

# DETECCIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES ASOCIADOS CON LA RESISTENCIA AL AÑUBLO BACTERIAL DE LA YUCA (*Manihot esculenta* Crantz) EN COLOMBIA.

Paula Ximena Hurtado<sup>1</sup>, Elizabeth Álvarez<sup>2</sup>, Germán A. Llano<sup>2</sup> y Martin Fregene<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Los Andes, Bogotá, Colombia, <sup>2</sup>Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) A.A. 6713, Cali, Colombia  
paxihulo@hotmail.com, ealvarez@cgiar.org, mfregene@cgiar.org

\*Trabajo galardonado con mención honorífica del Premio Nacional de Fitopatología Rafael Obregón, categoría profesional, auspiciado y otorgado por ASCOLFI en el XXV Congreso de la Asociación, CIAT- Palmira Agosto 11-13 de 2004

## RESUMEN

Una de las principales estrategias para el manejo del Añublo Bacterial de la Yuca (CBB), causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* es el uso de resistencia varietal, que implica desarrollar variedades de yuca con resistencia genética duradera. Para tal fin, es necesario conocer los genes que dominan la resistencia a la enfermedad, detectando inicialmente marcadores moleculares asociados con la respuesta fenotípica de la planta, siendo este el principal objetivo del presente estudio. Inicialmente, se evaluó la reacción a CBB de 4 familias de yuca BC1 (retrocruce 1), se seleccionó la más segregante bajo presión natural de inóculo en Villavicencio (Meta, Colombia) y se confirmó la respuesta a CBB en condiciones de invernadero en CIAT (Palmira, Valle). La familia GM 315 presentó la mejor segregación, siendo la más adecuada para buscar asociación entre su reacción fenotípica y la presencia de un marcador molecular. Para esto, se evaluaron 486 cebadores microsatélites mediante análisis de grupos segregantes (BSA), encontrándose que 17 de ellos mostraron polimorfismo entre los grupos contrastantes y solo uno de ellos, el cebador SSRY 65, mostró diferencias significativas entre individuos resistentes y susceptibles. Al evaluar este cebador en toda la familia segregante se encontró asociación entre su presencia y los individuos evaluados fenotípicamente como resistentes en campo e invernadero, con una probabilidad mínima de  $P=0,0015$  y  $P=0,007$  respectivamente, en una prueba de Chi-cuadrado de independencia. Adicionalmente, a partir de los resultados obtenidos en el análisis estadístico, se calcularon los valores predictivos, especificidad y sensibilidad del marcador SSRY 65. Con base en los valores predictivos positivos generados, es posible sugerir la utilización de este marcador en pruebas diagnósticas para detectar la presencia de una banda específica en individuos resistentes de familias genéticamente relacionadas con la familia GM 315.

**Palabras claves:** microsatélites, añublo, retrocruce, haplotípica, ecozona

## SUMMARY

A major strategy for managing Cassava Bacterial blight (CBB), caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, is to use varietal resistance, that is, to develop cassava varieties with lasting genetic resistance. A search for the genes that dominate resistance to the disease was initially conducted by seeking the molecular markers associated with the plant's phenotypic response to CBB. The response in four BC1 (backcross 1) cassava families was accordingly evaluated under natural disease pressure at Villavicencio (Meta, Colombia). The most segregating family was then selected, and its response to CBB was verified under greenhouse conditions at CIAT (Palmira, Valle). Family GM 315 presented the best segregation, so, it was the most suitable for seeking association between its phenotypic reaction and the presence of a molecular marker. Of 486 microsatellite primers evaluated by bulked segregant analysis (BSA), 17 showed polymorphism among contrasting groups. Only one primer, SSRY 65, showed significant differences between resistant and susceptible individuals. On evaluating this primer for the entire segregating family, an association was found between its presence and individuals evaluated phenotypically as resistant in the field and greenhouse (minimum  $P = 0.0015$  and  $P = 0.007$ , respectively, in a chi-square test of independence). With the results of the statistical analysis, the predictive values, specificity, and sensibility of marker SSRY 65 were calculated. The positive predictive values generated indicate that this marker can be used in diagnostic tests to detect the presence of a specific band in resistant individuals of families genetically related to the GM 315 family.

**Keywords:** cassava, tuber roots, bacterial diseases, molecular markers

## INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una raíz amilácea que constituye uno de los alimentos más importantes en el trópico, siendo la principal fuente de carbohidratos para 500 millones de personas que viven en países en desarrollo, localizados en América Latina, África y Asia (Lozano, 1991). Por su tolerancia a condiciones ambientales adversas, adaptabilidad a suelos pobres y su tiempo de cosecha flexible, la yuca es un componente vital de la seguridad alimenticia de países en desarrollo.

El rendimiento mundial de yuca según la FAO (Food and Agriculture Organization of

the United Nations) para el 2002 se reportó en 10,65 ton/ha y en Colombia fue de 10,63 Ton/ha (FAO, 2002). Actualmente, en Colombia la yuca se cultiva desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm, principalmente en la costa norte y en laderas de la región Andina. La mayor parte de la producción se usa para consumo humano y actualmente se fomenta el cultivo de yuca como sustituto del maíz en la fabricación de alimentos concentrados para animales.

El rendimiento y la producción se ven afectados por enfermedades y plagas, dentro de las cuales el Añublo Bacterial de la Yuca (CBB) que genera daños en tallo y hojas, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv.

*manihotis*, es de gran importancia económica por las pérdidas ocasionadas en el rendimiento del cultivo, que pueden superar el 80%. El Añublo Bacterial de la Yuca fue descrito por primera vez en América del Sur en 1912 y en África en 1970 (Maraiete *et al.*, 1981). *X. axonopodis* pv. *manihotis* puede causar una amplia combinación de síntomas, incluyendo lesiones angulares en hojas, marchitamiento, tizón, exudados y necrosis en el tallo (Maraiete, 1993). Las pérdidas causadas por este patógeno se han reducido combinando prácticas culturales y resistencia del huésped (Lozano, 1986; Boher *et al.*, 1994. Op. Cit. en Verdier *et al.*, 1998; Alvarez, 2002). La resistencia al Añublo Bacterial ha sido desarro-

llada principalmente en *M. esculenta* y *M. glaziovii*, y se piensa que es heredada poligénica y aditivamente. Sin embargo los genes que determinan la resistencia no han sido identificados aún.

Con el fin de conocer la dinámica de la enfermedad, en estudios previos se evaluó la diversidad de *X. axonopodis* pv *manihotis* en cuanto a características fisiológicas (Maraite *et al.*, 1981), de virulencia (Elango *et al.*, 1981. Op. Cit. en Verdier *et al.*, 1998; Verdier *et al.*, 1993) y polimorfismos del ADN (Berthier *et al.*, 1993; Verdier *et al.*, 1993), encontrándose una alta diversidad a nivel patogénico y genético como posible consecuencia de la diversidad de ambientes en los cuales se cultiva la yuca, así como de la variabilidad genética de la planta huésped. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se sugiere una posible resistencia varietal a *X. axonopodis* pv *manihotis* y una relación cuantitativa entre la planta huésped y el patógeno debido a la interacción entre diferentes variedades de yuca evaluadas y un gran número de cepas asiladas (Verdier *et al.*, 1998).

Una vez estudiado el patógeno, es necesario ampliar el conocimiento sobre la resistencia a CBB en la planta huésped y desarrollar variedades de yuca con resistencia genética duradera. Para tal fin, es necesario conocer los genes que dominan la resistencia a CBB detectando inicialmente marcadores moleculares asociados con la respuesta fenotípica de la planta a la enfermedad, siendo este el principal objetivo del presente estudio desarrollado en los Programas de Patología y Genética de Yuca del centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Evaluación de 4 familias BC1 bajo presión natural de inóculo

La progenie de 4 familias de yuca BC1 (retrocruce 1) cuyo padre recurrente es M Nga 19 (Tabla 1) fue sembrada en campo, en Villavicencio (Meta), localizado en la ecozona 2 donde la enfermedad es endémica y se presenta la más alta diversidad haplotípica de *X. axonopodis* pv *manihotis* en Colombia (Restrepo, 1997). De cada genotipo se sembró una parcela con 6 plantas que fueron evaluadas individualmente, 4 y 7 meses después de la siembra, según su reacción a CBB, bajo presión natural de inóculo. Se utilizó una escala de severidad de la enfermedad con valores entre 1,0 y 5,0 donde 1,0 indica planta sin ninguna lesión; 1,5 planta con necrosis leve; 2,0 planta con mayor área necrótica o exudado sin marchitamiento y sin necrosis; 2,5 planta con exudado en 2 o más puntos; 3,0 planta con marchitamiento de hojas sin marchitamiento del ápice y con exudado; 3,5 planta con marchitamiento del ápice; 4,0 plantas con necrosis a lo largo del tallo y marchitamiento general; 4,5 planta completamente marchita y necrosis que causa do-

blamiento; 5,0 planta muerta por la sintomatología causada por *X. axonopodis* pv *manihotis*.

Partiendo del mayor valor de evaluación en cada parcela, se graficó la distribución de frecuencia de la enfermedad en las cuatro familias BC1, a partir de la última evaluación (siete meses después de la siembra) y se calculó la desviación estándar en cada una de ellas, lo que permitió seleccionar la familia más segregante (con individuos en todos los niveles de la escala de severidad de la enfermedad).

### Evaluación de la familia de yuca segregante en invernadero

Para confirmar la respuesta a CBB, de la familia GM 315, seleccionada entre las cuatro familias BC1 como la más segregante por su reacción a la enfermedad, 138 individuos de la progenie fueron sembrados en suelo estéril, bajo condiciones de invernadero en CIAT, siguiendo un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones y unidad experimental conformada por una planta. Después de seis semanas de crecimiento de los nuevos brotes, se llevó a cabo la inoculación, siguiendo la metodología estandarizada para monitorear la resistencia a CBB en yuca (Alvarez *et al.*, 1999). Se inoculó mediante inyección el tallo, entre el tercero y cuarto pecíolo de cada planta, con una suspensión de *X. axonopodis* pv *manihotis* (cultivo de 24 horas evaluado previamente como altamente patogénico) cuya absorbancia se ajustó en espectrofotómetro en 0,5 a 600 nm; las plantas inoculadas se expusieron a humedad relativa (HR) de 80% y temperatura (T°) de 28/19°C (día/noche). 12, 19 y 26 días después de la inoculación la evaluación se hizo según la escala de severidad de CBB presentada previamente.

**Tabla 1.** Cruces de procedencia de las familias BC1 y número de individuos que las conforman

Familia	Cruce	Progenie (N° de Individuos)
GM315	M Nga 19 × CM 9208-13	357
GM316	M Nga 19 × CM 9208-26	399
GM317	M Nga 19 × CM 9208-31	348
GM318	M Nga 19 × CM 9208-73	238

### Análisis de grupo segregante

Una vez seleccionada la familia segregante y confirmada su respuesta a CBB en invernadero, se tomaron los datos de las evaluaciones fenotípicas para conformar dos grupos contrastantes de individuos según la severidad observada en la evaluación de campo. Teniendo en cuenta la escala de severidad de CBB, se conformó un grupo de individuos altamente resistentes con sintomatología entre 1,0 y 2,0 (sembrados junto a individuos sus-

ceptibles, garantizando que la ausencia de síntomas no fuera causada por escapes a la enfermedad) y un grupo de individuos susceptibles con sintomatología entre 4,0 y 5,0

Se hizo extracción de ADN de los individuos seleccionados, siguiendo el protocolo de Gilbertson-Dellaporta (Dellaporta, 1983), se visualizó la calidad del ADN y se cuantificó la concentración de cada uno. Se hizo una dilución a 10ng/μL y se mezclaron volúmenes iguales de individuos resistentes y susceptibles por separado, para conformar los dos grupos y realizar el análisis de grupo segregante (Michelmores *et al.*, 1991) Posteriormente, el ADN de M Nga 19 junto con el de los grupos contrastantes fueron evaluados utilizando 486 cebadores microsatélite que fueron diseñados con base en ADN (155 cebadores NS) o en cADN (331 cebadores SSRY) por Mba *et al.* (2001).

Cada reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se realizó en un volumen final de 25 μL, teniendo en cuenta las siguientes concentraciones finales: dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM cada uno; 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U de Taq polimerasa, 0,2 μM de cada cebador; Buffer de Taq polimerasa 1X; y 50 ng de ADN como molde.

La amplificación con los cebadores NS y SSRY se realizó según las condiciones de amplificación requeridas por cada cebador evaluado, utilizando dos tipos de termocicladores Robocycler 96 de Stratagene, con el siguiente programa: dos minutos a 95°C; 30 ciclos con desnaturalización por 40 segundos a 95°C, apareamiento por 90 segundos a 55/45 °C, y extensión por dos minutos a 72°C; y un solo ciclo de extensión final por cinco minutos a 72°C o MSJ-Research PTC-200 / MSJ-Research PTC-100, con el siguiente programa: 2 min a 94-96°C; 30 ciclos con desnaturalización por 30 segundos a 94°C, apareamiento por un minuto a 55/65°C, y extensión por 2 min a 72°C; y un solo ciclo de extensión final por cinco minutos a 72°C.

Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de acrilamida al 6%, en una electroforesis que se corrió a 1600 v, 95 mA y 85 W, durante 2 horas y se tñieron con nitrato de plata.

A partir del análisis de grupo segregante, fue posible identificar cebadores que evidenciaron diferencias a nivel molecular entre los grupos, entendiéndose esto como la presencia de una(s) banda(s) en el grupo resistente y su ausencia en el grupo susceptible. Estos cebadores se denominaron marcadores candidatos.

### Evaluación de la familia segregante con los cebadores candidatos

Se evaluó cada individuo que conforma los grupos contrastantes con los marcadores candidatos seleccionados, identificando los cebadores que mostraron diferencias entre los

individuos contrastantes para evaluar toda la familia GM 315 y determinar la asociación entre marcador SSR y la resistencia a CBB en campo y en invernadero. La evaluación del marcador en toda la familia dio origen a una matriz binaria, donde la presencia de banda se evaluó con 1 y la ausencia con 0.

### Asociación entre marcador molecular SSR y respuesta fenotípica de la familia segregante a CBB

De acuerdo con la reacción de los individuos a *X. axonopodis* pv. *manihotis*, en campo e invernadero y teniendo en cuenta el máximo valor y el valor promedio dentro de cada parcela o grupo de repeticiones, se utilizaron cinco grupos de rangos, según la escala de severidad de la enfermedad, agrupando los valores de evaluación en tres o cuatro categorías (Tabla 2) para el análisis estadístico, teniendo como modelos análogos de clasificación las categorías de virulencia y agresividad de *X. axonopodis* pv. *manihotis* en yuca, propuestas por Restrepo y Verdier (Restrepo *et al.*, 1997; Restrepo *et al.*, 2000; Verdier, 1998, Jorge, 2001).

Para determinar la asociación entre el marcador SSR y la respuesta fenotípica a CBB de la familia GM 315, se hizo una prueba de Chi-cuadrado de independencia utilizando el programa estadístico SAS (SAS, 1999-2001).

La Hipótesis nula ( $H_0$ ) en la prueba de Chi-cuadrado de independencia fue: No hay asociación entre marcador molecular y resistencia a CBB. Se utilizó un nivel de significancia del 5%. La regla de decisión acepta la  $H_0$  si el valor de Chi-cuadrado calculado es menor que el valor de Chi-cuadrado tabulado (No hay asociación entre marcador molecular y resistencia a CBB).

Con el fin de valorar la validez del marcador en la detección de individuos fenotípicamente resistentes, se determinó su sensibilidad y especificidad a partir de la prueba de independencia. Estos valores permiten conocer la probabilidad de obtener un resultado concreto (verdaderos positivos o verdaderos negativos) en función de la verdadera respuesta de cada genotipo, con respecto a la presencia de la banda evaluada (Fernández y Díaz, Pruebas diagnósticas). Una vez calculados estos valores se determinó el porcentaje de falsos positivos y negativos al hacer uso de este marcador en la familia GM 315. Adicionalmente, se determinó la seguridad al utilizar este marcador, calculando los valores predictivos de un resultado positivo o negativo que dependen directamente de la frecuencia del marcador en la población evaluada (Fernández y Díaz, Pruebas diagnósticas). Estos valores permiten conocer cual es la probabilidad de que un individuo fenotípicamente resistente tenga el marcador o cual es la probabilidad de que un individuo fenotípicamente susceptible no tenga el marcador.

La validez del marcador y la seguridad al emplearlo se determinaron con base en la Tabla 3 a partir de la cual es posible determinar sensibilidad (SE), especificidad (ES), falsos positivos (FP), falsos negativos (FN), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para el marcador SSR asociado con resistencia a CBB (Tabla 4)

Tabla 2. Grupos de rangos propuestos según la escala de severidad de CBB.

Categorías	Grupos de rangos de resistencia				
	I	II	III	IV	V
Resistente	1,0-2,4	1,0-2,5	1,0-2,3	1,0-2,0	Menor a 3
Intermedio	2,5-3,5	2,6-3,6	2,4-3,6		
Susceptible	3,6-5,0	3,7-5,0	3,7-5,0	4,0-5,0	Mayor a 3
Moderadamente resistente				2,0-3,0	
Moderadamente susceptible				3,0-4,0	

Tabla 3. Evaluación del marcador SSR y repuesta de los individuos de la familia GM315 a CBB

Evaluación del marcador SSR	Respuesta de los individuos de la familia GM315 a CBB		
	Susceptible (S)	Resistente(R) / Intermedio(I)	Total
Negativo Ausente (0)	A	B	A+B
Positivo Presente (1)	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

Tabla 4. Fórmulas derivadas de la tabla 3, para calcular los parámetros que determinan validez y seguridad del marcador SSR asociado con resistencia a CBB

Parámetro	Fórmula
Especificidad	$ES = A/(A+C)$
Sensibilidad	$SE = D/(B+D)$
Falsos positivos	$FP = C/(A+C)$
Falsos negativos	$FN = B/(B+D)$
Valor predictivo positivo	$VPP = D/(C+D)$
Valor predictivo negativo	$VPN = A/(A+B)$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Distribución de frecuencias de CBB en las cuatro familias de yuca (BC1) evaluadas por su reacción a CBB

De acuerdo a las gráficas de distribución de frecuencia de CBB (Figura 1) a partir de la evaluación fenotípica realizada siete meses después de la siembra en Villavicencio, al menos 83% de los individuos en cada una de las cuatro familias, tuvo valores menores a 3,0 según la escala de severidad de la enfermedad, lo que indica que la mayor parte de los individuos presentan un nivel de resistencia alto a la diversidad de cepas de *X. axonopodis* pv. *manihotis* presentes en esta región de Colombia donde la enfermedad es endémica.

La gráfica de distribución de frecuencia de CBB en la familia GM 315 (Figura 1A) indica una buena segregación con individuos en todos los niveles de la escala de enfermedad, presentando 5,6% de individuos alta-

mente resistentes evaluados con 1,0-1,5 y 2,0% altamente susceptibles evaluados con 4,5-5,0. Adicionalmente, esta familia presentó la mayor desviación estándar (0,697), confirmando lo anterior, pues con respecto al valor medio de enfermedad (3,0) esta familia tiene individuos evaluados por encima y por debajo de este valor. Esta familia fue selec-

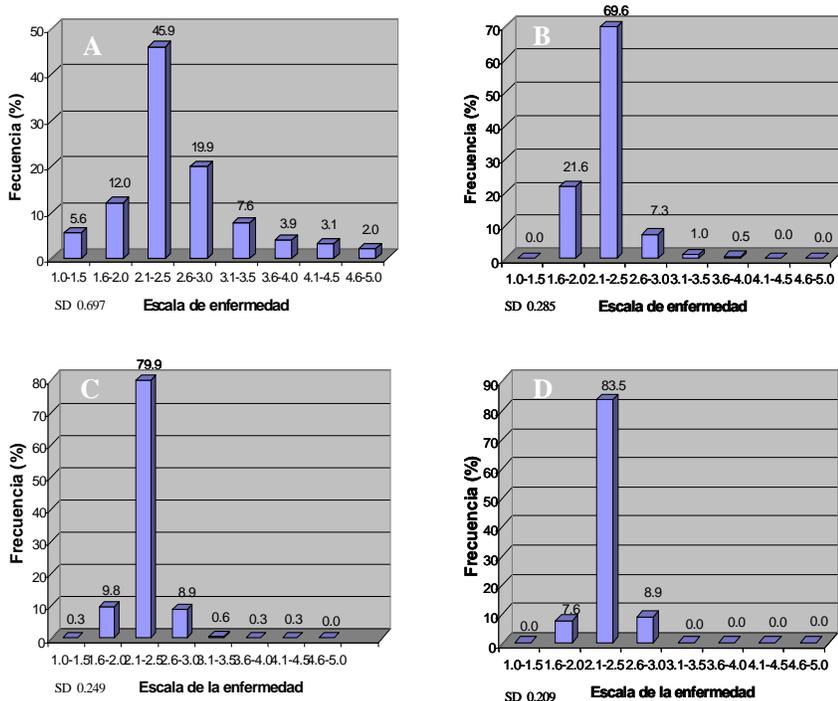
cionada entre los cuatro BC1 para identificar marcadores SSR ligados a resistencia a CBB en yuca por análisis de Grupo segregante (BSA).

### Evaluación de la familia BC1 más segregante por su reacción a CBB en condiciones de invernadero

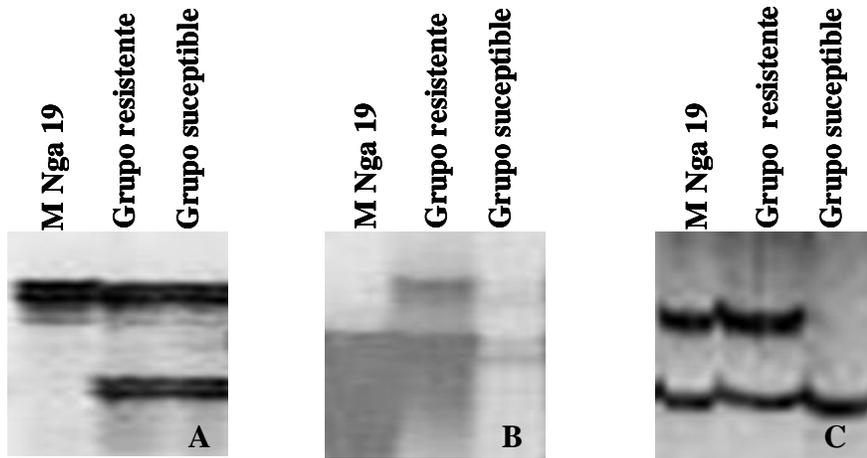
Transcurridos 26 días después de la inoculación de la familia GM 315 bajo condiciones de invernadero, se evaluó su reacción a CBB y se observó que el 65% de los individuos evaluados presentaron una reacción intermedia a *X. axonopodis* pv. *manihotis* (datos no mostrados), con valores en la escala de severidad de la enfermedad entre 2,5-3,5. La familia GM315 presentó una buena segregación para CBB en invernadero y presentó una distribución normal, confirmando los resultados de la evaluación de CBB en campo.

### Análisis de Grupo segregante

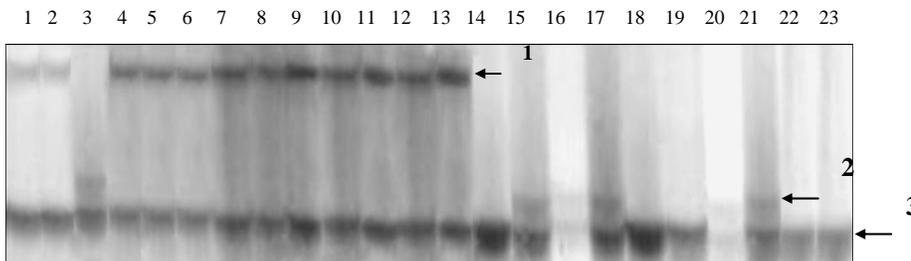
El análisis de grupo segregante de la familia GM 315 con 486 cebadores SSR, detectó tres polimorfismos diferentes con los cebadores evaluados (Figura 2). Se observaron diferencias entre el parental y los dos grupos contrastantes (Figura 2A), lo cual sugiere que posiblemente la banda presente en los dos grupos haya sido heredada del parental susceptible que no fue evaluado y no habría asociación con resistencia a CBB. Por otro lado, se observaron diferencias entre los dos grupos contrastantes (Figura 2B) y adicionalmente entre el grupo resistente y el parental resistente, lo que sugiere que posiblemente la banda que presenta este grupo fue heredada del parental susceptible y no habría asociación entre la presencia de banda y la



**Figura 1.** Distribución de Frecuencia de CBB en cuatro familias de yuca producto de retrocruce con el parental resistente (M Nga 19), de acuerdo al nivel de resistencia a *X. c. pv. manihotis*. (A) Familia GM 315. (B) Familia GM 316. (C) Familia GM 317. (D) Familia GM 318. SD = Desviación estándar para cada familia.



**Figura 2.** Patrones electroforéticos que muestran posibles polimorfismos detectados con los cebadores SSR en el análisis de grupo segregante. **A.** Polimorfismo entre el parental resistente y los grupos contrastantes. **B.** Polimorfismo entre los grupos contrastantes. **C.** Marcadores candidatos SRR



**Figura 3.** Patrones electroforéticos del producto amplificado de los individuos que conforman los grupos contrastantes con el cebador SSRY 65. Carril 1 = M Nga 19, carril 2 = Grupo resistente (R), carril 3 = Grupo susceptible (S), carril 4-13 individuos resistentes, carril 14-23 individuos susceptibles. 1= banda 1; 2= banda 2; 3= banda 3.

resistencia a CBB. El último polimorfismo detectado muestra diferencias entre los grupos contrastantes y adicionalmente entre el parental resistente y el grupo susceptible (Figura 2C), lo que sugiere que la banda visualizada puede estar asociada con resistencia a CBB y que los cebadores que generaron este tipo de polimorfismo pueden ser posibles marcadores SSR.

Con base en lo anterior, de los 486 marcadores SSR evaluados, solo 17 de ellos fueron seleccionados como marcadores candidatos asociados con la resistencia a CBB.

Se determinó que la familia GM 315 (M Nga 19 x CM 9208-13) presentó la mejor segregación en campo e invernadero y con base en las evaluaciones fenotípica y genotípica se planteó una prueba de Chi-cuadrado de independencia para determinar la asociación entre resistencia a CBB y la presencia de un marcador SSR. La prueba de independencia es la mejor opción para buscar asociación entre un marcador molecular y una característica fenotípica cualitativa. En el caso de CBB, el nivel de enfermedad se evalúa mediante una escala de severidad, siendo esta una variable no continua que en un análisis de correlación simple no brinda información.

La prueba de Chi-cuadrado con los datos fenotípicos y genotípicos de la familia GM 315 evaluada en campo, determinó la asociación entre el marcador SSRY 65 y la resistencia a CBB con el máximo valor y el valor promedio de severidad por parcela. La especificidad calculada para cada grupo de rangos con los que se aceptó la  $H_0$ , no superó el 70%, indicando que entre 61,9 y 68,2% de los individuos evaluados con el marcador son verdaderos negativos, siendo estos los individuos susceptibles en los que la banda 1 está ausente. Por su parte, la sensibilidad mostró que entre 49,5 y 54,5% de los individuos evaluados fenotípicamente como resistentes tienen la banda 1, siendo estos los verdaderos positivos.

#### Evaluación de cebadores candidatos

El cebador SSRY 65 mostró diferencias entre los individuos resistentes y susceptibles que conforman los grupos contrastantes de la familia GM 315 (Figura 3) y puede considerarse marcador SSR.

Los individuos fenotípicamente resistentes presentaron las bandas 1 y 3; por el contrario, los individuos fenotípicamente susceptibles presentaron las bandas 2 y 3. Individuos resistentes que no presentan la banda 1 probablemente sufrieron recombinación durante la cual pudo haber delección o inserción de algunas regiones genómicas.

#### Evaluación de cebadores posiblemente asociados con resistencia a CBB en la familia segregante

Se evaluó cada banda por separado, con el fin de encontrar asociación directa entre una de ellas y la resistencia a CBB, teniendo en cuenta que la banda 1 está presente en todos los individuos resistentes del grupo R; la banda 2 está presente sólo en algunos individuos susceptibles del grupo S, sugiriendo que posiblemente esta región amplificada fue heredada del parental susceptible pero no está ligada con resistencia a CBB. La banda 3, por otro lado, es compartida por todos los individuos, lo que sugiere que esta región se conserva en los parentales y fue heredada por la progenie.

### Asociación entre marcador molecular SSR y respuesta fenotípica de la familia segregante a CBB

En la Tabla 5 se presentan los resultados de la prueba de Chi-cuadrado de independencia para los grupos de rangos donde se rechazó la  $H_0$ , siendo estos los que demuestran que existe asociación entre el marcador microsatélite (SSRY 65) y la resistencia a CBB tanto en campo como en invernadero.

**Tabla 5.** Resultados de la prueba de chi-cuadrado de independencia para los grupos de rangos de resistencia en los que se rechazó la  $H_0$

TIPO DE ASOCIACIÓN	GC <sup>a</sup> - Fcmax <sup>b</sup>		GC <sup>a</sup> - FCμ <sup>c</sup>			GI <sup>d</sup> - FIμ <sup>e</sup>
	I	II	II	III	IV	III
<b>Grupo de Rangos (Tabla 1)</b>						
GL <sup>f</sup>	2	2	2	2	3	2
Chi cuadrado <sup>g</sup>	9,2412	8,0567	13,03	6,1407	9,2450	9,9034
Probabilidad	0,0098	0,0170	0,0015	0,046	0,026	0,007
Especificidad	65,75	61,90	65,22	68,18	65,75	76,47
Sensibilidad	54,48	50,26	49,51	49,76	54,48	51,19
Falsos positivos	34,25	38,10	34,78	31,82	34,25	23,53
Falsos negativos	45,51	49,73	50,48	50,24	45,51	48
Valor predictivo positivo	77,2	85,4	92,7	93,6	77,2	95,8
Valor predictivo negativo	40,33	21,8	12,6	12,6	40,3	13,2

Evaluación genotípica de individuos de campo, <sup>b</sup> Evaluación fenotípica de individuos de campo (máximo valor por parcela), <sup>c</sup> Evaluación fenotípica de individuos de campo (valor promedio por parcela), <sup>d</sup> Evaluación genotípica de individuos de invernadero, <sup>e</sup> Evaluación fenotípica de individuos de invernadero (valor promedio de las repeticiones) <sup>f</sup> Grados de libertad, <sup>g</sup> Chi cuadrado calculado

Aunque los valores de especificidad y sensibilidad calculados con los datos de campo para el marcador SSR no son muy altos, es importante tener en cuenta que un porcentaje bajo de falsos positivos es detectado al emplear este marcador, considerando que no hubo un control estricto en las evaluaciones fenotípicas y que incluso pruebas diagnósticas a nivel clínico, no alcanzan valores cercanos a 100%.

La prueba de chi-cuadrado de independencia realizada con la evaluación fenotípica y genotípica de la familia GM 315 bajo condiciones de invernadero, permitió determinar la asociación entre la banda 1 generada por el marcador SSRY 65 y la resistencia a CBB. La especificidad generada por el marcador en estos datos, fue mayor que la generada por los datos de campo. En invernadero, se encontró que 76,4% de los individuos son verdaderos negativos (individuos susceptibles que no presentaron la banda 1). Así mismo, se de-

terminó solo un 23,5% de falsos positivos y el valor predictivo positivo fue mayor que en los datos de campo analizados, confirmando la resistencia a CBB en 95,8 % de los individuos que presentaron la banda 1

Aunque se encontró asociación entre el marcador SSRY 65 y la resistencia a CBB en campo y en invernadero, la especificidad del marcador fue mayor en invernadero, al igual que el valor predictivo positivo. Esto sugiere que bajo condiciones controladas de evaluación de la enfermedad es posible tener mayor certeza de la confiabilidad del marcador, encontrando una mayor probabilidad de que los individuos resistentes presenten la banda 1 generada por el marcador y que los individuos susceptibles no la tengan. Es importante resaltar que aunque la evaluación en invernadero generó resultados interesantes, en ensayos posteriores es necesario aumentar el número de cepas de *X. axonopodis* pv *manihotis* evaluadas para determinar como afecta la diversidad del patógeno a la población que en campo muestra buena segregación.

En el caso de la evaluación de los individuos sembrados en campo, existen diversas causas para la baja especificidad y el aumento

presentada por esta familia, así como la naturaleza contrastante de los parentales, permiten sugerir su utilización en estudios posteriores de evaluación frente a otros patógenos con miras a generar un nuevo mapa de yuca que permita localizar nuevos marcadores que expliquen la resistencia de *Manihot esculenta* Crantz a diversos patógenos.

Finalmente, basándose en los valores predictivos positivos generados por el marcador SSRY 65, es posible sugerir la utilización de este marcador molecular en pruebas diagnósticas para detectar individuos resistentes a CBB, que tengan parentesco genético con la familia GM 315, pero su utilidad en programas de mejoramiento genético y en selección asistida por marcadores se encuentra aún bajo estudio debido a la falta de conocimiento sobre la ubicación del marcador en el genoma de *Manihot esculenta* Crantz.

### CONCLUSIONES

- En condiciones de campo (Villavicencio), la familia GM 315 (retrocruce entre M Nga 19 y CM 9208-13) fue la más segregante en su reacción a CBB.
- Bajo condiciones de invernadero, la familia GM 315 presentó buena segregación, confirmando los resultados de la evaluación fenotípica en campo.
- El análisis de grupo segregante de la familia GM 315 con 486 cebadores SSR, detectó tres polimorfismos diferentes con los cebadores evaluados
- El cebador SSRY 65 mostró diferencias consistentes entre los individuos resistentes y susceptibles que conforman los grupos contrastantes de la familia GM 315 y puede considerarse un marcador SSR putativo.
- La prueba de Chi-cuadrado con los datos fenotípicos y genotípicos de la familia GM 315 evaluada en campo e invernadero, determinó que existe asociación entre el marcador SSRY 65 y la resistencia a CBB.
- La especificidad del marcador fue mayor en invernadero, con respecto a los valores generados por los datos de campo
- Bajo condiciones controladas de evaluación de CBB es posible tener mayor certeza de la confiabilidad del marcador.
- Con base en los valores predictivos positivos generados por el marcador SSRY 65, es posible sugerir la utilización de este marcador en pruebas diagnósticas para detectar la presencia de una banda específica (banda 1) en individuos resistentes de familias genéticamente relacionadas con la GM 315

### PERSPECTIVAS

La segregación presentada por la familia GM 315, así como la naturaleza contrastante de los parentales, permiten sugerir su utilización

en estudios posteriores de evaluación frente a otros patógenos con miras a generar un nuevo mapa de yuca que permita localizar nuevos marcadores que expliquen la resistencia de *Manihot esculenta* Crantz a diversos patógenos.

## AGRADECIMIENTOS

Al personal del laboratorio de Patología de Yuca por prestar su asesoría técnica. Al personal del laboratorio de Genética de Yuca por facilitar sus instalaciones para desarrollar parte de este estudio. A Myriam Cristina Duque por su colaboración en el análisis estadístico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, E. Cadena S. F y Llano, G A. 1999. Evaluación de resistencia de yuca a doce cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Ascolfi informa*. 25 (4-6).
- Álvarez, E., Llano, G. 2002. Enfermedades del cultivo de la yuca y métodos de control. En : Cultivo de la yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento utilización y comercialización. Editado por B. Ospina y H. Ceballos. P. 131 – 147. CIAT, Cali.
- Berthier, Y., Verdier, V., Guesdon, J. L., Chevrier, D., Denis, J. B., Decoux, G. y Lemattre, M. 1993. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction pattern. *Appl. Environ. Microb.* 59: 851-859.
- Boher, B. y Verdier, V. 1994. Cassava Bacterial Blight in Africa. The state of knowledge and implications for designing control strategies. *African Crop Science Journal*. 2: 1-5.
- CIAT(Centro Internacional de Agricultura Tropical). 2001. Annual Report. Cali, Colombia.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. y Hicks, J. R. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Bio. Rep.* 1: 19.
- Elango, F. y Lozano, J. C. 1981. Pathogenic variability of *Xanthomonas manihotis*, the causal agent of cassava bacterial blight. *Fitopatología Brasileira*. 6: 57-63.
- FAO. 2003. Faostat agricultura data. 2002. [en línea]. <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>. [consulta: Junio 15 de 2003]
- Fernández, P., Díaz, P. 2003. Pruebas diagnósticas. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo. A Coruña (España). [en línea]. [http://www.fisterra.com/material/investigacion/pruebas\\_diagnosticas/pruebas\\_diagnosticas.htm](http://www.fisterra.com/material/investigacion/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.htm)[consulta: Agosto 15 de 2003]
- Jorge, V., Fregène, M., Vélez, C. M., Duque, M. C., Tohme, J. y Verdier, V. 2001. QTL analysis of field resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in cassava. *Theor. Appl. Genet.* 102: 564-571.
- Lozano, J. C. 1986. Cassava bacterial blight: a manageable disease. *Plant. Dis.* 70: 1089-1093.
- Lozano, J. C. 2001. Revisiones críticas [en línea]. Control integrado de enfermedades en Yuca (Integrated control of cassava diseases). Programa de Yuca, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. *Fitopatología Venezolana*. 4(2):30-36. <http://www.redpavfpolar.info.ve/fitopato/v042/v042a010.html> [consulta: septiembre 22 de 2001]
- Maraité, H., Weyns, J., Yimkwan, O., Limpemba, P. y Perreux, D. 1981. Physiological and pathogenic variations in *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. In: Lozano, J.C., Gwin, P., eds. Proceedings of the fifth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Cali, Colombia: CIAT, 358-368.
- Maraité, H. 1993. *Xanthomonas campestris* pathovars on cassava, cause of bacterial blight and bacterial necrosis. In: Swings, J.G., Civerolo, E.L., eds. *Xanthomonas*. London, UK: Chapman and Hall Ltd, 18-24.
- Mba, R. E. C., Stephenson, P., Edwards, K., Melzer, S., Nkumbira, J., Gullberg, U., Apel, K., Gale, M., Tohme, J. y Fregène, 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.
- Michelmore, R. W., Paran, I., y Kesseli, R. V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregant populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 9828-9832. Genetics.
- Restrepo, S., y Verdier, V. 1997. Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Appl. Environ. Microb.* 63: 4427-4434.
- Restrepo, S., Duque, M. C. y Verdier, V. 2000. Resistance spectrum of selected *Manihot esculenta* genotypes under field conditions. *Field Crops Research*. 65: 69-77
- SAS Institute. (1999-2001). Software release 8.2 (TSMO). Sun OS 5.8 Platform.
- Verdier, V., Dongo, P. y Boher, B. 1993. Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Journal of General Microbiology*. 139: 2591-2601.
- Verdier, V., Restrepo, S., Mosquera, G., Duque, M.C., Gerstl, A. y Laberry, R. 1998. Genetic and pathogenic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Venezuela. *Plant Pathology*. 47: 601-608.