución de la diversidad de plantas cultivadas vegetativamente.

Palabras claves: *M. esculenta*, introgresión, flujo de genes, domesticación, SSR, Marcha cromosómica, filogenia

Temática general

Desde su domesticación, la diversidad de plantas cultivadas ha sido en gran medida influenciada por las prácticas agronómicas. Según las situaciones genéticas, agroecológicas, económicas, estas han tenido un impacto variable en la dinámica de plantas cultivadas. Las prácticas agronómicas de gestión de la diversidad genética y sus consecuencias, son estudiadas por el equipo DYNADIV del IRD en especies representando sistemas de reproducción y agroecosistemas diferentes. Estudios a este propósito, a parte de contribuir al progreso del conocimiento científico, se integran en las perspectivas de desarrollo de acciones de conservación *in situ* y *on farm*, básicamente.

El flujo de genes es un factor importante en la dinámica de la diversidad genética, pudiendo así mismo producir fenotipos indeseables como formas intermediarias que “contaminan” las variedades cultivadas. Estos procesos, documentados en algunas plantas originarias de diversos centros de domesticación, necesitan ser caracterizados en un contexto de difusión posible de transgénicos en los agrosistemas tradicionales.

A una escala evolutiva, la hibridación y la introgresión son fenómenos mayores en la diversificación de los complejos de especies y géneros de plantas en régimen de domesticación. Inspirados en la genética de la domesticación, el presente estudio de caso aborda el estudio de una planta propagada asexualmente y de gran importancia en el régimen alimenticio de gran parte del tercer mundo, la yuca.

El caso de cultivos propagados vegetativamente

En el caso de plantas cultivadas por reproducción vegetativa, nos esperamos a una estructuración fuerte entre variedades. La idea subyacente es que la domesticación arrancó sobre una base genética amplia creada por la reproducción sexual. Cada variedad habría sido entonces domesticada a partir de uno o pocos individuos diferentes entre variedades. Las variedades estarían entonces compuestas de un solo genotipo, genéticamente distinguible de otras variedades ya que correspondería a eventos diferentes productos de la recombinación sexual. En ausencia de regeneración de la diversidad exceptuando los efectos de la mutación, esta diversidad creada se mantendría por reproducción vegetativa degenerándose progresivamente. Por mucho tiempo, se ha pensado que la sola fuente de diversidad en las plantas a propagación asexual sería la mutación (Zahori 1984). Como la mutación es solamente capaz de crear genotipos extremadamente cercanos al genotipo original, la diversidad genética esperada en las plantas propagadas por vía asexual es baja. Sin embargo varios estudios de diversidad en plantas cultivadas por vía asexual muestran una alta diversidad genética (Ej. papa: Brush et al. 1995, camote: Zhang et al. 1998, yuca: Elías et al. 2000, taro: Lakhanpaul et al. 2003, ñame: Mignouna et al. 2003), incompatible con la erosión esperada de la diversidad y que solo un escenario bajo los efectos de la mutación no lo puede explicar. La hipótesis de la creación de diversidad por el solo efecto de la mutación es entonces objetada, no solo porque varias especies han conservado su aptitud a la reproducción sexual (sexualidad residual), sino porque

estudios de carácter etnobotánico sugieren que la reproducción sexual en estas especies es utilizada por el hombre contribuyendo así a la diversificación de formas cultivadas.

Los casos de la papa y de la yuca son los más documentados. Estas dos plantas alógamas son cultivadas en agrosistemas tradicionales y han conservado su aptitud a la reproducción sexual. Según Jonhs et Keen (1986), la semilla botánica de papa es apta a la germinación y los tubérculos producidos podrían ser integrados por el agricultor. Así, la gran diversidad morfológica de tubérculos y la clasificación bastante imprecisa de variedades permitiría la incorporación de nuevos genotipos dentro de cada variedad. Algunos casos han sido documentados por Jonhs & Keen (1986) y por Quirós y al. (1992) de agricultores que siembran voluntariamente semilla de variedades cultivadas. Esta intervención de la reproducción sexual permitiría, según los agricultores, de sanear las plantas. Estos autores concluyen que el hombre introduciría nuevos genotipos en el compartimiento cultivado aportando así a su diversificación.

En el caso de la yuca, Emperaire et al. (1998) y Elias (2000) muestran que la práctica de cultivar sobre terrenos quemados permite a los bancos de semillas de germinar en los nuevos campos de yuca. Algunas plántulas de yuca, provenientes de semilla botánica, no son eliminadas por los agricultores: las plantas que presentan una morfología interesante son cosechadas e integradas dentro de una variedad parecida morfológicamente. Estos dos ejemplos sugieren que la utilización de la reproducción sexual por parte de los agricultores es un factor importante a tomar en cuenta para comprender la evolución de la diversidad de plantas cultivadas propagadas vegetativamente. Aportando nuevas combinaciones genéticas o alelos nuevos, la reproducción sexual contribuiría a la diversificación del pool cultivado. Además, la integración de plántulas provenientes de semilla botánica entre variedades tradicionales, modifica la visión que se tenía anteriormente: en lugar de estar constituidas de genotipos derivados de la mutación de un genotipo original, las variedades son esperadas genéticamente polimórficas y constituidas de genotipos diferentes creados por la recombinación genética.

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

La yuca es un arbusto perenne originario de América y cultivado por sus raíces tuberosas. Constituye la base de la alimentación para más de 600 millones de habitantes en regiones tropicales y entre las producciones vegetales alimenticias, ubicándose en quinto lugar a nivel mundial después del maíz, el arroz, el trigo y la papa (FAO 2000).

Taxonómicamente la yuca es una Euforbiaceae y pertenece al género *Manihot*. Este género botánico comprende 98 especies, todas monoicas y alógamas, cuya delimitación es controversial. Su distribución está restringida al continente americano, del sur de los Estados Unidos al norte de Argentina. Entre ciertas especies, se conocen híbridos interespecíficos espontáneos ya que las barreras reproductivas parecen poco definidas a nivel del género botánico. La forma

cultivada es encontrada frecuentemente en simpatria con especies silvestres (Rogers y Appan 1973), pero, todavía recientemente, la forma ancestral y el rol posible de hibridaciones interespecificas en el proceso de domesticación no habían sido caracterizados. Aunque ninguna barrera genética limitando la hibridación entre especies del género ha sido demostrada, existen sin embargo barreras geográficas en particular entre los centros de diversidad de especies silvestres en Brasil y México.

Hasta los últimos años, el origen de la yuca cultivada era desconocido. Varias especies silvestres habían sido propuestas como formas ancestrales posibles: *M. aesculifolia* distribuida en América central (Rogers y Appan, 1973), *M. carthaginensis*, originaria de Colombia y de Venezuela (Bertram 1993) y *M. esculenta* ssp. *flabellifolia* sin *M. esculenta* ssp. *peruviana* de la región amazónica (Allem 1994)

La utilización de marcadores moleculares diversos (Colombo et al. 1998, Roa et al. 1997, Roa et al. 2000 Second et al. 1997) incluyendo las secuencias de un gen nuclear (Olsen & Schaal, 1999) han aportado elementos para esclarecer el origen genético de la yuca cultivada. Estos estudios muestran que la diversidad molecular de la yuca cultivada está poco estructurada y que la forma silvestre *M. esculenta* ssp. *flabellifolia* syn. *peruviana* es la forma silvestre mas cercana a la yuca y propuesta como la forma ancestral del cultivo. Esta hipótesis contradice a Rogers & Appan (1973) quienes postulaban que *M. esculenta* sería derivada de hibridaciones introgresivas entre varias especies sin una forma ancestral mayor. Otros datos moleculares a nivel del ADN cloroplástico y genes ribosómicos nucleares (Fregene et al. 1994) confirman la hipótesis de Allem (1994) sin descartar sin embargo la posibilidad de hibridaciones con otras especies silvestres. Así, Colombo (1997), Second et al. (1997) y Second & Iglesias (2001) empleando marcadores arbitrarios en el análisis de un vasto numero de especies del genero *Manihot* (especies principalmente sudamericanas), obtienen indicios de contribución posible de otras especies silvestres, particularmente la especie *M. glaziovii*. Esta especie originaria del este de Brasil, es conocida como "manicoba" y forma híbridos naturales con la yuca a pesar de su alta divergencia genética. Estos híbridos son encontrados con frecuencia en el noreste de Brasil donde son conocidos como "yuca de siete años" o "árboles yuca", siendo algunos cultivados por sus raíces. *M. glaziovii* es muy cercana genéticamente a la especie *M. carthaginensis* (Second et al. 1997), la cual es conocida también por formar híbridos espontáneos con la yuca (Rogers & Appan 1973). De acuerdo al análisis morfológico, *M. carthaginensis*, *M. glaziovii* y sus híbridos con la yuca (árboles yuca) representan el complejo de especies *M. carthaginensis* s.l (Second 2000). *M. glaziovii* ha sido también introducida en África a finales del siglo XIX debido a su interés como fuente de látex. Esta especie es también fuente de resistencia de las dos enfermedades principales de la yuca, la bacteriosis vascular (CBB) y el mosaico viral africano (CMV), por esta cualidad *M. glaziovii* ha sido bastante utilizada en programas de mejora genética de la yuca cultivada para introgresar la resistencia a las dos mencionadas enfermedades. En África Central, la existencia de híbridos espontáneos fértiles ha sido reportada mediante el uso de isoenzimas (Lefevre 1989). Es decir que la existencia de híbridos espontáneos entre la yuca y *M. glaziovii* ocurre tanto en la región nativa de estas especies (noreste de Brasil)

como en el continente africano donde ambas han sido introducidas. Esta situación y ciertos resultados moleculares sugieren que *M. glaziovii* haya podido contribuir a la diversidad genética de ciertas variedades de yuca por introgresión genética, es decir vía retrocruzamientos sucesivos de los híbridos (árboles yuca) con la yuca cultivada.

Con estos antecedentes, el objetivo de este trabajo es el de verificar si existe introgresión en ciertas variedades tradicionales de yuca a partir de *M. glaziovii*, lo cual pondría en evidencia un factor que explicaría parte de la gran diversidad en esta planta con varias implicaciones no solo en materia de gestión de recursos genéticos de la yuca sino con otras que serán explicadas posteriormente. Metodológicamente este estudio está estructurado en dos grandes partes,

1) La primera comprende un análisis genético con SSR (en gran parte cartografiados) en un set de 58 accesiones incluyendo la yuca cultivada y formas silvestres del género *Manihot*. El empleo de estos marcadores permitió detectar en la yuca alelos candidatos de introgresión para ciertos locus. Estos polimorfismos se determinaron en base a su ausencia en la forma ancestral *M. flabellifolia* y compartidos a su vez entre *M. glaziovii*, árboles yuca y algunas variedades tradicionales. Resulta particularmente interesante talla de estos alelos SSR que difieren significativamente entre los de la forma cultivada y silvestre de *M. esculenta*.

2) La segunda parte consiste en determinar el origen del polimorfismo detectado en la primera parte. Para esto, se realizó una filogenia de un grupo de alelos de los locus SSR en los cuales se presume introgresión. La filogenia se reconstruyó en base al polimorfismo de secuencia de las regiones flanqueantes a las secuencias repetidas de los microsatélites (motifs); para lo cual con el fin de contar con mayor cantidad de información se aplicó previamente una extensión mediante la técnica de *Márcha* sobre el cromosoma. Los resultados permitieron determinar el origen de los alelos analizados comprobando en algunos casos la hipótesis de introgresión previamente postulada.

Con fines didácticos, presentamos una síntesis de la parte metodológica de la primera parte y los principales resultados obtenidos, seguida de la segunda parte con el mismo esquema, y finalmente una breve discusión general.

I parte: Detección de introgresiones del complejo de especies *Manihot carthaginensis* s.l., en variedades tradicionales americanas y africanas de yuca

El objetivo de este estudio es el de precisar la estructura genética de uno de los complejos de especies más distantes respecto a la yuca cultivada y sus híbridos naturales (*M. carthaginensis* s.l.), y de detectar marcadores de introgresión de estas especies distantes en variedades tradicionales de yuca (si los hubiere), utilizando SSR y una variedad artificialmente introgresada como control. Optamos por utilizar SSR cartografiados (Mba et al. 2001) y localizados en regiones cromosómicas que portan QTLs de resistencia a las dos enfermedades principales de la yuca, ya que la especie *M. glaziovii* (que integra este complejo de especies) es portadora de la resistencia y se piensa que un QTL mayor detectado en el mapa genético corresponde a un vestigio de introgresión de *M. glaziovii* en uno de los padres de la carta genética (Jorge et al. 2000). Por otro lado, a pesar de la homoplasia de los microsatélites (sobre todo cuando se compara el polimorfismo a nivel interespecífico), la talla así como las frecuencias alélicas observadas que son a menudo muy diferentes entre *M. esculenta* y *M. carthaginensis* s.l. (Roa et al. 2000) permiten de detectar posibles alelos introgresados.

Materiales y métodos

Material vegetal: de 99 accesiones analizadas con 3 combinaciones de AFLPs, se seleccionaron 58 accesiones en base al polimorfismo observado. Así se analizaron 26 cultivares, 6 accesiones de la forma ancestral *M. e. spp. flabellifolia*, 7 accesiones de *M. glaziovii*, 6 de *M. carthaginensis*, 8 árboles yuca (formas híbridas de *M. glaziovii* x yuca cultivada), y 5 de otras especies emparentadas (3 *M. brachyloba* y 2 *M. quinquepartita*).

Extracción de ADN: se utilizaron hojas secadas con silicagel empleándose el protocolo detallado por Colombo et al. (1998). La concentración y calidad del ADN fue determinada por fluorescencia en gel y espectrofotómetro.

Genotipage de SSR: el ADN de cada accesión fue amplificado con 27 microsatélites, diez reportados por Chavarriaga et al (1998) y 17 mapeados por Mba et al (2001); estos últimos seleccionados por su localización en los QTL de resistencia a la CBB (grupos de ligación D, F, G y L, Jorge et al, 2000) (Tabla 1). Los productos de amplificación fueron revelados por marcaje radioactivo con [γ ³³P]-ATP (AH9968 Amersham). La concentración final de la reacción de PCR fue de 25 ng de ADN total, 0.4 μ M de cada primer marcado con P₃₃, 200 μ M dNTPs, 2 mM MgCl₂ y 0.04 U/ μ l de Taq DNA Polimerasa (Promega). El programa de amplificación corresponde a 2 min a 94°C, 1 min a 94°C, 1 min a 55°C o 45°C en función del primer (Tabla 1) y 2 min a 72 °C durante 30 ciclos y 5 min a 72°C. Después de la denaturación de los productos de amplificación, estos son separados en geles de poliacrilamida denaturantes al 6%. Los geles son secados en papel Wattman de tamaño 33x40 cm y expuestos durante 24h a un film Kodak Bio Max X-Ray. La talla de los alelos fue estimada en función de su migración con un

marcador de referencia (30-330 pb Promega). El registro de bandas (alelos) se realizo de manera visual sobre la autoradiografía del gel.

Análisis estadísticos: Las matrices de datos fueron utilizadas para calcular una matriz de similitud empleando el coeficiente de Jaccard y SMC. Con esta matriz se obtuvo un agrupamiento con el método UPGMA y un Análisis de Coordenadas Principales (PCO). Estos análisis se realizaron con el programa NTSYS (Exeter ver. 2.0, Rohlf, 2002).

El programa GENETIX ver. 4.02 (Belkhir et al. 2001) fue utilizado para realizar una AFC (Análisis Factorial de Correspondencia) a fin de poner en correspondencia los alelos y los individuos en un mismo plan de coordenadas y así identificar los alelos responsables de una determinada estructura. Se calculo así mismo las frecuencias alélicas por locus, especie y los valores Fis con los estimadores de Robertson & Hill, así como parámetros de polimorfismo como la heterocigosis esperada al equilibrio de Hardy-Weinberg, la heterocigosis observada, la proporción de locus polimórficos (calculadas a 0.95 y 0.99) y el numero promedio de alelos por locus.

Resultados

Polimorfismo de los SSR: se registraron un total de 269 alelos en las 58 accesiones genotipadas. El número mayor de alelos se observó en la yuca cultivada (166), luego en los árboles yuca (156), *M. glaziovii* (154), *M. flabellifolia* (137), *M. carthaginensis* (82), *M. quinquepartita* (57) y *M. brachyloba* (53). Veinte y dos locus presentan entre 10 y 18 alelos y solo 4 locus presentan menos de 10 alelos. Del total de alelos observados, 78 son compartidos entre la yuca y las especies silvestres, mientras que 155 (43%) son únicos a una especie determinada (privados). *M. glaziovii* con 27 alelos es la especie que presenta el mayor numero de alelos privados (8.5%) seguido de la yuca con 23. Diez alelos únicos fue el número máximo detectado para un solo locus (SSRY-147).

El nivel de polimorfismo para cada una de las especies varía entre 0.59 para *M. brachyloba* y 0.96 para la yuca con una media de polimorfismo observado de 0.87. Los locus SSRY-31 y SSRY-145 con 23 y 20 alelos respectivamente, fueron los más polimórficos, al contrario del locus SSRY-146 con solo 6 alelos. El locus SSRY-68 es el mas polimórfico para la yuca cultivada ya que 10 alelos fueron revelados. Respecto al numero de alelos por locus, la yuca es la mas polimorfita con una media de 6.1 alelos por locus seguido de *M. glaziovii* y los árboles yuca con 5.7.

Talla, frecuencia y distribución de alelos SSR

La mayor diferencia de talla entre alelos de un mismo locus se observó para el locus SSRY-100 con 62pb al contrario del locus SSRY-146 con 11pb. El resto de locus presentan un rango entre 16 y 58pb. La mayor parte de alelos tienen una frecuencia inferior a 0.3 (incluso a nivel intra-específico), excepto para el alelo

SSRY38-114 cuya frecuencia es elevada en varias especies. Tres casos de alelos nulos (ausencia de amplificación) fueron observados, el locus SSRY-9 en *M. glaziovii* y SSRY-88 en *M. brachyloba* y *M. carthagenensis*.

Heterocigosis

Solo la yuca y los árboles yuca presentaron valores similares entre los valores de heterocigosis esperada y observada. En cambio en especies como *M. glaziovii*, *M. carthagenensis* y *M. e.ssp. flabellifolia*, se obtuvo un déficit en genotipos heterocigotos lo que sugiere de una estructuración de la diversidad genética en estas especies. En los árboles yuca, los genotipos son en general heterocigotos (H_t media = 0.81) y revelan básicamente una estructura *M. esculenta* x *M. glaziovii*, y en ciertos locus *M. esculenta* x *M. carthagenensis*.

Polimorfismo comparado de *M. esculenta* y el complejo *M. carthagenensis*

M. esculenta se caracteriza por una alta diversidad alélica, con el mayor número de alelos por locus y una heterocigosis media observada más alta que *M. glaziovii*. Del total de alelos observados, existen 14 alelos comunes entre *M. esculenta* y *M. glaziovii* y 6 con *M. carthagenensis* y que a su vez están ausentes en *M. flabellifolia*. Entre estos alelos, cinco son exclusivos de *M. glaziovii* y 2 de *M. carthagenensis* (ya que los 9 restantes están también presentes en alguna otra especie silvestre). Analizando las frecuencias de los alelos compartidos entre *M. esculenta* y *M. glaziovii*, se pueden distinguir 3 situaciones: que el alelo común sea frecuente en las dos especies (> 0.1), que el alelo sea frecuente en *M. glaziovii* y raro en *M. esculenta*, y que el alelo sea raro en las dos especies. En la mayoría de casos, los alelos compartidos entre *M. esculenta* y otras especies silvestres (excepto *M. flabellifolia*), tienen frecuencias raras y podrían tratarse de alelos introgresados en la yuca. Este es el caso del 15% del total de alelos observados; así la mayor cantidad de alelos compartidos entre *M. esculenta* y formas silvestres (exceptuando *M. flabellifolia*) es con los árboles yuca (30), seguida de *M. glaziovii* (15), *M. carthagenensis* (6) y *M. quinquepartita* y *M. brachyloba* (4). Respecto a alelos candidatos exclusivos de introgresión desde *M. glaziovii* en *M. esculenta*, algunos alelos fueron determinados como candidatos, estos están presentes en variedades sugeridas introgresadas por otros tipos de marcadores.

Estructura genética: Análisis multivariado

La figura 1 muestra el PCO obtenido con el polimorfismo observado en los 27 SSR analizados. El eje 1 que extrae 10% de la varianza total observada, separa al complejo *M. carthagenensis* (*M. glaziovii* y *M. carthagenensis*) de *M. esculenta*. *M. flabellifolia* se muestra cercana a *M. esculenta* mientras que los árboles yuca aparecen en posición intermedia. Las especies *M. brachyloba* y *M. quinquepartita* aparecen menos divergentes con respecto a *M. esculenta*. Entre el grupo de cultivares se observa un grupo de variedades con mayor afinidad a la variedad artificialmente introgresado de *M. glaziovii* diferenciándose del resto de cultivares.

Por otro lado, cuando se analizan por separado los locus de un mismo grupo de ligación, se pueden visualizar las relaciones respecto a un mismo fragmento cromosómico. El gráfico de la figura 2 muestra la dispersión según los 7 locus del grupo de ligación D. Como en la figura 1, el eje 1 separa a *M. esculenta* de *M. glaziovii*, distinguiéndose un grupo de cultivares más cercano a *M. glaziovii* el cual comparte un mayor número de alelos con esta especie. En este grupo, encontramos la variedad artificialmente introgresada y otros cultivares tradicionales sugeridos introgresados. En cambio cuando se analizan locus de otros grupos de ligación, ninguna estructura aparente es observada.

Discusión

Polimorfismo comparado de *M. esculenta* y el complejo *M. carthagenensis* s.l.

La utilización de SSR corroboró lo obtenido con AFLPs (Morillo 2001) confirmando primero la divergencia genética del complejo *M. carthagenensis* respecto a *M. esculenta*, y ratificando la proximidad genética de *M. flabellifolia*, en acuerdo con los resultados de Roa et al (1997, 2000) y Second (2000). Además nuestro estudio mostró la transferibilidad a de SSR nivel interespecifica identificados en *M. esculenta* (Mba et al, 2001) a especies tan divergentes del género como las que conforman el complejo *M. carthagenensis*. Los SSR confirman la alta diversidad alélica de *M. esculenta* y su alto nivel de heterocigosis. Los valores de heterocigosis observados que están en concordancia con los valores esperados (bajo la hipótesis de equilibrio de HW), sugieren una recombinación genética que solo puede ser posible por el uso de la reproducción sexual. A este respecto, autores como Empéaire et al. 1998 y Elias 2000, reportan en la yuca el uso de plántulas provenientes de semilla sexual en campos tradicionales indígenas, mecanismo que permitiría la incorporación de una nueva diversidad entre las variedades. Por otro lado, el gran número de alelos específicos observados para las especies *M. glaziovii* y *M. carthagenensis*, sugiere de una divergencia de *M. esculenta* no reciente en la escala evolutiva, aumentando la probabilidad de que la presencia de alelos compartidos entre estas especies tenga su origen en la hibridación e introgresión genética. Un elemento a favor de esta hipótesis es la existencia de los árboles yuca, híbridos presumidos confirmados por los SSR corroborando la existencia de flujo genético entre estas especies. Los SSR revelaron una alta diversidad de estos árboles yuca; este resultado puede ser atribuido a: a) la existencia de varios niveles posibles de inter cruzamiento y/o retrocruzamiento, y, b) la diversidad de genotipos *M. esculenta* y *M. glaziovii* implicados en el flujo genético entre estas especies.

Además los SSR revelaron alelos privados de los árboles yuca que no fueron observados ni en *M. esculenta* ni en *M. glaziovii*. Probablemente, estos alelos no estén representados en el muestreo analizado, o podrían corresponder a alelos provenientes de otras especies o tratarse de alelos aparecidos después de la hibridación.

Finalmente, los SSR revelaron un grupo de accesiones de *M. glaziovii* más afín a *M. esculenta* (confirmado también por los AFLPs, Morillo 2001) sugiriendo que una introgresión de *M. esculenta* pudo también diversificar a esta especie silvestre lejana.

Variabilidad intra-específica de *M. esculenta*

El nivel de polimorfismo observado en *M. esculenta* refleja una buena representatividad genética del material utilizado, bien que se hayan analizado solo variedades dulces ya que en estas se observaron los primeros indicios de introgresión (Second 2000). El agrupamiento de variedades sudamericanas con la variedad africana artificialmente introgresada de *M. glaziovii* sugiere que los eventos de introgresión a partir de cruzamientos diferentes (espontáneos o dirigidos), podrían conducir a patrones de introgresión no aleatorios en el genoma. Esto es observado al analizar individualmente el polimorfismo de locus pertenecientes a un mismo fragmento cromosómico, como el del grupo de ligación D.

Los SSR aportan con nuevos índices de introgresión

El empleo de SSR aporta con nuevos elementos que fortalecen la hipótesis de introgresión en *M. esculenta*:

- Se observa la presencia de alelos comunes entre *M. esculenta* y el complejo *M. carthagenensis* s.l que incluye a dos de las especies más divergentes del género *Manihot*,
- Demostramos el status híbrido de los árboles yuca que permite confirmar el flujo genético entre estas especies,
- Se detecta un grupo de variedades tradicionales afines a la variedad africana artificialmente introgresada de *M. glaziovii*

Con estos resultados, la hipótesis de introgresión en *M. esculenta* está parcialmente probada ya que, dado el carácter homoplásico de los SSR, se necesita una confirmación a nivel filogenético para que la hipótesis sea totalmente validada. Este punto es la base de la segunda parte del estudio.

II parte: Validación de la hipótesis de introgresión en *M. esculenta* mediante reconstrucción filogenética de locus SSR presumidos introgresados

El objetivo es validar la hipótesis de introgresión en *M. esculenta* reconstruyendo una filogenia de los alelos en locus SSR donde existe sospecha de introgresión a partir de especies distantes como *M. glaziovii* (parte 1). Según Anderson (1961), la hibridación introgresiva ha jugado un rol importante en el origen de plantas cultivadas. Particularmente en áreas perturbadas por el hombre, la introgresión sería un mecanismo de generación de genotipos recombinantes de interés y que representan una diversidad nueva para ser sometida a la presión de selección. Anderson muestra la conexión entre introgresión y perturbación de habitats naturales, afirmando que la variabilidad existente en las formas cultivadas recuerda a la variación observada en las poblaciones naturales introgresadas. Según Anderson, en los centros de origen de plantas cultivadas, la posibilidad de introgresión entre formas domesticadas o en curso de domesticación con formas silvestres locales es enorme y no debe ser descartada. Se pretende entonces confirmar si el esquema propuesto por Anderson se aplica a la yuca.

Como ya mencionado, la yuca pertenece al género *Manihot* integrado por especies de difícil delimitación taxonómica. Frecuentemente la especie cultivada esta en contacto con especies silvestres (Roger & Appan 1973). Esta asociación se da cuando el hombre siembra yuca en áreas de distribución natural de especies silvestres, o como sucede a menudo, al refugiarse estas especies silvestres a lo largo de rutas y caminos o en bordes de campos cultivados. Además las barreras interespecíficas en el género *Manihot* son poco pronunciadas reportándose cruzamientos bidireccionales entre varias especies del género (Ex. Nassar 2003)

Con estos antecedentes, y varias evidencias moleculares que sugieren la introgresión de *M. glaziovii* en cultivares de *M. esculenta* (entre ellas nuestros resultados con SSR), este estudio busca a confirmar si la existencia de alelos compartidos entre especies tan divergentes corresponde a vestigios de introgresión genética.

Teóricamente, la existencia de alelos compartidos entre especies genéticamente tan divergentes puede ser explicada por dos hipótesis:

- i) La existencia de eventos de mutación que originaron alelos SSR homólogos en talla pero homoplásticos (diferente origen filogenético)
- ii) Se tratan de alelos específicos de la especie silvestre los cuales están introgresados en variedades cultivadas como consecuencia de la hibridación interspecífica

La metodología que utilizamos en este estudio para confrontar estas dos hipótesis es la siguiente:

Se trata de realizar secuenciación de las regiones flanqueantes de los locus SSR para los que se sospecha introgresión y compararlas entre las diferentes especies del género que se dispone. Según el grado de divergencia del locus en cuestión, el posicionamiento filogenético de los diferentes alelos nos va a determinar su

origen evolutivo permitiendo distinguir entre polimorfismo ancestral e introgresión. Un primer ensayo de comparación se efectuó amplificando la longitud máxima del clon aislado en la construcción de la genoteca SSR (fragmentos de alrededor 400 a 500 pb). Sin embargo el bajo polimorfismo observado, en relación con la naturaleza conservada de estas regiones, constituye una limitación para la obtención de suficiente información para el análisis cladístico. Aplicando la técnica de "Marcha genómica" (*Genome Walking*), que permite conocer la secuencia flanqueante de un fragmento de ADN, extendimos la talla conocida de los clones originales SSR.

Material vegetal: la forma cultivada estuvo representada por 18 accesiones de las cuales 6 se presumen introgresadas. Así mismo se incluyeron dos cultivares artificialmente introgresados de *M. glaziovii* (códigos 5.59 y 5.70), la forma ancestral *M. flabellifolia* estuvo representada por 5 accesiones, los árboles yuca por 5, *M. glaziovii* por 4 y *M. carthaginensis* por 2. Otras especies de las que se disponía material como *M. quinquepartita* (2) y *M. brachyloba* (2) también fueron analizadas.

Locus SSR analizados: entre algunos locus SSR donde se observan alelos presumidos de introgresión (parte I), se analizaron tres locus del grupo de ligación D (Fig. 4). Estos locus fueron seleccionados debido a su localización en el mapa genético de la yuca (cromosoma D), ya que en este grupo de ligación ha sido localizado un QTL mayor que confiere la resistencia a la CBB y CMV (este fragmento se presume introgresado de *M. glaziovii* en uno de los padres de la población en la cual se estableció este mapa, Jorge et al. 2000). Los locus analizados fueron los siguientes:

Locus SSRY-3: de 11 alelos observados en genotipage, 4 están presentes en la yuca cultivada (204, 216, 226 y 233 pb) de los cuales los alelos 204 y 216 son candidatos de introgresión. Esto debido a las razones siguientes: *i*) están presentes en baja frecuencia, el primero únicamente en las variedades artificialmente introgresadas, y el segundo en una variedad tradicional, *ii*) están ausentes en las muestras analizadas de *M. flabellifolia* (forma ancestral), *iii*) están presentes en *M. glaziovii*, y *iv*) su talla alélica es distinta a los alelos observados en *M. flabellifolia* (alelos 226 y 228pb)

Locus SSRY-9: de 8 alelos observados en genotipage, 6 están presentes en la forma cultivada: 244, 256, 257, 259, 262 y 270. Los cuatro últimos están presentes en *M. flabellifolia*. El alelo 256, cercano en talla a los alelos observados en *M. flabellifolia*, no es sospechado introgresado sino simplemente ausente en nuestro muestreo. En cambio el alelo 244 es candidato de introgresión ya que no se encuentra en *M. flabellifolia* y su talla es netamente distinta al resto, además este alelo está presente en dos variedades presumidas introgresadas (SRT1316, código 5.64) y Col22, 5.62); con otros tipo de marcadores, AFLPs (Second et al. 1999) y RAPDs (Colombo et al. 1998). Además, el alelo 244 es encontrado en un árbol yuca.

Locus SSRY-40: de los 10 alelos observados en genotipage, seis están presentes en la yuca cultivada, 218, 221, 226, 229, 231, y 236pb. Estos alelos son comunes

a *M. flabellifolia* y *M. glaziovii* y ningún alelo es particularmente sospechado de introgresión.

Extensión por Marcha Genómica

Varios métodos basados en la PCR son publicados para la extensión de secuencias genómicas alrededor a una secuencia de ADN conocida: PCR inversa, Tail PCR y *PCR walking*. Utilizamos la *PCR walking* cuyo principio técnico se explica en la figura 3. Esta técnica fue aplicada según el protocolo del kit Universal Genome Walker TM (CLONTECH, No. 638904). El método consiste en tres etapas principales: i) una restricción del ADN genómico con digestiones separadas con al menos 4 enzimas (en nuestro caso 6 enzimas fueron utilizadas), ii) la ligación de un adaptador asimétrico de los productos de digestión, y iii) una Nested-PCR que tiene por objeto mejorar la especificidad del producto PCR obtenido reamplificándose con primers internos a las primeras utilizadas. Los fragmentos obtenidos con cada enzima (variando entre 1 y 3 kb) son clonados y secuenciados con el fin de verificar la extensión con respecto a la secuencia de ADN conocida.

Validación de la extensión

Una primera verificación de la extensión es hecha por alineamiento de la secuencia del fragmento candidato con un segmento de la secuencia conocida, una centena de bases en común permiten de confirmar una homología entre las dos secuencias. En base a la secuencia extendida (una vez que se añade la secuencia del fragmento extendido), se procede al diseño de nuevos primers para la amplificación a partir del ADN genómico. Una segunda validación se logra si se obtiene la amplificación del producto esperado con los nuevos primers, finalmente la validación definitiva se logra mediante clonage y secuenciación del producto PCR. Los primers así validados permiten la amplificación de alelos SSR extendidos para su clonage y secuenciación.

Aislamiento y obtención de secuencias de alelos SSR extendidos

Los alelos SSR, obtenidos por amplificación del clon SSR extendido, fueron clonados y secuenciados en doble sentido. El clonage se realizó empleando un kit comercial (pGEM-T, Promega A-1380). El nombre de alelos por accesión depende de su naturaleza homocigota o heterocigota para el locus en cuestión, así un genotipo homocigoto para un locus proveerá un alelo y un genotipo heterocigoto proveerá dos alelos. Con fines de reducir el número de reacciones de clonage empleamos la siguiente estrategia; amplificamos para cada ADN de cada accesión los tres locus SSR extendidos obteniendo los productos de amplificación esperados, luego mezclamos los productos PCR y este pool de alelos fue utilizado como templado para la reacción de clonage. En el caso de que una accesión sea heterocigoto para los tres locus analizados, seis alelos diferentes pueden ser clonados. Para seleccionar los alelos de cada uno de los tres locus analizados, se realizó un criblage de 25 colonias transformadas utilizando primers específicos del plasmido (Sp6 y T7) y se selecciono de acuerdo a la talla de los productos de amplificación. Con fines de secuenciar el máximo número de alelos, en una

primera fase se envió a secuenciar 6 alelos por accesión (al menos 1 alelo por cada uno de los 3 locus extendidos), resultando en 120 alelos clonados secuenciados. En una segunda fase secuenciamos alelos claves en las filogenias o secuencias que necesitaban corroboración. La figura 3 muestra ejemplos de las fases aquí descritas. Cabe señalar que en el caso de transferencia de primers a especies divergentes, se puede obtener una ausencia de amplificación (alelo nulo) interpretada como un defecto en la hibridación del primer debido a la divergencia de la secuencia. En estos casos se probaron otras combinaciones de primers para lograr la amplificación de alelos extendidos en estas especies.

Análisis de secuencias: reconstrucción filogenética de locus SSR extendidos

Las secuencias brutas (cromatogramas) de los alelos extendidos se limpiaron, editaron y ensamblaron utilizando el paquete DNASTAR (Programas EDITSEQ y SEQMAN). Para cada alelo se obtiene entonces una secuencia consenso (del ensamblaje de las dos secuencias, en sentido 5' y 3' respectivamente). Los alelos redundantes, es decir la misma secuencia aislada de una misma accesión, fueron eliminados del análisis. El alineamiento de secuencias se hizo con el programa MEGALIGN. Los indels (inserciones o deleciones) fueron considerados a partir de 5 caracteres y codificados según su ausencia o presencia al final de la secuencia nucleotídica. Los motifs SSR (elementos repetitivos) fueron eliminados para el análisis cladístico, es decir que las filogenias se basan estrictamente en el polimorfismo de secuencia de las regiones flanquantes de los SSR.

Para la reconstrucción filogenético de cada locus, se utilizaron dos métodos de análisis empleando el programa PAUP (Swofford 2001)

- i) *el método de Máximo de Parcimonia (MP)*: se basa en la hipótesis según la cual las relaciones filogenéticas entre los taxa son lo mejor representadas por el árbol representado con el mínimo de mutaciones (nucleotídicas o tipo indel). Este método detecta que caracteres de la secuencia son informativos para establecer una filogenia. Las opciones "*Random step wise addition*" y "*Tree bisection reconstruction (TBR)*" fueron utilizadas para la búsqueda heurística de árboles parsimoniosos. De todos los árboles parsimoniosos, el método "*Consensus strict*" permite obtener un árbol consenso, además la robustez de las ramas del árbol es calculada con un bootstrap con 100 repeticiones.
- ii) *El criterio Likelihood (ML)*: este método calcula el árbol que tiene la más alta probabilidad de llegar a los datos de secuencia, obteniéndose el árbol filogenético más probable. Este método, más largo en tiempo de cálculo, permite una modelización de la evolución de secuencias más realista que el método MP.

Resultados

Con el fin de facilitar la presentación de resultados, presentamos para cada uno de los tres locus analizados el árbol obtenido con el método ML ya que este método provee un solo árbol que en todos los casos fue similar al árbol consenso obtenido con el método MP. El árbol ML es presentado como un filograma no enraizado en el cual el largo de las ramas son proporcionales al porcentaje de divergencia estimado por el programa. El porcentaje de bootstrap después de 100 replicaciones es indicado solo para los grupos para los que estos superan a 50. En el árbol, cada alelo se representa por su talla molecular obtenida *in silico* (es decir sobre la secuencia misma) con los primers originalmente utilizados en el genotipaje de la parte I.

Extensión de locus SSR por marcha cromosómica y alelos secuenciados

Para los tres locus SSR, la extensión obtenida supera los 1000pb con una tasa de extensión de 2 a 3.6 la talla original del clon SSR. El tamaño de los alelos (en PCR) extendidos fue de 1155pb para el locus SSRY-3, 1157pb para el locus SSRY-9 y 1078pb para el locus SSRY-40 (Tabla 2). De la secuenciación bidireccional de más de 200 alelos SSR clonados, se logró representar en el análisis filogenético 75%, 49% y 89% de total alelos registrados en gel para los tres locus respectivamente. Así para el locus SSRY-3, 20 alelos distintos están representados en nuestra filogenia, siendo los alelos 224, 238 y 240 los mayormente representados (es decir aislados de varias accesiones). En total, 40 alelos aislados a partir de 28 accesiones están representados en la filogenia de este locus. Para el locus SSRY-9, 11 alelos distintos están representados en nuestra filogenia, siendo el alelo 262 el mas representado. En total, 27 alelos aislados a partir de 22 accesiones están representados en la filogenia de este locus. Para el locus SSRY-40, 14 alelos distintos están representados siendo los alelos 229, 225 y 223 los mayormente representados. En total, 54 alelos aislados a partir de 36 accesiones están representados en la filogenia de este locus.

Polimorfismo de secuencia (SNP) de regiones flanqueantes de locus SSR

En función del número de caracteres útiles para un análisis cladístico, la tasa de polimorfismo de secuencia (SNP) obtenida en las regiones flanqueantes de los tres locus SSR analizados fue de 6% en promedio; es decir una mutación puntual cada 20pb de secuencia. Sin embargo el grado de polimorfismo depende también del locus, así el locus SSRY-3 fue el más polimórfico con 8.2% mientras que el locus SSRY-9 fue el mas conservado con 3.2% (Tabla 3).

Análisis filogenético de locus SSR

Locus SSRY-3: el método de MP retiene a 92 caracteres informativos (de los cuales 5 indels) de 1110 caracteres alineados (Tabla 3). El árbol ML muestra a todos los alelos exceptuando a dos aislados de la especie *M. brachyloba*,

agrupados en dos clados principales A y B, ambos sostenidos por valores bootstrap superiores a 90 (Fig. 5). El grupo A incluye la mayor parte de alelos observados en los cultivares, todos los de *M. flabellifolia* y el alelo 253 presente en un árbol yuca. El grupo B incluye a todos los alelos observados en el complejo *M. carthaginensis*, la especie *M. quinquepartita* y cuatro cultivares, dos tradicionales y dos artificialmente introgresados de *M. glaziovii*. Este clado confirma la presencia de alelos de *M. glaziovii* en estos cultivares tradicionales confirmando así la ocurrencia de una introgresión espontánea homóloga a la obtenida artificialmente en África. La presencia de los árboles yuca, que representan cultivares intermedios indican claramente la vía posible de esta introgresión.

Locus SSRY-9: de 1143 caracteres alineados, el método de MP determina a 37 polimorfismos útiles para la filogenia (Tabla 3). El filograma (Fig. 6) muestra que a los alelos distribuidos en tres clados principales; A, B y C, exceptuando a un alelo aislado de un cultivar triploide proveniente de *M. carthaginensis* (Morillo 2001). El clado A, localizado en la parte superior del árbol, agrupa al alelo 250 (presente en cuatro cultivares y un árbol yuca) y el alelo 266 presente en la variedad artificialmente introgresada. Aunque este clado no esté sostenido por un bootstrap significativo (debido probablemente a que este locus evidencio la más baja tasa de polimorfismo y por lo tanto de divergencia entre secuencias), este clado agrupa a los alelos más cercanos a las formas silvestres lejanas. El resto de cultivares, incluyendo los árboles yuca se distribuyen en los clados B y C, sostenidos estos por valores de 62 y 82 e incluyendo a 3 accesiones de *M. flabellifolia* y un *M. glaziovii*.

Locus SSRY-40: de 856 caracteres alineados, 57 caracteres son útiles para la filogenia (Tabla 3). El filograma basado en este polimorfismo muestra 4 grupos principales de alelos (A, B, C y D) con grupos internos sostenidos por valores superiores a 69% (Fig 7). Los alelos de los cultivares se encuentran presentes en todos los grupos y asociados a los de *M. flabellifolia* en dos de estos (B y D). El grupo A, sostenido a 94%, incluye las especies lejanas (*M. brachyloba*, *M. quinquepartita* y *M. carthaginensis*), dos árboles yuca y tres cultivares, uno introgresado artificialmente y dos tradicionales. El grupo B, sostenido en su mayor parte a 73% incluye también especies distantes (*M. glaziovii*, *M. carthaginensis*) y dos variedades tradicionales asociadas a estas mismas especies para uno o los dos loci precedentes para los que fueron analizadas.

Discusión

Posicionamiento filogenético de alelos presumidos de introgresión en la yuca

La filogenia del locus SSRY-3 muestra que excepto dos alelos aislados de la especie *M. brachyloba*, el resto de alelos está separado en dos grupos robustos estadísticamente. Un primer grupo (A) comprende a los alelos de mayor talla (238 a 257), y un segundo (B) los alelos de menor talla (214 a 238). Los alelos grandes están asociados con cultivares de yuca y la forma ancestral *M. flabellifolia*, y en un solo caso un alelo grande fue aislado a partir de un miembro del complejo *M.*

carthaginensis s.l. De su lado, los alelos cortos están asociados al complejo *M. carthaginensis* s.l aunque presente también en la especie *M. quinquepartita*. En este grupo notamos la presencia de las dos variedades artificialmente introgresadas lo que confirma que esta introgresión que confiere la resistencia a la CCB y CMV proviene de la especie *M. glaziovii* en estas dos variedades y también en cultivares tradicionales, pero por eventos de introgresión espontánea. La presencia de alelos diferentes en ambos eventos de introgresión (artificial y espontánea) indica que éstos se realizaron independientemente.

En relación al locus SSRY-9, la filogenia muestra que el alelo 250 (considerado introgresado) es divergente en relación al resto de alelos presentes en *M. esculenta* (260, 262 y 264 los cuales se encuentran agrupados con alelos de *M. flabellifolia*). Este alelo, presente en cuatro cultivares y un árbol yuca, se agrupa con el alelo 266 presente en la variedad artificialmente introgresada. Estos resultados confirman la introgresión, además estos cultivares en los que el alelo 250 está presente son presumidos introgresados por otros marcadores (Colombo et al, 1998, Second 2000).

A una misma conclusión se llega en el caso del locus SSRY-40; su filogenia revela una diversidad interesante revelando cuatro grupos de alelos incluyendo siempre a los cultivares. Particularmente interesante resulta el grupo A, el más divergente respecto al grupo D que incluye la mayor parte de alelos de los cultivares y *M. flabellifolia*. El clado A agrupa a los alelos de las especies más divergentes en relación a *M. esculenta*, es decir *M. brachyloba*, *M. quinquepartita* y *M. carthaginensis*, y además tres cultivares, la variedad artificialmente introgresada y dos cultivares tradicionales.

Confirmando la introgresión en cultivares tradicionales de *M. esculenta*

Varios estudios de diversidad molecular en la yuca proveen índices que favorecen la hipótesis del aporte genético de otras especies silvestres a su genoma además del de la forma ancestral directa (*M. flabellifolia*). Nuestro estudio de la parte I, aporta con nuevos índices a partir de especies del complejo *M. carthaginensis* s.l, uno de los más distantes en relación a *M. esculenta* (Second & Iglesias 2001). En nuestro estudio de secuencias de regiones flanqueantes SSR, varias filogenias sostenidas estadísticamente (por valores altos de bootstrap), incluyen alelos del complejo *M. carthaginensis* s.l y a algunos cultivares y excluyen a los analizados de *M. flabellifolia*. Estos resultados confirman la introgresión de estas especies distantes en cultivares tradicionales de yuca.

Entre los alelos candidatos de introgresión para los locus SSR analizados, el alelo 216 del locus SSRY-3 confirma la introgresión en las variedades artificialmente introgresadas aunque este alelo no se encuentre en las variedades tradicionales. Para el alelo 241 en cambio, la introgresión no se confirma. Sin embargo, otros alelos que no eran candidatos de introgresión (238 y 240 por ejemplo) se agrupan filogenéticamente con alelos del complejo *M. carthaginensis* s.l y son sustentados por un alto valor bootstrap (90%). Es decir que inesperadamente, la filogenia evidenció la introgresión a partir de estos alelos. Así mismo en el locus SSRY-9, el

alelo 244 era candidato de introgresión; la filogenia de este locus favorece la hipótesis de introgresión al agrupar a este alelo con el de la variedad artificialmente introgresada. De la misma manera en el locus SSRY-40 la filogenia revela alelos de especies distantes agrupados con cultivares.

En conclusión, de tres locus analizados, el locus SSRY-3 muestra claramente la introgresión y los dos locus restantes, ubicados en el mismo segmento cromosómico (grupo de ligación D) corroboran la hipótesis. Nuestro estudio muestra la existencia de introgresiones a partir del complejo *M. carthagenensis* s.l en variedades tradicionales de *M. esculenta*.

Discusion final:

La introgresión como mecanismo de diversificación de formas cultivadas

La hibridación y la introgresión interespecifica son procesos naturales observados en numerosos grupos de especies vegetales y esenciales para su especiación. La introgresión se define como la asimilación de genes de una población o especie en el pool genético de otra especie (Groot et al 2003). Para alcanzar los estadios de introgresión, los híbridos de primera generación deben estar suficientemente adaptados para retrocruzarse con uno de los parentales hasta recuperar su fertilidad. Este escenario es aplicable a la yuca donde híbridos espontaneos con especies divergentes como las del complejo *M. carthagenensis* s.l. (*M. glaziovii* y *M. carthagenensis*) han sido documentados (Second 2000). Sobre esta base, y los antecedentes antes mencionados, testamos la hipótesis de introgresión en la yuca aplicando una metodología novedosa aunque laboriosa. Esta no solo permitió demostrar la introgresión en *M. esculenta*, sino que encontramos que la introgresión es bidireccional al detectar alelos cultivados presentes en especies silvestres distantes.

Aun mas interesante resulta el hecho de demostrar la introgresión en una variedad artificialmente introgresada en África. Esta observación sugiere que eventos de introgresión a partir de cruzamientos diferentes (espontáneos y artificiales) pueden conducir a patrones genéticos estables en ciertas zonas del genoma.

La introgresión refleja una dinámica de la diversidad genética en *M. esculenta*

Aunque la yuca se cultiva por vía vegetativa, mostramos que la introgresión ha favorecido a su diversificación. La introgresión en *M. esculenta* es un proceso posibilitado por los siguientes factores:

- 1) su régimen mixto de reproducción, normalmente propagado por vía vegetativa pero que incorpora la reproducción sexual en la gestión de su diversidad a través de practicas tradicionales aplicadas por el hombre (Elias 2000),
- 2) La hipótesis de que el genero *Manihot*, aunque vasto y muy variable, representaría en realidad un solo complejo de especies a través del cual la difusión de genes no esta limitada por barreras genéticas estrictas,

3) el hecho de que la mayor parte de especies silvestres pueden, en su área de origen, encontrarse frecuentemente en contacto con yuca cultivada posibilitan el flujo de genes y la introgresión

En conclusión nuestro trabajo provee resultados pioneros respecto a la introgresión como un mecanismo posible en la diversificación de ciertas formas cultivadas y/o silvestres. Este resultado es importante para el conocimiento de la evolución de la agrobiodiversidad y puede aplicarse principalmente en el marco de la gestión del impacto de plantas transgénicas en los agrosistemas tradicionales.

Bibliografía

- Anderson E. 1961. The analysis of variation in cultivated plants with special reference to introgression. *Euphytica* 10:79-86
- Allem A.C. 1994. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* 41: 133-150
- Brush S, Kesseli R, Ortega R, Cisneros P, Zimmerer K & Quiros C (1995) Potato diversity in the Andean center of crop domestication. *Conservation Biology* 9, 1189-1198
- Bertram R.B., 1993. Application of molecular techniques to genetic resources of cassava (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae)/ interspecific evolutionary relation-ships and intraspecific characterization. Thèse PhD, University of Maryland, Etats-Unis, 465 p.
- Colombo C, Second G, Losada Valle T. et Charrier A. 1998. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). I) RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 21, 11 105-113
- Chavarriaga-Aguirre P., Maya M.M., Bonierbale M.W., Kresovich S., Fregene M.A., Tohme J., Kockert G., 1998. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) : discovery, inheritance and variability. *TAG*, 97 (3): 493-501.
- Belkhir K., Goudet J., Chikhi L. and Bonhomme F. 2000. Genetix Ver. 4.01, logiciel sous windowsTM pour la génétique des populations. Montpellier, France
- Elias M. 2000. Sélection naturelle, sélection humaine, et diversité chez une plante domestiquée propagée de façon végétative : le cas de la culture du manioc par les indiens Makushi du Guyana. Synthèse. Thèse Doctorat. Université Montpellier II. pp.22-25.
- Emperaire E., Pinton F., Second G. 1998. Gestion dynamique de la diversité variétale du manioc en Amazonie du nord-ouest. *Nature, science et société* 6 (2) :27-42
- FAO, 2000. <http://www.fao.org/ag/magazine/sp1.htm>
- Fregene M.A., J. Vargas, F. Angel, J. Tohme, R. A. Asiedu, M. O. Akorada, and W.M. Roca. 1994. Chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA variability in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its wild relatives. *TAG* 89 : 719-727
- Johns T & Keen SL (1986) Ongoing evolution of the potato on the Altiplano of Western Bolivia. *Econ. Bot.* 40, 409-424
- Jorge V., Fregene M.A., Duque M.C, Bonierbale M.W, Tohme J. and Verdier V. 2000. Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet* 101:865-872

- Lakhanpaul S, Velayudhan KC & Bhat KV (2003) Analysis of genetic diversity in Indian taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 50, 603-609
- Lefèvre F. 1989. Ressources génétiques et amélioration du manioc, *Manihot esculenta* Crantz, en Afrique. Paris, France, Orstom, Travaux et documents microédités No. 57, 175p.
- Mba R.E.C, Stephenson P., Edwards K., Melzer S., Nkumbira J., Gullberg U., Appel K., Gale M., Tohme J. and Fregene M. 2001. Simple sequence 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.
- Mignouna HD, Mank RA, Ellis THN, van den Bosch N, Asiedu R, Ng SYC & Peleman J. (2002) A genetic linkage map of Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) based on AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 105, 716-725
- Morillo E. 2001. Caractérisation des introgressions du complexe d'espèces *M. carthaginensis* s.l. incluant divers « arbres manioc » dans certaines variétés traditionnelles américaines et africaines du manioc (*M. esculenta* Crantz). Mémoire DEA RPI, ENSAM, Montpellier, France
- Nassar N. 2003. Gene flow between cassava, *Manihot esculenta* Crantz, and wild relatives. *Genet. Mol. Res.* 2(4):334-347
- Olsen K. and Schaal B. 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5586-5591
- Quiros CF, Ortega R, van Raamsdonk L, Herrera-Montoya M, Cisneros P, Schmidt E & Brush SB (1992) Increase of potato genetic resources in their center of biodiversity: the role of natural outcrossing and selection by the Andean farmer. *Genet. Res. Crop Evol.* 39, 107-113
- Rohlf F. J. 2002. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.1. Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY. Sokal, R.R and P.H.A. Sneath. 1963. Principles of Numerical Taxonomy. Freeman San Francisco. 359 p.
- Rogers D.J., Appan M., 1973. *Manihot, Manihotoideae* (Euphorbiaceae). New York, Etats-Unis, Hafner Press, Flora Neotropica Monograph n°13, 274 p.
- Roa, A.C., M. M. Maya, M.C.Duque, J. Tohme, A. C ., Allem, and M. W. Bonierbale, 1997. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. *Theoretical and Applied Genetics* 95 : 741-750.
- Roa A.C., P. Chavarriaga-Aguire, M. C. Duque, M.M. Maya, M.W. Bonierbale, C.I. Iglesias and J. Tohme. 2000. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) microsatellites : allelic polymorphism and degree of relationship. *Amer. J. Bot.* 87(11) : 1647-1655
- Second G., Allem A., Mendes R., Carvalho L., Emperaire L., Ingram C. and Colombo C. 1997. Molecular Marker (AFLP)-based *Manihot* and cassava numerical taxonomy and genetic structure analysis in progress: Implications for their dynamic conservation and genetic mapping. *Genome*. Vol. 2: 140-147
- Second G. and Iglesias C. 2001. The state of use of cassava genetic diversity and a proposal to enhance it. In *Broadening the Genetic Basis of Crop Production* (eds. Cooper HD, Spillane D, Hodgkin T., pg. 201-221
- Second G. 2000. *Manihot glaziovii* contributed to the genetic make-up of cassava and represents an example of dynamic conservation and on-farm breeding of genetic resources. In *Proceedings of IV International Scientific Meeting of Cassava Biotechnology Network*

- Swofford D. 2001. PAUP software. Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4b8. Sinaur, Sunderland, MA
- Zhang D, Ghislain M, Huaman Z, Golmirzaie A & Hijmans R (1998) RAPD variation in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cultivars from South America and Papua New Guinea. Genet. Res. Crop Evol. 45, 271-277
- Zohary D (1984) Modes of evolution in plants under domestication. In: Plant biosystematics. Ed Grant WF. Academic Press. p579-586

Tabla 1. Lista de microsatelites seleccionados para el analisis de diversidad de yuca y especies silvestres emparentadas.

No	Codigo Life Tech.*	Talla Producto PCR (pb)	Temperat. Annealing.	Secuencia del motif	Grupo de ligacion	Referencia
1	SSRY-3	247	55	(CA)17	D	Mba <i>et al.</i> 2001
2	SSRY-9	278	55	(GT)15	D	Mba <i>et al.</i> 2001
3	SSRY-23	247	45	(CA)17	D	Mba <i>et al.</i> 2001
4	SSRY-40	231	55	(GA)16	D	Mba <i>et al.</i> 2001
5	SSRY-108	203	55	(CT)24CCT	D	Mba <i>et al.</i> 2001
6	SSRY-120	139	55	(CA)7AA(GA)8	D	Mba <i>et al.</i> 2001
7	SSRY-169	100	55	(GA)19A3(GAA)2	D	Mba <i>et al.</i> 2001
8	SSRY-31	188	55	(GA)21	F	Mba <i>et al.</i> 2001
9	SSRY-68	287	55	(CT)12CC(CT)17	F	Mba <i>et al.</i> 2001
10	SSRY-179	226	55	(GA)28	F	Mba <i>et al.</i> 2001
11	SSRY-30	220	55	(CT)22	G	Mba <i>et al.</i> 2001
12	SSRY-38	122	55	(CA)17	G	Mba <i>et al.</i> 2001
13	SSRY-103	272	55	(GA)22	G	Mba <i>et al.</i> 2001
14	SSRY-135	253	45	(CT)16	G	Mba <i>et al.</i> 2001
15	SSRY153	117	45	GA-131	G	Chavariaga <i>et al.</i> 1998
16	SSRY-55	145	55	(GA)16	L	Mba <i>et al.</i> 2001
17	SSRY-88	243	55	(CA)7(N)6(GA)22	L	Mba <i>et al.</i> 2001
18	SSRY-100	210	55	(CT)17TT(CT)7	L	Mba <i>et al.</i> 2001
19	SSRY-144	117	45	GAGG-5	Q	Chavariaga <i>et al.</i> 1998
20	SSRY-145	143	45	GA-12	pd	Chavariaga <i>et al.</i> 1998
21	SSRY-146	139	45	GA-13	pd	Chavariaga <i>et al.</i> 1998
22	SSRY-147	113	45	GA-16	pd	Chavariaga <i>et al.</i> 1998
23	SSRY-148	114	45	GA-21	pd	Chavariaga <i>et al.</i> 1998
24	SSRY-151	182	45	GA-126	K	Chavariaga <i>et al.</i> 1998
25	SSRY-152	233	45	GA-127	K	Chavariaga <i>et al.</i> 1998
26	SSRY-154	318	45	GA-134	pd	Chavariaga <i>et al.</i> 1998
27	SSRY-155	158	45	GA-136	pd	Chavariaga <i>et al.</i> 1998

* = Ref.: *Cassava Map Pairs, Life Technologies*

Tabla 2. Resultados obtenidos de la extensión de locus SSR en yuca por la técnica de Marcha Genómica

Locus	Talla Original (pb)	Despues de Extension (pb)	Taza de extension	Producto Pcr (pb)
SSRY-3	520	1501	2.6	1155
SSRY-9	350	1641	3.6	1157
SSRY-40	600	1836	2.0	1078

Tabla 3. Resultados del análisis filogenético del polimorfismo de secuencia de las regiones flanqueantes de alelos SSR en yuca y especies silvestres emparentadas

Locus	Alelos Secuenciados	Caracteres alineados	Caracteres Constantes	Caracteres variables		Polimorfismo (%)
				C. NI	C. I.	
SSRY-3	40	1110	891	130	89	8.2
SSRY-9	27	1143	1027	79	37	3.2
SSRY-40	54	856	705	94	57	6.6

C. NI: Polimorfismos no útiles para la filogenia (sitios donde un polimorfismo es privado de una sola secuencia)

C. I : Polimorfismos útiles para la filogenia (polimorfismos presentes en al menos dos secuencias)

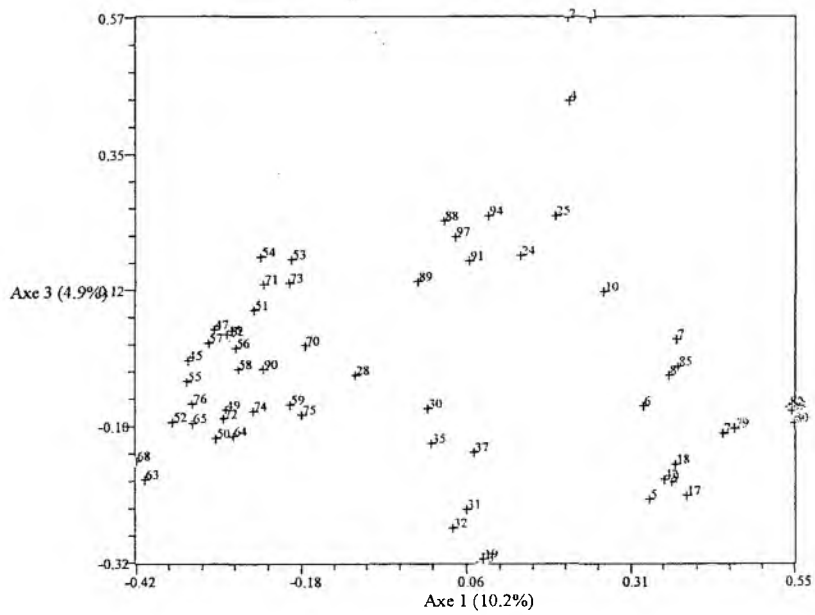


Figura 1. PCO basado en el polimorfismo de 58 accesiones con 27 SSR. En negro: *M. esculenta*, azul: *M. flabellifolia*, verde: *M. glaziovii*, rojo: arboles yuca, gris: *M. carthaginensis*, azul: *M. quinquepartita* y morado: *M. brachyloba*

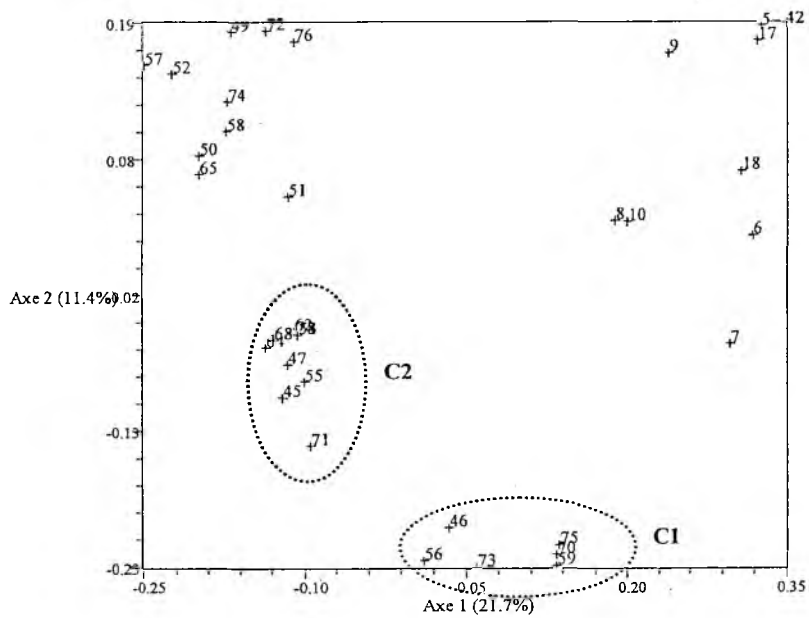


Figura 2. PCO basado en el polimorfismo de 7 locus SSR del grupo de ligación D que muestra la distribución de accesiones de *M. esculenta* y *M. glaziovii*

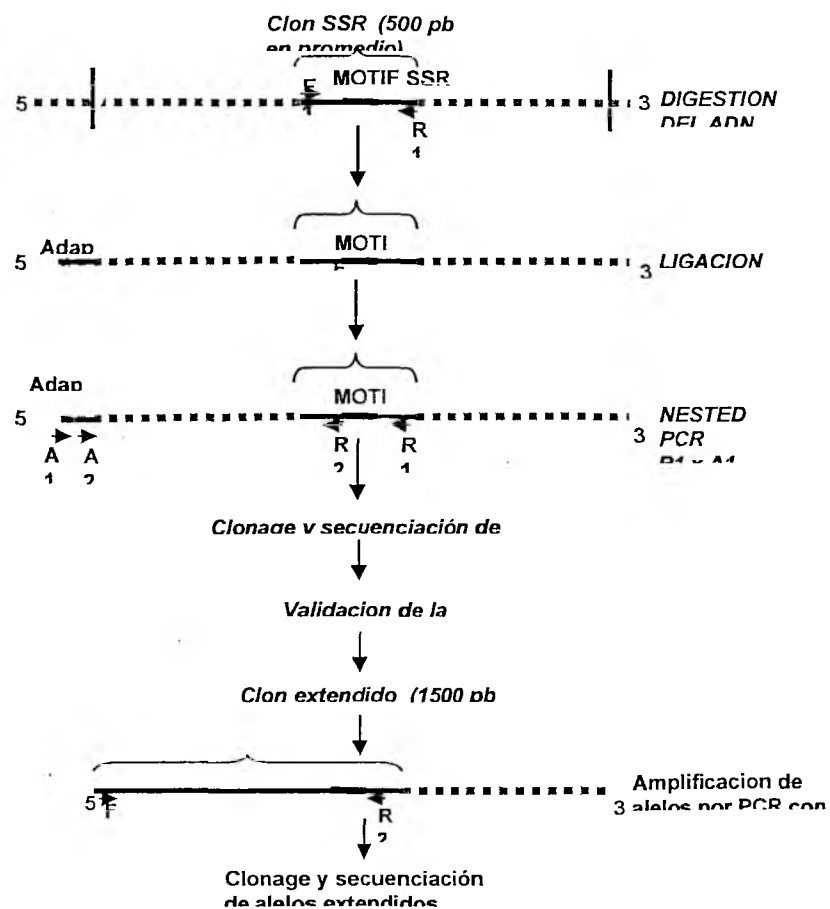


Figura 3. Esquematización del principio técnico de la "Marcha genómica" aplicada para la obtención de secuencias de las regiones flanqueantes de alelos SSR extendidos y elaboración de filogenias de locus SSR presumidos de introgresión en *M. esculenta*

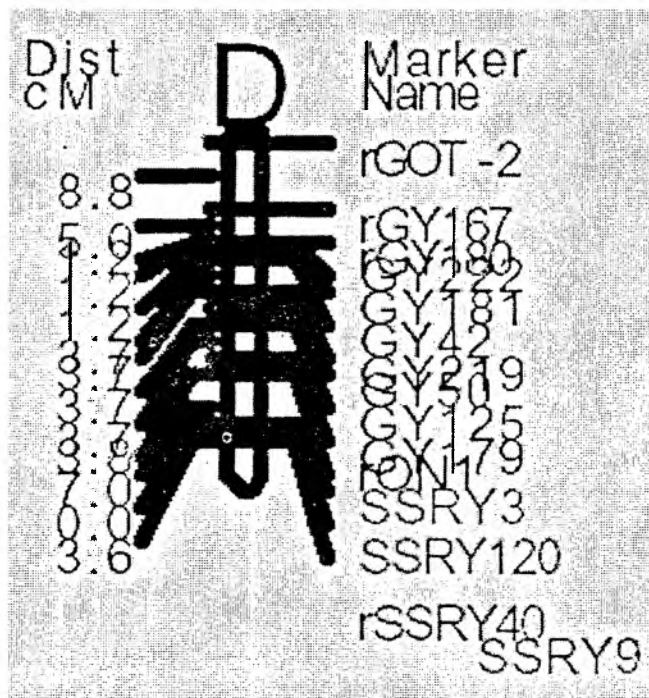


Figura 4. Mapa genético del cromosoma D (Mba et al. 2001). El interés del grupo de ligación D es que es portador de un QTL mayor implicado en la resistencia a la CMV y CBB de la yuca (Jorge et al. 2000).

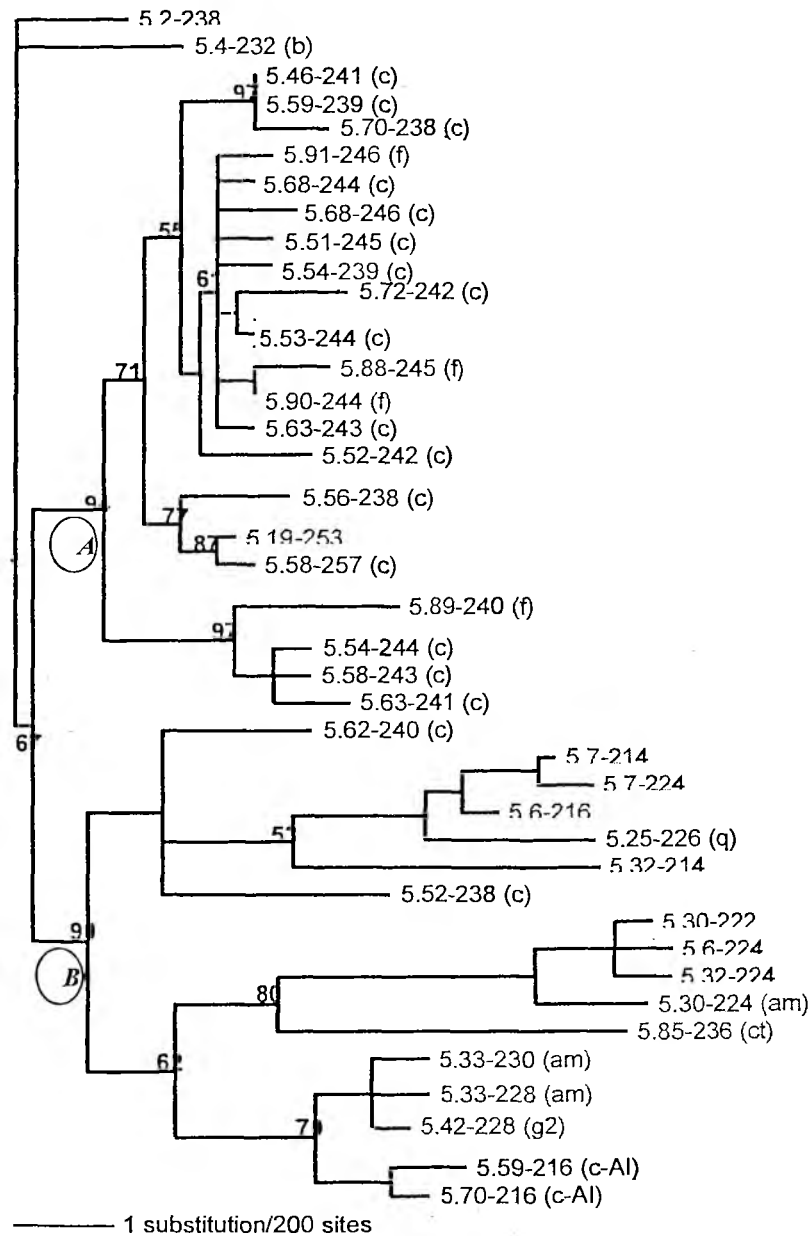


Figura 5. Filograma obtenido por ML a partir del polimorfismo de secuencia de las regiones flanqueantes de 40 alelos del locus SSRY-3 en yuca. Los alelos se indican por el código de la accesión de la cual se aislaron, y su talla *in silico* obtenida con los primers utilizados en genotipage (parte I). Los cultivares se indican con C y AI por los artificialmente introgresados, *am* identifica a los árboles yuca, *f* a *M. flabellifolia*, *g* a *M. glaziovii*, *ct* a *M. carthagenensis*, *b* a *M. brachyloba* y *q* a *M. quinquepartita*. Los valores de bootstrap se obtuvieron después de 100 replicaciones.

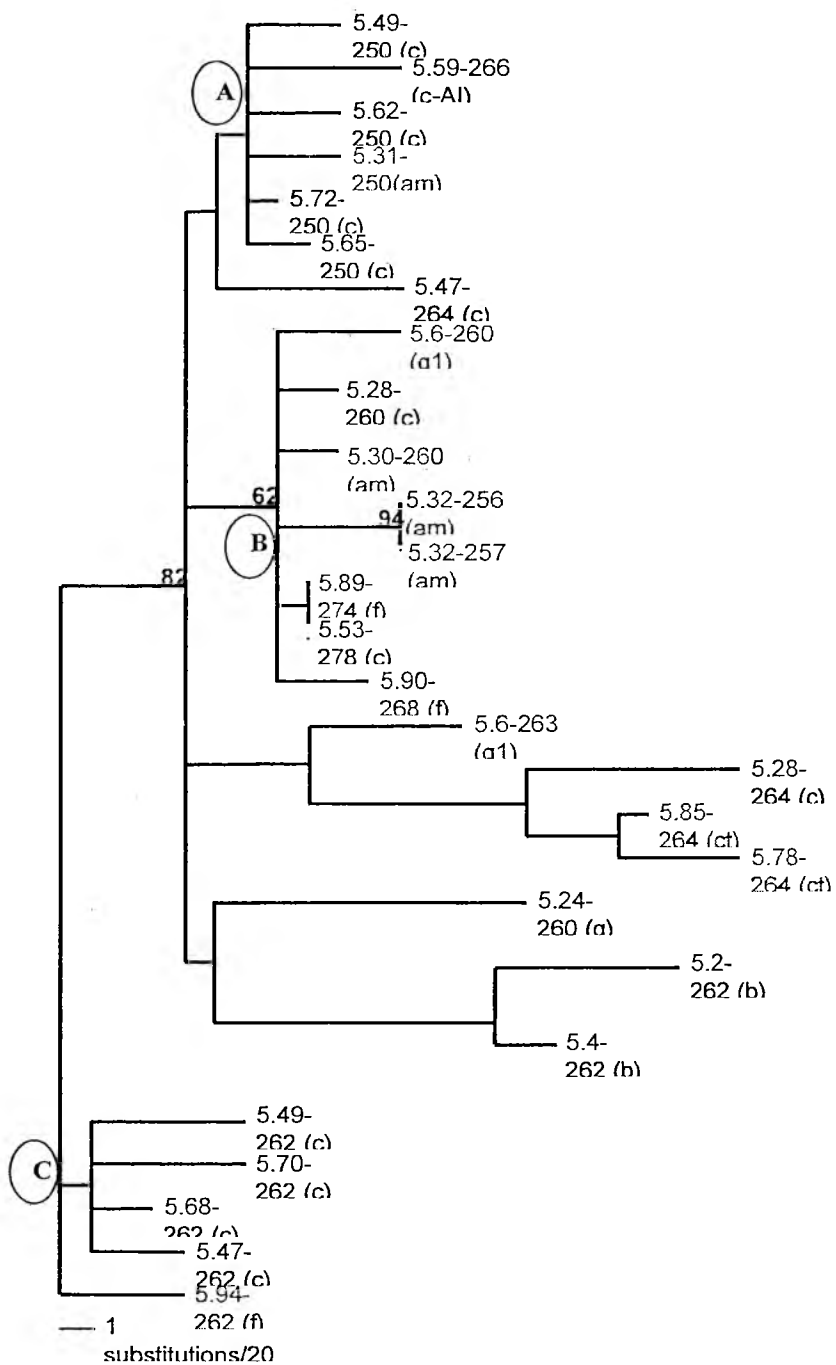


Figura 6. Filograma obtenido por ML a partir del polimorfismo de secuencia de las regiones flanqueantes de 27 alelos del locus SSRY-9 en yuca. Los alelos se indican por el código de la accesión de la cual se aislaron, y su talla *in silico* obtenida con los primers utilizados en genotipage (parte I). Los cultivares se indican con C y AI por los artificialmente introgresados, am identifica a los árboles yuca, f a *M. flabellifolia*, g a *M. glaziovii*, ct a *M. carthaginensis*, b a *M. brachyloba* y q a *M. quinquepartita*. Los valores de bootstrap se obtuvieron después de 100 replicaciones.

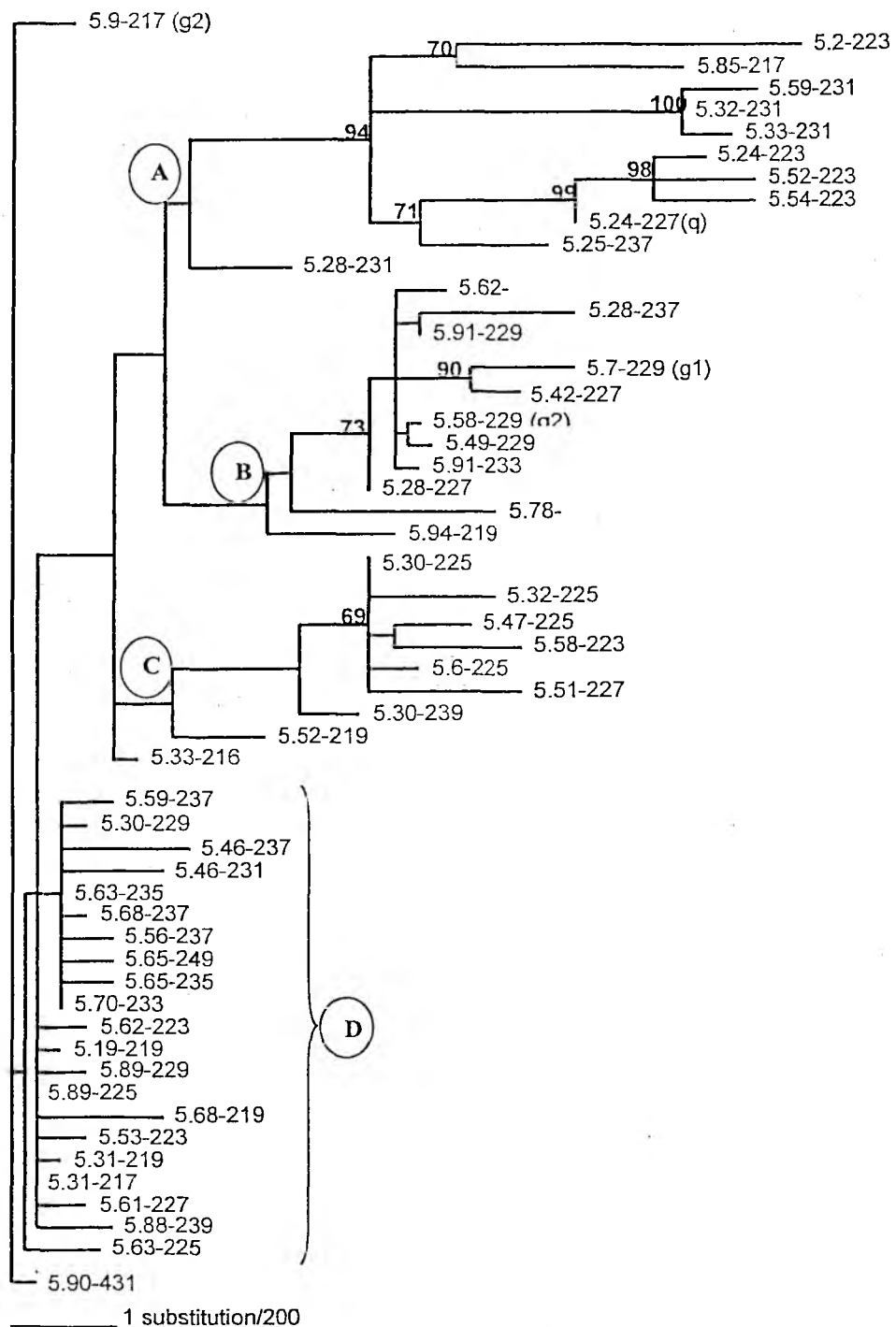


Figura 7. Filograma obtenido por ML a partir del polimorfismo de secuencia de las regiones flanqueantes de 54 alelos del locus SSRY-40 en yuca. Los alelos se indican por el código de la accesión de la cual se aislaron, y su talla *in silico* obtenida con los primers utilizados en genotipage (parte I). Los cultivares se indican con C y A1 por los artificialmente introgresados, am identifica a los árboles yuca, f a *M. flabellifolia*, g a *M. glaziovii*, ct a *M. carthaginensis*, b a *M. brachyloba* y q a *M. quinquepartita*. Los valores de bootstrap se obtuvieron después de 100 replicaciones.