



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Sobreexpresión del gen *RXam1* en yuca en la variedad modelo cv 60444

Mariana Herrera Corzo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia

2014

Sobreexpresión del gen *RXam1* en yuca en la variedad modelo cv 60444

Mariana Herrera Corzo

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias – Biología

Director: Camilo Ernesto López Carrascal
Ph.D

Línea de Investigación en Genética de Plantas
Grupo de Investigación: Manihot Biotec

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2014

Vivir

Agradecimientos

A mi familia por ser mi centro y mi refugio.

Agradezco inmensamente al profesor Camilo López, quien me aceptó en el grupo, me brindó la oportunidad de formarme como investigadora, gracias por la guía y la paciencia que siempre recibí.

A Juan Camilo Ochoa por ser mi guía y mi apoyo incondicional durante este proceso.

A los integrantes del grupo Manihot Biotec, por su ayuda, por los comentarios, por las discusiones e indudablemente por la calidez de cada uno.

Al programa ECOS Nord por la financiación de mi estadía en el Institut de Recherche pour le Développement.

A Boris Szurek y al equipo Effecteurs -Résistance des Plantes aux Bioagresseurs, del Institut de Recherche pour le Développement, por la acogida y la ayuda en mi estadía.

A Paúl Chavarriaga y al grupo de la plataforma de transformación del Centro Internacional de Agricultura Tropical por el apoyo en el proceso de transformación y caracterización de las plantas transgénicas.

A Colciencias por la financiación de este proyecto (Contrato 504-2011 Código QUIPU 201010016687).

A mis amigos por estar siempre allí.

A Linda por ser mi compañera de camino.

Resumen

La yuca es un cultivo de vital importancia para el consumo humano, especialmente en países tropicales y subtropicales. Una de sus principales limitaciones es la bacteriosis vascular, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). Hasta ahora no se ha identificado ningún gen de resistencia en yuca a ninguna de sus enfermedades. Sin embargo se cuenta con un gen candidato denominado *RXam1*, el cual codifica para una proteína LRR serina-treonina quinasa similar a la proteína Xa21 de arroz que confiere resistencia a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). Este gen colocaliza con un QTL que explica el 13% de la resistencia a la cepa CIO136 de *Xam*. En este trabajo se emplearon dos estrategias complementarias para la validación funcional del gen. En el primer caso se llevo a cabo la generación de plantas transgénicas de la variedad susceptible 60444 que sobreexpresan el gen. Se lograron obtener 19 putativas líneas transgénicas de yuca que mostraron la presencia de la construcción tanto por PCR como por expresión del gen marcador *gus*, tres de éstas líneas (15, 16 y 18) sobreexpresan *RXam1*. Las plantas están en proceso de multiplicación para poder llevar a cabo la caracterización fenotípica. Adicionalmente se buscó llevar a cabo una validación empleando un sistema heterólogo de más fácil manipulación como el arroz. El gen de yuca *RXam1* fue transferido mediante transformación genética estable a la variedad Nipponbare, la cual es susceptible a *Xoo*. De las plantas transgénicas obtenidas se logró llevar hasta semillas T2. Dos de estas líneas y su control fueron caracterizadas molecular y fenotípicamente. Se pudo observar una segregación del transgén en cada una de esas líneas, pero no se observó una correlación entre la presencia del transgén detectado por PCR con la respuesta fenotípica a la infección por *Xoo*. Finalmente se realizó una búsqueda *in silico* de posibles genes *PR* en yuca. Se seleccionaron 15 miembros de diferentes familias de *PR* para el diseño de cebadores. Se evaluó la expresión de 14 de estos posibles genes *PR* en dos variedades de yuca: SG107-35 y 60444 a diferentes tiempos post-inoculación. Los perfiles de expresión no permitieron identificar un gen que se indujera

específicamente en respuesta a *Xam*. Los resultados obtenidos en este trabajo permitirán validar la función del gen *RXam1* de yuca y ganar un mejor conocimiento de las bases moleculares de la yuca a la bacteriosis vascular. Esta información podrá ser utilizada a futuro en los programas de mejoramiento.

Palabras clave: *PRR* (pattern recognition receptor), plantas transgénicas, *PR* (pathogenesis related), arroz

Abstract

Cassava is a very important crop for human consumption, mainly in tropical and subtropical countries. One of its main limitations is the cassava bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). Until this moment there have not been identified any suitable gene of resistance in cassava to any of its diseases. Nevertheless there is a candidate gene denominated *RXam1*, which encodes or a LRR serine-threonine kinase protein, similar to Xa21 kinase. This gene colocalizes with a QTL, which explains the 13% of the resistance to the CIO136 strain of *Xam*. In this work two complementary strategies were used to validate functionally the gene. In the first case, transgenic plants of the variety 60444 overexpressing the gene were generated. Nineteen putative transgenic lines showed the presence of the construct by PCR and expression of the GUS reporter gene. Three of these lines (15, 16 and 18) overexpress *RXam1*. The plants are in a propagation process to achieve the phenotypic characterization. Additionally, it was aimed to validate the system by the use of an easier handling model, as rice. The gene *RXam1* of cassava was transferred by genetic stable transformation of the variety Nipponbare, susceptible to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). The transgenic plants obtained were taken until T2 seed. Two of these lines and its control were characterized molecular and phenotypically. A segregation of the transgen was observed on each lines, but there was not correlation observed between the presence of

the transgen detected by PCR with the phenotypical answer to the infection by *Xoo*. Finally a search of possible *PRs* genes of Cassava was made in silico. Fifteen members of different *PRs* families of were selected for the design of primers. The expression of 14 of these was evaluated in two varieties of cassava: SG107-35 y 60444, in different post inoculation times. The profiles of expression did not allow identifying a gene induced specifically responding to *Xam*. The results obtained in this work will allow to validate the function of the gene *RXam1* of cassava and to gain a better knowledge of the molecular basis of the cassava against bacterial blight. This information can be used in future in the breeding programs.

Keywords: *PRR* (pattern recognition receptor), transgenic plants, *PR* (pathogenesis related), rice

Contenido

Resumen	IX
Abstract.....	X
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas	XVI
Lista de símbolos y abreviaturas.....	XVIII
Introducción	21
Objetivos.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos	24
Marco teórico	26
1 Sobreexpresión del gen <i>RXam1</i> en yuca en la variedad modelo cv 60444... 45	45
1.1 Introducción.....	45
1.2 Materiales y métodos	48
1.2.1 Elaboración de los constructos	48
1.2.2 Transformación en plantas de yuca.....	51
1.2.3 Caracterización molecular de plantas transgénicas.....	55
1.3 Resultados.....	59
1.3.1 Elaboración de los constructos	59
1.3.2 Transformación en plantas de yuca	62
1.3.3 Coloración GUS.....	64
1.3.4 Evaluación molecular de plantas transgénicas por PCR.....	65
Evaluación molecular de plantas transgénicas por Southern blot.....	67
Expresión relativa de <i>RXam1</i>	68
1.4 Discusión	70
2 Evaluación de la sobreexpresión del gen <i>RXam1</i> en la variedad Nipponbare	75

2.1	Introducción	75
2.2	Materiales y métodos	79
2.2.1	Bacteria y condiciones de crecimiento	79
2.2.2	Material vegetal e inoculaciones	79
2.2.3	Extracción de ADN de arroz.....	80
2.2.4	Confirmación del inserto mediante amplificación.....	80
2.3	Resultados	82
2.4	Discusión	91
3	Búsqueda de genes PR marcadores en yuca	94
3.1	Introducción	94
3.2	Materiales y métodos	97
3.2.1	Búsqueda y diseño de cebadores para PR candidatos	97
3.2.2	Material vegetal e inoculación	97
3.2.3	Extracción de ARN, síntesis de ADNc y RT-PCR.....	98
3.3	Resultados	100
3.3.1	Búsqueda y diseño de cebadores de PR	100
3.3.2	RT-PCR de SG107-35 y 60444	103
3.4	Discusión	108
	Conclusiones	114
	Bibliografía	116
	Anexo A. Composición de medios	133
	Anexo B. Protocolo de transformación CIAT	134
	Anexo C. Familias de proteínas relacionadas con patogenicidad (PR)	135
	Anexo D. Genes de yuca candidatos a PR	136
	Anexo E. Cebadores de genes PR candidatos en yuca	140

Lista de figuras

Figura 1-1 Estrategia de elaboración de los constructos.....	50
Figura 1-2 Digestiones y eluciones de los constructos.....	60
Figura 1-3 Esquema del constructo pCAMBIA1305.2 35S::RXam1::NOS.....	61
Figura 1-4 Proceso de transformación del CEF	63
Figura 1-5 Ensayo de GUS en plantas transgénicas regenerantes.	64
Figura 1-6 Extracciones de ADN de las plantas transgénicas putativas de yuca del genotipo 60444.....	66
Figura 1-7 PCR de <i>G3PDH</i> sobre extracciones de ADN de plantas transgénicas.	66
Figura 1-8 PCR de <i>hptII</i> sobre extracciones de ADN de plantas transgénicas.....	67
Figura 2-1 Infiltración de plantas transgénicas de Nipponbare.	83
Figura 2-2 Inoculación de plantas transgénicas de Nipponbare.	84
Figura 2-3 Genotipificación y fenotipificación de la línea EC1 26.1.	87
Figura 2-4 Genotipificación y fenotipificación de la línea EC2 30.2.	88
Figura 2-5 Genotipificación y fenotipificación de la línea EC2 32.1.	89
Figura 3-1 Proteínas candidatas a PR en yuca.	101
Figura 3-2 Amplificación de genes <i>PR</i> candidatos sobre ADN genómico de SG107-35 y 604444.....	103
Figura 3-3 Estandarización de la amplificación de Tubint en ADNc.....	104
Figura 3-4 Amplificación de genes <i>PR1 a</i> y <i>PR1b</i> .en las dos variedades.	105
Figura 3-5 Amplificación de genes <i>PR8a</i> y <i>PR8b</i> .en las dos variedades	106
Figura 3-6 Amplificación de genes <i>PR2b</i> , <i>PR4c</i> , <i>PR10a</i> y <i>PR10b</i> en SG107-35.	107

Lista de tablas

Tabla 1-1 Cebadores usados para la construcción de pCAMBIA1305.2 <i>35S::RXam1::NOS</i>	49
Tabla 1-2 Composición <i>Buffer</i> GUS	55
Tabla 1-3 Cebadores para las reacciones de PCR en tiempo real	58
Tabla 1-4 PCR tiempo real, Ct y temperatura de disociación plantas transgénicas.	68
Tabla 2-1 Líneas de plantas transgénicas de Nipponbare.	77
Tabla 2-2 Cebadores usados para amplificación de <i>OsExp</i> , <i>Hyg</i> y <i>RXam1</i>	80
Tabla 2-3 Condiciones de la <i>PCR</i>	81
Tabla 3-1 Tratamientos empleados en las variedades para la búsqueda de PR	98
Tabla 3-2. Familias de proteínas PR seleccionadas en yuca.....	102

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ABA	Ácido Abscisico
ADN	Ácido Deoxiribonucleico
ADNc	Ácido Deoxiribonucleico Complementario
ANA	Ácido Naftalén-Acético
AJ	Ácido Jasmónico
ARN	Ácido Ribonucleico
AS	Ácido Salicílico
AUDPC	Area Under Disease Progress Curve (Área bajo la curva de progreso de la enfermedad)
BAP	Bencil Amino-Purina
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CEF	Callo Embriogénico Friable
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
DEPC	Diethyl-Piropcarbonate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GD	Gresshoff and Doy
hptII	Hygromicine phosphotransferase II
IBA	Indole-3-butyric Acid
IITA	International Institute of Tropical Agriculture
LB	Luria-Bertani
MATAB	Mixed Alkyl-Trimethyl Ammonium Bromide
MS	Murashige & Skoog
hptII	Hygromicine phosphotransferase II
NOS	Nopaline synthase

Abreviatura	Término
OD	Optic Density
PCR	Polymerase Chain Reaction
ppm	Partes Por Millón
RGC	Resistance Gene Candidate
RT-PCR	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
UFC	Unidades formadoras de Colonia
Xam	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>
YEP	Yeast Extract Peptone
YEPA	Yeast Extract Peptone Agar

Introducción

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es uno de los cultivos más importantes en el trópico, el cual junto con el maíz (*Zea mays* L), la caña de azúcar (*Saccharum spp*) y el arroz (*Oryza sativa* L), constituyen la fuente de energía más importante en la alimentación humana de muchos países tropicales (Ceballos *et al.*, 2010). Sin embargo este cultivo posee limitaciones importantes, ya que presenta enfermedades que lo afectan severamente, entre las que se encuentra la bacteriosis vascular o añublo bacteriano. Esta enfermedad es causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). El grado de afectación del cultivo puede variar entre 50-85% (Lozano, 1986; Wydra & Verdier 2002). Las principales estrategias de control consisten en cultivar variedades que sean resistentes y la siembra de estacas provenientes de plantas sanas (Verdier, 2002).

A lo largo de las últimas dos décadas se han desarrollado estudios que han permitido la caracterización del patógeno, la enfermedad y la identificación de posibles genes de resistencia en plantas de yuca, con el fin de tener un control óptimo del patógeno (López & Bernal, 2012). Sin embargo estas estrategias requieren un amplio conocimiento de las bases moleculares entre plantas y patógenos, el cual se ha desarrollado principalmente en patosistemas modelo.

La inmunidad en plantas ha sido descrita bajo el modelo zig-zag (Jones & Dangl, 2006). Las plantas se encuentran expuestas a diversos patógenos y son capaces de defenderse activando una primera respuesta denominada *MTI* (*MAMP triggered immunity*, inmunidad activada por el reconocimiento de *MAMP*). La *MTI*, es la inmunidad desencadenada por patrones moleculares asociados a microorganismos, donde se reconocen moléculas altamente conservadas conocidas como *MAMPs* (*microbe associated molecular patterns*, patrones moleculares asociados a microorganismos). Estos *MAMPs* están presentes en toda clase de microorganismos, sean patogénicos o no. La *MTI* depende de la presencia

de receptores que se encuentran en la membrana plasmática, denominados receptores de reconocimiento de patrones, *PRRs* (*pattern recognition receptors*, receptores de reconocimiento de patrones), los cuales reconocen los *MAMPs* (Dodds & Rathjen, 2010; Jones & Dangl, 2006). Esta inmunidad activa una respuesta de defensa primaria, mediante una cascada de señalización, que en algunos casos es suficientemente eficiente para detener la colonización de los patógenos no adaptados, generando resistencia de amplio espectro (Chisholm *et al.*, 2006).

La *MTI* se ha estudiado en pocos sistemas planta-patógeno y son relativamente pocos los *PRRs* reportados. La *MTI* contribuye de manera importante a la resistencia no hospedero, la cual se presenta en todas las variedades de una especie vegetal particular, frente a todas las variaciones de una especie de patógeno potencial. Teniendo en cuenta esta característica, se han desarrollado estrategias para generar una resistencia de amplio espectro y duradera mediante la transferencia de *PRRs* entre especies (Lacombe *et al.*, 2010).

Así como las plantas desarrollaron un mecanismo para reconocer los microorganismos, éstos a su vez han desarrollado elementos que les permiten su multiplicación en hospederos específicos, bloqueando el reconocimiento de la planta y suprimiendo la *MTI*. Los patógenos han logrado esto mediante la liberación de moléculas efectoras al citoplasma vegetal (Chisholm *et al.*, 2006). En respuesta a los efectores, las plantas desarrollaron proteínas de resistencia (*R*), presentes en el interior de la célula, las cuales se caracterizan en la mayoría de los casos por presentar dominios *NB-LRR* (*nucleotide binding- leucine-rich repeats*, unión a nucleótidos - repeticiones ricas en leucina). Los productos de los genes *R* reconocen de manera altamente específica la presencia de estas proteínas efectoras (denominadas entonces *Avr*). El proceso de reconocimiento de los efectores conforma la segunda rama de la inmunidad denominada *ETI* (*effector triggered immunity*, inmunidad activada por efectores) (Bent & Mackey, 2007; Jones & Dangl, 2006). Posterior al reconocimiento *R-Avr* se activan fuertes respuestas de defensa que son similares a las activadas durante la *MTI*. Una de las principales respuestas es la inducción de la expresión de genes de defensa, conocidos como proteínas *PR* (*pathogenesis-related*, relacionas con patogenicidad). Estos genes *PR* son empleados como marcadores de la activación de la inmunidad vegetal.

Estudios recientes en el grupo de investigación Manihot Biotec, sugieren la existencia de dos genes involucrados en la resistencia de yuca a la bacteriosis vascular, llamados *RXam1* y *RXam2* (Contreras & López, 2008). *RXam1* codifica para una proteína *RLK* (*receptor-like kinase*, receptora tipo quinasa) con dominios *LRR* y *STK* (*serine/threonine kinase*, serina/treonina quinasa) similar a la proteína XA21, un putativo *PRR* de arroz. *RXam2* es una proteína de tipo *NB-LRR* (López *et al.*, datos no publicados).

En este trabajo se emplearon diferentes estrategias complementarias para validar la posible función del gen *RXam1* de yuca en la inmunidad vegetal y en particular frente a *Xam*. En primera instancia se evaluó el efecto de sobreexpresar el gen *RXam1* en plantas de la variedad de yuca 60444, susceptible a la bacteriosis vascular, por transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Adicionalmente se empleó un sistema heterólogo (arroz), para evaluar la respuesta de las plantas de la variedad susceptible Nipponbare, que sobreexpresen *RXam1* a la infección con *Xanthomonas*. Finalmente como parte del proceso de evaluación de las plantas transgénicas de yuca, es fundamental establecer marcadores que permitan caracterizar la defensa de estas plantas, por ello se realizó la búsqueda y caracterización de posibles genes *PR* en yuca.

Objetivos

Objetivo general

Validación funcional del gen *RXam1* de yuca por sobreexpresión en plantas de yuca susceptibles a la bacteriosis vascular.

Objetivos específicos

- Generar plantas transformadas de la variedad de yuca TMS60444 con el gen *RXam1*.
- Confirmar la inserción del gen *RXam1* en el genoma de la variedad TMS60444

Marco teórico

Inmunidad en plantas

MTI

A lo largo del proceso de evolución, las plantas y los patógenos han estado en un constante diálogo molecular. Las plantas han desarrollado un sistema de inmunidad innata que les permiten interactuar con otros organismos y una vez estos sean reconocidos como algo extraño, la planta eventualmente desencadena una respuesta de defensa, que conduce a limitar la multiplicación y expansión del microorganismo (Chisholm *et al.*, 2006). En la inmunidad vegetal se pueden establecer dos estrategias de detección de los patógenos, que a su vez se relacionan con las dos ramas de inmunidad. La primera se presenta en la parte externa de la célula hospedera y la segunda estrategia involucra el reconocimiento por medio de receptores intracelulares (Dodds & Rathjen, 2010).

En el primer caso las moléculas de los microorganismos que son reconocidas por las plantas se denominan *PAMPs* o *MAMPs* (*pathogen/microbe-associated molecular patterns*), los cuales se encuentran en microorganismos patogénicos o no patogénicos (Dodds & Rathjen, 2010; Jones & Dangl, 2006). Son moléculas fundamentales para la viabilidad del microorganismo y en consecuencia son ampliamente distribuidas, altamente conservadas y presentan evolución lenta (Schwessinger & Zipfel, 2008). Dentro de los *MAMPs* más estudiados se encuentran la flagelina (*flg22*) (Felix *et al.*, 1999), el factor de elongación Tu (*EF-tu*) (Kunze *et al.*, 2004), los lipopolisacáridos (*LPS*) (Dow *et al.*, 2000), la quitina (Kaku *et al.*, 2006) y *eMAX* de bacterias del género *Xanthomonas*. Este último *MAMP* no ha sido purificado por lo que su naturaleza química es desconocida (Jehle *et al.*, 2013). Los *MAMPs* son reconocidos a través de receptores *PRRs*. Los *PRRs* son proteínas receptoras tipo quinasa (*RLK receptor-like kinases*) o proteínas similares a receptores (*RLP receptor-like proteins*) (Segonzac & Zipfel, 2011;

Macho & Zipfel, 2014). Los *RLKs* están compuestos por un dominio extracelular (involucrado en la unión al ligando), un dominio transmembranal y un dominio intracelular quinasa. Los *RLPs* tienen una organización estructural similar, pero carecen de dominio intracelular. Los *PRRs* de tipo *LRR* se unen a proteínas o péptidos como la flagelina (*flg22*), *FLS2* (flagellin-sensing 2) (Gomez-Gomez & Boller, 2000; Chinchilla *et al.*, 2006) o al factor de elongación *elf18*, *EFR* (*EF-TU elongation factor thermo unstable receptor*) (Zipfel *et al.*, 2006)

Otros *PRRs* exhiben dominios extracelulares de tipo *LysM*, los cuales son dominios protéicos que reconocen N-acetilglucosamina (GlcNAc) como la quitina de los hongos y el peptidoglucano de las bacterias o el de los factores de nodulación bacterianos, además de funcionar en simbiosis e inmunidad (Monaghan & Zipfel, 2012; Greeff *et al.*, 2012). Estas proteínas presentan un dominio ectópico *LysM*, un dominio transmembranal de paso único y un dominio citoplasmático quinasa (Böhm *et al.*, 2014). Las proteínas *PRRs* con dominios *LysM* incluyen el receptor *CERK1* de *Arabidopsis* que reconoce oligosacáridos de quitina (N-acetilquitooligosacáridos) (Miya *et al.*, 2007). La proteína *OsCERK1* de arroz, que aunque no es el receptor de quitina, forma un complejo receptor de hetero-oligómeros con *CEBiP* que es en efecto el receptor de N-acetilquitooligosacáridos en esta planta (Shimizu *et al.*, 2010). *CEBiP* al igual que *CERK1* tiene dominios *LysM* extracelulares pero carece de dominios intracelulares (Kaku *et al.*, 2006). El receptor de *Arabidopsis* *LYM2* se une a quitina y contribuye a la inmunidad anti fúngica, además reduce el flujo metabólico de célula a célula y es independiente de *CERK1* (Faulkner *et al.*, 2013). En arroz *LYP4* y *LYP6*, median la percepción de peptidoglucano y la inmunidad antibacterial (Liu *et al.*, 2012).

ETS

Algunos fitopatógenos han logrado vencer la inmunidad basal o primera rama de inmunidad, logrando colonizar las células vegetales. Los fitopatógenos lo logran a través de la introducción de moléculas virulentas patogénicas (efectores) al citoplasma vegetal, con el objetivo de suprimir las respuestas de defensa o favorecer el crecimiento del patógeno (Alfano & Collmer, 2004). En el caso particular de bacterias fitopatógenas existe el sistema de secreción tipo III (*TTSS- type three secretion system*) el cual se emplea para la translocación de las proteínas efectoras a través de la membrana bacteriana y de la célula hospedera (Troisfontaines & Cornelis, 2005). Dentro de las

funciones conocidas de los efectores se encuentra la inhibición de *PTI*, como es el caso de AvrPto que inhibe fuertemente *PTI* en *Arabidopsis* (He *et al.*, 2006) y XopN de *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* en tomate (Kim *et al.*, 2009). Adicionalmente se ha reportado que AvrPto inhibe la actividad quinasa de FLS2 y EFR (Xiang *et al.*, 2008). Otros efectores como el caso de Slp1 de *Magnaporthe oryzae* se acumulan en el apoplasto y previenen la activación de la *MTI* en arroz, al competir con CEBiP por la unión con quitina (Mentlak *et al.*, 2012). Uno de los principales puntos blancos de los efectores son las rutas que involucran proteínas quinasas activadas por mitógenos (*MAPK*). Así por ejemplo, HopAI1 de *Pseudomonas syringae* se une a MPK3 y MPK6 de *Arabidopsis* inactivando la actividad quinasa, suprimiendo las respuestas de defensa de la planta (Zhang *et al.*, 2007). Los efectores de la familia AvrBs3/PthA (Avirulencia y patogenicidad), actualmente conocidos como TALEs (*transcriptional activator like effector*), presentes en *Xanthomonas*, actúan como factores de transcripción, uniéndose directamente y de manera específica a promotores e induciendo la expresión de genes del hospedero que promueven la colonización del patógeno (Boch & Bonas, 2010; Bogdanove *et al.*, 2010)

ETI

Dependiendo de la evolución de la interacción entre una planta y un patógeno dado, ciertas variedades de plantas de una especie en particular pueden haber desarrollado genes que codifican para proteínas de resistencia (R), que reconocen específicamente uno de los efectores inyectados presentes en cepas específicas de un determinado patógeno. Cuando las proteínas efectoras son reconocidas por una proteína R, reciben el nombre de proteínas de Avirulencia (Avr). Este reconocimiento, desencadena una segunda rama de inmunidad vegetal conocida como *ETI* (*effector triggered immunity*) y corresponde al modelo gen por gen propuesto por Flor en los años 50s (Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010).

La ETI involucra el reconocimiento directo o indirecto por medio de receptores intracelulares de los efectores inyectados por las bacterias, lo cual activa las vías de señalización de defensa (interacción incompatible o resistencia) (Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010).

La mayoría de las proteínas de resistencia presentan un dominio *NBS* y un dominio *LRR* en su extremo N-terminal. En su extremo carboxi terminal pueden presentar o no un dominio *TIR* (*Toll/interleukin-1 receptor*) (Dodds & Rathjen, 2010).

Vías de señalización en inmunidad

Una vez se ha dado el reconocimiento del patógeno a través de los *PRRs* o de las proteínas *R*, se induce la activación de cascadas de transducción de señales lo que conlleva a la reprogramación de la expresión génica y de otros eventos fisiológicos en la célula. Este tipo de respuesta puede culminar con una respuesta hipersensible o *HR* (*hypersensitive response*), que es un tipo de muerte celular programada que limita la expansión, crecimiento y desarrollo del patógeno (Dodds & Rathjen, 2010).

Entre las principales respuestas de defensa inducidas durante el reconocimiento se encuentran la inducción de cascadas de fosforilación mediadas por *MAPKs*, expresión de genes relacionados con patogenicidad (*PR*, *pathogenesis-related*), producción de especies reactivas de oxígeno (*ROS reactive oxygen species*), aumento de la concentración intracelular de iones de calcio y refuerzo de la pared celular entre otros (Abramovitch *et al.*, 2006; Nürnberger *et al.*, 2004).

Fitosanidad, Seguridad alimentaria y la yuca

Se estima que para el año 2050, el crecimiento poblacional alcanzará los 9 billones de personas en el mundo, por lo cual será necesario incrementar al menos en un 70% la producción actual de alimentos, para así poder satisfacer la demanda (FAO, 2010). Este es un reto muy grande y a la vez es una de las mayores preocupaciones a nivel mundial. Adicionalmente se ha estimado que cada año un 10-16% de la cosecha de alimentos global se pierde por causa de enfermedades (Strange & Scott, 2005). La agricultura debe transformarse para afrontar los desafíos de la seguridad alimentaria y el cambio climático, especialmente para los países en desarrollo donde la tasa de crecimiento poblacional es mayor (FAO, 2010).

Actualmente existen 500 especies de plantas domesticadas, sin embargo tan sólo 150 de ellas son cultivadas comercialmente alrededor del mundo y de éstas tan sólo 12 especies concentran la producción global (ETC Group, 2009). Dentro de estas especies se encuentra la yuca. A nivel mundial en el año 2012, la yuca ocupó el octavo lugar en

producción (262'585.741 toneladas), después de la caña de azúcar, maíz, arroz, trigo, papa, remolacha y hortalizas (FAOSTAT, 2014).

Yuca

La yuca pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, compuesta por alrededor de 300 géneros y 8000 especies, muchas de ellas son especies tropicales que se caracterizan por la producción de látex. Dentro del género *Manihot*, la tribu *Manihotae* está conformada por 98 especies del neotrópico dentro de las cuales se encuentra *M. esculenta* Crantz (Rogers & Appan 1973). El nombre científico de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) fue dado por Crantz en 1766 (Ceballos 2012). El origen de la yuca aun es incierto, si bien hay algunas teorías que sugieren el Amazonas como su origen geográfico, otras indican que es en México, sin embargo por ciertas características fisiológicas y varios estudios moleculares, la teoría del origen en el sur de la cuenca del Amazonas se afianza (Lebot 2009; Olsen & Schaal 1999). La domesticación de la yuca se dio entre 5000 y 7000 años A.C (Hahn *et al.*, 1990).

La yuca es una planta perenne, monoica (Ceballos & de la Cruz, 2002), alógama (polinización cruzada), presenta baja tasa de reproducción sexual dada por el bajo número de semillas fértiles que produce. Principalmente su multiplicación es asexual, por medio de estacas (Ceballos, 2002). Es una especie altamente heterocigota (Fregene *et al.*, 2003), y es considerada como diploide funcional $2n=2x=36$ (Allem, 1994), sin embargo, Magoon *et al.* (1969) sugieren que quizá sea un alotetraploide segmental. La yuca es un arbusto, con una altura de uno a tres metros (Ceballos & de la Cruz 2002), es cultivada en muchos países tropicales situados entre 30° N y 30° S del ecuador, a una elevación de 2000 m.s.n.m, con una precipitación anual de 500 mm (en eco-zonas semiáridas) a <200 mm (eco-zonas húmedas), lo cual indica su adaptabilidad a un rango amplio de ambientes y ecosistemas (El- Sharkawy, 2012). Aunque la yuca tiene una elevada tolerancia a los suelos ácidos, resistencia a sequía, adaptación a una amplia gamma de suelos y es uno de los pocos cultivos que produce en suelos infértiles, es sensible al déficit de agua en el suelo durante los tres primeros meses después de plantarse (Cadavid, 2005; FAO, 2013).

Actualmente la yuca es cultivada en todos los países tropicales del mundo. La gran adaptabilidad y la flexibilidad de su ciclo de vida facilita su expansión. Cuando la tierra es

escasa, los requerimientos alimenticios por unidad de área cultivada aumentan razón por la cual muchos agricultores privilegian el cultivo de yuca, ya que genera mayor producción de energía por hectárea (Lebot, 2009). El cultivo se da principalmente en África, Asia y Latinoamérica (FAOSTAT, 2014). La yuca tiene una gran diversidad de usos, tanto hojas como raíces son ampliamente utilizadas (Ospina & Ceballos 2012). El órgano más importante para la producción y comercialización de yuca son las raíces tuberosas almacenadoras, que contienen un alto porcentaje de almidón (65-91%) (Ceballos *et al.*, 2010). Por otro lado sus hojas tiernas contienen hasta un 25 % de proteínas, además de hierro, calcio y vitaminas A y C (FAO, 2013; Ospina & Ceballos 2012). Otras partes de la planta también pueden utilizarse como alimento para animales. Se ha reportado que el ganado criado con yuca tiene una buena resistencia a las enfermedades y bajas tasas de mortalidad (FAO, 2013).

La yuca contiene glucósidos cianogénicos tanto en sus raíces como en sus hojas (Ospina & Ceballos, 2012; Lebot, 2009). Dependiendo del nivel de estos, las variedades de yuca son llamadas, “yuca dulce” cuando los niveles son bajos, o “yuca amarga” cuando los niveles de glucósidos son altos. La yuca dulce es la que usualmente se utiliza directamente como fuente de energía para consumo humano (Ceballos *et al.*, 2010). En la industria de alimentos, del producto fresco se elaboran croquetas y carimañolas entre otras. Como producto transformado, la harina se emplea en panadería, el almidón se usa como agente estabilizador de sopas, pasabocas y alimentos congelados. Adicionalmente se emplea en el sector industrial, para fabricar pegantes; en la industria textil para el engomado de telas de algodón (Aguilera, 2012). En Asia se utiliza como fuente de alimento para los cerdos, en Brasil se utiliza como *farinha* y también se ha empleado exitosamente como alcohol. Durante la crisis energética, se reemplazó la gasolina por el bioetanol y actualmente es una fuente importante de bioetanol en Nigeria y Tailandia (Ospina & Ceballos, 2012).

La yuca constituye la base de la alimentación para más de 1000 millones de personas en el mundo y es cultivada por pequeños agricultores en más de 100 países (FAO, 2013). La yuca como alimento proporciona hasta un tercio de las calorías diarias necesarias para la población humana de países tropicales, posicionándose por esta razón como uno de los cultivos más importantes para la seguridad alimentaria, al ser la segunda fuente de almidón en el mundo después del maíz (FAO, 2008; FAO, 2013). El cultivo

posee un enorme potencial ya que actualmente los rendimientos medios ascienden apenas a un 20% de lo que se obtiene en condiciones óptimas (FAO, 2008). Su producción ha aumentado constantemente en los últimos cincuenta años, es así que desde el año 2000 la producción ha amentado un 60% (FAO, 2013) llegando a más de 262 millones de toneladas a nivel mundial en el año 2012 (FAOSTAT). Para América Latina la producción es de 32 millones de toneladas. Colombia ocupa el tercer lugar después de Brasil y Paraguay, aportando casi un 1% de la producción mundial con 2.274 millones de toneladas (Aguilera, 2012; FAOSTAT). Si bien la yuca se cultiva en todas las regiones del país, la región que mayor porcentaje de área sembrada presenta es el Caribe con un 52% (Aguilera, 2012).

A pesar de que la yuca es un cultivo rústico, que crece bajo condiciones donde pocas otras especies pueden sobrevivir, ya que muchas variedades son tolerantes a la sequía, pueden producir en suelos degradados y resistir a muchas plagas y enfermedades (Ceballos *et al.*, 2010), existen varias que lo afectan. Entre las principales se destacan, la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*), el gusano cachón (*Erinnyis ello*), el virus del mosaico común de la yuca (CCMD, *Cassava Common Mosaic Disease*) causado por el virus potex, la enfermedad del cuero de sapo causada por un virus hasta el momento parcialmente caracterizado y finalmente la bacteriosis o añublo vascular (*cassava bacterial blight*) (Álvarez *et al.*, 2002; Calvert *et al.*, 2008).

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis* (Xam)

La bacteriosis vascular de la yuca (*CBB - cassava bacterial blight*) es causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) (Lozano & Sequeira, 1974). La bacteriosis se presenta en todas las regiones donde la planta es cultivada y es una de las mayores limitantes de la producción en los cultivos localizados en América del Sur, África y más recientemente en Asia (Lozano, 1986; Wydra & Verdier, 2002). Las pérdidas en producción pueden llegar hasta el 80%, (incluso 100% tras tres ciclos de cosecha (Verdier, 2002)) según las condiciones del medio y en ausencia de buenas prácticas agronómicas (Lozano, 1986). En Colombia existen reportes de bacteriosis vascular en todas las regiones productoras de yuca (Restrepo & Verdier, 1997). En los años setenta la bacteriosis vascular de la yuca ocasionó pérdidas del 75-80% en la producción en la República Democrática del Congo (anteriormente llamado Zaire) generando hambruna (Maraite, 1993). En Nigeria un estudio de las diferentes zonas agroecológicas, reporta

prevalencia de la bacteriosis vascular en 70% de todas las ecozonas evaluadas en el 2001 y más del 90% en el 2003. Más del 80% de los campos mostraron un grado de infección con bacteriosis moderadamente severos (Onyeka *et al.*, 2008). En la zona noroeste de Uganda se realizó un estudio con el fin de determinar la prevalencia de diferentes enfermedades en seis variedades élites, adaptadas y sembradas por los agricultores de la zona. Este estudio encontró que la bacteriosis vascular se presentó en todas las variedades y en todas las zonas evaluadas, con incidencias altas (73.8 -100%) y alta severidad (2.0 -3.4); lo cual confirma que la enfermedad es un problema serio en esta región (Abaca *et al.*, 2014).

Xam, es una bacteria gram negativa, posee un flagelo polar, crece en medio con sacarosa produciendo bacterias sin pigmentación, presenta características fisiológicas y bioquímicas típicas de las xanthomonadas (Verdier, 2002). El género *Xanthomonas* comprende 27 especies que causan enfermedades en aproximadamente 400 plantas hospederas diferentes, entre ellas arroz, banano, pimentón, frijol, col, plantas del género citrus y yuca (Ryan *et al.*, 2011).

La aparición y expansión de la enfermedad en un cultivo se debe principalmente a la siembra de material infectado con *Xam*, dado por el uso de estacas como medio de propagación, o por el empleo de herramientas infectadas con *Xam*, las cuales se usan ya contaminadas para los siguientes ciclos de producción. Como consecuencia, el patógeno puede difundirse fácilmente a estacas sanas tomadas de tallos asintomáticos (Verdier, 2002).

El proceso de infección inicia con una fase epífita en las hojas, a continuación se introduce al interior de los tejidos foliares a través de estomas y heridas (Lozano, 1986). La fase preliminar ocurre en espacios intercelulares en el mesófilo de la hoja y posteriormente el patógeno se interna en los vasos. Si los tallos lignificados se infectan la bacteria se mantiene en los tejidos vasculares, donde puede sobrevivir hasta por 30 meses (Verdier, 2002). La bacteria se multiplica rápidamente y produce un exudado que bloquea los tejidos vasculares, ocasionando el marchitamiento de las hojas y en consecuencia induce una amplia variedad de síntomas, como manchas angulares en las hojas, añublo o quemazón, marchitamiento, lesiones, exudados en el tallo y la muerte de la planta (Lozano & Sequeira, 1974; Verdier, 2002; Verdier *et al.*, 2004). El

establecimiento de la bacteria se da luego de 12 horas de alta humedad relativa, la temperatura ideal es 23°C (Verdier, 2002). Durante el proceso de infección *Xam* degrada la lamela media y la pared celular, lo cual favorece la colonización en el tejido del hospedero (Boher *et al.*, 1995).

Estudios del patógeno

El potencial evolutivo de la población de un patógeno está reflejado en su estructura poblacional genética. Los patógenos con sistemas de reproducción mixta, un alto flujo génico, un tamaño poblacional efectivo grande y altas tasas de mutación, poseen un potencial muy alto para lograr burlar la resistencia vegetal (McDonald & Linde, 2002). Por lo tanto conocer la estructura poblacional y la diversidad geográfica es indispensable para desarrollar estrategias en el control del patógeno (Verdier *et al.*, 2004; López *et al.*, 2006).

Dada la importancia y amplia distribución de esta enfermedad, durante los últimos 20 años se han desarrollado estudios para determinar la variabilidad genética en *Xam* (Revisado por López *et al.* (2006) y López & Bernal (2012)). Los países de América del Sur donde más se han estudiado las poblaciones de *Xam* son Brasil, Venezuela y Colombia (Restrepo *et al.*, 2000a; Restrepo *et al.*, 2000b; Verdier *et al.*, 2004). Los estudios de diversidad mediante el uso de la técnica *RFLP* (*restriction fragment length polymorphism*) usando como sonda el gen de patogenicidad *pthB* han permitido discriminar filogenéticamente los haplotipos encontrados a lo largo de las distintas zonas edafoclimáticas (Restrepo & Verdier 1997; Restrepo *et al.*, 2004; Restrepo *et al.*, 2000b). Posteriormente se realizaron estudios con la estrategia de *AFLPs* (*amplified fragment length polymorphism*) y técnicas de PCR (*polymerase chain reaction*) con secuencias repetitivas, esta estrategia fue mucho más robusta, permitiendo una mayor discriminación espacial de las poblaciones de *Xam* a nivel de distintos países y zonas edafoclimáticas como una visión temporal de la estabilidad genética y poblacional del patógeno (Restrepo, 1999; Restrepo *et al.*, 2000a; Verdier *et al.*, 2004).

Durante cinco años Restrepo *et al.* (2004) estudiaron las poblaciones de *Xam* en Colombia, determinando que éstas son inestables y su estructura poblacional puede variar drásticamente, esto puede ocurrir incluso en menos de un año. Los picos de diversidad parecen estar relacionados con las condiciones climáticas óptimas para el

desarrollo de la enfermedad y las variedades de yuca presentes en la zona edafoclimática (Restrepo *et al.*, 2004; López & Bernal, 2012). Estudios recientes realizados entre 2008-2010 en la región Caribe, mediante AFLPs confirman la presencia de procesos migratorios anteriormente mencionados en los años 90s, reportando algunos haplotipos nuevos. Altos niveles de diversidad se encontraron en subregiones donde la yuca se ha cultivado por mucho tiempo y donde las condiciones climáticas favorecen la enfermedad (Trujillo *et al.*, 2014).

Los estudios de dinámica poblacional mostraron inicialmente que las poblaciones africanas de *Xam* son altamente homogéneas, contrario a lo reportado en las poblaciones americanas (Verdier *et al.*, 1993; Verdier *et al.*, 1994). Sin embargo, estudios recientes han identificado una variabilidad importante en las poblaciones de *Xam* africanas (Ogunjobi *et al.*, 2006; Wydra *et al.*, 2004).

Efectores de *Xam*, supresores de defensa

Recientes estudios se han enfocado en la búsqueda y caracterización de los factores de patogenicidad de *Xam*, entre ellos se encuentran las proteínas efectoras. Una de las más estudiadas pertenece a los efectores de tipo TALE, anteriormente denominadas AvrBs3/pthA (avirulencia/patogenicidad) (Boch & Bonas, 2010; Bogdanove *et al.*, 2010; Kay *et al.*, 2007). Castiblanco *et al.* (2012) identificaron por primera vez un efector de tipo TALE en *Xam* (TALE1_{*xam*}), y pusieron en evidencia su importancia en patogenicidad, la importancia de los dominios en la actividad y su función como activador transcripcional. Más recientemente se ha avanzado en la identificación de los genes de yuca, cuya expresión se modifica en presencia de TALE1_{*xam*}. Dentro de la lista de genes candidatos regulados por TALE1_{*xam*}, se destaca el *Heat shock transcription factor B3* (Muñoz, 2012).

Por otro lado actualmente se cuenta con el genoma totalmente anotado de la cepa *Xam* CIO151 (Arrieta *et al.*, 2013) y parcialmente para 65 cepas de *Xam* (Bart *et al.*, 2012). Estos estudios reportan 10 grupos de factores de patogenicidad conservados de *Xanthomonas*, 126 genes únicos para *Xam* y 25 efectores, con lo cual se podría catalogar sistemáticamente los genes que podrían jugar un papel importante en la interacción entre CIO 151 y la planta hospedera de yuca (Arrieta *et al.*, 2012; López & Bernal., 2012). Sin embargo la función de estos efectores como supresores de la inmunidad aún se desconoce.

Resistencia a la bacteriosis en yuca

Las respuestas de la planta para limitar el crecimiento de *Xam* son diversas. En el tejido floemático se presenta lignificación y suberización asociada a los depósitos de calosa, un mecanismo efectivo que refuerza las barreras de la planta; en el tejido xilemático se recubre de un material de tipo lignina y/o pectina. Adicionalmente flavonoides se incorporan recubriendo las paredes celulares secundarias. Estos mecanismos se presentan tanto en variedades susceptibles como en resistentes, sin embargo son más rápidos e intensos en las resistentes (Kpémoua *et al.*, 1996). Otro mecanismo presente en las variedades resistentes es la formación de tílides, que obstruyen los haces vasculares y secretan compuestos fenólicos (aparentemente bactericidas), los cuales contribuyen a detener la colonización del patógeno en los haces vasculares (Kpémoua *et al.*, 1996).

Los métodos de control consisten en cultivar variedades resistentes, la siembra de estacas provenientes de plantas sanas y buenas prácticas de manejo (Lozano, 1986). Sin embargo a pesar de la existencia de algunas variedades relativamente resistentes a la bacteriosis (Restrepo *et al.*, 2000a, 2004), éstas no poseen buenas cualidades culinarias (Verdier, 2002). Adicionalmente estas variedades no siempre se encuentran bien adaptadas a zonas agro-ecológicas específicas donde la yuca se siembra (Restrepo *et al.*, 2004). Por esta razón no han sido adoptadas por los productores (López *et al.*, 2006). En ausencia de un control químico para la bacteriosis, la identificación de la base genética subyacente, presente en las variedades resistentes no comerciales y la transferencia de esta a variedades comerciales es la estrategia más promisoría para el manejo de la enfermedad (Verdier *et al.*, 2004).

Se ha considerado que la resistencia a la bacteriosis vascular es poligénica y aditivamente heredada (CIAT, 1980), además teniendo en cuenta que la diferencia entre las variedades resistentes y susceptibles está dada por la tasa de colonización que se da en los tejidos vasculares, se sugiere que la resistencia a la bacteriosis vascular es cuantitativa (Verdier *et al.*, 2004; López *et al.*, 2006; López & Bernal, 2012). La resistencia cuantitativa, también es conocida como resistencia horizontal o poligénica, está gobernada por varios genes, en donde cada uno de ellos contribuye con un

porcentaje de la resistencia total (Kou & Wang, 2010). Este tipo de resistencia, a diferencia de la cualitativa, se ve afectada en gran medida por condiciones ambientales.

La dificultad en identificar genes de resistencia en yuca se debe a la carencia de un mapa genético saturado y la ausencia de un amplio repertorio de herramientas (colección de mutantes, sistemas de validación funcional, etc.). Sin embargo en los últimos años se han obtenido importantes avances, ya que en la actualidad se conoce el genoma de la yuca y se ha seguido avanzando en la búsqueda de regiones genómicas asociadas a la resistencia a bacteriosis vascular a través de la construcción de mapas genéticos más densos (Rabbi *et al.*, 2014; Soto en preparación).

El primer mapa genético construido para yuca fue reportado por Fregene *et al.* (1997), con el fin de identificar loci de resistencia al virus del mosaico africano. Este mapa se construyó a partir del cruce entre TMS30572 (MNGA2) como la madre y CM2177-2 como el padre. TMS30572 representa una variedad mejorada desarrollada en el IITA (International Institute of Tropical Agriculture), Nigeria y CM2177-2 es una variedad élite del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), Colombia. A partir de este cruce se obtuvo una F1 de 150 individuos. El primer mapa estuvo formado por 132 RFLPs, 30 RAPDs (*random amplification of polymorphic DNA*), tres microsatélites y tres isoenzimas como marcadores moleculares. A partir de este mapa y con el fin de identificar regiones genómicas involucradas en resistencia, los trabajos de Jorge *et al.* (2000, 2001) permitieron la identificación de doce *QTLs* implicados en la resistencia a cepas particulares de *Xam* (CIO84, CIO1, CIO136, CIO295 y ORSTX27). Estos doce *QTLs* explicaron de 9 a 27.1 % de la resistencia. De estos, algunos son específicos para una cepa (Jorge *et al.*, 2000). Para estudios de *QTLs* evaluados en campo se reportaron otros *QTLs*, que explicaron 7.2 a 18.2% de la variación fenotípica. También se detectaron cambios en los *QTLs* entre los ciclos de cultivo (Jorge *et al.*, 2000; Jorge *et al.*, 2001). La importancia de este tipo de estudios es que muestran la relación compleja en la interacción planta/patógeno para la bacteriosis vascular. Adicionalmente, a partir de estos estudios se puede realizar un mapeo detallado, para la identificación de genes presentes en los *QTLs*, aislarlos y obtener resistencia amplia y durable a través de mejoramiento genético o transformación (López & Bernal, 2012).

Aún no se ha logrado clonar y caracterizar molecularmente ningún gen de resistencia en yuca a ninguna de sus enfermedades. Sin embargo, considerando los dominios conservados que presentan las proteínas de resistencia, se diseñaron cebadores degenerados para amplificar secuencias de ADN que codifican proteínas con dominios *NB* logrando obtener genes candidatos a resistencia (*RGC- resistance gene candidates*) (López *et al.*, 2003). Este estudio permitió encontrar doce clases de *RGCs*, dos de tipo *TIR* y diez de tipo *NB* (López *et al.*, 2003). Posteriormente estos *NB* se mapearon y se encontraron dos asociados con *QTLs* de resistencia a dos cepas de *Xam*. La resistencia explicada por uno de estos *QTLs* es de 61.6% y está asociada con resistencia a la cepa CIO151 (López *et al.*, 2007). El gen candidato asociado a este *QTL* es de tipo *NB-LRR* no *TIR* y ha sido llamado *RXam2* (*Resistance to Xam 2*) (Contreras y López, 2008). Por otro lado un fragmento amplificado de ADN de yuca con cebadores del gen *Xa21* de arroz (*CBB1 -cassava bacterial blight 1*), fue mapeado en el grupo de ligamiento X y colocó con un *QTL* que explica el 13% de la resistencia a *Xam* CIO136 (Jorge *et al.*, 2000). El marcador desarrollado a partir de este gen fue llamado inicialmente *CBB1*. La secuencia completa del gen fue obtenida y representa un gen candidato de tipo *LRR-STK* el cual actualmente es llamado *RXam1* (*Resistance to Xam 1*) (Contreras y López, 2008).

Continuando la búsqueda de genes implicados en la interacción yuca-*Xam*, además de los dos genes candidatos de resistencia, se han realizado otros estudios que han ayudado a esclarecer las respuestas posteriores al reconocimiento tales como los cambios en la expresión génica. Empleando *ADNc-AFLPs*, se identificaron muchos genes expresados diferencialmente ante *Xam* (Santaella *et al.*, 2004). Adicionalmente varias librerías de *ADNc* fueron construidas a partir de tejidos de yuca infectados con *Xam*, tanto de variedades resistentes como susceptibles. A partir de estas librerías se generó una colección de *ESTs* (*expressed sequence tags*) y un catálogo unigen de 5700 genes expresados en yuca (López *et al.*, 2004), los cuales fueron utilizados para estudiar el perfil de expresión de genes en yuca infectada con *Xam* por medio de un microarreglo de *ADNc*. Para ello se empleó la variedad MBRA685 y la cepa *Xam* CIO151, lo que permitió estudiar una interacción incompatible (resistencia), a diferentes tiempos. Un total de 199 genes diferencialmente expresados se identificaron, 126 inducidos y 73 reprimidos. Algunos de estos genes se encuentran involucrados en el refuerzo de la pared celular, asociados con el estrés oxidativo (peroxidasas, peroxidasas catiónicas y glutatión-S-transferasa), con la degradación proteica (proteasas, ubiquitina) y factores de

transcripción de respuesta al etileno (López *et al.*, 2005). Ocho de los genes que mostraron ser expresados diferencialmente por microarreglos fueron estudiados para el caso de la reacción compatible (enfermedad) mediante *RT-PCR* (*reverse transcription – polymerase chain reaction*). Para esto se utilizó la variedad Col1522 la cual es sensible a la cepa de *Xam* ClO151 (López *et al.*, 2005). Se encontró que seis de los ocho genes eran igualmente inducidos, pero a tiempos más tardíos, lo cual corrobora lo previamente reportado por estudios morfológicos: la respuesta entre variedades resistentes y susceptibles es similar, salvo que en las primeras la respuesta es más temprana y fuerte.

Por otro lado se ha explorado el papel de los microARNs (miARN), en la regulación de la expresión génica. Pérez-Quintero *et al* (2012) realizaron un análisis bioinformático a partir de librerías de ARNs pequeños, permitiendo caracterizar 56 familias de miARNs conservadas y 12 nuevas familias específicas de yuca. Así mismo se encontró que la expresión para algunas familias de miARNs era inducida en respuesta a la infección bacteriana, como es el caso de la inducción de miARNs que reprimen los genes de la señalización por auxinas. Algunas familias de miARNs se reprimen en respuesta a la bacteria, como es el caso de aquellos miARNs involucrados en la regulación de cobre, y cuyos blancos putativos son genes de resistencia.

Recientemente se realizó un estudio encaminado a la construcción del interactoma de *RXam2* mediante la técnica de doble híbrido, arrojando información fundamental en la comprensión de los mecanismos moleculares básicos que se encienden o tienen lugar durante la inmunidad y amplían el campo para un futuro uso de estas proteínas en los programas de mejoramiento (Román *et al*, 2012).

Biotecnología: generación de alternativas a los problemas sanitarios

Los recientes avances en biotecnología son herramientas que han ayudado de manera importante al aumento de la producción, entre los cuales se encuentra el mejoramiento de nuevas variedades, producción de biofertilizantes, biopesticidas, propagación de material, diagnóstico de enfermedades y la conservación y manejo de los recursos genéticos de los cultivos (Vemireddy, 2014). Las pérdidas causadas, ya sea por factores bióticos o abióticos, reducen entre un 30-60% la producción a nivel global. Usualmente éstas pérdidas se dan cuando las plantas están en la cúspide de su desarrollo, cuando ya se ha invertido mucha del agua y los nutrientes necesarios en su producción

(Dhalamini *et al.*, 2005). La adopción de los cultivos modificados genéticamente reduce la inseguridad alimentaria en un 15-20%. Si bien no son la solución absoluta a los problemas de hambre, estos puede ser un componente importante en las estrategias de seguridad alimentaria (Qaim & JKouser 2013).

De 1996 a 2010 los cultivos biotecnológicos contribuyeron a la seguridad alimentaria, la sostenibilidad y el cambio climático, incrementando el valor de la producción a 78.4 billones de dólares, suministrando un mejor ambiente al disminuir en 443 millones de kilogramos el uso de pesticidas, ayudando a conservar la biodiversidad a través de la preservación de 91 millones de hectáreas de tierra (James, 2011). Para el 2011 se reportó un récord de 16.7 millones de campesinos, en 29 países quienes plantaron 160 millones de hectáreas de cultivos biotecnológicos, un aumento de 8% (12 millones) con respecto al 2010 (148 millones hectáreas). Colombia ocupa la posición número 18 a nivel mundial en hectáreas de cultivos biotecnológicos, con menos de 100 000 hectáreas sembradas. Se tienen reportes de 49.333 Ha de algodón y 59.239 Ha de maíz biotecnológico sembrados en el país (James, 2011).

Actualmente casi todo lo que el ser humano consume es producido a partir de semilla que ha sido genéticamente alterada de una u otra manera (Ronald, 2014). Usando mejoramiento genético se han logrado desarrollar plantas para mejorar problemas en los cultivos, ya sean bióticos o abióticos o mejorar su calidad nutricional. Los ejemplos más importantes son el arroz dorado, la papaya resistente a virus y el algodón Bt.

Con el objetivo de disminuir la deficiencia nutricional de vitamina A, que padecen 250 millones de niños en el mundo, de los cuales 250 000 – 500 000 pierden la vista y la mitad de ellos muere (OMS), los investigadores Ingo Potrykus y Peter Beyer desarrollaron el arroz dorado, plantas genéticamente modificadas con dos genes, uno proveniente de maíz (*psy-plant phytoene synthase*) y uno de la bacteria *Erwinia uredovora* (*crt I- phytoene desaturase*), obteniendo granos enriquecidos en beta caroteno (provitamina A) (Paine *et al.*, 2005). Por otro lado se encuentra el caso de la papaya, el principal limitante del cultivo es el virus de la mancha anular. En la Universidad de Hawai se desarrollaron plantas transgénicas, con la expresión de un gen de la proteína de la cápside del virus (Fitch *et al.*, 1992; Tennant *et al.*, 1994), mediante ARN de doble cadena (de interferencia) generando silenciamiento postranscripcional (Chiang *et al.*,

2001). Otro ejemplo destacado es el algodón transgénico Bt, estas plantas están provistas de genes aislados de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, que codifican para proteínas “cry”, que son tóxicas para larvas de algunos insectos que atacan el cultivo. Su uso es benigno para los humanos (Roh *et al.*, 2007) y reduce drásticamente el uso de insecticidas (Lu *et al.*, 2012).

Transformación en yuca

El primer reporte de yuca transgénica se presentó en 1996, por dos grupos, uno del laboratorio de I. Potrykus en el Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (ETH Zurich) y el otro en el grupo de Claude Fauquet (Laboratory Scripps Research) (Li *et al.*, 1996; Schöpke *et al.*, 1996). Desde entonces se han desarrollado diferentes sistemas de transformación genética. Uno de ellos consiste en la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de cotiledones de embriones somáticos maduros producidos a partir de lóbulos de hojas jóvenes provenientes de plantas *in-vitro*, las cuales se regeneran bajo selección por medio de organogénesis (Li *et al.*, 1996). Otro método empleado es utilizar suspensiones de callo embriogénico friable (CEF) que son transformadas por medio de biobalística, cuya regeneración se realizó mediante embriogénesis somática (Taylor *et al.*, 1996; Schöpke *et al.*, 1996). Algunas de las desventajas de la técnica por bombardeo, es que la eficiencia de transformación es mucho menor que la de *A. tumefaciens* y adicionalmente es más costoso. La transformación por *A. tumefaciens* permite transferir sólo uno o un número reducido de copias del fragmento de ADN de interés (Shibata & Liu, 2000; Gelvin, 2003). El CEF es el tejido preferido para realizar las transformaciones, ya que éste reduce el riesgo de generar plantas quiméricas, comparados con el empleo de tejidos organizados como los cotiledones

La transformación genética de plantas de yuca presenta limitaciones, por ejemplo la inducción de CEF depende fuertemente del genotipo (Liu *et al.*, 2001). Lo mismo ocurre con los procesos de embriogénesis somática y regeneración los cuales son variedad-dependientes. En consecuencia la transformación sólo ha sido exitosa en variedades específicas como 60444 (Raemakers *et al.*, 2001). Se ha encontrado que los meristemas axilares y apicales son capaces de producir de forma eficiente embriones somáticos (Medero *et al.*, 2000). Recientemente Ochoa *et al.* (2012) reportan exitosamente la

inducción de embriones somáticos y la regeneración de plantas en dos variedades de yuca (SG107-35 y BRA685) mediante el empleo de picloram.

Todo el proceso desde la inducción del CEF hasta la regeneración de las plantas ha sido optimizado (Bull *et al.*, 2009). En términos generales el proceso inicia a partir de yemas axilares, las cuales producen estructuras embrionarias que se convierten en CEF pro-embriogénico, por cultivos sucesivos en medio con sales GD (Gresshof & Doy). Este CEF se cocultiva con *A. tumefaciens*, luego las colonias putativas de CEF transgénico se transfieren a medio con un antibiótico amino glucósido y se prosigue con la regeneración de embriones en estado de cotiledones inmaduros para finalmente regenerar las plantas en medio suplementado con BAP (6-Benzylaminopurine).

Muchos proyectos de generación de yuca transgénicas se han venido desarrollando (Taylor *et al.*, 2012). Entre los objetivos de mejoramiento por esta estrategia están la tolerancia a herbicidas (Sarria *et al.*, 1995; 2000), la reducción de compuestos cianogénicos (Siritunga *et al.*, 2004; Jørgensen *et al.*, 2005), cantidad y calidad de almidón (Raemakers *et al.*, 2005; Ihemere *et al.*, 2006), incremento en el contenido de carotenoides en la raíz (Chavarriaga *et al.*, 2009). Así mismo se ha empleado el silenciamiento de genes específicos mediante ARN de interferencia (Jørgensen *et al.*, 2005), para resistencia ante Virus del mosaico africano (ACMV) (Chellappan *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Vanderschuren *et al.*, 2007a, 2009), para el incremento del contenido de proteína (Abhary *et al.*, 2011) y para mejorar la resistencia al virus del estriado marrón de la yuca (CBSD) (Yadav *et al.*, 2011). La posibilidad de transformar plantas de yuca, abre una gran variedad de usos potenciales en el mejoramiento de cualidades agrícolas y sanitarias, entre ellos generar plantas transgénicas que expresen genes de interés para lograr la resistencia a la bacteriosis vascular.

Considerando que la yuca es un producto fundamental para la seguridad alimentaria y con un amplio rango de aplicaciones industriales es necesario reducir o limitar las pérdidas que se pueden ocasionar en la producción por enfermedades como la bacteriosis vascular. Sólo un enfoque multidisciplinario y empleando diferentes aproximaciones hará posible desarrollar variedades resistentes a esta enfermedad. Una de las aproximaciones en las que se ha venido trabajando fuertemente en los últimos años es la identificación de genes de resistencia. Fruto de estos esfuerzos es la

identificación de un gen de resistencia candidato denominado *RXam1*. El objetivo del presente trabajo es validar la función de este gen candidato, empleando diferentes aproximaciones de biología molecular y transformación. El documento de tesis está estructurado bajo la forma de tres artículos correspondiente a tres capítulos. En el primero se presenta la sobreexpresión de *RXam1* en plantas de yuca de la variedad 60444, modelo de transformación y susceptible a la bacteriosis vascular. En el segundo capítulo se describe la caracterización de plantas de arroz transformadas con el gen *RXam1* en la cual se emplea un sistema heterólogo para validar la función del gen de yuca. Finalmente el tercer capítulo presenta los esfuerzos por identificar y caracterizar genes *PR* en yuca como marcadores de la activación de la inmunidad en yuca.

1 Sobreexpresión del gen *RXam1* en yuca en la variedad modelo cv 60444

1.1 Introducción

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) constituye la base de la alimentación para más de 1000 millones de personas en el mundo y es cultivada en 105 países (FAO, 2013). Su cultivo se realiza principalmente en tierras bajas del trópico. Este alimento proporciona hasta un tercio de las calorías diarias necesarias para la población humana de países tropicales, posicionándose como uno de los cultivos más importantes para la seguridad alimentaria, al lado del maíz y el arroz (FAO, 2008).

La bacteriosis vascular o añublo bacteriano, ocasionada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) es una de las enfermedades más importantes de este cultivo, ya que puede producir pérdidas en la producción que van del 12% al 100% después de tres ciclos de producción (Lozano, 1986). Los métodos de control utilizados consisten en cultivar variedades resistentes, y la propagación por siembra de estacas provenientes de plantas sanas. La mayoría de variedades resistentes no tienen características de interés agro-económico, ni se encuentran adaptadas a las zonas agro-ecológicas específicas donde la yuca se siembra (Restrepo *et al.*, 2004; Verdier, 2002).

El objetivo de un programa de mejoramiento genético en yuca frente a la bacteriosis vascular es desarrollar variedades con un amplio rango de resistencia a diferentes cepas de *Xam*. Esto puede lograrse explotando los mecanismos naturales que las plantas han desarrollado para defenderse de los patógenos. Clásicamente, se considera que existen dos ramas de inmunidad en plantas, según el tipo de moléculas que sean reconocidas.

La primera es la *MTI* (*MAMP triggered Immunity*, inmunidad activada por MAMPs) la cual depende del reconocimiento de *MAMPs* (*microbial associated molecular patterns*, patrones moleculares asociados a microbios) los cuales son reconocidos por *PRRs* (*pattern recognition receptors*, receptores de reconocimiento de patrones). La segunda rama depende del reconocimiento de proteínas específicas de patógenos adaptados denominadas efectores, por parte de proteínas de resistencia (*R*) (Dodds & Rathjen, 2010). Estudios recientes han mostrado que la transferencia de *PRRs* genera resistencia bacteriana de amplio espectro (Lacombe *et al.*, 2010). La transferencia del receptor *EFR* de *Arabidopsis thaliana* a plantas de *Nicotiana benthamiana* (tabaco) y *Solanum lycopersicum* (tomate) incrementó la resistencia a diversas especies bacterianas fitopatógenas entre las que se encuentran *Xanthomonas perforans*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Lacombe *et al.*, 2010). También se han reportado algunos casos de transferencia exitosa de genes *R* entre especies, como el caso de plantas transgénicas de tomate, que sobreexpresan el gen *R* de *Capsicum spp.* (pimienta), *Bs2*, aumentaron la resistencia a *Xanthomonas campestris* (Horvath *et al.*, 2012). Recientemente Narusaka *et al.* (2013) transfirieron *RPS4* y *RRS1* de *A. thaliana* a tomate y tabaco logrando conferir resistencia a múltiples patógenos. Sin embargo para generar una resistencia durable y de amplio espectro será necesario combinar tanto genes *R* como *PRRs*, simultáneamente dentro de la misma variedad.

Hasta el momento no se ha identificado ningún gen involucrado en la resistencia a la bacteriosis vascular. Resultados preliminares del grupo de investigación Manihot Biotec han permitido identificar dos posibles genes involucrados en la resistencia a la bacteriosis vascular, llamados *RXam1* y *RXam2* (Contreras & López, 2008). La amplificación por *PCR* empleando cebadores diseñados a partir del gen *Xa21* de arroz permitió obtener un amplicón que fue empleado como marcador molecular y permitió ser mapeado en el mapa genético de yuca, el cual colocalizaba con un *QTL* que explica el 13% de la resistencia ante la cepa de *X. axonopodis* CIO136 (Jorge *et al.*, 2000). Posteriores estudios empleando el amplicón obtenido como sonda sobre una librería BAC permitieron obtener la secuencia completa del gen *RXam1* de la variedad TMS30001 (empleada en la construcción del BAC). Con la reciente liberación del genoma de yuca (<http://www.phytozome.net/cassava.php/>) se pudo corroborar la secuencia del gen. *RXam1* codifica para una proteína con *LRR* (*Leucine-rich repeat*, repeticiones ricas en leucina) en su extremo N-terminal y con un dominio serina-treonina-quinasa

citoplasmático. La proteína *RXam1* de yuca presenta 43% de identidad y un 59% de similitud a la proteína *XA21* de arroz que confiere resistencia a *Xanthomonas oryzae*. Se ha sugerido que la proteína *XA21* podría reconocer alguna molécula conservada del patógeno. Inicialmente se consideró que esta molécula era un pequeño péptido sulfatado denominado *Ax21* (Lee *et al.*, 2009), pero esto se ha refutado recientemente (Shuguo *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Estudios recientes han permitido concluir que *Ax21* no es el activador de la inmunidad mediada por *Xa21* (Bahar *et al.*, 2014).

Actualmente se cuenta con la secuencia completa de *RXam1* y *RXam2* y se han realizado estudios funcionales en estos genes para evaluar su papel en la resistencia a la bacteriosis vascular (López & Bernal, 2012). Pequeños fragmentos de *RXam1* y *RXam2* fueron clonados en el vector *pHellsgate12*, el cual permite la inserción de fragmentos en orientación sentido y antisentido, con el objetivo de silenciar los genes. Plantas de la variedad 60444 se transformaron independientemente con estos constructos, pero sólo se generaron líneas transgénicas para *RXam2*. Empleando *RXam1* no se logró la regeneración de embriones, posiblemente por el silenciamiento de otros genes de tipo *RLK* implicados en el desarrollo (Ochoa, 2011). De esta manera no ha sido posible la validación funcional del gen *RXam1*.

Como una vía alternativa para validar la función de *RXam1* en la inmunidad de yuca se plantea la posibilidad de sobreexpresar el gen y evaluar si se observa un incremento en la resistencia a la bacteriosis vascular. Para ello, el gen *RXam1* se amplificó a partir de la variedad resistente *CM6438-14*, utilizando la enzima *Taq Polimerase High Fidelity Platinum®* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y se clonó en el vector *pCR2.1* (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), utilizando cebadores con sitios de corte para las enzimas de restricción *KpnI* y *BamHI* (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). El inserto se confirmó por *PCR* de colonia y secuenciación (Gómez, 2012). En este trabajo se realizó una construcción conteniendo el gen *RXam1* bajo el control del promotor *35S* en el vector binario *pCAMBIA1305.2* y se empleó para transformar plantas de yuca de la variedad 60444 altamente susceptible a diferentes cepas de *Xam*.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Elaboración de los constructos

1.2.1.1 PCR

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 10 μ L, a una concentración de 0.4 mM de dNTPs, 0.2 mM de cada cebador, 0.25 U de DreamTaq™ DNA polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y 1X de DreamTaq™ Buffer, sobre 50 ng de ADN molde. Los ciclos de temperatura empleados fueron de 93°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de amplificación: 93 °C por 30 s; 30 s de anillamiento a la temperatura específica de los cebadores empleados y 72 °C por un tiempo variable de acuerdo al tamaño del amplicón (Tabla 1 1) y un ciclo final de extensión de 72 °C por 5 min seguido por un ciclo de enfriamiento de 12 °C por 5 min. Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en buffer TAE 0.5 X. Se empleó el marcador de peso molecular 1kb Plus Ladder como referencia (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

1.2.1.2 Bacterias y vectores

Las cepas utilizadas en este estudio fueron células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH10B™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), las cuales fueron cultivadas en medio LB ([Anexo A](#)) a 37°C por 12 horas; y células de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1, conteniendo el plásmido pEHA105 (pTiBo542 Δ T-DNA), cultivadas en medio YEP-agar o YEP ([Anexo A](#)) con carbenicilina a 100 μ g/mL a 28 °C. El vector binario empleado fue pCAMBIA1305.2 (Número de acceso GenBank: AF354046.1; región 2158..2410) (CAMBIA, Canberra, Australia), el cual posee el gen *hptII* b de selección para resistencia a higromicina y el gen reportero *GUSPlus* en el T-DNA, cada uno bajo el control del promotor *CaMV35S* (35S cauliflower mosaic virus promoter). También se empleó el vector de clonación pCR® 2.1-TOPO® TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Tabla 1-1 Cebadores usados para la construcción de pCAMBIA1305.2 35S::*RXam1*::NOS

Cebador	Secuencia (5' - 3')	Descripción
194	CAAGAGGAATTTGGCTAG	Rv2_Int de <i>RXam1</i>
195	GTAGAGCTCGGCTTGCTA	Fw2_Int de <i>RXam1</i>
196	CTTATAGAGATCTCTATA	Rv3_Int de <i>RXam1</i>
197	GGAATAAACTTGGAGGGG	Fw3_Int de <i>RXam1</i>
198	GCACCCGGGTCTCTGAATCATTACCTGCTGTC	Rv_Final de <i>RXam1</i>
199	GCAGGATCCATGGGGTGTGGATGCTTC	Fw_Inicio de <i>RXam1</i>
659	GCAGGTACCATGGGGTGTGGATGCTTCTG	Fw_ <i>Rxam1</i> _KpnI
660	TGCGGATCCCTTAGGTGTAGATTTTC	Rv_ <i>Rxam1</i> _BamHI
661	GCAGAATTCTCAACATGGTGGAGCAC	Fw_35S_EcoRI
662	TGCGAGCTCGTCCCCGGTGTCTCTCC	Rv_35S_SacI
837	GCAGGATCCCGTTCAAACATTTGGC	Fw_Nost_BamHI
838	TGCGTCGACCCCGATCTAGTAACATAG	Rv_Nost_Sall
881	GCTGAATTGCCAGCAAACAGGATG	Fw_Final de <i>Rxam1</i>

1.2.1.3 Estrategia de construcción

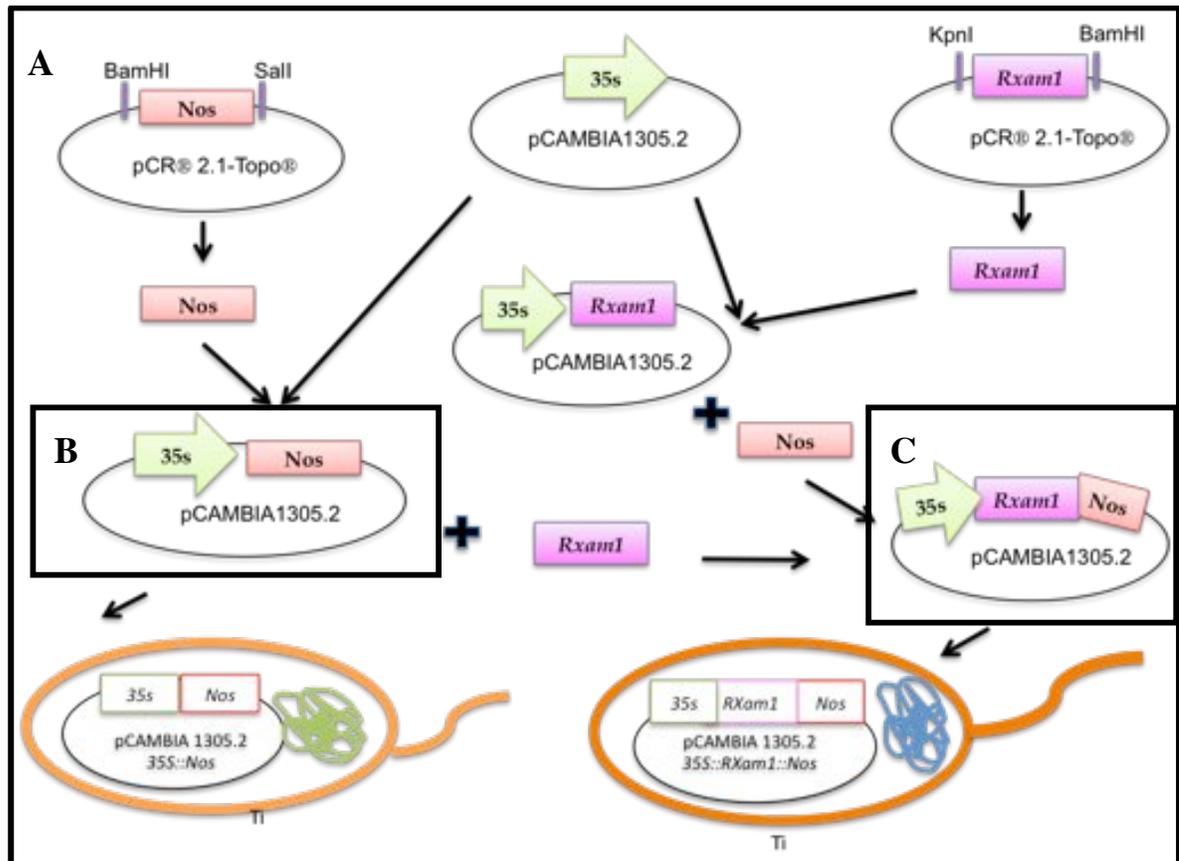
Para obtener el constructo 35S::*RXam1*::NOS (pC-35S::*RXam1*::NOS) en el vector pCAMBIA1305.2 se utilizaron los constructos previamente verificados y secuenciados (Gómez, 2012): pCAMBIA1305.2 35S (pC-35S) clon 3, pCR2.1::*RXam1* clon 7 y pCR2.1::NOS clon 12 (terminador NOS, nopaline synthase) previamente clonado en el grupo a partir del terminador NOS del gen GUS del vector pCAMBIA1305.2. A partir de los cultivos de *E. coli* que contenían los plásmidos verificados, se realizaron minipreps con el kit GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). Para el plásmido pCR2.1::*RXam1* se realizó una digestión sencilla con *Bam*HI, se eluyó la banda (plásmido linealizado) con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega). Posteriormente se realizó la segunda digestión a partir del plásmido digerido y limpiado con *Kpn*I, de la cual se obtuvo la liberación completa del gen *RXam1*. Paralelamente el plásmido pCR2.1::NOS se digirió con *Bam*HI/*Sall*, se eluyó la banda correspondiente al NOS. El plásmido pC-35S se digirió con *Bam*HI/*Kpn*I y *Bam*HI/*Sall*, los plásmidos linealizados se eluyeron y se ligaron empleando la T4 DNA ligase (Fermentas) con *RXam1* y NOS respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos generados fueron pCAMBIA1305.2 35S::*RXam1* (pC-35S::*RXam1*) y pCAMBIA1305.2 35S::NOS (pC-35S::NOS), este último es el constructo que se utilizó como control negativo, (Figura 1-1 B).

1.2.1.4 Electroporación de *E. coli*

La transformación de las células competentes se realizó en un electroporador *Micropulser* 165-2100 marca Biorad®. En una cubeta de electroporación (0.1 cm de separación) se mezclaron 20 μ L de células competentes de *E. coli* (DH10B) y 1 μ L de la reacción de ligación (pC-35S::*RXam1* o pC-35S::*NOS*), se sometieron a un voltaje de 2.5 kV durante 5 ms e inmediatamente se resuspendieron en 800 μ L de medio LB ([Anexo A](#)) sin antibiótico, a 37 °C durante 1 hora, con agitación. Finalmente las células se sembraron en medio LB ([Anexo A](#)) con kanamicina (50 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C por 14 horas.

Figura 1-1 Estrategia de elaboración de los constructos.

[A] A partir de los constructos pC-35S, pCR2.1-NOS y pCR2.1-*RXam1* se realizaron una serie de digestiones y ligaciones para obtener los constructos finales. [B] El constructo control pC-35s::*NOS* se obtiene al digerir pCR2.1-NOS y pC-35S con BamHI/Sall. [C] El constructo de interés pC-35S::*RXam1*::*NOS* se obtiene a partir del constructo pC-35S::*NOS* ligado con *RXam1* o a partir de pC-35S::*RXam1* ligado con *NOS*.



1.2.1.5 Constructo final

A partir de las colonias positivas se realizó el miniprep de estas. Los plásmidos pC-35S::RXam1 y pC-35S::NOS se digirieron con KpnI/BamHI y BamHI/Sall respectivamente. Las bandas se eluyeron y se ligaron de la siguiente forma: el plásmido linearizado pC-35S::NOS con RXam1 y el plásmido linearizado pC-35S::RXam1 con NOS (Figura 1 1 C). La ligación se llevó a cabo empleando la T4-DNA-ligasa siguiendo las recomendaciones del fabricante (Fermentas). La transformación, selección de colonias, verificación por PCR y minipreps se llevó a cabo como se describió previamente. Los clones positivos se secuenciaron empleando los cebadores 739, 740, 659, 195, 194 y 660 (Tabla 1 1). Se realizó miniprep de las colonias positivas y se confirmó la presencia del inserto por secuenciación (Macrogen, Seoul - Korea) y con una de ellas se realizó la electroporación en *A. tumefaciens* (ver más adelante).

1.2.2 Transformación en plantas de yuca

1.2.2.1 Material vegetal

Plantas *in vitro* de la variedad 60444 se propagaron por segmentos nodales en medio CBM ([Anexo A](#)) su crecimiento se realizó en una cámara de crecimiento marca Sanyo MLR 351H, a 28 °C, con un fotoperiodo alternando 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (12/12).

1.2.2.2 Embriogénesis somática

La embriogénesis primaria se realizó a partir de yemas axilares, las cuales se transfirieron a medio MS2-50pi ([Anexo A](#)) y se incubaron a 28 °C por 26 días en oscuridad. Posterior a la embriogénesis primaria se realizó una embriogénesis cíclica en medio MS2-50pi ([Anexo A](#)) endurecido con goma gellan (Gelrite™) 0.2% partiendo de los embriones somáticos obtenidos en la embriogénesis primaria. Los embriones se incubaron por 30 días a 28 °C en oscuridad (Taylor *et al.*, 1996).

1.2.2.3 Producción de callo embriogénico friable (CEF)

Se aislaron embriones globulares cortados en fragmentos, se transfirieron a medio GD2-50pi ([Anexo A](#)) por 45 días a 28 °C en oscuridad. A partir de las agrupaciones celulares obtenidas se realizó el aislamiento de callo embriogénico (CEF) en medio GD2-50pi ([Anexo A](#)). El medio se renovó cada 22 días, manteniéndose a 28 °C con un fotoperiodo 12/12 (Taylor *et al.*, 1996).

1.2.2.4 Transformación de CEF de 60444 por medio de *Agrobacterium tumefaciens*

- **Células competentes de *Agrobacterium tumefaciens***

El protocolo seguido fue modificado a partir del reportado por Jaimes (2005). Inicialmente, se realizó un crecimiento de *A. tumefaciens* cepa AGL1 por agotamiento en medio LB ([Anexo A](#)). El cultivo se mantuvo incubado durante 18 horas en oscuridad. A partir de una colonia aislada se realizó un precultivo en 2 mL de medio YEP ([Anexo A](#)) y se mantuvo incubado a 28 °C, con agitación a 230 rpm, en oscuridad.

Del precultivo realizado se tomó 0.1 mL y se inocularon dos matraces Erlenmeyer con 150 mL de medio YEP. El cultivo se incubó a 28 °C con agitación a 250 rpm, en oscuridad. Periódicamente se monitoreó el cultivo hasta que alcanzó una densidad óptica OD a 600nm (OD₆₀₀) de 0.9. Una vez alcanzada la densidad óptica se transfirió el cultivo a seis tubos de centrifuga de 50 mL, previamente enfriados, y se centrifugó a 3000 x g por 10 min, a 4 °C. El medio se descartó y las células se resuspendieron en 50 mL de glicerol 10% (v/v) frío. La suspensión celular se centrifugó de nuevo a 3000 x g por 10 min, a 4 °C, las células se resuspendieron en 20 mL de glicerol 10% y se juntó el contenido de dos tubos en uno solo. El cultivo se lavó dos veces más con glicerol 10% y finalmente los precipitados celulares se resuspendieron en 0.25 mL de sorbitol 1 M. Las células obtenidas se dispensaron en alícuotas de 25 µL y se almacenaron a -80 °C.

1.2.2.5 Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de las células competentes se realizó en un electroporador *Micropulser* 165-2100 de Biorad®. En una cubeta de electroporación (0.1 cm de

separación) se mezclaron 50 μ L de células competentes de *A. tumefaciens* de la cepa AGL1 y 0.5 μ L del plásmido diluido 1:100 de pCAMBIA1305.2 35S::*RXam1*::NOS, luego se sometieron a un pulso (voltaje de 2.5 kV durante 5 ms) e inmediatamente se resuspendieron en 300 μ L de medio LB líquido ([Anexo A](#)) sin antibiótico, a 28 °C durante 2 horas, con agitación. Finalmente, las células se sembraron en medio LB ([Anexo A](#)) con carbenicilina 100 μ g/mL y kanamicina 50 μ g/mL, se dejaron a 28 °C por dos días. Este procedimiento se realizó también para el vector control pC-35S::NOS (plásmido pCAMBIA1305.2 35S::NOS).

- **Co-cultivo de CEF de yuca con *Agrobacterium tumefaciens***

Para el crecimiento de *A. tumefaciens* se tomaron colonias aisladas en placas de LB suplementado con 100 mg/L de carbenicilina y 50 mg/L de kanamicina para la cepa AGL1. Se realizó un precultivo en 5 mL de medio LB ([Anexo A](#)) con sus respectivos antibióticos de selección un día antes de la transformación a 30 °C con una agitación de 250 rpm. Posteriormente, se tomaron 3 mL del precultivo y se agregaron a 150 mL de medio LB (con antibiótico) en un frasco de 500 mL. El cultivo se mantuvo en oscuridad y agitación constante a 30 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5. Una vez alcanzada la densidad óptica, se realizó una pre-inducción con acetosiringona a una concentración de 200 μ M durante 3 horas y/o hasta una OD₆₀₀ de 0.8 -1.0. Se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min y se resuspendió en dos volúmenes de medio de inducción con acetosiringona a una concentración de 100 μ M durante 16 horas o hasta que se alcanzó una OD₆₀₀ entre 0.8 y 1.0. A continuación se centrifugó el cultivo a 6000 rpm por 10 min, se descartó el medio y se resuspendieron las bacterias en 25 mL de medio GD2-50pi líquido ([Anexo A](#)) suplementado con acetosiringona 200 μ M.

El CEF se dispuso en agrupaciones de 1 – 1.5 cm de diámetro en cajas con medio GD2-50pi ([Anexo A](#)) suplementados con acetosiringona 200 μ M, se adicionaron 40 μ L de la solución bacteriana a cada agrupación de CEF, se mezcló suavemente con pinzas y el co-cultivo se dejó por tres días a 26 °C en oscuridad. Una vez cumplido el tiempo de co-cultivo se transfirió el CEF infectado a frascos de compota que contenían 10 mL de medio GD2-50pi líquido suplementado con cefotaxima 500 mg/L. Posteriormente se realizaron tres lavados con el mismo medio hasta que se observó que este estaba totalmente transparente, como indicativo de que la bacteria estaba controlada. El régimen

de lavados se mantuvo diariamente sobre el CEF en suspensión durante 5 días consecutivos, hasta que la suspensión de callo se encontró macroscópicamente limpia de bacterias con el fin de iniciar con el proceso de selección y regeneración. Finalmente el CEF transformado se colocó formando agrupaciones, sobre placas de medio GD2-50pi suplementado con cefotaxima 500 mg/L e higromicina 2.5 mg/L, como agente de selección de CEF transgénico y se incubaron a 28°C con un fotoperiodo 12/12. Como controles de las transformaciones se sembró CEF de cada línea en medio con GD2-50pi con cefotaxima 500 mg/L e higromicina 2.5 mg/L y sin selección (higromicina) y se subcultivaron paralelamente al CEF transformado.

- **Selección y regeneración de plantas transgénicas**

Para la selección y proliferación del CEF transgénico, luego de tres semanas el CEF transformado se subcultivó en medio GD2-50pi suplementado con cefotaxima 500 mg/L e higromicina 5 mg/L. Pasadas tres semanas se realizó un subcultivo del CEF transformado, se transfirió a medio GD2-50pi suplementado con cefotaxima 500 mg/L e higromicina 7.5 mg/L. Finalmente, se realizó un subcultivo del CEF transformado, se transfirió a medio GD2-50pi suplementado con cefotaxima 500 mg/L e higromicina 10 mg/L. A los dos meses el CEF se subcultivó a un medio MBI suplementado con higromicina 15 mg/L durante cuatro meses.

Los embriones maduros se transfirieron a medio MS2-0.5 C.A ([Anexo A](#)), con el fin de inducir su germinación. Los embriones se mantuvieron incubados alrededor de 6 semanas, hasta que se observó la formación del meristemo apical del tallo y subsecuentemente de las partes aéreas de la planta. Los ápices observados se transfirieron finalmente a medio MSN ([Anexo A](#)) para estimular enraizamiento.

- **Coloración GUS**

Con el fin de caracterizar las plantas transgénicas se empleó la tinción histoquímica de GUS (Jefferson *et al.*, 1987). El gen reportero *GUSPlus-His6*, (presente en el plásmido pCAMBIA1305.2) codifica para la enzima β -glucuronidasa, cuando esta enzima se encuentra presente en los tejidos y es incubada en presencia del *buffer* que contiene el

sustrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónido), se produce una coloración azul en el tejido que expresa activamente esta proteína. Es decir, el tejido transgénico presenta coloración azul.

Se preparó el *buffer* GUS (Tabla 1-2) en alícuotas de 50 mL, a cada una de ellas se le adicionó 25 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (X-Glucuro CHA Salt; INALCO SPA, Milano, Italy) disuelto en 200 μ L de DMSO hasta homogenización. En placas de 96 pozos, se cortaron pequeños fragmentos de las plantas transgénicas regenerantes, tanto de hoja como de tallo, no superior a 5 mm, a este tejido se le añadió 100 μ L *buffer* GUS, de tal manera que la solución cubriera la totalidad del tejido. La placa se mantuvo a 37 °C por 12-24 horas.

Tabla 1-2 Composición *Buffer* GUS

Reactivo	Cantidad	Concentración final
NaH ₂ PO ₄	6 g	6 g/L
EDTA Na ₂	3.72 g	3.72 g/L (10 mM)
K ₄ Fe(CN) ₆	0.21 g	0.21 g/L (0.5 mM)
K ₃ Fe(CN) ₆	0.164 g	0.164 g/l (0.5 mM)
Triton X-100	1 mL	0.1% (v/v)
Na ₂ HPO ₄	Aproximadamente 40 g hasta llegar a pH 7.4	≈40 g/L (3.2 g/50 mL aprox)
Agua estéril tipo MQ-	Completar volumen a 800 mL	
Metanol	140 mL	14% (v/v)
Volumen final de solución 1000 mL.		

1.2.3 Caracterización molecular de plantas transgénicas

1.2.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN de yuca para PCR y Southern blot se realizó a partir de hojas frescas de plantas mantenidas es condiciones *in vitro* maceradas en nitrógeno líquido. El *buffer* de extracción utilizado se compone de TRIS-HCl 0.1 M pH 8.0, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM pH 8.0, polietilenglicol 6000 1%, NaHSO₄ 0.5% y MATAB 2%. Posteriormente el ADN fue purificado con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 y precipitado con isopropanol (Coca *et al.*, 2004). La concentración de ADN obtenida fue cuantificada con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 Thermo Scientific® mediante la medición de absorbancia a 260 y 280 nm.

1.2.3.2 PCR

Las plantas transgénicas mantenidas *in vitro* se evaluaron por medio de PCR del gen marcador de selección *HptII* y se verificó la presencia del inserto amplificando una sección del fragmento del gen *RXam1* utilizando cebadores que incluyen la secuencia del vector. El procedimiento fue similar al descrito anteriormente.

1.2.3.3 Southern blot.

El Southern blot fue realizado mediante la digestión de 12.5 µg de ADN de plantas de yuca con la enzima de restricción *KpnI* a 5 U/µg de ADN. La digestión se corrió en un gel de agarosa al 0.8% a 75 V por 4 horas. El protocolo para la realización del montaje y la transferencia se realizó tal como se describe en Roche (2000). Para realizar la síntesis de la sonda marcada con digoxigenina se utilizó el kit DIG PCR probe synthesis kit (Roche, Mannheim, Germany) de acuerdo con las indicaciones del fabricante y con los cebadores mencionados en la Tabla 3-1 para el gen *hptII* y empleando como molde el plásmido pC 35S::*RXam1*::NOS. La hibridación y detección de la luminiscencia se realizó con el kit DIG Luminescent Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Roche, 2000).

1.2.3.4 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se colectaron hojas de plantas transgénicas *In vitro* inmediatamente se almacenaron en nitrógeno líquido, luego se maceraron, para la extracción de ARN total el buffer de extracción utilizado contenía acetato de sodio pH 5.2 100 mM, EDTA pH 7.5 1 mM y SDS 4%. Posteriormente se realizó purificación con fenol ácido (pH 4.5): cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1 y se precipitó con isopropanol, luego se lavó el ARN con etanol y se resuspendió en agua libre de nucleasas. Finalmente el ARN se purificó al realizar el proceso de extracción con INVITRAP® SPIN UNIVERSAL RNA MINI KIT (Stratec biomedical), siguiendo el procedimiento recomendado por la casa comercial.

Previo a la realización de la síntesis de ADNc se realizó tratamiento con ADNasa con el fin de garantizar la total ausencia de ADN genómico. El tratamiento enzimático se realizó

sobre 300 ng -500 ng de ARN total y se usó la enzima ADNasa I libre de ARNasas (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA,USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Posterior al tratamiento se realizó un PCR del gen tubulina sobre el ARN como control de calidad del tratamiento enzimático. La síntesis de primera cadena de ADN se realizó con el kit First Strand cDNA synthesis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a partir del ARN total tratado con ADNasa I y cebadores oligo-dT₍₁₈₎, de acuerdo al protocolo recomendado por la casa comercial.

1.2.3.5 Análisis de la expresión de *RXam1* por PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron usando el cDNA puro, una concentración final de 500nM para cada cebador específico (ver Tabla 1-3) , SSoFast™ Evagreen® supermix 1X (Bio-Rad). La reacción de PCR se realizó en platos de reacción de 384 pozos, a 95°C por 30 seg, seguido de 40 ciclos de denaturación a 95°C/5 s, anillamiento a 56°C/5 s y extensión a 65°C/5 s. La curva de disociación se realizó al finalizar la amplificación, con intervalos de 0,5°C (desde 65-95°C) por 5 s, se analizó para verificar la especificidad de cada reacción de amplificación. Las corridas de PCR en tiempo real se realizaron en un equipo CFX384 (Bio-Rad), el software CFX Manager™ v3.1 Upgrade (Bio-Rad) fue usado para extraer los valores de Ct usando el cálculo de la segunda derivada y se empleó la formula [1] para calcular la eficiencia [E] de la reacción a partir de la curva estándar con cinco puntos de diluciones seriadas (tres réplicas), a partir de la ecuación de la regresión lineal se obtiene la pendiente. Para estimar los niveles de transcrito, se empleó el método de cuantificación, con corrección de la eficiencia de acuerdo a la ecuación de Pfaffl (2001) [2], donde la expresión relativa es calculada a partir de la eficiencia (E) y los valores Ct de una muestra versus su control. Se usaron las plantas transgénicas control como el calibrador (control) y el gen de tubulina (Tub) como normalizador.

$$E=10^{-1/\text{pendiente}} \quad [1]$$

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E_{RXam1})^{\Delta Ct_{RXam1}(\text{Control}-\text{muestra})}}{(E_{Tub})^{\Delta Ct_{Tub}(\text{Control}-\text{muestra})}} \quad [2]$$

Tabla 1-3 Cebadores para las reacciones de PCR en tiempo real

Gen	Nombre	Sequence (5' - 3')
RXam1	MB0077RXam1.Rw.RT	ACTGGTAGATGCAACCACTCCTCA
	MB0078RXam1.Fw.RT	TGGAGCAGCTAAGTCTTTCATGGC
Tubulina	MB1095_tub3ex_f	GGAAAGATGAGCACCAAGGA
	MB1096_tub3ex_r	ACCAGTATACCAGTGCAAGAAG

1.3 Resultados

1.3.1 Elaboración de los constructos

Para generar la construcción conteniendo el gen *RXam1* bajo el promotor 35S y el terminador NOS se partió de tres construcciones previamente elaboradas en el grupo: pCR2.1::*RXam1*, pCR2.1::*NOS* y pC-35S (clonado en el sitio de clonación múltiple MCS). El plásmido pC-35S fue digerido con *KpnI/BamHI* tal como se observa en la Figura 1-2 A, se obtuvo una banda de aproximadamente 12 kb la cual corresponde al plásmido linearizado, dejando los extremos cohesivos para ligar *RXam1*. Paralelamente se realizó el mismo procedimiento en este plásmido pero con las enzimas *BamHI/SalI*, para obtener el plásmido linearizado (Figura 1-2 A), dejando los extremos cohesivos para ligar el *NOS*. El plásmido pCR2.1-*NOS* fue digerido con *BamHI/SalI* para cortar y eluir el fragmento *NOS*, que como se observa en la Figura 1-2 B, tiene un tamaño esperado de 250 pb. A partir del fragmento *NOS* y el pC-35S linearizado (digerido con *BamHI/SalI*) se realizó la ligación, obteniendo así el constructo pC-35S::*NOS*, este es el plásmido control (Figura 1-1 B).

El plásmido pCR2.1::*RXam1* se digirió con la enzima de restricción *KpnI*, obteniéndose el plásmido linearizado. Esta banda se eluyó del gel para posteriormente realizar la segunda digestión con *BamHI*, ya que las dos enzimas poseen *buffers* incompatibles. El producto de esta segunda digestión permitió obtener una banda de tamaño esperado para *RXam1* (3181pb) (Figura 1-2 C), la cual se cortó y eluyó. Finalmente este producto purificado se empleó para realizar la ligación de los fragmentos pC-35S linearizado (Izquierda Figura 1-2 A) con *RXam1*, obteniendo así el constructo pC-35S::*RXam1*.

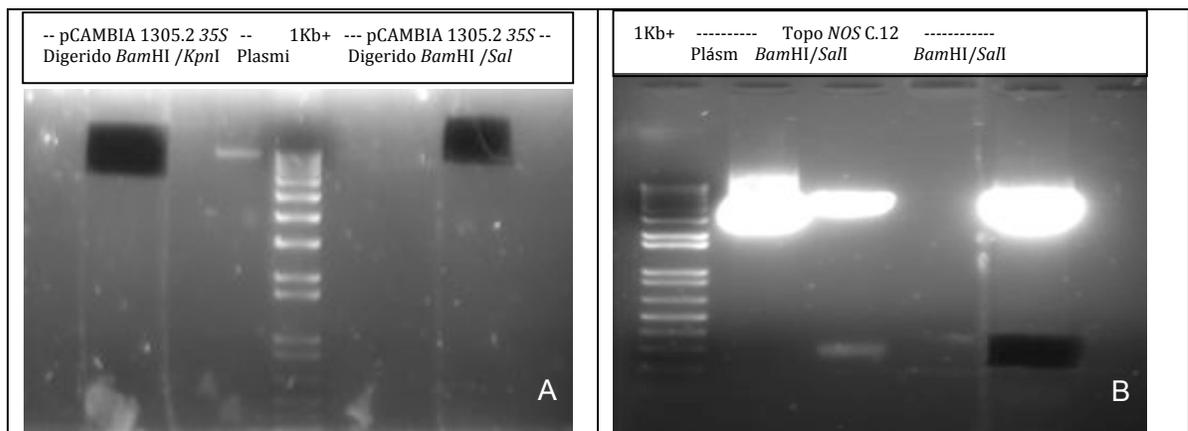
Constructo pCAMBIA1305.2 35S::*RXam1*::*NOS*

A partir de las construcciones pC-35S::*RXam1* y pC-35S::*NOS*, se realizaron las electroporaciones respectivas en *E. coli*. La PCR de colonia generó un amplicón del tamaño esperado (250 pb) para el constructo pC-35S::*NOS* en 22 de las 30 colonias a las que se aplicó, confirmando la presencia del inserto. Se seleccionaron cinco de ellas para realizar el miniprep y se enviaron a secuenciar dos de estos clones. Los resultados

de secuenciación confirmaron la correcta clonación de *NOS*. Un alineamiento con la secuencia obtenida mostró un 100% de identidad con la secuencia del gen sintasa de nopalina (*nopaline synthase*) reportada en el GenBank (Número de acceso AF354046.1; 2158..2410). Bacterias con este constructo (pC-35S::*NOS*) se emplearon como control (vector vacío) en los experimentos de transformación. Para pC-35S::*RXam1* se realizó el PCR para 30 colonias, dos de ellas presentaban el inserto que corresponde a un producto de PCR de aproximadamente 3200 pb (datos no se muestran). Estas dos colonias se seleccionaron para realizar el miniprep y se enviaron a secuenciar los dos clones. Los resultados de secuenciación permitieron verificar los insertos en la construcción. Las secuencias obtenidas son idénticas y presentan un 99% de identidad con la secuencia del gen *RXam1* disponible en el grupo, los cambios observados corresponden a polimorfismos que no afectan el marco abierto de lectura. Una vez confirmados estos constructos, se digirieron con *KpnI* y *BamHI* para liberar el gen *RXam1* de pC-35S::*RXam1* (Figura 1-2 D) y para linealizar el plásmido pC-35S::*NOS*. El plásmido linearizado (pC-35S::*NOS*) se ligó con el fragmento *RXam1*, obteniendo así el constructo final pC-35S::*RXam1*::*NOS*. En la Figura 1-3 se muestra el esquema general de la construcción, los insertos clonados en el MCS, con sus respectivas enzimas de restricción que permitieron la obtención del constructo.

Figura 1-2 Digestiones y eluciones de los constructos.

[A] El constructo pC-35S es linearizado con *BamHI/KpnI* y *BamHI/SalI*. **[B]** El *NOS* es liberado a partir del constructo pCR2.1-*NOS* a través de digestión enzimática con *BamHI/SalI*. **[C]** El fragmento correspondiente al gen *RXam1* se obtiene a partir de la digestión del constructo pCR2.1-*RXam1* empleando *BamHI/KpnI*. **[D]** A partir del constructo pC-35S::*RXam1* se obtiene *RXam1* mediante doble digestión con *KpnI/BamHI*.



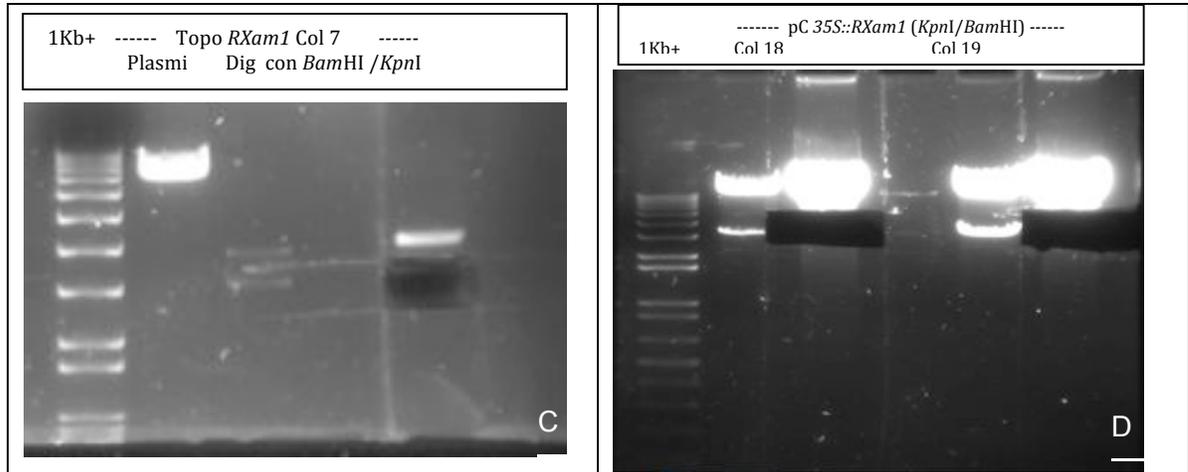
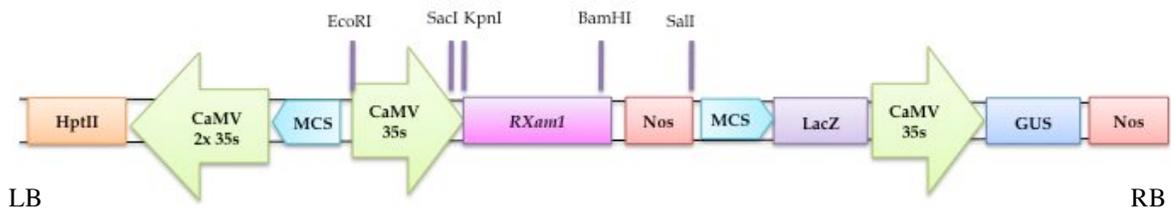


Figura 1-3 Esquema del constructo pCAMBIA1305.2 35S::RXam1::NOS.

Casete empleado en la transformación genética de yuca, para la sobreexpresión de *RXam1*. Se diagrama el ADN de transferencia, se indica la región (MCS) donde se clonan los insertos y las respectivas enzimas empleadas en la clonación. MCS: Sitio de clonación múltiple. LB: borde izquierdo. RB: borde derecho.



Se realizó una transformación mediante electroporación del constructo pC-35S::RXam1::NOS, en *E. coli* obteniendo un alto número de colonias (más de 120). La PCR de colonia confirmó la presencia del inserto en 59 de 60 colonias, de las cuales se seleccionaron dos para secuenciación. Las secuencias obtenidas permitieron identificar la presencia del promotor 35S en la posición adecuada, inmediatamente después se encuentra el gen *RXam1* sin ninguna mutación que afecte el marco de lectura y finalmente el terminador NOS en el extremo del casete.

Una vez confirmado el constructo en *E. coli*, se procedió con la electroporación en *A. tumefaciens*. Se emplearon dos cepas AGL1 y LBA4404; y dos constructos: pC-35S::RXam1::NOS y pC-35S::NOS (control de transformación sin inserto). Cada cepa se electroporó con los dos constructos. En ambos casos se obtuvo un alto número de colonias positivas por PCR (más de 30). Una colonia por cada construcción se empleó para crecimiento en líquido y en los experimentos de transformación.

1.3.2 Transformación en plantas de yuca

Las plantas de yuca de las variedades 60444 y COL2215 se propagaron *in vitro* siguiendo las metodologías estandarizadas en nuestro laboratorio (Figura 1-4 A). A partir del material vegetal se aislaron yemas axilares, se realizó la inducción del CEF logrando obtener suficiente CEF de cada una de ellas, el cual fue codificado como 60444L220612, 60444L200812 y COL2215L150612 (Figura 1-4 B), de acuerdo a la fecha en la que se comenzó la línea (L), es decir el aislamiento de las yemas axilares para iniciar la embriogénesis somática.

Aunque se obtuvieron transformantes de *A. tumefaciens* con los constructos pC-35S::RXam1::NOS y pC-35S::NOS, para las dos cepas (AGL1 y LBA4404), sólo se transformó el CEF con AGL1. Para realizar el cocultivo (Figura 1-4 C) la cepa AGL1 conteniendo el constructo pC-35S::NOS, se emplearon siete cajas con nueve agrupaciones de CEF (Figura 1-4 C -1cm diámetro) de L220612, dos cajas de L150612 y una de caja de L200812. Para pC-35S::RXam1::NOS se utilizaron seis cajas de L220612, dos cajas de L150612 y una de L200812. Una vez realizada la transformación se realizaron los respectivos lavados con el medio líquido con antibiótico, en agitación constante para retirar la bacteria (Figura 1-4 D).

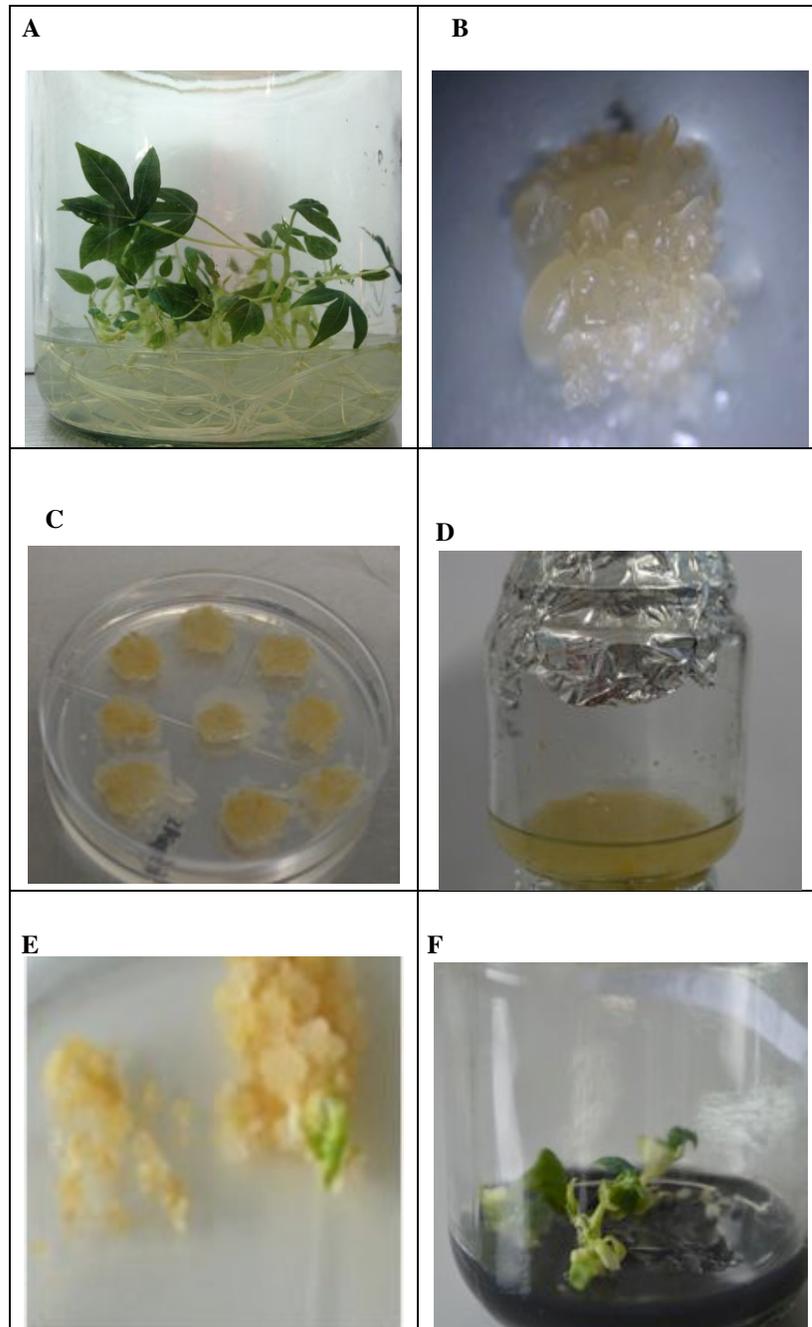
La transformación ha permitido la regeneración de embriones para la construcción pC-35S::NOS y esto sólo para las líneas de 60444. El CEF transformado con pC-35S::RXam1::NOS no proliferó, ni regeneró en ninguna de las dos variedades (60444 y COL2215). Actualmente se continúan obteniendo embriones (derecha Figura 1-4 E), en donde se observan algunos ápices que se encuentran en proceso de elongación (Figura 1-4 F).

De manera paralela se realizó otro evento de transformación en el CIAT, en la plataforma de transformación genética, siguiendo el protocolo propuesto por Taylor *et al* (2012) con algunas modificaciones ([Anexo B](#)), con las construcciones pC-35S::RXam1::NOS y pC-35S::NOS, empleando la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* pero utilizando solamente CEF de la variedad 60444. De esta transformación se obtuvieron embriones a partir de los cuales tras ocho meses se ha logrado obtener 19 líneas de plantas con la

construcción pC-35S::RXam1::NOS y 39 líneas de plantas con la construcción pC-35S::NOS.

Figura 1-4 Proceso de transformación del CEF

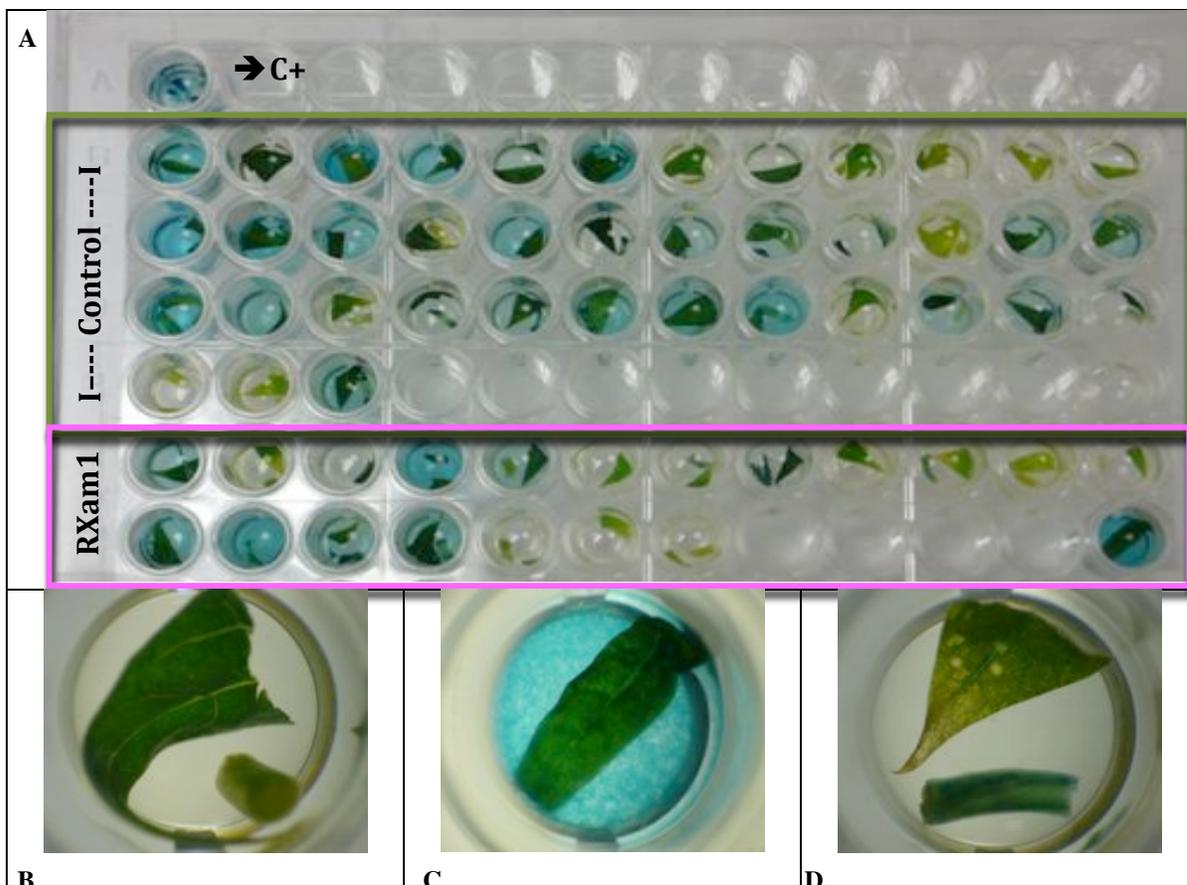
A partir de las yemas axilares de plantas *in vitro* [A], se inducen embriones somáticos de los cuales se obtiene el CEF [B]. El CEF se cocultiva con *A. tumefaciens* [C], luego se realizan lavados para eliminar el exceso de bacteria [D]. Al finalizar el proceso de selección con higromicina aparecen los primeros brotes [E], estos se pasan a medio de maduración y enraizamiento [F]. CEF: callo embriogénico friable



1.3.3 Coloración GUS

Figura 1-5 Ensayo de GUS en plantas transgénicas regenerantes.

[A] Fragmentos de hojas y tallos de las plantas con el constructo control (recuadro verde) y plantas con el constructo con *RXam1* (recuadro rosado). [B] Tejido no transgénico, sin coloración azul. [C] Tejido transgénico, coloración azul. [D] Tejido transgénico, coloración azul. C+: control positivo.



Para corroborar inicialmente y de manera preliminar la presencia de la construcción en las líneas de plantas regenerantes se realizó la prueba de coloración con el *buffer* GUS, sobre muestras de hojas y tallos de las plantas. Como se observa en la Figura 1-5 A los controles positivos los cuales corresponden a dos líneas de plantas transgénicas conteniendo el plásmido pCAMBIA1305.2 obtenidas previamente en la plataforma del CIAT se observa la coloración azul esperada como producto de la degradación del X-Gluc por la enzima β -glucuronidasa. En la placa se observan las diferentes líneas de plantas obtenidas en este estudio. En el bloque superior se encuentran las líneas de las plantas con el constructo control, pC-35S::NOS (NOS), donde se observan 7 de 39

plantas que muestran una coloración totalmente verde, sin coloración azul en el tejido ni el *buffer* (Figura 1-5 B). Las restantes 32 dieron positivo para la actividad de la enzima β -glucoronidasa, en donde se observa un color azul tanto en el tejido como en el *buffer*. En otras aunque el *buffer* no se alcanza a observar de color azul (Figura 1-5 D), se observan manchas azules en los tejidos, lo cual indica un resultado positivo. En el bloque inferior se encuentran las líneas de las plantas con el constructo pC-35S::RXam1::NOS (*RXam1*). De estas se observan 7 plantas totalmente verdes, sin coloración azul en el tejido, ni el *buffer* indicando que no son transgénicas. Sin embargo 12 de las 19 plantas dieron positivas para la actividad enzimática. Los resultados de este ensayo indican que al menos 82% de las plantas pC-35S::NOS y 63% de las plantas pC-35S::RXam1::NOS, son transgénicas. Estos resultados se corroborarán mediante análisis de *Southern blot* y expresión por *RT-PCR*.

1.3.4 Evaluación molecular de plantas transgénicas por PCR

Como parte de la caracterización de las plantas obtenidas en el CIAT, se realizó la extracción de ADN en hojas –tallos de las plantas *in vitro*, según el protocolo de extracción mencionado (Figura 1-6). Las plantas 4 y 12 obtenidas con la construcción pC-35S::RXam1::NOS no regeneraron embriones exitosamente, por lo cual no se logró coleccionar tejido para la extracción de ADN. Adicionalmente se realizó la extracción de ADN de las muestras controles, transformadas con el constructo pC-35S::NOS; aunque hay 39 plantas, tan sólo se emplearon nueve de ellas (C1-C9) como controles, por razones logísticas. En la figura 1-6 se observa ADN genómico de buena calidad, a una concentración elevada, entre 1500 y 2500 ng/ μ L.

Con el fin de verificar la integridad del ADN extraído, se amplificó el gen de G3PDH (glicerol-3-fosfatasa) con los cebadores mencionados en la

Tabla 1-1. El resultado muestra que el ADN de la planta 1 no fue útil para la amplificación de G3PDH; todas las demás plantas amplificaron satisfactoriamente (Figura 1-7)

Figura 1-6 Extracciones de ADN de las plantas transgénicas putativas de yuca del genotipo 60444.

Verificación ADN. Números de 1-21 plantas transgénicas con *RXam1*. C1-C9 plantas transgénicas control. C+: control positivo.

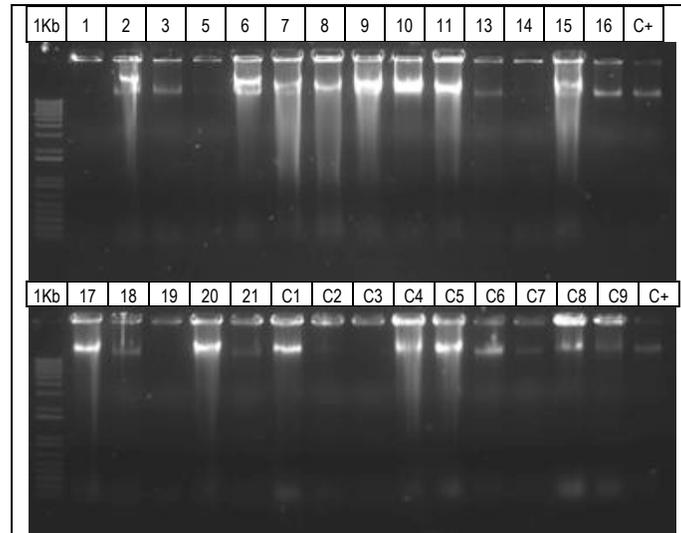
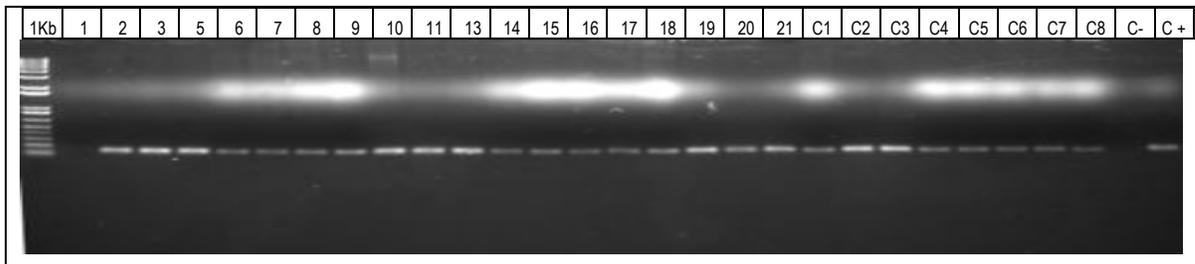


Figura 1-7 PCR de *G3PDH* sobre extracciones de ADN de plantas transgénicas.

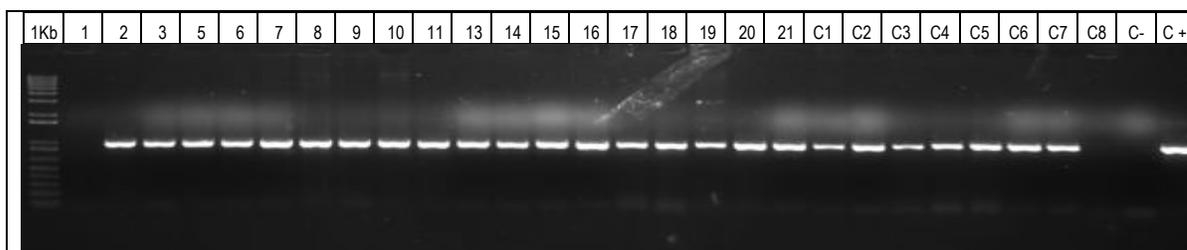
Verificación calidad del ADN. Números de 1-21 plantas transgénicas con *RXam1*. C1-C9 plantas transgénicas control. C+: control positivo. C-: mix PCR.



Una vez verificada la integridad del ADN, se realizó la amplificación del gen de selección *hptII*, (resistencia a higromicina), con el fin de determinar cuáles de las plantas regeneradas son transgénicas (Figura 1-8). De las 19 plantas (pC-35S::*RXam1*::*NOS*) todas parecen ser transgénicas. Por otro lado de las ocho plantas empleadas como control de transformación (pC-35S::*NOS*) todas a excepción de la planta C8 amplificaron dicho gen.

Figura 1-8 PCR de *hptII* sobre extracciones de ADN de plantas transgénicas.

Amplificación de *hptII*. Números de 1-21 plantas transgénicas con *RXam1*. C1-C9 plantas transgénicas control. C+: control positivo. C-: mix PCR.

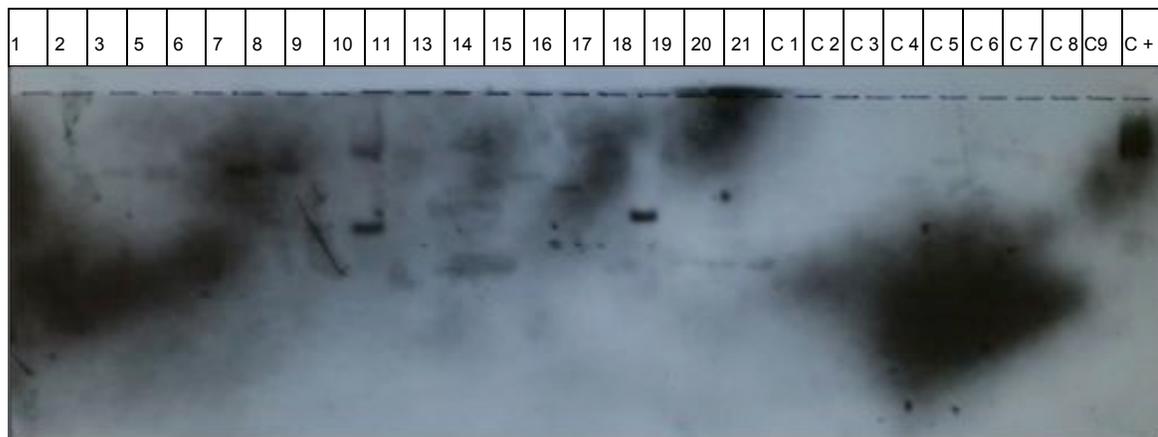


Evaluación molecular de plantas transgénicas por Southern blot

El análisis de *Southern blot* se realizó en las 19 plantas que dieron *PCR* positivo para la amplificación de *hptII* del constructo con el inserto *RXam1*, para confirmar la transformación genética y estimar el número de eventos de integración. En la Figura 1-9 se presenta el resultado del *Southern blot* realizado. Aunque la imagen no es muy nítida, se observa una tendencia a un patrón de bandeo diferencial en las líneas. Algunas como el caso de la línea 10 se observan dos eventos de inserción, en otras como es el caso de las líneas 15, 16 y 18 se presenta un único evento de inserción. Dado que estas plantas son de crecimiento lento, no se ha logrado tener suficiente material para realizar nuevamente la extracción de ADN, y poder así repetir el ensayo de *Southern blot*.

Figura 1-9 Southern blot de plantas transgénicas.

Determinación del número de copias del transgén, ADN digerido con *KpnI* e hibridado con la sonda correspondiente al gen *hptII*. Plantas transgénicas con el constructo con *RXam1* (números 1-21) y en plantas transgénicas con el constructo control (C1-C9). C+: control positivo.



Expresión relativa de *RXam1*

A partir de las líneas transgénicas con *RXam1* 15, 16 y 18, y el control 5 (transgénicas sin *RXam1*) se realizó la síntesis de ADNc, y se realizó la cuantificación de *RXam1* mediante PCR en tiempo real. Los valores de Ct y la temperatura de disociación se presentan en la Tabla 1-4. Aunque inicialmente se empleó la planta transgénica sin *RXam1* como control (C.5), los valores de Ct resultaron ser muy bajos, lo que coincide con el análisis de la curva de disociación cuyo análisis permite concluir que no se presentó amplificación de *RXam1* en estas plantas. De igual manera se observó que las plantas *in vitro* no transgénicas del cultivar 60444, tienen el mismo comportamiento que las plantas transgénicas control, es decir no hay expresión de *RXam1* o esta es muy baja para ser detectada por QRT-PCR. En este sentido no fue posible realizar la cuantificación de la expresión de *RXam1* teniendo como referencia el nivel de expresión de las plantas control C.5. En el caso de las plantas transgénicas con *RXam1* (L.15, 16 y 18), se pudo determinar que el Ct de *RXam1* osciló entre 28 a 30 ciclos. (Tabla 1-4).

Tabla 1-4 PCR tiempo real, Ct y temperatura de disociación plantas transgénicas.

Genes amplificados sobre ADNc: *Rzam1* y Tubulina (tub). Líneas transgénicas con *RXam1* :L.15,L.16 y L.18). Líneas transgénicas control (sin *RXam1*) :C5. Plantas *in vitro* no transgénicas: 60444 .

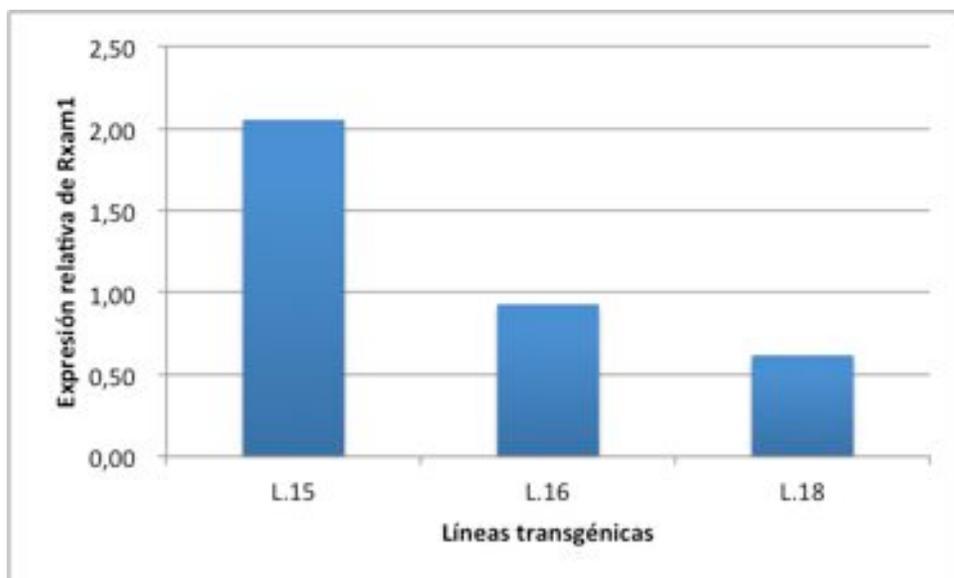
Gen	Muestra	Melt Temp	Ct	Promedio ct
RXam1	C.5	None	39,11	
	C.5	None	40,20	
	C.5	None	40,60	
	L.15	80,00	30,23	30,46
	L.15	80,00	30,88	
	L.15	80,00	30,26	
	L.16	80,00	28,82	28,71
	L.16	None		
	L.16	80,00	28,61	
	L.18	80,00	30,07	30,14
	L.18	80,00	29,88	
	L.18	80,00	30,46	
	60444	None	39,94	39,54
	60444	None	38,22	
	60444	None	40,48	
Tub	C.5	81,50	29,28	29,36
	C.5	81,50	29,30	
	C.5	81,50	29,50	

L.15	81,50	30,17	30,51
L.15	81,50	31,40	
L.15	81,50	29,95	
L.16	81,50	28,09	27,35
L.16	81,50	26,85	
L.16	81,50	27,11	
L.18	81,50	29,08	29,14
L.18	81,50		
L.18	81,50	29,20	
60444	81,50	25,66	25,89
60444	81,50	25,93	
60444	81,50	26,07	

Por otro lado se consideró realizar la comparación al interior de las líneas 15, 16 y 18, empleando como referencia la línea que presentó menor expresión, es decir la línea 18. Bajo este criterio se puede observar que la línea 15 expresa *RXam1* casi cuatro veces más que la línea 18, en tanto que en la línea 16 expresa el gen *RXam1* se expresa 1.5 veces más que en la línea control L18.. Es decir la línea 15 es la que tiene mayor expresión de *RXam1* entre las líneas transgénicas caracterizadas (Figura 1-10)

Figura 1-10 Expresión relativa de *RXam1* en tres líneas transgénicas

Expresión relativa de *RXam1* en la tres líneas unicopias elegidas en el *Southern blot*.,



1.4 Discusión

Existen varios argumentos a favor de la función de la proteína RXam1 de yuca en la resistencia a la bacteriosis vascular: *i*) posee dominios *LRR* y quinasa presentes en proteínas de inmunidad (Boller & Felix, 2009), *ii*) colocaliza con un *QTL* asociado a la resistencia a la cepa CIO136 (Jorge *et al.*, 2000), *iii*) la expresión del gen es inducida 5 días posinoculación con *Xam* en variedades resistentes (Contreras & López, 2008). En este trabajo se desarrollaron plantas de yuca transgénicas que sobreexpresan el gen *RXam1* en la variedad susceptible 60444 como una alternativa adicional a la validación funcional de este gen. En total se obtuvieron 19 posibles líneas transgénicas de las cuales 12 expresan GUS, lo que posiblemente indica la correcta inserción del casete conteniendo el gen *RXam1* en el genoma de la planta. Dado que la variedad empleada en los experimentos de transformación es altamente susceptible a varias cepas de *Xam*, esperamos que la sobreexpresión de este gen logre reducir la susceptibilidad de la planta, demostrando la función de este gen en la inmunidad a la bacteriosis vascular de yuca.

Dado que la yuca es la base de la alimentación de más de mil millones de personas en el mundo (Ceballos *et al.*, 2010) y que una de sus principales limitaciones es la bacteriosis vascular (Lozano & Sequeira, 1974; Verdier, 2002), es importante lograr generar variedades resistentes a la enfermedad, que conserven sus atributos agro-culinarios deseados. Para lograrlo es imprescindible contar con genes de resistencia clonados y caracterizados. Aunque no se han reportado genes clonados y validados para resistencia a la bacteriosis vascular en yuca, los análisis de mapeo han permitido identificar *QTLs* que explican un porcentaje de la resistencia (Jorge *et al.*, 2000). Uno de estos es el que explica el 13% de la resistencia y colocaliza con *RXam1*. Sin embargo antes de emplear este gen en cualquier programa de mejoramiento encaminado a incrementar la resistencia a la bacteriosis vascular es imprescindible su confirmación funcional (López *et al.*, 2006; Contreras & López, 2008).

Inicialmente, se exploró la posibilidad de validar la función de RXam1, mediante una aproximación de silenciamiento génico. Ochoa (2011) desarrolló una construcción

sentido-antisentido de un fragmento de *RXam1* y realizó la transformación para obtener plantas con el gen silenciado. Sin embargo, no se logró obtener plantas regenerantes. Es posible que el ARN de interferencia utilizado desencadene un silenciamiento poco específico e interfiera con la expresión de otros miembros de la familia *LRR*-quinasa, que son indispensables en el desarrollo de la planta (López & Bernal, 2012).

Una estrategia alternativa en la validación, es la asociación de polimorfismos con el fenotipo de resistencia. En el grupo se ha secuenciado el gen completo en 10 variedades de yuca las cuales también se han tipificado por su resistencia a la cepa CIO136. Aunque no se encontró una asociación (Barrera *et al.*, datos sin publicar). Es necesario ampliar este tipo de estudios con un mayor número de variedades para poder dar conclusiones definitivas.

En yuca tampoco se cuenta con colección de variedades mutantes por lo que actualmente no es posible disponer de un mutante para este gen como si sucede con arroz o *Arabidopsis* (TAIR – www.arabidopsis.org). Recientemente el desarrollo de TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*, nucleasas efectoras tipo activador de transcripción) abre la posibilidad de hacer edición genómica dirigida para validar genes o crear TALEs (*transcription activator-like effector*, efectores tipo activador de transcripción) artificiales para inducir la expresión de genes de manera específica (Li *et al.*, 2012). Actualmente en el grupo se están empleando TALEs artificiales diseñados para la inducción específica de *RXam1*. Todas estas estrategias permitirán confirmar si el gen *RXam1* estaría implicado en la resistencia de la yuca ante *Xam*.

Si bien todas estas estrategias son complementarias, la prueba confirmatoria de la función de este gen en resistencia, es la inducción de la resistencia a través de la transformación. No se sabe claramente si la variedad 60444 posea todas las copias del gen sin marcos de lectura truncados, así como tampoco se ha evaluado si en esta variedad el gen se expresa. Sin embargo dado que lo que se busca en este trabajo es una sobreexpresión del gen *RXam1*, si se podría esperar reducir el nivel de susceptibilidad de esta variedad.

La sobreexpresión de genes candidatos es una de las aproximaciones empleadas con frecuencia en la validación funcional de cualquier gen de resistencia (Song *et al.*, 1995;

Xioa *et al.*, 2001). Frente a las limitaciones reportadas en la aproximación de silenciamiento génico de *RXam1*, este trabajo se dirigió hacia la estrategia alternativa de sobreexpresarlo.

La elaboración de la construcción conteniendo el gen *RXam1* bajo el promotor fuerte y constitutivo 35S fue exitosa y se confirmó por secuenciación. El promotor 35S ha sido extensamente empleado en estrategias de transformación que requieren un alto nivel de expresión génica de manera constitutiva, en todos los tejidos vegetales (Potenza *et al.*, 2003). Si bien existen otros promotores como el de ubiquitina, este sólo ha mostrado ser efectivo en monocotiledóneas (Gupta *et al.*, 2001). Otros promotores de origen viral pueden tener limitaciones, al ser reconocidos por la célula huésped, lo cual genera su inactivación (Elmayan & Vaucheret, 1996). Otra gran ventaja del promotor CaMV, es que permite una expresión a altos niveles del inserto tanto en mono como en dicotiledóneas (Battaw & Hall 1990; Benfey *et al.*, 1990).

El vector binario empleado para realizar las construcciones fue pCAMBIA1305.2, el cual ha sido empleado en transformación genética en yuca (Beltrán *et al.*, 2010). Este vector posee además la ventaja de contener el gen reportero *GUSPlus* en el ADN-T (ADN de transferencia), que permite determinar fácilmente si el material transformado contiene efectivamente la construcción a través del ensayo de coloración GUS (Bull *et al.*, 2009; Jefferson *et al.*, 1987). Adicionalmente, este vector posee un marcador de selección de resistencia a higromicina el cual puede ser empleado no sólo como agente selectivo sino también en la evaluación de las inserciones en el genoma por medio de *Southern blot*.

El proceso de transformación se realizó con dos variedades 60444 y COL2215. Sin embargo la regeneración sólo fue exitosa para la primera variedad. La limitación en la transformación ha demostrado ser variedad-dependiente (Raemakers *et al.*, 2001; Rossin & Rey., 2011). Considerando que el objetivo del trabajo es lograr la sobreexpresión del gen *RXam1* en variedades susceptibles, esperando aumentar la resistencia a la bacteriosis se quiso emplear la variedad COL2215 ya que es una de las más cultivadas en el país y es susceptible a la bacteriosis vascular (Trujillo *et al.*, 2014). Si bien la variedad 60444 es también susceptible, no tiene valor comercial. El hecho de que no se haya podido transformar la variedad comercial COL2215, pero sí 60444 implica que de encontrar que *RXam1* sí está involucrado en resistencia. Sería necesario desarrollar estrategias alternativas para introducir el gen en esta u otras variedades

comerciales. Una posibilidad sería hacer cruzamientos de la variedad 60444 transgénica con las variedades comerciales y hacer selección mediante mejoramiento genético.

A pesar de que *RXam1* está asociado a un QTL específico a la cepa CIO136, una vez se logre tener un alto número de individuos de las plantas transgénicas éstas podrán ser evaluadas ante diferentes cepas de *Xam*. Las características de *RXam1*, tales como su estructura de tipo *RLK* (*receptor-like kinases*, receptores tipo kinasa), la cual es característica de *PRRs*, llevan a sugerir que *RXam1* podría ser considerado como un *PRR*. Hasta el momento no se ha identificado ningún gen de resistencia específico de una variedad con la estructura de tipo *RLK*. De esta manera es posible hipotetizar que *RXam1* podría conferir resistencia a un amplio espectro de cepas.

El proceso de transformación en yuca es lento y puede tardar más de un año (Bull *et al.*, 2009) y lo más común es que demore más de año y medio (Chavarriga comunicación personal). De esta manera es difícil llegar a hacer una caracterización molecular y fenotípica de las plantas. En otras plantas modelo, la transformación es mucho más rápida. *Arabidopsis* tarda unos tres meses (Zhang *et al.*, 2006), arroz 4 a 5 meses (Hiei & Komari, 2008). De esta manera el uso de la transformación como una herramienta de validación funcional a gran escala en yuca es una estrategia dispendiosa, difícil y demorada. Sin embargo para genes que presentan características de interés, como candidatos a resistencia, o de cualidades agronómicas de interés, la opción de la transformación es viable. Otra dificultad adicional que enfrenta la transformación en yuca es que sólo se ha logrado buena eficiencia empleando la variedad modelo 60444. Sin embargo recientemente se han hecho modificaciones que han permitido mejorar la eficiencia en otras variedades como SM1219-9 (Chavarriga, comunicación personal). Todas estas mejoras repercutieron directamente en este trabajo, lo que permitió obtener aproximadamente 19 posibles plantas transgénicas.

Se espera poder confirmar el número de eventos de inserción en el genoma, repitiendo el ensayo de *Southern blot*. Los primeros análisis de expresión relativa muestran que la expresión de *RXam1* en plantas *in vitro* del cultivar 60444 y plantas transgénicas sin el transgén, es muy baja, quizá si se aumentaran los ciclos de amplificación se podría observar su amplificación. La expresión del transgén en las líneas 15, 16 y 18 muestra que hay una evidente sobreexpresión de *RXam1* en dichas líneas. Por otro lado es

importante mencionar que la calidad de ADNc no fue la mejor debido a la baja concentración de ARN, que a su vez está relacionada con el poco tejido que se logra obtener de estas plantas, dado que su crecimiento es muy lento. Esta primera aproximación de la expresión de *RXam1*, evidencia su sobreexpresión, sin embargo es necesario mejorar el *Southern blot*, para evaluar más líneas unicopias por PCR en tiempo real. A partir de esta información se seleccionarán las líneas más promisorias (aquellas que sobreexpresen *RXam1*) para su multiplicación para finalizar con la evaluación fenotípica. Se espera que estos resultados confirmen de manera definitiva la función de *RXam1* en la inmunidad, lo que constituiría el primer gen de resistencia identificado en yuca y avalaría su incorporación en los programas de mejoramiento genético.

2 Evaluación de la sobreexpresión del gen *RXam1* en la variedad Nipponbare

2.1 Introducción

Las plantas se encuentran expuestas a constantes factores limitantes. Entre ellos sobresalen los patógenos los cuales juegan un papel determinante en las pérdidas de los cultivos (Strange & Scott, 2005). Las plantas han evolucionado para defenderse del ataque de los patógenos mediante el reconocimiento de *MAMPs* (*microbe-associated molecular patterns*, patrones moleculares asociados a microorganismos), moléculas conservadas en los microorganismos, a través de los *PRRs* (*pattern recognition receptors*), receptores de membrana de reconocimiento de patrones (Boller & Felix, 2009). Dentro del grupo de *PRRs* se encuentran las *RLKs* (*receptor-like kinases*, receptores de tipo quinasa), como FLS2 (*flagellin-sensitive-2*, receptor de flagelina) (Gómez-Gómez & Boller, 2000), EFR (*EF-Tu Receptor*, receptor del factor de elongación) (Zyfel *et al.*, 2006) y XA21 (Song *et al.*, 1995), las cuales reconocen respectivamente la flagelina (Chinchilla *et al.*, 2006), el factor de elongación Tu (Zyfel *et al.*, 2006) y un péptido desconocido (Bahar *et al.*, 2014).

El reconocimiento de los *MAMPs* por parte de los *PRRs*, hace parte de la defensa no –hospedero, la cual es efectiva contra patógenos no adaptados. Este tipo de resistencia es conocida como *MTI*, o inmunidad activada por *MAMPs*, la cual se considera como de amplio espectro y duradera. La *MTI* se caracteriza por desencadenar respuestas de defensa como producción de especies reactivas de oxígeno, activación de proteínas quinasa activadas por mitógenos (Nicase *et al.*, 2009).

El gen *Xa21*, que codifica para la proteína de arroz XA21 fue uno de los primeros genes de resistencia (R) en ser clonados (Song *et al.*, 1995). Este tipo de proteína posee una estructura de tipo *RLK* y durante años fue considerado como la única proteína R de esta clase. La proteína XA21 confiere resistencia de amplio espectro a las cepas de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) que poseen la proteína de avirulencia AvrXa21 (Ronald *et al.*, 1992; Song *et al.*, 1995). En años pasados se aisló una molécula de *Xoo* que inicialmente se consideró era reconocida por XA21 y fue denominada Ax21. Este péptido se encontró presente en varias cepas de *Xoo* y en varias especies de *Xanthomonas* por lo que se consideró que Ax21 correspondería a un *MAMP* y *Xa21* sería un *PRR* (Lee *et al.*, 2009). Sin embargo recientemente estos resultados fueron refutados y se debió hacer una retractación científica por parte de los autores (Lee *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2013), así que aún no se conoce la naturaleza de la proteína reconocida por XA21. A pesar de esto, el gen *Xa21* ha sido empleado para incrementar la resistencia en otras especies. La introducción del gen *Xa21* de arroz en plantas de naranja (*Citrus sinensis*) incrementó la resistencia a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, bacteria que causa el cáncer de los cítricos (Mendes *et al.*, 2010). Resultados similares se obtuvieron al introducir y sobreexpresar este mismo gen en tomate (*Lycopersicon esculentum*), el cual presentó un incremento en la resistencia a *Pseudomonas solanacearum* (Afroz *et al.*, 2011). Recientemente *Xa21* se transfirió a banano (*Musa sp.*) mediante transformación genética, logrando plantas que expresaban este gen de arroz de manera constitutiva y observando que las plantas obtenidas presentaban una resistencia a *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Tripathi *et al.*, 2014).

La yuca es cultivada por pequeños agricultores en más de cien países tropicales en el mundo (FAO, 2013) y es la base de la alimentación para más de mil millones de personas (FAO, 2008). Una de las principales limitantes en su producción son las enfermedades, entre ellas la enfermedad bacteriana denominada bacteriosis vascular o añublo bacteriano, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) es una de las más importantes (Lozano & Sequeira, 1974). Actualmente el manejo de la enfermedad incluye el no-transporte de material contaminado y la siembra de variedades con mayor resistencia (Verdier, 2002). Aunque hasta ahora no se ha logrado clonar y caracterizar un gen responsable de la resistencia a *Xam*, existe un gen candidato que colocaliza con un *QTL* que explica el 13% de la resistencia a la cepa CIO136 (Jorge *et*

al., 2000). Este gen tiene dominios putativos de tipo *LRR- STK* (*serine-threonine kinase*, serina-treonina quinasa), como los presenta *XA21* y el grupo de *RLKs*. El gen en yuca se denomina *RXam1* (*Resistance to Xam 1*, resistencia a *Xam*) (Contreras & López, 2008).

Como parte de la validación funcional de *RXam1* se realizó la transformación de plantas de yuca con el fin obtener el silenciamiento génico mediado por ARN antisentido (Ochoa, 2011). Sin embargo, no se lograron obtener plantas regenerantes (Ochoa, 2011). Como alternativa a la validación funcional de *RXam1*, se partió de la siguiente premisa: si *RXam1* de yuca juega un rol en inmunidad, es posible de emplear un sistema heterólogo, en este caso arroz, para observar su función. En esta estrategia se partió de plantas de la variedad Nipponbare de *Oryza sativa*, la cual es susceptible a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* y que no posee un gen *Xa21* funcional (Ronald, comunicación personal) para sobreexpresar el gen *RXam1* de yuca mediante transformación genética.

Previamente, se logró realizar una construcción genética que posee el gen *RXam1* obtenido a partir de las variedades de yuca 60444 y MBra685, las cuales son altamente susceptible y resistente a *Xam*, respectivamente. Cada gen fue clonado en el vector binario pCAMBIA5300 bajo el promotor de ubiquitina (Ubi). Las construcciones obtenidas fueron empleadas para realizar la transformación en arroz, variedad Nipponbare, empleando la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*. En total se obtuvieron varias líneas transgénicas para cada una de las tres construcciones empleadas. Las construcciones fueron las siguientes: i) EC0: pCAMBIA5300 (vector vacío), ii) EC1: pCAMBIA5300 *Ubi::RXam1Bra685* y iii) EC2: pCAMBIA5300 *Ubi::RXam1T60444* (Tabla 2-1).

En este trabajo se realizó la evaluación molecular y fenotípica de algunas de las líneas de las plantas transgénicas obtenidas.

Tabla 2-1 Líneas de plantas transgénicas de Nipponbare.

pC5300::vacío	pC5300::RXam1M685	pC5300::RXam1T60444
EC0-2.1	EC1-2.1	EC2-1.1 ^(C)
EC0-6.2 ^(B)	EC1-8.1 ^(A,B)	EC2-2.1 ^(A)
EC0-8.1 ^(C)	EC1-14.1	EC2-3.1

EC0-13.1	EC1-15.1 ^(A)	EC2-7.1 ^(B)
EC0-15.1 ^(A,B,D)	EC1-24.1 ^(C)	EC2-8.1
EC0-16.1 ^(A)	EC1-26.1 ^(A,D)	EC2-14.1
EC0-22.1 ^(C)	EC1-27.1	EC2-18.1
EC0-30.1	EC1-29.1	EC2-30.1 ^(A,B,D)
EC0-33.1	EC1-34.1 ^(B)	EC2-31.2 ^(C)
	EC1-34.2 ^(C)	EC2-32.1 ^(A,D)

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Bacteria y condiciones de crecimiento

La cepa de *Xoo* empleada en este estudio fue PXO99^A, originaria de Filipinas (raza 6), que se encuentra almacenada en el cepario del IRD (Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, Francia) a -80°C (#84 Xantho 2). La bacteria se creció en medio PSA, a 28°C ([Anexo A](#)) durante dos días. La bacteria fue resuspendida en agua estéril hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) 0.2 para los ensayos de infiltración y de 0.5 para los ensayos de inoculación (leaf-clipping).

2.2.2 Material vegetal e inoculaciones

Los experimentos se realizaron en el invernadero del IRD en Montpellier, Francia. Se partió de plantas T1 (primera generación). Treinta semillas por cada una de las líneas seleccionadas de la variedad Nipponbare de *Oryza sativa* ssp japonica transformadas (Tabla 2-1) se sembraron en turba. El invernadero tuvo un fotoperiodo de 12 horas de luz a 26 °C y 12 horas de oscuridad a 25 °C, y una humedad relativa del 70%.

Plantas de tres semanas, transformadas con o sin el inserto de interés, fueron inoculadas con una suspensión bacteriana de *Xoo* PXO99^A a una DO₆₀₀ de 0.5 con agua. La inoculación se realizó por infiltración empleando una jeringa sin aguja a 4 cm del ápice de la hoja más joven. Se realizaron 4 infiltraciones por cada hoja (3-4 mm diámetro) (Reimers & Leach, 1991). Las lesiones se evaluaron 6 días posinoculación (dpi), mediante infiltración.

Para la inoculación por el método de recorte de hoja (*leaf-clipping*), se tomaron plantas de 5 semanas. El ápice de la hoja más joven (totalmente extendida) se cortó con tijeras previamente sumergidas en una solución bacteriana con una DO₆₀₀ de 0.2 (Kaufman *et al.*, 1973). La longitud (cm) de la lesión se midió a los 14 y 21 días posinoculación (dpi).

2.2.3 Extracción de ADN de arroz

La extracción de ADN se realizó a partir de la hoja más joven del material evaluado. Se colectaron 3 cm de la hoja totalmente extendida. Las hojas se colectaron en nitrógeno líquido y se homogenizaron. La extracción se realizó siguiendo el método de Coca *et al.* (2004), utilizando MATAB como *buffer* de extracción (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 2% MATAB, 1% PEG 6000, 0.5% NaHSO₄). Posteriormente se realizó la purificación con cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 y precipitación con isopropanol. La cuantificación del ADN se realizó con el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) mediante la medición de absorbancia a 260 y 280 nm.

2.2.4 Confirmación del inserto mediante amplificación

Con el ADN extraído se procedió a realizar las amplificaciones para un gen constitutivo de arroz *OsExp* (ubicación del gen, locus LOC_Os06g11070.1) como control de la calidad del ADN. Adicionalmente se realizó la amplificación del gen marcador *hptII* (Hyg) de selección de las plantas transgénicas y se verificó la presencia del inserto amplificando una sección del fragmento del gen *RXam1* contenido en el vector, con los cebadores casa_R- cassav_F (Tabla 2-2). Las condiciones de *PCR* se muestran en la Tabla 2-3,. Las características de los amplicones y las condiciones particulares de la *PCR* se observan en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2 Cebadores usados para amplificación de *OsExp*, *Hyg* y *RXam1* .

Cebadores y condiciones de *PCR* empleadas en la amplificación de *Hyg*: gen de resistencia a higromicina. *OsExp*: gen de expresión constitutiva en arroz. *Cassa*: fragmento del gen *RXam1*

Nombre	Secuencia 5-3'	T°C anillamiento T de extensión	Tamaño del amplicón
Hyg F	CTGAACTCACCGCGACGTCTG	An 57°C Ext 70s	1183 pb
Hyg R	GGCGTCGGTTTCCACTATCG		
OsExp F	CGGTTAGCTAGAGTTCATGTGA	An 57°C Ext 30s	217 pb
OsExp R	ATTGGAGTAGTGGAGTGCCAAA		
Cassav	GGTTGCATCTACCGATTTTCAGC	An 52 °C Ext 60s	759 pb
Cassa	TCAGGGGCCATTAAGTTGTC		

Tabla 2-3 Condiciones de la PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94 °C	5 min	1
Denaturación	94 °C	30 seg	35 ciclos
Anillamiento	T °C específica	30 seg	
Extensión	72 °C	t extensión	
Extensión final	72 °C	5 min	1

2.3 Resultados

De acuerdo al número de semillas disponibles de cada línea, se seleccionaron las líneas con mayor número de semillas para los ensayos. En total se realizaron cuatro ensayos (Tabla 2-1). En el primero (A) se sembraron dos líneas de EC0 (15.1, 16.1), tres de EC1 (8.1, 15.1, 26.1) y tres EC2 (2.1, 30.1 32.1). En el segundo (B) se sembraron dos líneas EC0 (6.2, 15.1), dos de EC1 (8.1, 34.1) y dos de EC2 (7.1, 30.1). Para el tercer ensayo (C) se sembraron nuevamente dos líneas de cada construcción: EC0 (8.1, 22.1), EC1 (24.1, 34.2), y EC2 (1.1, 31.2). Finalmente el cuarto ensayo (D) se sembraron las líneas promisorias del primer ensayo: EC0 (15.1), EC1 (26.1) y EC2 (30.1 32.1). En cada ensayo se sembraron 30 semillas de cada línea.

Evaluación fenotípica por inoculación mediante infiltración

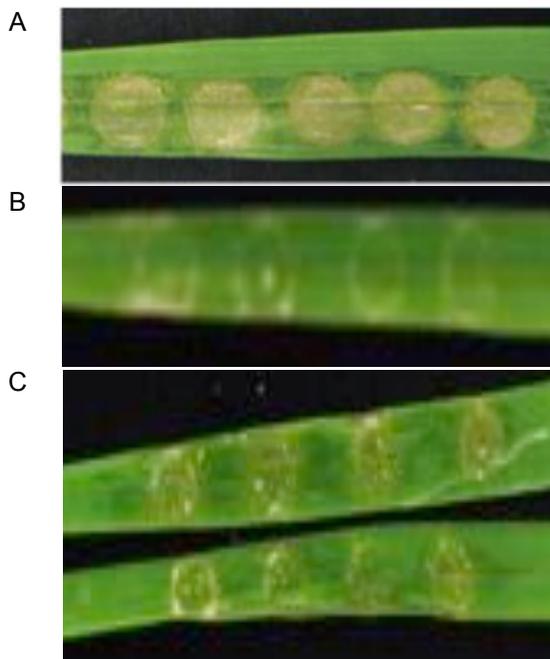
A partir de 30 semillas de cada una de las líneas evaluadas se lograron obtener plantas las cuales fueron inoculadas mediante infiltración a las tres semanas. En la Figura 2-1 A, se observa una planta de la variedad Nipponbare (susceptible) infiltrada con PXO99 (Yu *et al.*, 2011) la cual presenta crecimiento de la bacteria manifestado por los círculos de infiltración completamente amarillos. En el recuadro B se observa el control absoluto correspondiente a plantas infiltradas con agua (solución control) y el recuadro C representa las plantas transgénicas infiltradas con PXO99 a una DO_{600} de 0.5.

Como se observa en la Figura 2-1 B las hojas infiltradas con agua presentaron un típico daño mecánico en la hoja, pero no se ven afectadas por la bacteria. Las plantas inoculadas con agua no presentaron síntomas, salvo una leve formación de un halo amarillo. Todas las hojas de las plantas transgénicas infiltradas con la bacteria, ya sean EC1 o EC2, presentaron síntomas como los que se observan en la Figura 2-1 C. Se evidencia daño en el tejido, representado por un color amarillento. En algunas zonas el daño es tan avanzado que la clorofila se ha ido perdiendo, por ello se ven zonas un poco traslúcidas en el centro de la infiltración y en la periferia de los círculos de infiltración se observa cómo avanza la lesión. Estas plantas también presentan un color verde más oscuro, que corresponde a la proliferación de la bacteria por los haces vasculares. Adicionalmente, se observan precipitados de color amarillo, sobre el halo de infiltración,

indicando crecimiento de la bacteria, en el círculo inicial de infiltración. Si bien los resultados mostrados corresponden al ensayo D, vale la pena mencionar que estos fueron constantes en los cuatro ensayos realizados.

Figura 2-1 Infiltración de plantas transgénicas de Nipponbare.

[A] Plantas de Nipponbare infiltradas con PXO99 (Yu *et al.*, 2011). Plantas transgénicas de Nipponbare de tres semanas, infiltradas con agua **[B]**, infiltradas con PXO99 **[C]** luego de 6 dpi.



Evaluación fenotípica por inoculación mediante leaf clipping

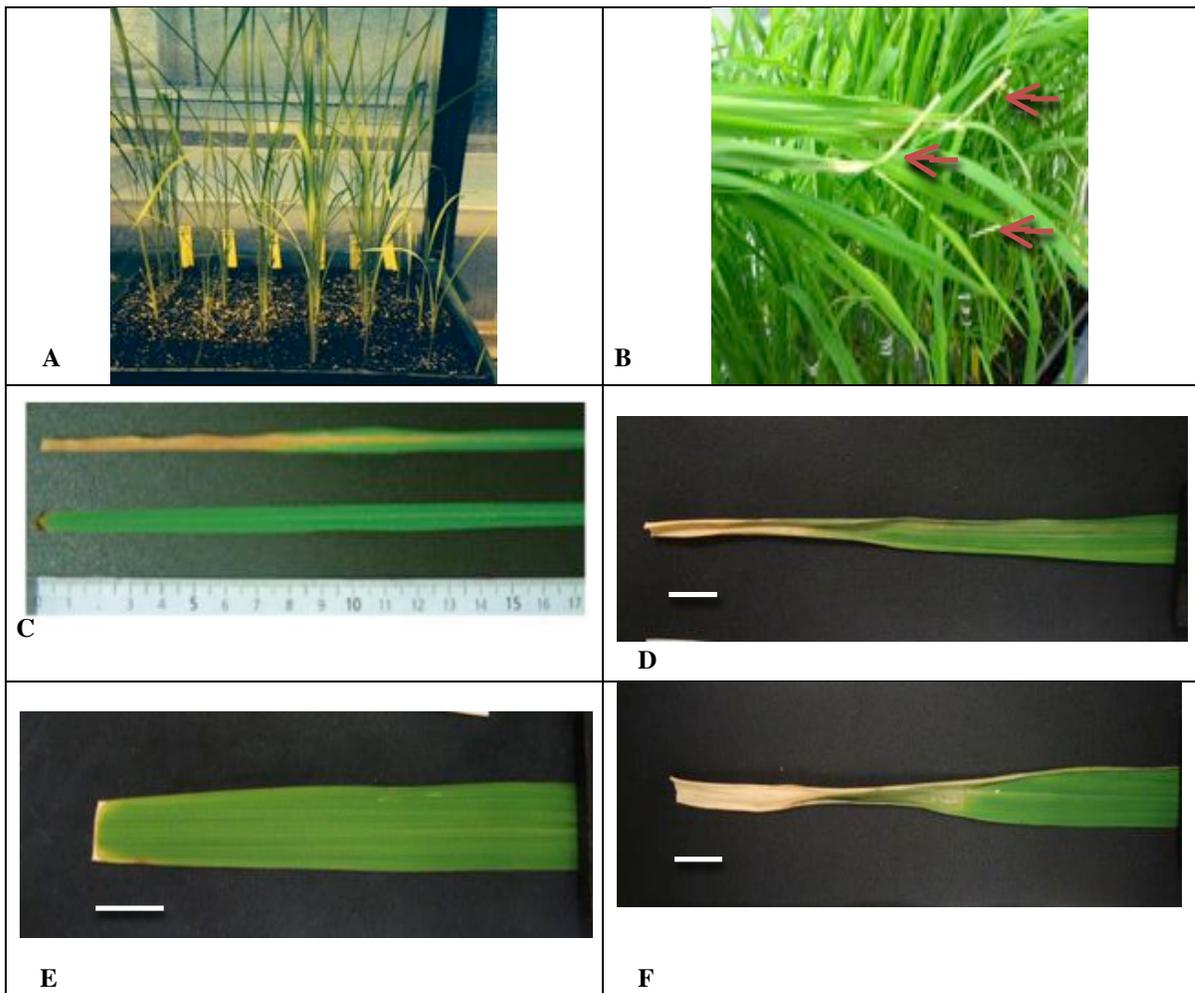
La inoculación por *leaf clipping* arroja datos de tipo cuantitativo ya que las mediciones del avance de la enfermedad en escala de cm se hacen a las dos y tres semanas posinoculación. Los datos de la fenotipificación de los ensayos A, B y C no se presentan. Las plantas de los ensayos B y C no tuvieron un buen desarrollo: presentaron quemazón en sus hojas y algunas tenían un porte muy bajo. Esto pudo deberse a condiciones variables del invernadero. Aquí se presentan sólo los resultados obtenidos de la fenotipificación del ensayo D (Figura 2-3, Figura 2-4 y Figura 2-5).

Las mismas plantas que fueron empleadas para ser inoculadas por infiltración, fueron utilizadas para realizar la inoculación mediante *leaf clipping* (Figura 2-2 A) pero a las cinco semanas de sembradas. Se inocularon con la cepa PXO99 a una DO_{600} de 0.2. Si

bien siempre se sembraron 30 semillas, el porcentaje de germinación no fue homogéneo para todas las líneas, por eso para la línea EC126.1 se reportan datos de 20 plantas evaluadas, mientras que para la línea EC2 30.2 se obtuvo información para 19 plantas evaluadas, en tanto para la línea EC2 32.1 tan sólo se obtuvieron 8 plantas.

Figura 2-2 Inoculación de plantas transgénicas de Nipponbare.

Plantas transgénicas de Nipponbare de seis semanas [A], inoculadas con PXO99 [B]. Referencia de plantas de Nipponbare inoculadas con PXO99 y agua [C] (Yu *et al.*, 2001). Plantas transgénicas de Nipponbare con *RXam1*, inoculadas con agua [E] e inoculadas con PXO99 [D y F]. Flechas rojas indican lesión.



Luego de 21 dpi se observa un daño generalizado en las hojas, causado por el crecimiento de la bacteria, independientemente de la línea empleada (controles o transgénicas con *RXam1*) (Figura 2-2 B). En la Figura 2-2 C se observa una hoja inoculada con agua y una hoja de Nipponbare inoculada con PXO99 luego de 21 dpi. En

el cuarto ensayo (D), se observó que en todas las plantas inoculadas con agua se ve un amarillamiento leve en el punto de corte de la tijera (Figura 2-2 E).

En la Figura 2-2 D y F se observa un ejemplo de las lesiones que se presentaron en algunas plantas. En el panel D se observa el grado de afectación de la hoja por la bacteria, tanto así que se presenta un entorchamiento de la hoja, se observa la lesión en las zonas laterales. En la F se observa otro caso de lesión en donde se aprecia el avance de la bacteria, el cual se da por los haces vasculares y a medida que avanza por la hoja la lesión abarca los espacios laterales de la hoja. La lesión es de un color amarillo.

A continuación se presenta una descripción detallada de los diferentes individuos para cada una de las líneas evaluadas. En la Figura 2-3 (panel superior) se presentan los datos correspondiente a la evaluación fenotípica de los diferentes individuos para la línea EC1 26.1. Los valores de medición de la lesión variaron entre 13 y 26 cm. Nueve (50%) de las plantas presentaron lesiones intermedias de 15 a 20 cm, mientras que cuatro de ellas (25%) presentaron lesiones superiores a 20 cm y las restantes (33%) presentaron lesiones bajas, de 15 cm o menos.

En el panel inferior de la Figura 2-4 se observan los datos correspondientes de la evaluación fenotípica para los individuos de la línea EC2 30.2. La longitud de la lesión varió entre 14 a 33 cm. Seis de ellas (33%) presentaron lesiones intermedias de 15 a 20 cm, 10 de ellas (55%) presentaron lesiones superiores a 20 cm y dos de ellas (12%) presentaron lesiones bajas, de 15 cm o menos. En general las lesiones de las hojas de esta línea fueron mayores que las otras dos líneas.

Finalmente, en la Figura 2-5 se presentan los datos correspondientes de la evaluación fenotípica de la línea EC2 32.1 (panel inferior). El porcentaje de germinación de estas líneas no fue muy exitoso, tan sólo el 26% de las semillas germinaron. La medición de la lesión presenta datos que van de 17 a 22 cm, son los datos de fenotipificación con un rango de variación menor. Tres plantas (43%) presentan lesiones intermedias de 15 a 20 cm, cuatro de ellas (57%) presentaron lesiones superiores a 20 cm y no se presentaron lesiones bajas, de 15 cm o menos.

Evaluación genotípica

Para corroborar la presencia del inserto en las plantas de cada línea se realizó una genotipificación que incluyó la amplificación de un gen endógeno de arroz (*OsExp*), como control positivo de la calidad del ADN, la amplificación del gen de selección (*Hyg*) y del gen *RXam1* presentes en el casete del T-ADN (Tabla 2-2). Para esta genotipificación se realizó la extracción de ADN de cada una de las plantas evaluadas en el ensayo D (Figuras 2-3, 2-4 y 2-5). A partir de este ADN se realizó la amplificación de los tres genes. Las evaluaciones de la línea EC0 no se presentan ya que estas no poseen el gen *RXam1* de interés, sin embargo se emplean como controles positivos de presencia de los genes *OsExp* y *Hyg*.

El control EC0 que corresponde a las plantas que fueron transformadas con el vector vacío, amplificó únicamente para *Hyg* como se esperaba (Figura 2-3). Las plantas EC0 empleadas como controles amplificaron tanto para el gen constitutivo de arroz como para el gen de *Hyg*. No se presentó amplificación del gen *RXam1*, tal y como se esperaba. De las plantas de la línea EC1 26.1, 19 plantas fueron evaluadas, la planta 6 murió en el transcurso del experimento. Se observa que las plantas 4, 5 y 10 no son transgénicas (16%), porque no amplifican *RXam1* ni *Hyg*, sin embargo presentan el gen constitutivo de arroz *OsExp*. Las plantas restantes (1, 2, 3, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20) (79%) pueden ser consideradas plantas transgénicas ya que amplificaron tanto *RXam1* como *Hyg*. Sin embargo un caso especial lo constituye la planta 12 ya que amplifica para *RXam1* pero no amplifica *Hyg*.

En la Figura 2-4 (panel superior) se observa la amplificación de los genes de interés de las 19 plantas de la línea EC2 30.2 evaluadas. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que sólo tres no son transgénicas, (7, 12 y 15), ya que no amplifican *RXam1* ni *Hyg*, pese a amplificar el gen endógeno de arroz *OsExp*; por lo tanto el 16% de las plantas no son transgénicas. Nuevamente se presentó el caso particular en que la planta 4 amplifica *Hyg* pero no *RXam1*, esto es algo fuera de lo normal, se esperaría que todo el fragmento ADNti se insertara. Algo similar se presentó con la planta 12 de la línea EC1 26.1. Las plantas 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18 y 19, (73%), se consideran plantas transgénicas al amplificar tanto *RXam1* como *Hyg*.

Figura 2-3 Genotipificación y fenotipificación de la línea EC1 26.1.

Panel superior: amplificación de los genes *OsExp*, *Hyg* y *RXam1* en plantas transgénicas EC1 26.1.
 Panel inferior: tamaño de la lesión (cm) de las plantas transgénicas inoculadas con PXO99, luego de 6 semanas posinoculación. NT: planta no transgénica.

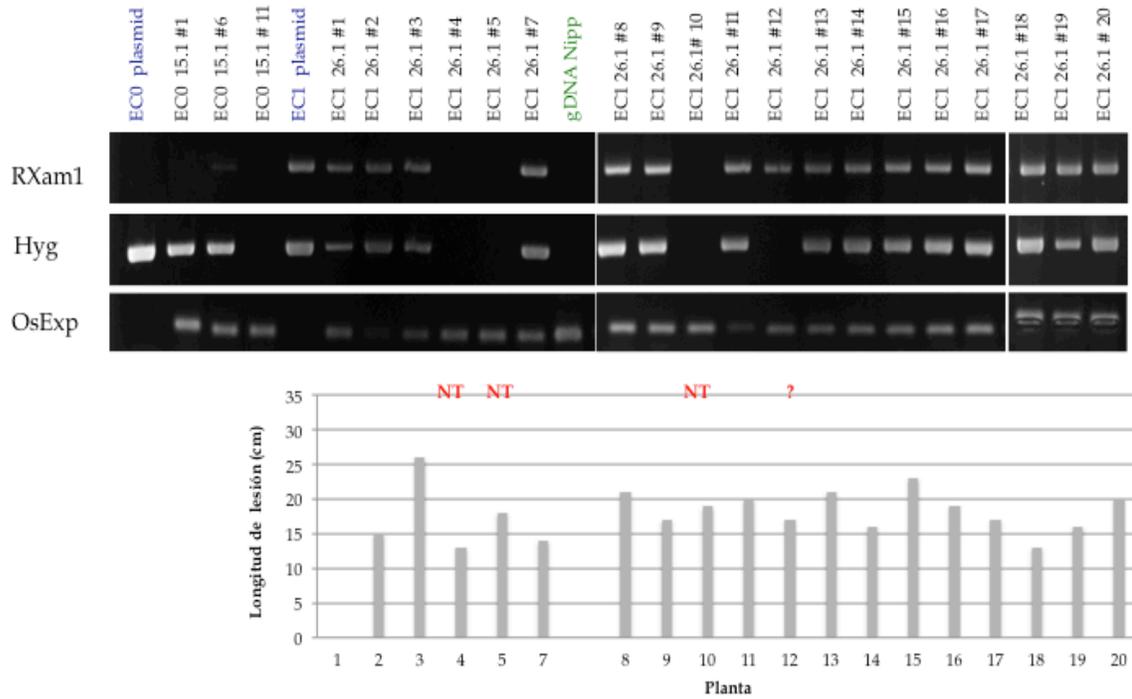


Figura 2-4 Genotipificación y fenotipificación de la línea EC2 30.2.

Panel superior: amplificación de los genes *OsExp*, *Hyg* y *RXam1* en plantas transgénicas EC1 30.1.
 Panel inferior: tamaño de la lesión (cm) de las plantas transgénicas inoculadas con PXO99, luego de 6 semanas posinoculación. NT: planta no transgénica.

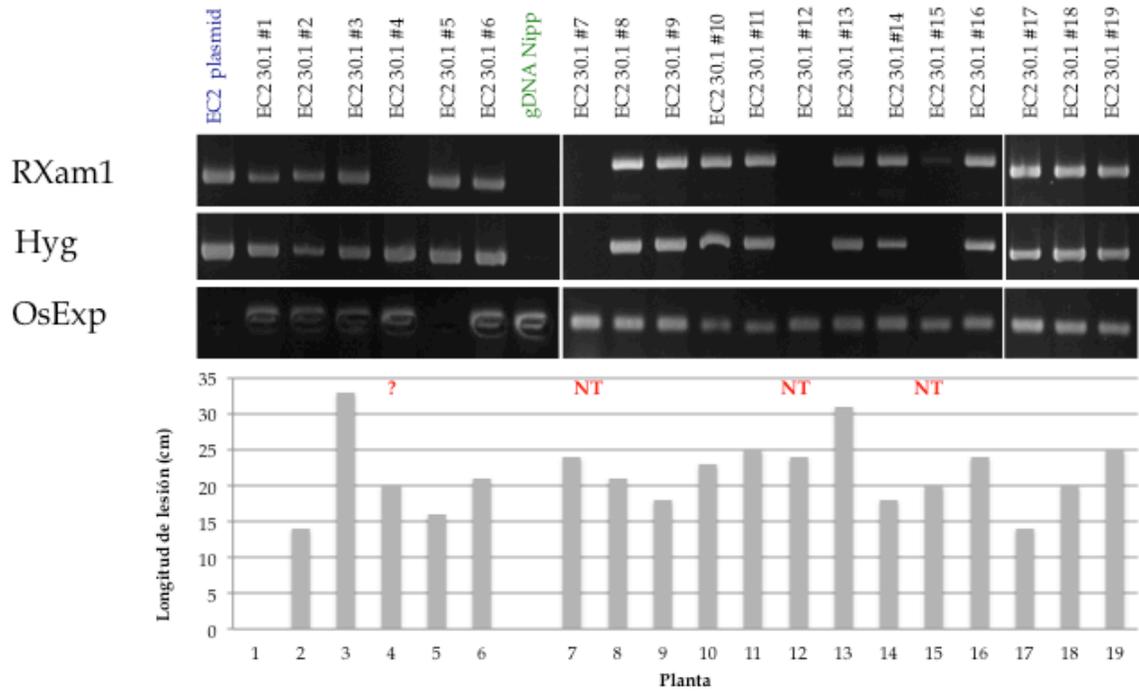
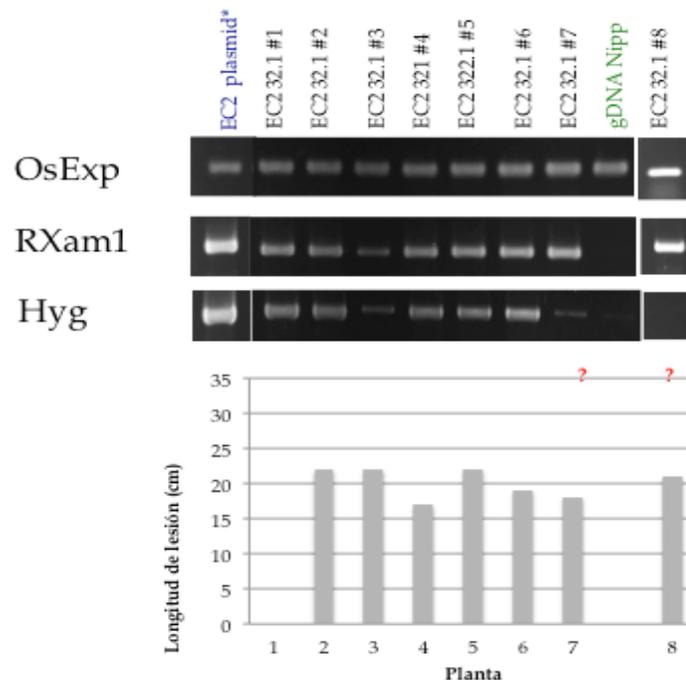


Figura 2-5 Genotipificación y fenotipificación de la línea EC2 32.1.

Panel superior: amplificación de los genes *OsExp*, *Hyg* y *RXam1* en plantas transgénicas EC1 32.1.
 Panel inferior: tamaño de la lesión (cm) de las plantas transgénicas inoculadas con PXO99, luego de 6 semanas posinoculación.



En la Figura 2-5 se observa la amplificación de los genes de interés para las 8 plantas evaluadas de la línea EC2 32.1. En general se puede concluir que todas son transgénicas, sin embargo hay ciertas inconsistencias. La planta 3 por ejemplo presenta una amplificación muy tenue tanto de *RXam1* como de *Hyg*. Por otro lado las plantas 7 y 8 pese a amplificar *RXam1* no amplifican *Hyg*.

Relación entre presencia del inserto *RXam1* y fenotipo

Para los controles de transformación, los cuales corresponden a plantas que contienen el vector vacío (sin *RXam1*), los valores de fenotipo oscilaron entre 18 y 28 cm (datos no mostrados). De las 15 plantas transgénicas confirmadas de la línea EC1 26.1, tan sólo dos (plantas 7 y 18) presentaron lesiones bajas, mientras que ocho de ellas presentan lesiones intermedias y cuatro mostraron lesiones superiores a 20 cm. Adicionalmente de las tres plantas no transgénicas, una de ellas (planta 4) tiene una lesión de 13 cm, lo cual

representa un fenotipo de resistencia. En conclusión, no se evidencia una correlación entre la presencia de *RXam1* y el tamaño de la lesión para esta línea.

De las 14 plantas transgénicas confirmadas de la línea EC2 30.2, tan sólo dos (2 y 17) presentaron lesiones bajas. Adicionalmente tres de ellas (5, 9 y 14) presentaron lesiones intermedias y ocho mostraron lesiones superiores a 20cm. Incluso las plantas con lesiones mayores, como por ejemplo las plantas 3 y 13, presentaron lesiones superiores a 30 cm. Por otro lado de las tres plantas no transgénicas, una de ellas (planta 15) tiene una lesión intermedia, mientras que las otras dos presentaron lesiones superiores a 20cm. Tomando en consideración todo esto, no se evidencia una correlación entre la presencia del gen *RXam1* y la disminución de la lesión.

Finalmente de ocho plantas de la línea EC2 30.2, que presentan el transgén *RXam1*, tres plantas presentaron lesiones intermedias (plantas 4, 6 y 7), mientras que en cuatro de estas plantas las lesiones superaron los 20cm. En general los individuos de esta línea presentaron las lesiones más bajas. Las lesiones oscilaron entre 17-22 cm. Si se tiene en cuenta que las plantas EC1 15.1 presentan lesiones de 18-28 cm, en esta línea hay plantas con lesiones más bajas que las control, sin embargo tampoco se evidencia una correlación entre la presencia de *RXam1* y el tamaño de la lesión.

2.4 Discusión

En ese trabajo se introdujo el gen *RXam1* de yuca en plantas de arroz como una alternativa para la validación funcional de *RXam1*. A partir de las plantas de arroz transgénicas que poseen el gen *RXam1* se realizó una caracterización fenotípica y molecular de 20, 19 y 8 plantas T1 de tres líneas transgénicas (EC1 26.1, EC2 30.2 y EC2 32.1 respectivamente). Las plantas de la línea EC1 poseen el gen *RXam1* de la variedad Bra685, mientras que en las líneas EC2, el gen proviene de la variedad 60444. Se logró demostrar que los individuos de la T1 segregaron el transgén, sin embargo con los datos fenotípicos no se pudo establecer una asociación clara entre la presencia de *RXam1* y el incremento en la resistencia a *Xoo*.

El empleo de un sistema de validación como arroz se constituye en una excelente alternativa por varias razones. *i)* la transformación en yuca es un proceso mucho más lento, mientras que en arroz puede tardar no más de seis meses. *ii)* El alto grado de similitud entre *RXam1* y *Xa21*, 43% de identidad y un 59% de similaridad con *Xa21* (López *et al.*, datos no publicados), sugiere que la proteína de yuca podría tener una función conservada en arroz. *iii)* Bajo el supuesto de que *Xa21* y en consecuencia *RXam1* son *PRRs*, varios reportes han demostrado la transferencia exitosa de *PRRs* entre diferentes especies (Lacombe *et al.*, 2010).

Inicialmente se consideró introducir el gen *Xa21* de arroz en yuca, mediante transformación genética. Investigadores del ETH (Zurich, Suiza) han empleado la misma estrategia generando plantas transgénicas pero no mostraron un incremento en la resistencia (Gruissem, comunicación personal). Esto contrasta con previos estudios que han demostrado el éxito de la transferencia de *Xa21* en cítricos, tomate y banano (Mendes *et al.*, 2010; Afroz *et al.*, 2012; Tripathi *et al.*, 2014). En nuestro laboratorio tras varios esfuerzos no se logró obtener plantas transgénicas con dicho gen.

Alternativamente se llevó a cabo un procedimiento inverso, es decir introducir *RXam1* de yuca en arroz. A pesar de que se obtuvieron plantas de arroz transgénicas con el gen

RXam1 con una morfología normal, se presentaron ciertas complicaciones en las condiciones del invernadero que afectaron el desarrollo normal de las plantas. Sin embargo en uno de los ensayos las plantas mostraron una morfología relativamente normal, lo cual permitió la inoculación y evaluación de síntomas. Sin embargo no se logró establecer una clara asociación entre la presencia del transgén *RXam1* de yuca y la reducción de síntomas tras la inoculación con la cepa de *Xoo*. Teniendo en cuenta que *RXam1* podría ser considerado como un *PRR* valdría la pena expandir este estudio inoculando diferentes cepas de *Xoo*, lo que quizás permitiría encontrar una mayor resistencia a cepas diferentes a PXO99^A que fue la que se empleó en este estudio. No obstante de no observarse resistencia a ninguna de las cepas, se podría inferir que la *MTI* no sea conservada entre arroz y yuca, y por lo tanto *RXam1* no tendría la capacidad de activar la resistencia en arroz. Alternativamente puede suceder que *RXam1* no sea un verdadero *PRR*.

Es importante considerar que pese a tener estructuras similares *RXam1* y *Xa21*, la activación de la señal posterior al reconocimiento está regida por muchas otras proteínas acompañantes, las cuales difieren entre yuca y arroz. Alternativamente *RXam1* podría reconocer una proteína que sea diferente a la que es reconocida por *Xa21*. Aún está por determinarse la proteína o estructura molecular reconocida por *Xa21* para activar la respuesta inmune. Es posible que *RXam1* reconozca algún patrón molecular de *Xam* pero no presente en todas las especies de *Xanthomonas*. Es decir que la molécula blanco no esté presente en *Xoo* y por eso no se haya presentado resistencia en las plantas de arroz transgénicas conteniendo *RXam1*.

Otro factor a considerar es que si bien se pudo establecer que las líneas evaluadas poseen el inserto no se determinó su expresión. En este sentido uno de los estudios posteriores a realizar es la cuantificación de la expresión de *RXam1* en las plantas evaluadas fenotípica y molecularmente. De esta forma podría ser posible que aquellas líneas que no mostraron un mayor nivel de resistencia, el inserto a pesar de estar presente no se exprese en los niveles suficientes para permitir la activación de la respuesta inmune. Futuros estudios encaminados a evaluar el nivel de expresión mediante qRT-PCR permitirían clarificar esta situación.

3 Búsqueda de genes PR marcadores en yuca

3.1 Introducción

La manera en que interactúan plantas y patógenos está determinada por el reconocimiento de moléculas presentes en los patógenos por parte de las plantas para activar la inmunidad y la evasión o bloqueo de esta inmunidad por parte de los patógenos. El reconocimiento depende de los *PRRs* (*pattern recognition receptors*, receptores de reconocimiento de patrones) y de las proteínas codificadas por los genes de resistencia R, los cuales reconocen a los *MAMPs* (*microbe-associated molecular patterns*, patrones moleculares asociados a microorganismos) y a proteínas efectoras respectivamente (Dodds & Rathjen, 2010; Monaghan & Zipfel, 2012). Una vez ocurre el reconocimiento del patógeno por parte de la planta se desencadena una serie de respuestas de defensa. Estas incluyen la fortificación de la pared celular a través de la síntesis de calosa y lignina (Hauck *et al.*, 2003), la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos como fitoalexinas (Almagro *et al.*, 2009) y la activación de las cascadas de señalización por MAPK (mitogen-activated protein kinases, proteínas kinasas activadas por mitógenos) (Meng & Zhang, 2013), entre otras. Todas estas respuestas culminan con la inducción de expresión de genes dentro de los cuales se encuentran aquellos que codifican para proteínas relacionadas con patogenicidad (*PR pathogenesis-related*) (van Loon, *et al.*, 2006).

Las proteínas PR están asociadas con la defensa de la planta, especialmente en interacciones incompatibles, en las cuales se impide el progreso del patógeno. Estas proteínas no poseen un alto grado de especificidad en la respuesta a patógenos, y son coordinadas a nivel transcripcional (van Loon *et al.*, 1999). Los genes que codifican para

estas proteínas han sido ampliamente utilizados como marcadores de defensa en las plantas. Algunas de estas proteínas PR tienen actividad antimicrobiana directa, llegando a producir la muerte del patógeno, mientras que otros sólo inhiben su crecimiento (van Loon *et al.*, 1994).

Las proteínas PR se han agrupado en alrededor de 17 familias de acuerdo a su función biológica, molecular, propiedades físico-químicas u homología de secuencia (Sels *et al.*, 2008) ([Anexo C](#)). Entre las principales proteínas PR se encuentra PR1, cuya función específica se desconoce, pero es ampliamente empleada como marcador de la activación de la respuesta inmune. Las proteínas de las familias PR 3, 4, 8 y 11 son de tipo quitinasas, en tanto PR2 son glucanasas. Las proteínas PR son activadas por ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (Sels *et al.*, 2008).

La yuca es una de las principales fuentes de alimentación en África, Asia y Latinoamérica (FAO, 2010). Sin embargo su producción se ve fuertemente afectada por la bacteriosis vascular, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). En los últimos años se han empleado diferentes estrategias para comprender mejor comprensión los mecanismos celulares y moleculares de la interacción yuca-*Xam*. Gracias a los estudios histológicos (Boher *et al.*, 1995; Kpémoua *et al.*, 1996) y de mapeo (Jorge *et al.*, 2000, 2001), se ha podido establecer que la resistencia a *Xam* es de tipo cuantitativa. El nivel de resistencia puede ser mayor o menor entre las diferentes variedades en tanto que la velocidad de la respuesta es genotipo-dependiente. Se ha observado que las respuestas son más rápidas e intensas en las variedades resistentes (Kpémoua *et al.*, 1996).

Por otro lado se han realizado trabajos en busca de la identificación de proteínas involucradas en el reconocimiento del patógeno, así como el estudio del cambio de la expresión génica durante la interacción de yuca con *Xam*, tanto en variedades resistentes como susceptibles (Santaella *et al.*, 2004; López *et al.*, 2005). Estos estudios han evidenciado el aumento en los niveles de expresión de posibles genes de defensa presentes en yuca y que han sido previamente descritos en otros patosistemas. Estos incluyen genes involucrados en el estallido oxidativo (ascorbato peroxidasa, glutatión-S-transferasa), reconocimiento de patógenos potenciales (proteínas con dominios LRR) y reguladores de transcripción (factores de transcripción de tipo WRKY). También se

identificaron putativos genes *PR* basados no sólo en su similitud sino también en su potencial función como una quitinasa y osmotina (López *et al.*, 2005).

Sin embargo hasta el momento no se ha establecido con certeza cuáles son los genes de tipo *PR* que se inducen en respuesta a *Xam* y si esta expresión es diferencial entre variedades resistentes y susceptibles, ni mucho menos el período de tiempo exacto en el cual se observa una expresión diferencial. Este tipo de conocimiento es fundamental no sólo para caracterizar las respuestas diferenciales sino también para contar con marcadores que permitan determinar rápidamente si se están activando procesos moleculares inducidos en respuesta a una infección. Con este tipo de conocimiento se podría realizar una mejor caracterización de las plantas resistentes y compararlas con susceptibles, y caracterizar molecularmente las respuestas que se dan en plantas transgénicas que posean un gen de otra especie o que sobreexpresen un gen endógeno.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Búsqueda y diseño de cebadores para PR candidatos

A partir de la base de datos Uniprot (www.uniprot.org) se extrajeron las proteínas relacionadas con patogenicidad (PR), reportadas para cada una de las diferentes 17 familias. Se realizó una búsqueda empleando palabras conteniendo los nombres de los PR: PR-1, PR2...PR-17. También se emplearon palabras que abarcaran su función molecular tales como: proteínas relacionadas con patogénesis (*pathogenesis-related protein*) y su actividad asociada al tipo de familia a la cual corresponde.

A partir de las secuencias seleccionadas, se realizó un análisis BLAST de cada una contra el genoma de yuca (www.phytozome.net), para seleccionar las secuencias con mayor similitud a cada uno de los PR de referencia de Uniprot. A partir de las secuencias codificantes (CDS, *coding sequence*) de los genes PR candidatos obtenidos de yuca, se diseñaron los cebadores empleando el programa Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012).

3.2.2 Material vegetal e inoculación

Plantas de tres meses de las variedades 60444 y SG107-35 se crecieron en el invernadero de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, bajo las siguientes condiciones: temperatura de 28°C/21°C (día/noche), humedad relativa de 80%, con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. 15 plantas fueron inoculadas con la bacteria, 15 plantas inoculadas con la solución control (MgCl₂ 10 mM). Para cada tratamiento se colectó el tallo. Los tiempos de toma de muestra fueron a las 0, 1, 3, 5 y 7 días posinoculación (dpi). Adicionalmente, se emplearon 3 controles absolutos, que corresponden a plantas a las que no se le realizó ningún tratamiento (Tabla 3-1).

Para la inoculación se empleó la cepa *Xam* 686, para la cual la variedad 60444 es susceptible, mientras que la variedad SG107-35 es resistente. Las bacterias se crecieron por agotamiento a partir del stock almacenado a -80°C del cepario del laboratorio del

grupo Manihot Biotec de la Universidad Nacional, en medio LPGA ([Anexo A](#)). Las bacterias se crecieron a 28 °C por dos días. Tras obtener colonias aisladas, se tomó una de ellas y se realizó el cultivo en 3 mL de medio LPG ([Anexo A](#)) a 28 °C a 250 rpm durante 12 horas.

Se centrifugó 1 mL del cultivo a 6000 rpm durante 4 min, se descartó el sobrenadante, y posteriormente se resuspendió el precipitado en 1 mL de MgCl₂. Se ajustó a una 600 nm (DO₆₀₀) de 0.02 que corresponde a 10⁷ UFC/mL (unidades formadoras de colonia). La concentración de bacterias empleada se verificó por diluciones seriadas.

La inoculación se realizó en el tallo mediante punción, la cual se realizó entre la segunda y tercera hoja totalmente extendida (≈ 3 cm) con un palillo de madera estéril. El palillo fue removido y se reemplazó por una punta pequeña estéril con 10 µL de la solución bacteriana de *Xam* 686. Para las plantas control se realizó el mismo procedimiento pero con una solución control de MgCl₂ 10 mM. Las muestras se colectaron en nitrógeno líquido en los tiempos previamente establecidos (Tabla 3-1). Se tomó la región del tallo que comprendía 1.5 cm hacia arriba y 1.5 cm hacia abajo desde el punto de inoculación.

Tabla 3-1 Tratamientos empleados en las variedades para la búsqueda de PR

Tratamientos	Tiempo de recolección (dpi)									
	SG107-35					60444				
	0	1	3	5	7	0	1	3	5	7
MgCl ₂ 10 mM	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4
<i>Xam</i> 686 10 ⁷	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4
Control absoluto	3					4				

3.2.3 Extracción de ARN, síntesis de ADNc y RT-PCR

El ARN fue extraído a partir de material vegetal fresco que se colectó y maceró en nitrógeno líquido. El *buffer* de extracción utilizado contenía acetato de sodio 100 mM, EDTA pH 7.5 1 mM y SDS 4% (pH 5.2). Posteriormente se purificó con fenol ácido (pH 4.5): cloroformo: alcohol isoamílico 24:24:1. La fenolización se repitió una vez, y se realizó la extracción con cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, dos veces. Finalmente, se

precipitó con isopropanol. El ARN se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua ultra-pura (libre de nucleasas).

A partir del ARN extraído manualmente, se realizó una purificación empleando el kit *RNA extraction kit* (Invitek, Berlin, Germany). La integridad del ARN se observó en gel de agarosa al 1% y se cuantificó con el espectrofotómetro Nanodrop 2000c TERMO SCIENTIFIC® (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) mediante la medición de absorbancia a 260 y 280 nm.

Una vez obtenido el ARN, se trató con *DNase I* (Thermo Scientific, MA, USA) sobre 600 ng-1000 ng de ARN total, con el fin de remover el ADN genómico y así poder proceder con la síntesis de ADNc. Posteriormente se realizó un *PCR* del gen tubulina sobre el ARN tratado previamente con *DNase I*, como control. La síntesis de primera cadena de ADN se realizó con el kit *First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific, MA, USA). Para verificar la síntesis correcta de ADNc se realizó un RT-PCR con el gen tubulina, el cual se expresa constitutivamente.

Para el ADNc obtenido de cada una de las muestras, se estandarizaron las condiciones para RT-PCR (variando el número de ciclos y la cantidad inicial de ADNc) hasta obtener una amplificación uniforme del gen de la tubulina en cada una de las muestras. Una vez determinada la cantidad de ADNc uniforme para todas las muestras, se realizó la amplificación mediante *PCR* de los genes candidatos a *PR* encontrados.

3.3 Resultados

3.3.1 Búsqueda y diseño de cebadores de PR

Una vez realizada la búsqueda en la base de datos de Uniprot empleando como motor de búsqueda nombre y función el término PR, se seleccionaron la totalidad de genes que codifican para *PR*, un total de 50. Se incluyeron no sólo las secuencias de aminoácidos que estuviesen reportadas como PR sino también las proteínas que en su función molecular presentasen características de PR. Los genes que codifican para estas proteínas PR se resumen en el [Anexo D](#), se descargaron las secuencias en formato FASTA.

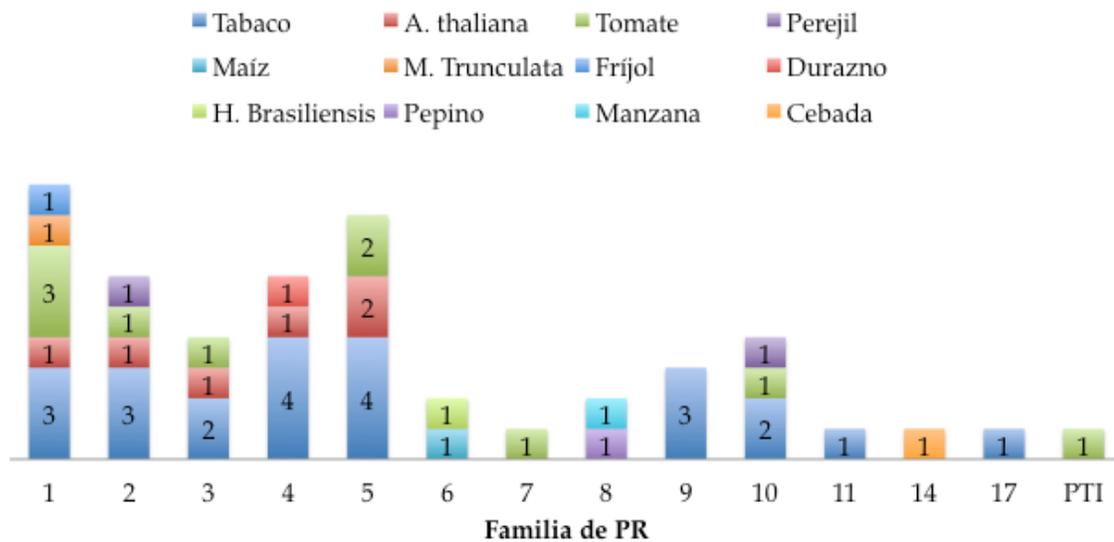
La Figura 3-1 muestra el resumen de los datos encontrados. La mayor cantidad de proteínas PR reportadas provienen de tabaco con 20 secuencias, seguido de tomate con 11 y luego *A thaliana* con siete proteínas. Las demás especies tan sólo tienen una proteína reportada, como el caso de cebada con el PR-14, y la proteína de maíz de la familia PR-6. La familia con mayor número de proteínas reportadas es la PR-1, con nueve proteínas, seguido de la familia PR-5 con ocho proteínas reportadas, luego las proteínas PR-2 y PR-4 con seis proteínas reportadas. Las familias PR-3 y PR-10 presentaron cuatro proteínas seguido de PR-9, PR-6, las demás familias (PR- 7, 11, 14 y 17) tienen tan sólo un reporte.

Con estas secuencias se procedió a realizar un BLASTP en Phytozome (www.phytozome.net) para identificar los genes similares en yuca y a partir de estos resultados se construyó una lista de los genes *PR* por especie y su similar en yuca ([Anexo D](#)). Una vez creada la matriz de los diferentes *PR* reportados y los candidatos similares en yuca, se evaluó si las secuencias de dichos *PR* candidatos identificados estaban presentes en el microarreglo reportado previamente por López *et al.* (2005). Sin embargo no se encontraron en esta colección de *ESTs* (*expressed sequence tag*, marcador de secuencia expresada).

De las secuencias similares en yuca de cada una de las 50 proteínas PR reportadas, tan sólo se seleccionaron aquellas secuencias que dentro de la misma familia de PR tuviesen reportes de secuencias de yuca y se encontraran en varias especies, por lo menos en tres de ellas. A partir de esta selección se diseñaron cebadores ([Anexo E](#)) para realizar *RT-PCR* y *qRT-PCR* (PCR cuantitativa) con el programa PrimerQuest (Integrated DNA Technologies, www.idtdna.com).

Figura 3-1 Proteínas candidatas a PR en yuca.

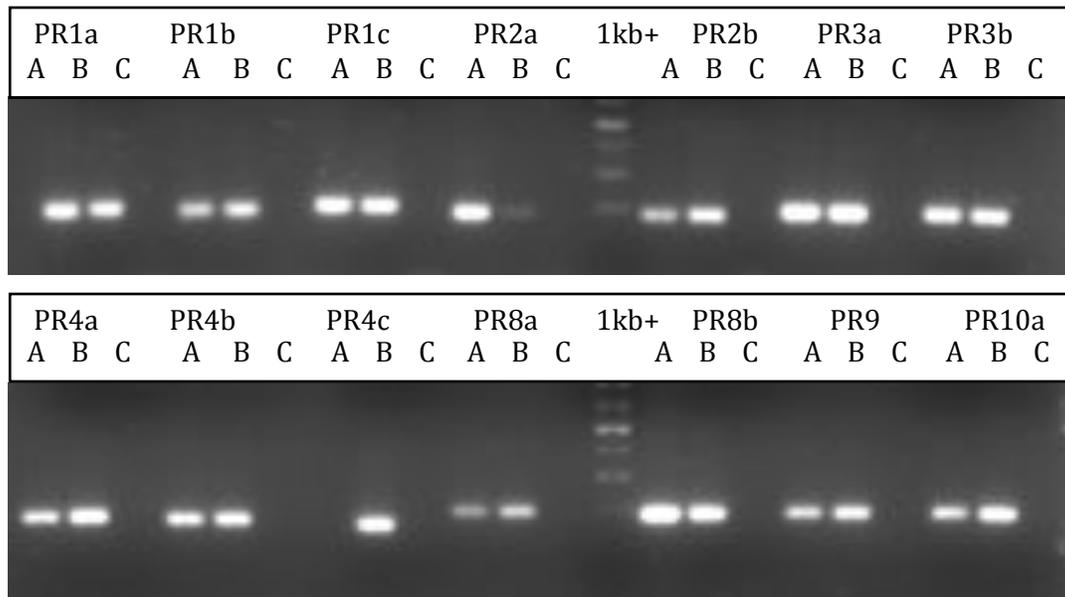
Proteínas de yuca que presentaron similitud con proteínas PR en otras especies.



Se sintetizaron 15 juegos (*forward –reverse*) de cebadores, tres cebadores para PR-1 y PR-4, dos cebadores para PR-2, PR-3, PR-8 y PR-10 y un cebador para PR-9 ([Anexo E](#)). La clasificación de las familias se presenta en la Tabla 3-2. Para verificar el correcto diseño y amplificación se realizó un *PCR* sobre ADN genómico de las variedades 60444 y SG107-35 y empleando una temperatura de anillamiento de 52°C para todos ellos. De los 15 candidatos, 14 amplificaron en la variedad 60444 y SG107-35 (Figura 3-2). El único juego de cebadores que no amplificó fue el correspondiente a PR10b.

Tabla 3-2. Familias de proteínas PR seleccionadas en yuca

PR	Familia	Familia
PR1a	Pfam:00188 Cysteine-rich secretory protein family	
PR1b	Pfam:00188 Cysteine-rich secretory protein family	
PR1c	Pfam:00188 Cysteine-rich secretory protein family	
PR2a	Pfam:00332 Glycosyl hydrolases family 17	
PR2b	Pfam:00407 Pathogenesis-related protein Bet v I family	
PR3a	Pfam:00182 Chitinase class I	Pfam:00187 Chitin recognition protein
PR3b	Pfam:00182 Chitinase class I	Pfam:00187 Chitin recognition protein
PR4a	Pfam:00187 Chitin recognition protein	
PR4b	Pfam:00187 Chitin recognition protein	Pfam:00967 Barwin family
PR4c	Pfam:00967 Barwin family	
PR8a	Pfam:00704 Glycosyl hydrolases family 18	
PR8b	Pfam:00704 Glycosyl hydrolases family 18	
PR9	Pfam:00141 Peroxidase	
PR10a	Pfam:00407 Pathogenesis-related protein Bet v I family	
PR10b	Pfam:00407 Pathogenesis-related protein Bet v I family	

Figura 3-2 Amplificación de genes PR candidatos sobre ADN genómico de SG107-35 y 60444.

A= ADN genómico de SG197-35 B= ADN genómico de 60444 C= Control negativo Mix PCR

3.3.2 RT-PCR de SG107-35 y 60444

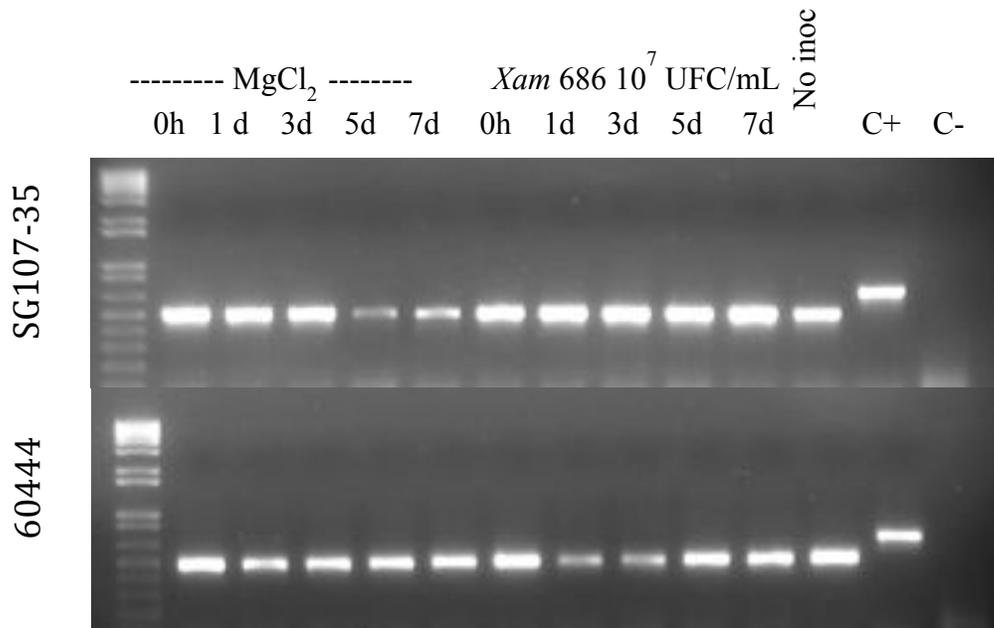
Una vez verificado que los cebadores podrían amplificar sobre el ADN genómico de las dos variedades, se evaluaron sobre ADNc obtenido a partir de las plantas de yuca de la variedad 60444 inoculada con CIO151 y colectado a diferentes tiempos posinoculación. A partir del ADNc sintetizado se realizó la amplificación de un gen constitutivo de tubulina (*tubint*), con el fin de verificar la calidad del ADNc, estandarizar y nivelar los ADNc, de tal manera que la cantidad de ADNc molde sea homogénea en todas las muestras. En la Figura 3- 3 se muestra la amplificación del gen de tubulina sobre el ADNc de las dos variedades SG107-35 (superior) y 60444 (inferior) a los diferentes tiempos, 0h, 1, 3, 5 y 7 días, tanto para el tratamiento con la solución control (MgCl_2 10 mM), como para la bacteria (Xam 686 10^7 UFC/mL).

En la figura 3-3 se muestra la amplificación del gen de tubulina, para la homogenización del ADNc de cada muestra. Cada carril representa el ADNc obtenido de las dos variedades SG107-35 (superior) y 60444 (inferior), tratadas con la solución control (MgCl_2 10 mM) o con la bacteria (Xam 686 10^7 UFC/mL) y colectado a 0, 1, 5 y 7 dpi.

Una vez determinada la cantidad de ADNc adecuada en cada muestra que amplificara un fragmento visualmente homogéneo se empleó esta cantidad para realizar la amplificación de los genes correspondientes a los PR.

Figura 3-3 Estandarización de la amplificación de Tubint en ADNc.

Amplificación de tubulina en plantas de las variedades SG107-35 y 60444 al ser inoculadas con el control ($MgCl_2$ 10mM) y la solución bacteriana (*Xam* 686 10⁷ UFC/mL) a diferentes tiempos posinoculación. C+: ADN genómico de la variedad. C-: Mix PCR tubulina.

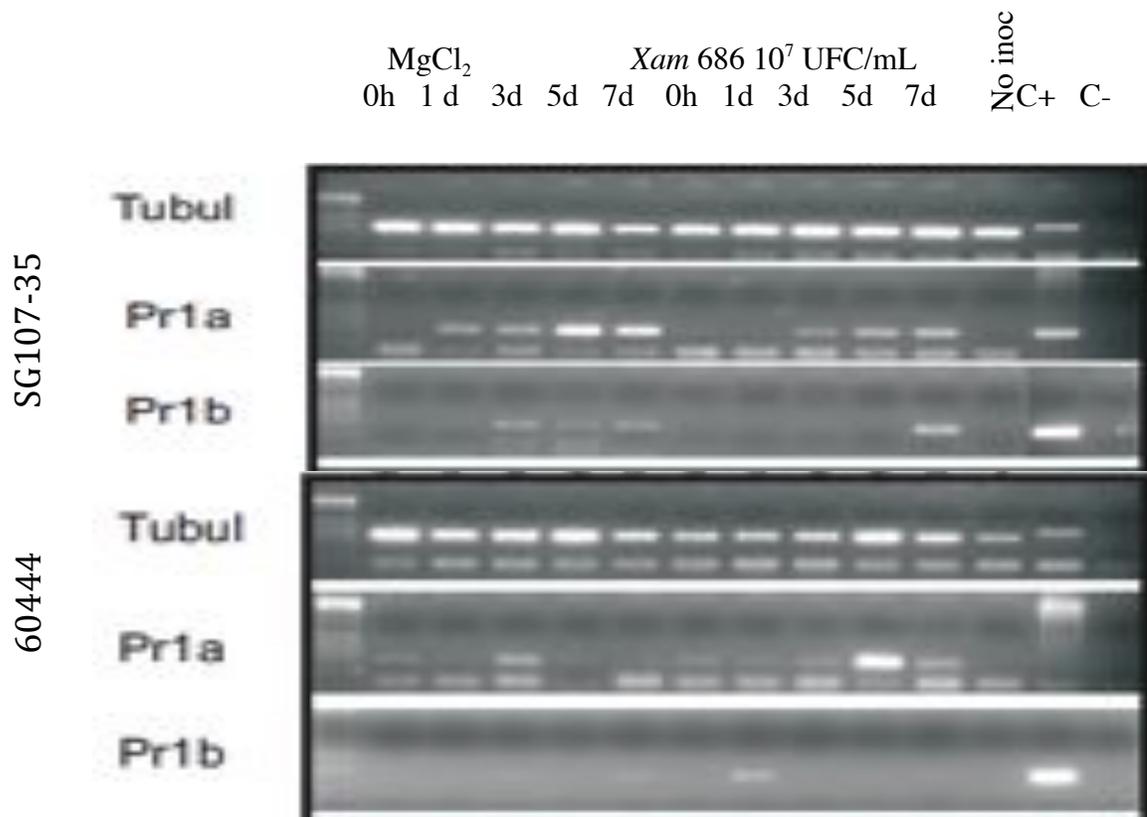


En la figura 3-4 se observa la expresión de los genes *PR* 1a y 1b en las dos variedades SG107-35 y 60444. En todos los casos, se logró amplificar el control positivo y no se presentaron problemas de contaminación con ADN, ya que en ningún caso amplificó el control negativo (C-, último carril). Si bien hubo una inducción del gen *PR1a* (proteína secretora rica en cisteína), esta se presentó desde el 1d en las plantas inoculadas con la solución control y desde el 3d en las plantas inoculadas con la bacteria, sin embargo esta amplificación no fue marcadamente fuerte en las plantas inoculadas con la bacteria como se esperaba encontrar en esta variedad SG107-35. Para la variedad 60444 se observa la inducción tenue de *PR1a* a las 0h y 3d en el tratamiento con el control, para las plantas inoculadas con la bacteria se evidencia inducción a las 0h, 1d, 3d con una marcada expresión al 5d, disminuyendo hacia el 7d. Por otro lado se observa en la variedad SG107-35, la inducción leve de la expresión de *PR1b* a 3, 5 y 7 dpi para las plantas tratadas con la solución control, en tanto las plantas inoculadas con la bacteria presentan

una clara inducción del *PR1b* a 7 dpi, lo cual es un comportamiento muy interesante dado que en la variedad susceptible 60444 sólo se observa una leve inducción a 1 dpi con la bacteria, por lo cual hay una inducción clara en la variedad resistente SG107-35 ante la inoculación con la bacteria a 7dpi.

Figura 3-4 Amplificación de genes *PR1a* y *PR1b* en las dos variedades.

Amplificación de *PR1a* y *PR1b* en plantas de las variedades SG107-35 y 60444 al ser inoculadas con el control ($MgCl_2$ 10mM) y la solución bacteriana (*Xam* 686×10^7 UFC/mL) a diferentes tiempos posinoculación. C+: ADN genómico de la variedad. C-: Mix PCR tubulina.

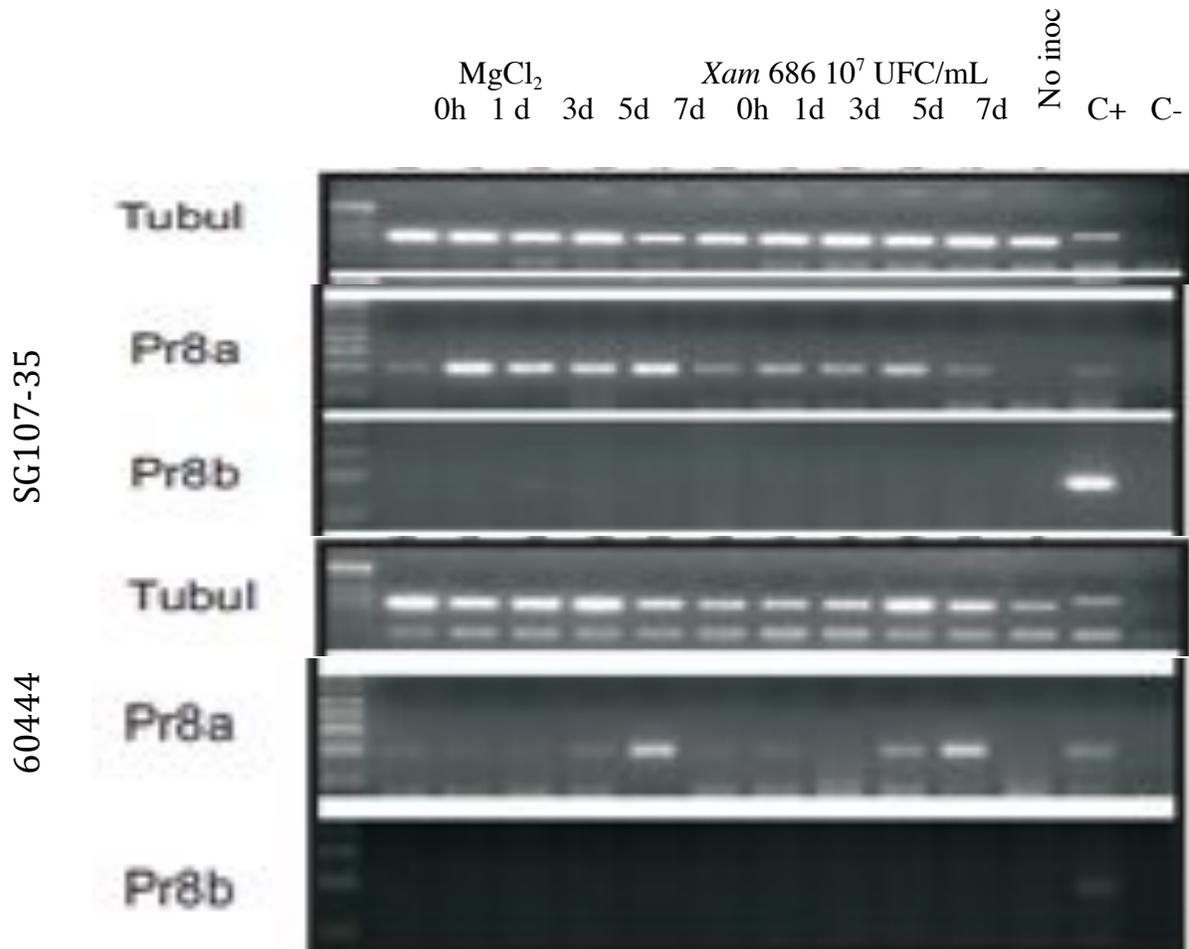


En la figura 3-5 se observa la expresión de los genes *PRb8a* y *PRb8b*, en las dos variedades SG107-35 y 60444, se logró amplificar el control positivo en todos los casos, y no se presentaron problemas de contaminación, ya que en ningún caso amplificó el control negativo. El gen *PR8a* (glicosil-hidrolasa) mostró una expresión desde el tiempo cero tanto en las plantas tratadas con la solución control como las infectadas con *Xam*. para la variedad resistente SG107-35. En la variedad susceptible 60444 el *PR8a* se expresa en todos los tratamientos, con una fuerte inducción en la planta inoculada con la solución control y colectada a los 7 dpi; de igual manera hay un incremento en la expresión de las plantas inoculadas con *Xam* y colectadas a los 5 y 7 dpi, siendo mayor

en este último tiempo. El gen *PR8b* perteneciente a la familia glicosil-hidrolasa no se expresó en ningún tratamiento, en ninguna variedad.

Figura 3-5 Amplificación de genes *PR8a* y *PR8b* en las dos variedades

Amplificación de *PR8a* y *PR8b* en plantas de las variedades SG107-35 y 60444 al ser inoculadas con el control ($MgCl_2$ 10mM) y la solución bacteriana (*Xam* $686 \cdot 10^7$ UFC/mL) a diferentes tiempos posinoculación. C+: ADN genómico de la variedad. C-: Mix PCR tubulina.

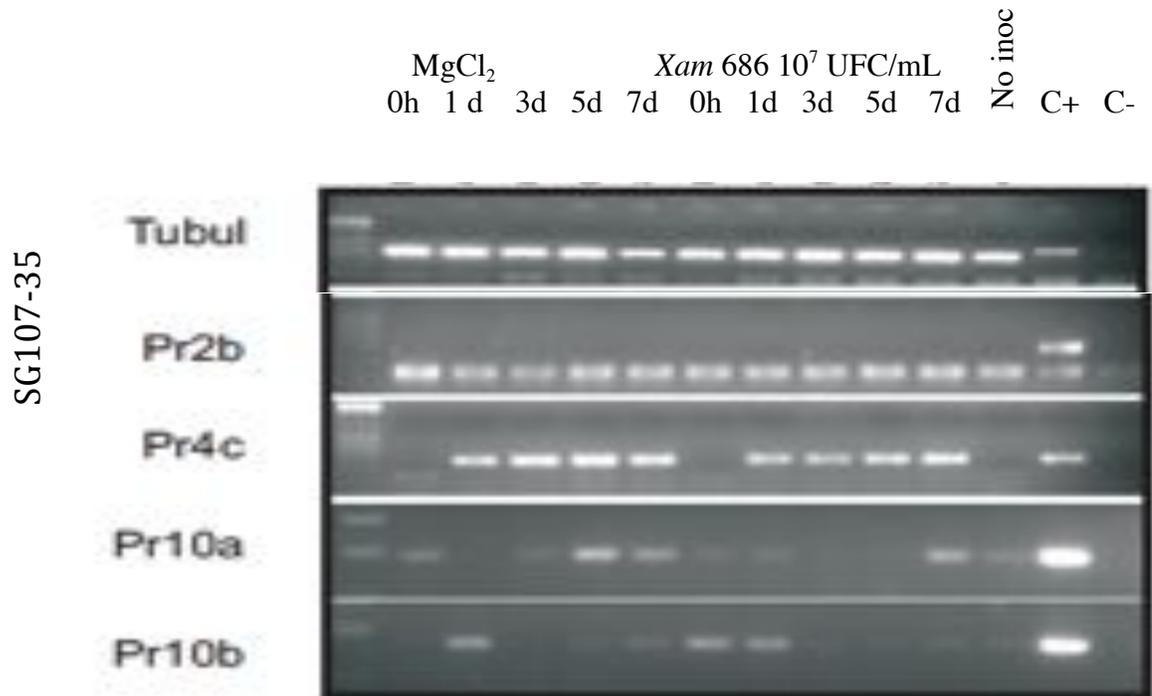


Finalmente en la Figura 3-6 se presenta la expresión de los genes *PR2b*, *PR4c*, *PR10a* y *PR10b* en la variedad SG107-35. No se observa expresión de *PR2b* en ningún tratamiento. El gen *PR4c* se indujo tanto para las plantas tratadas con la solución control, como en las infectadas con *Xam* en todos los tiempos a partir de 1 dpi. Los genes *PR10a* y *PR10b* (familia Bet vI) presentaron una amplificación sin una aparente tendencia, incluso hay una leve amplificación en el control absoluto (plantas de la misma edad a las que no se les realizó la inoculación ni con la solución control ni con *Xam*). Las demás

amplificaciones no se muestran en la figura dado que no presentan una tendencia clara, tal como se observa en los PR10a y PR10b de las plantas de la variedad SG107-35.

Figura 3-6 Amplificación de genes *PR2b*, *PR4c*, *PR10a* y *PR10b* en SG107-35.

Amplificación de *PR2b*, *Pr4c*, *PR10a* y *PR10b* en plantas de las variedades SG107-35 y 60444 al ser inoculadas con el control ($MgCl_2$ 10mM) y la solución bacteriana (*Xam* 686 10^7 UFC/mL) a diferentes tiempos posinoculación. C+: ADN genómico de la variedad. C-: Mix PCR tubulina.



3.4 Discusión

Las proteínas PR tienen una actividad muy importante durante las respuestas inmunes. La producción de tales proteínas es inducida por la activación de la señalización que se genera ante el reconocimiento del patógeno. Las proteínas PR tienen actividad antimicrobiana y afectan directamente la viabilidad y crecimiento del patógeno (van Loon, 1999a). Además de esto, la determinación de la expresión de las proteínas PR se convierte en un excelente marcador de la activación de la respuesta inmune (van Loon *et al.*, 2006). A pesar de la importancia de estas proteínas no se han descrito y estudiado proteínas de este tipo en yuca.

Para llenar este vacío se realizó una aproximación bioinformática basada en la similitud de estas proteínas entre especies para identificar un grupo de genes PR candidatos en yuca. El trabajo se realizó en dos variedades con respuestas a la infección contrastantes, considerando sus respectivas AUDPC (*area under the disease progress curve*, área bajo la curva del progreso de la enfermedad). Trujillo *et al* (2014) realizaron un ensayo de patotipos con nueve variedades de yuca y su respuesta (AUDPC) a diez aislamientos de *Xam*. Las variedades SG1087-35 y 60444 presentan una respuesta contrastante ante el aislamiento *Xam686* con una AUDPC de 1.44 y 1.90 respectivamente, por lo cual se pueden catalogar como variedad resistente y susceptible para esta cepa de *Xam*. A partir de un juego de 15 posibles genes que codificarían para proteínas candidatas de PR de yuca se evaluó la expresión de 14 de ellos en SG107-35 y 60444 durante la respuesta a *Xam686*.

Ya que la respuesta observada puede darse, bien sea por la herida o por el patógeno, uno de los objetivos de este trabajo fue estimar la diferencia en la expresión de los genes entre la respuesta ocasionada por la herida y la infección ocasionada por *Xam*. El otro objetivo fue identificar el efecto de la infección bacteriana en el genotipo resistente y el susceptible. Así para evaluar el efecto del daño por inoculación en la inducción de la

expresión de genes *PR*, las plantas fueron tratadas con $MgCl_2$ 10mM. Así se pudo investigar si el daño físico es suficiente para inducir la respuesta de defensa.

Estudios de microarreglos permitieron identificar un posible grupo de proteínas PR en yuca basado en su inducción en respuesta a *Xam* y su similitud con proteínas PR descritas en otras especies (López *et al.*, 2005). La expresión de estos genes se ha evaluado recientemente en el grupo pero no se han logrado obtener resultados consistentes. De igual manera el grupo de W. Gruissem en el ETH evaluaron la expresión de algunos de estos genes candidatos durante la respuesta de yuca a *Xam* sin encontrar perfiles claros de inducción (Grussem, oral presentation Uganda, 2012). Para ampliar el repertorio posible de genes *PR* en yuca se empleó una aproximación bioinformática. Basado en 50 secuencias de PR de otras plantas se logró obtener un grupo de 15 posibles genes *PR* en yuca. Las secuencias de las proteínas *PR* hacen parte de familias multigénicas (Sudisha *et al.*, 2012); así por ejemplo para el caso de PR1 existe el PR1a, PR1b y PR1c. Algo similar sucede con el PR2, PR4, PR8 y PR10. Estas proteínas presentan un alto grado de especificidad como respuesta a un patógeno y son reguladas a nivel transcripcional (van Loon, 1999b). Por esta razón resulta difícil, determinar cuáles de los diferentes miembros que presentan similitud con yuca están implicados en la respuesta a *Xam*. Para cada uno de los genes *PR* se identificaron en general más de cuatro posibles genes en yuca ([Anexo D](#)). Esto llevaría a evaluar más de 50 posibles juegos de cebadores para los genes de yuca; por esta razón en este estudio se seleccionó sólo un subgrupo de ellos.

Se seleccionaron 15 genes candidatos *PR* en yuca (ver Tabla 3-2). Los resultados muestran que la expresión de *PR1a* se da en las dos variedades; sin embargo, la inducción en SG107-35 se presenta tanto para la solución control como para la inoculación con la bacteria, a partir de 1 dpi en el tratamiento control y a partir del 3 dpi en el tratamiento con la bacteria. Por otro lado para 60444 la inducción se da en el tiempo 0 y 3 dpi con la solución control y en todos los tiempos para la bacteria, con un aumento de expresión a los 5 dpi. Este comportamiento aunque se da en la variedad susceptible, es marcadamente fuerte, lo cual hace de este un buen candidato a marcador de defensa.

Para *PR1b* la expresión en la variedad resistente SG107-35, se presenta en los tiempos 3, 5, y 7 dpi en el tratamiento con la solución control y para el día 7 en el tratamiento con

bacteria. Para la variedad 60444 se expresa tenuamente al día 7 en la solución control y el primer día en la inoculación con la bacteria. Al inducirse en tiempos tardíos en la variedad SG107-35 y en tiempos tempranos en la variedad 60444, es posible considerarlo un candidato a marcador de defensa.

En cuanto a *PR1c*, presentó expresión sin un patrón claro y consistente (datos no mostrados). La expresión de estos genes en yuca, no presenta un patrón definido y característico de una reacción de resistencia o susceptibilidad.

Los genes de la familia *PR1* son inducidos por AS (ácido salicílico) y por la presencia de patógenos, razón por la cual se ha empleado particularmente como marcador de resistencia (Mitsuhara *et al.*, 2008); sin embargo, pese a ser una familia tan ampliamente estudiada, aún se desconoce su función. En arroz se ha reportado la inducción de dos *PR1* (a y b) por la infección causada por el *Magnaporthe grisea* (Agrawal *et al.*, 2001) y por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Wu *et al.*, 2011). Por otro lado, en *Arabidopsis*, de 22 genes predichos *PR1* similares a *PR1a* de tabaco, sólo uno respondía a este patógeno (van Loon *et al.*, 2006). Por lo tanto la inducción de *PR1* no es exclusiva de respuesta a patógenos. Es posible que una situación similar se este presentando en el caso de yuca, en donde no todos los miembros de la familia *PR1* estén implicados en la inmunidad. La evaluación de la expresión de todos los miembros de esta familia en respuesta a *Xam* podría permitir identificar cuál de ellos es el que juega un rol en resistencia. Mitsuhara *et al.* (2008) reportan la inducción de genes de esta familia ante interacciones compatibles e incompatibles frente al añublo, aunque también se da con diferentes estímulos.

Para *PR4c* se observa una inducción a los tiempos 1, 3, 5, 7 dpi tanto en el tratamiento con $MgCl_2$ 10 mM, como en el tratamiento con *Xam* en la variedad resistente. En contraste, la variedad susceptible no presentó inducción de este gen candidato. Esta respuesta parece ser dependiente del genotipo. La familia *PR4* está constituida por endoquitinasas de clase I y II (Neuhaus *et al.*, 1996); la primera familia presenta un dominio C-terminal Barwin y un péptido señal en su extremo N-terminal similar a la hevaína (CBP-*chitin binding polypeptide*, polipéptido de unión a quitina), superfamilia de lectinas que se unen a quitina; la segunda familia carece de este dominio N-terminal (van Damme *et al.*, 1999) y se induce por ataque de patógenos, inhibiendo el crecimiento de las hifas de hongos. Tal es el caso de MdPR4 de manzana, que presenta actividad ribonucleasa y su

regulación se da principalmente por AS y AJ (Bai *et al.*, 2013). Aunque se esperaría que la inducción de este gen sólo se presentara en presencia de patógenos, Guevara-Morato (2010) reportan un PR4 en *Capsicum chinense* con actividad dual ARNasa y ADNasa, y aunque este gen se induce en interacciones compatible e incompatible, su inducción es mayor en la incompatible.

Para la familia PR10 se evaluaron dos genes *PR10a* y *PR10b*. La expresión de estos genes no es clara, para *PR10a* se presenta inducción 0, 3, 5 y 7 dpi, siendo el quinto día, el más fuerte en la variedad resistente con el tratamiento de $MgCl_2$ 10 mM. Plantas tratadas con las bacterias presentan una leve inducción a 0 y 1 dpi y aumenta a los 7 dpi. Para *PR10b* en la variedad resistente, el tratamiento con la solución control presenta inducción en los tiempos 1, 5, y 7 dpi, en tanto para la inoculación con *Xam* se presenta en los tiempos 0, 1, 5 y 7 dpi. Cabe anotar que hay una expresión tenue en plantas control absoluto, por lo tanto con esta información no es posible determinar la inducción de este gen en respuesta a la herida o al patógeno. La familia PR10 se ha reportado como multigénica. Por ejemplo, para *Lupinus luteus*, se han reportado nueve proteínas PR10 (Pasternak *et al.*, 2005). En cuanto a su expresión la inducción de esta se puede dar por factores bióticos o abióticos. Tal es el caso de PR10 de *Capsicum annum* el cual fue aislado en respuesta a la inoculación con el virus del mosaico del tabaco (Park *et al.*, 2004). Sin embargo en alfalfa se ha visto una inducción en respuesta a estreses abióticos como el calor, NaCl o frío (Borsics & Lados, 2002).

Los genes que codifican para proteínas PR por definición son aquellas que se inducen en respuesta a patógenos. En este estudio se observó que la mayoría de los genes PR candidatos de yuca muestran una inducción tanto en plantas tratadas con $MgCl_2$ 10 mM como infectadas con *Xam*. Esto indica que es una respuesta no específica. Previamente se ha reportado la expresión de genes PR en plantas sanas, sin ningún tipo de estrés (Tuzun, 2001). En el caso de yuca quizá la herida en el tallo genera una respuesta que puede ser similar a la que ocasionan patógenos necrótrofos o herbívoros, y esto puede llevar a la inducción de genes *PR*. De tal manera que la inducción observada no sea una consecuencia de la infección por *Xam*.

Como alternativa se podría evaluar la expresión en tejido de tallo distal al punto de infección. Recientemente se ha mostrado que se puede cuantificar una respuesta

diferencial entre R (resistencia) y S (susceptibilidad) tomando tejido desde 1cm a 6cm desde el punto de inoculación (Muñoz-Bodnar *et al.*, sometido).

En este estudio no se logró identificar ningún gen *PR* que mostrara inducción específica en respuesta a *Xam*, sin embargo *PR1a* y *PR1b* son genes candidatos a marcadores de defensa ya que presentan una respuesta diferencial en la expresión, a diferentes tiempos y respuesta diferencial entre las variedades.

Conclusiones

El presente trabajo está encaminado a la validación funcional del gen *RXam1*. Para ello se realizaron tres aproximaciones. En la primera, se sobreexpresó el gen *RXam1* en la variedad susceptible 60444, se lograron obtener los constructos pCAMBIA1305.2 35S::*RXam1*::NOS y pCAMBIA1305.2 35S::*NOS* en *Agrobacterium tumefaciens*, que se utilizaron en la transformación por embriogénesis somática, de la que se lograron obtener plantas transgénicas. Actualmente se cuenta con 19 potenciales líneas transgénicas, de las cuales tres de ellas L15, 16 y 18 sobreexpresan *RXam1*, para evaluar fenotípicamente, en condiciones de invernadero ante diferentes cepas de *Xam*.

La segunda aproximación se basó en el empleo de un sistema heterólogo aprovechando la amplia similitud del gen *RXam1* de yuca con el gen *Xa21* de arroz. En este caso se llevo a cabo la sobreexpresión de *RXam1* en plantas de arroz susceptible a *Xoo* (*Xa21* no funcional). A partir de las transformaciones previamente realizadas a partir de los constructos EC0 (*pC5300-EV*) EC1 (*pC5300::RXam1M685*) y EC2 (*pC5300::RXam1T60444*), se corroboró la presencia del inserto *RXam1* en las plantas. Sin embargo, no se encontró una relación entre la presencia del gen y la disminución de la lesión causada por *Xoo*. Se hace necesario realizar el análisis de expresión de dicho gen para continuar con la evaluación de estas plantas, ya sea por medio de RT-PCR o PCR en tiempo real para *RXam1*

La búsqueda de marcadores de defensa mediante una aproximación bioinformática y su evaluación experimental en plantas de yuca infectada con *Xam* permite inferir que actualmente (una réplica evaluada por tratamiento) no se ha identificado un gen que pueda ser empleado como marcador de defensa, sin embargo se cuenta con algunos genes candidatos (*PR1a* y *PR1b*) que podrían emplearse como marcadores de defensa. Al tratarse de familias con varios miembros en donde no todos ellos están implicados en

inmunidad, es posible que sea necesario la evaluación de todos los miembros de la familia para identificar el implicado en inmunidad. La base de datos de las proteínas putativas PR de yuca pueden servir para análisis bioinformáticos más profundos y eventualmente la búsqueda de otros genes que puedan estar implicados en las respuestas de defensa de la planta.

Bibliografía

Abaca, A., Kiryowa, M., Awori, E., Andema, A., Dradiku, F., Moja, A., Mukalazi, J.. Cassava pests and diseases' prevalence and performance as revealed by adaptive trial sites in north western Agro-Ecological Zone of Uganda. *Journal of Agricultural Science*, 6,116-122.

Abramovitch, R.B., Anderson, J.C., & Martin, G.B. (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 601-611.

Afroz A, Chaudhry Z, Rashid U, Muhammad Ali G, Nazir F, Iqbal J.& Khan MR (2011) Enhanced resistance against bacterial wilt in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) lines expressing the Xa21 gene. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104, 227–237.

Agarwal, P., Bhatt, V., Singh, R., Das, M., Sopory, S. K., & Chikara, J. (2013). Pathogenesis-related gene, JcPR-10a from *Jatropha curcas* exhibit RNase and antifungal activity. *Molecular Biotechnology*, 54(2), 412-425.

Agrawal, G. K., Rakwal, R., Jwa, N. S., & Agrawal, V. P. (2001). Signalling molecules and blast pathogen attack activates rice *OsPR1a* and *OsPR1b* genes: A model illustrating components participating during defence/stress response. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(12), 1095-1103.

Aguilera, D. M. (2012). La yuca en el Caribe colombiano: de cultivo ancestral a agroindustrial. Documentos de trabajo sobre Economía Regional, Banco de la República Colombia, número 158.

Alfano, J.R., & Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology* 42, 385-414.

Allem AC. 1994. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 41:133-150.

Almagro, L., Ros, L. G., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Barceló, A. R., & Pedreño, M. A. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 377-390.

Álvarez, E., Bellotti, A., Calvert, L., Arias, B., Cadavid, L., pineda, B., Llano, G., & Cuervo, M. (2002). Guía práctica para el manejo de las enfermedades, las plagas y las deficiencias nutricionales de la yuca (Cali, CIAT).

Arrieta-Ortiz, M. L., Rodríguez-R, L. M., Pérez-Quintero, Á. L., Poulin, L., Díaz, A. C., Rojas, N. A., ... & Bernal, A. (2013). Genomic survey of pathogenicity determinants and VNTR markers in the cassava bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strain CIO151. *PloS One*, 8(11), e79704.

Bahar, O., Pruitt, R., Luu, D. D., Schwessinger, B., Daudi, A., Liu, F., ... & Ronald, P. (2014). The *Xanthomonas* Ax21 protein is processed by the general secretory system and is secreted in association with outer membrane vesicles. *PeerJ*, 2, e242.

Bai, S., Dong, C., Li, B., & Dai, H. (2013). A PR-4 gene identified from *Malus domestica* is involved in the defense responses against *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 62, 23-32.

Bart R, Cohn M, Kassen A, McCallum EJ, Shybut M, Petriello A, Krasileva K, Dahlbeck D, Medina C, Alicai T, Kumar L, Moreira LM, Rodrigues Neto J, Verdier V, Santana MA, Kositcharoenkul N, Vanderschuren H, Gruissem W, Bernal A, Staskawicz BJ (2012) High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved

effectors to target for durable resistance.. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 109:E1972–E1979.

Bent, A.F., & Mackey, D. (2007). Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual Review of Phytopathology* 45, 399-436.

Boava, L. P., Cristofani-Yaly, M., Stuart, R. M., & Machado, M. A. (2011). Expression of defense-related genes in response to mechanical wounding and *Phytophthora parasitica* infection in *Poncirus trifoliata* and *Citrus sunki*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 76(2), 119-125.

Boch, J., Bonas, U. (2010). *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology*. 48:419–436.

Bogdanove, A.J., Schornack, S., Lahaye, T. (2010) TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current Opinion in Plant Biology*. 13:394–401.

Boher, B., Kpémoua, K., Nicole, M., Luisetti, J., Geiger, J. P. (1995). Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*: cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. *Phytopathology* 85: 777-788.

Böhm, H., Albert, I., Fan, L., Reinhard, A., Nürnberger, T. (2014). Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Current Opinion in Plant Biology*. 20:47-54.

Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379-406.

Borsics, T., & Lados, M. (2002). Dodder infection induces the expression of a pathogenesis-related gene of the family PR-10 in alfalfa. *Journal of Experimental Botany*, 53(375), 1831-1832.

Bravo, J. M., Campo, S., Murillo, I., Coca, M., & San Segundo, B. (2003). Fungus-and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the

pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize. *Plant Molecular Biology*, 52(4), 745-759.

Bull, S.E., Owiti, J.A., Niklaus, M., Beeching, J.R., Grissem, W., & Vanderschuren, H. 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation of friable embryogenic calli and regeneration of transgenic cassava. *Nature Protocols* 4, 1845-1854.

Cadavid, L.F. (2005). *Producción de Yuca*, 1 Edn . CIAT, Cali, Colombia.

Calvert, L., Cuervo, M., Lozano, I., Villareal, N., & Arroyabe, J. (2008). Identification of Three Strains of a Virus Associated with Cassava Plants Affected by Frogskin Disease. *Journal of Phytopathology* 156, 647-653.

Castiblanco, L. F., Gil, J., Rojas, A., Osorio, D., Gutierrez, S., Muñoz- Bodnar, A., Pérez-Quintero, A L., Koebnik, R., Szurek, B., López, C., Restrepo, S., Verdier, V., Bernal, A. J. (2012). TALE1 from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* acts as a transcriptional activator in plant cells and is important for pathogenicity in cassava plants. *Molecular Plant Pathology*. 14:84–95

Ceballos, H. (2002). La yuca en Colombia y el mundo: nuevas perspectivas para un cultivo milenario. En: Ceballos H, Ospina B (eds.) *La Yuca en el Tercer Milenio; Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*. CIAT, Cali, Colombia, pp.1-13.

Ceballos, H., de la Cruz, G. A. (2002). Taxonomía y morfología de la yuca. En: Ceballos H, Ospina B (eds.) *La Yuca en el Tercer Milenio; Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*. CIAT, Cali, Colombia, pp. 15–32.

Ceballos, H., Kulakow, P., Hershey, C. (2012). Cassava Breeding: current status, bottlenecks and the potential of biotechnology tools. *Tropical Plant Biology* 5:73-87.

Ceballos, H., Okogbenin, E., Pérez, J.C., López-Valle, L.A.B., & Debouck, D. (2010). Cassava. In *Root and tuber crops*, J.E. Bradshaw, ed. (London, SpringerLink), pp. 53-96.

Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. & Felix, G. (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* 18, 465–476

Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803-814.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (1980) Annual Report. Cali, Colombia.

Coca, M., Bortolotti, C., Rufat, M., Peñas, G., Eritja, R., Tharreau, D., Martinez, A., Messeguer, J., & San-Segundo, B. (2004). Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Molecular Biology* 54, 245-259.

Constable, C.P., Brisson, N. (1992). The PR related STH-2 gene product of potato show race specific accumulation after inoculation with low concentration of *Phytophthora infestans* zoospores. *Planta* 188:289–295.

Contreras, N.E., & López, C.E. (2008). Expresión de dos genes candidatos a resistencia contra la bacteriosis vascular en yuca. *Acta Biológica Colombiana* 13, 175-188.

Dodds, P.N., & Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews* 11, 539-548.

Dow M, Newman MA, von Roepenack E. (2000). The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annual Review. Phytopathology.* 38:241–61

El-Sharkawy, M.A., (2012). Stress-Tolerant Cassava: The Role of Integrative Ecophysiology-Breeding Research in Crop Improvement. *Open Journal of Soil Science.* 2:162-186.

ETC Group. 2009. Who will feed us? Questions for the food and climate crises. ETC Group, Canada [En Línea]

http://www.etcgroup.org/upload/publication/pdf_file/ETC_Who_Will_Feed_Us.pdf. [Fecha de consulta Junio 10 de 2014]

FAO (2008). Yuca para la seguridad alimentaria y energética. [En línea] <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2008/1000899/index.html> [Fecha de consulta 21 de octubre de 2012]

FAO (2010). The hague conference on agricultura, food security and climate change “Climate-Smart” Agriculture. Policies, Practices and Financing for Food Security, Adaptation and Mitigation. Roma.

FAO (2013). Ahorrar para crecer: la yuca. Guía a la intensificación sostenible de su producción. Roma.

FAOSTAT [En línea] http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/rankings/commodities_by_regions/S [Fecha de consulta Junio 10 de 2014]

Faulkner, C., Petutschnig, E., Benitez-Alfonso, Y., Beck, M., Robatzek, S., Lipka, V., Maule, A.J. (2013). LYM2-dependent chitin perception limits molecular flux via plasmodesmata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:9166-9170

Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal* 18, 265-276.

Fregene, M., Angel, F., Gomez, R., Rodriguez, F., Chavarriaga, P., Roca, W., Tohme, J., and Bonierbale, M. (1997). A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 95: 431-441.

Greeff, C., Roux, M., Mundy, J., Petersen M. (2012). Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. *Frontiers in Plant Science*, 3:209.

Gómez-Gómez, L., & Boller, T. (2000). FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 5(6), 1003-1011.

Gómez-Gómez, L., Rubio-Moraga, A., & Ahrazem, O. (2011). Molecular cloning and characterisation of a pathogenesis-related protein CsPR10 from *Crocus sativus*. *Plant biology*, 13(2), 297-303.

Guevara-Morato, M. Á., De Lacoba, M. G., García-Luque, I., & Serra, M. T. (2010). Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L3 plants with dual RNase and DNase activities. *Journal of Experimental Botany*, 61(12), 3259-3271.

Hahn, S.K., Bai, K.V., and Asiedu, R. (1990). Tetraploids, triploids, and 2n pollen from diploid interspecific crosses with cassava. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 79:433-439.

Hauck, P., Thilmony, R., and He, S.Y. (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible Arabidopsis plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8577–8582.

He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Sheen J. (2006) Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in Arabidopsis innate immunity. *Cell* 125:563–575.

Jaimes, H. (2005). Mejora del protocolo para la transformación genética de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* usando callo embriogénico friable. En Ciencias (Santiago de Cali, Universidad del Valle).

Jehle, A. K., Lipschis, M., Albert, M., Fallahzadeh-Mamaghani, V., Fürst, U., Mueller, K., Felix, G. (2013) The receptor-like protein ReMAX of Arabidopsis detects the Microbe-associated molecular Pattern eMax from Xanthomonas. *The Plant Cell*. 25:2330-2340.

Jones, J.D., & Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.

Jorge, V., Fregene, M.A., Duque, M.C., Bonierbale, M.W., Tohme, J., & Verdier, V. (2000). Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). TAG Theoretical and Applied Genetics 101, 865-872.

Kaku H., Nishizawa Y., Ishii-Minami N., Akimoto-Tomiya C., Dohmae N., Takio K., Minami E., Shibuya N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103: 11086–11091.

Kim, J-G., Li, X., Roden, J.A., Taylor, K.W., Aakre, C.D., Su, B., Lalonde, S., Kirik, A., Chen, Y., Baranage, G., McLane, H., Martin, G.B., Mudgett, M.B. (2009). Xanthomonas T3S effector XopN suppresses PAMP-Triggered Immunity and interacts with a tomato atypical receptor –like kinase and TFT1. The Plant Cell. 21:1305-1323.

Kou Y, Wang S. (2010). Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. Current Opinion Plant Biology. 13:1-5.

Kpémoua, K., Boher, B., Nicole, M., Calatayud, P. and Geiger, J.P. (1996) Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Canadian Journal Microbiology. 42:1131–1143.

Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., Felix, G. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. Plant Cell 16, 3496-3507.

Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H.P., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B.P., Staskawicz, B., *et al.* (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. Nature Biotechnology 28, 365-369.

Lebot, V. (2009). Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams, aroids. (Cambridge, CABI).

Lee, S.W., Han, S.W., Sriyanum, M., Park, C.J., Seo, Y.S., & Ronald, P.C. (2009). A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. *Science* 326, 850-853.

Lee SW, Han SW, Sriyanum M, Park CJ, Seo YS, Ronald PC. 2013. *Retraction Science* 342:191.

Liu, B., Li, J.F., Ao, Y., Qu, J., Li, Z., Su, J., Zhang, Y., Liu, J., Feng, D., Qi, K. et al. (2012). Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity. *Plant Cell*, 24:3406-3419.

López, C.E., & Bernal, A.J. (2012). Cassava Bacterial Blight: using genomics for the elucidation and management of an old problem. *Tropical Plant Biology*. 5:117-126.

López, C.E., Jorge, V., Piegu, B., Mba, C., Cortes, D., Restrepo, S., Soto, M., Laudie, M., Berger, C., Cooke, R., et al. (2004). A unigene catalogue of 5700 expressed genes in cassava. *Plant Molecular Biology* 56, 541-554.

López, C.E., Quesada-Ocampo, L.M., Bohorquez, A., Duque, M.C., Vargas, J., Tohme, J., & Verdier, V. (2007). Mapping EST-derived SSRs and ESTs involved in resistance to bacterial blight in *Manihot esculenta*. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* 50, 1078-1088.

López, C., Restrepo, S., & Verdier, V. (2006). Limitaciones de la bacteriosis vascular de yuca: Nuevos Avances. *Limitations of Cassava Bacterial Blight: New Advances. Acta Biológica Colombiana* 11, 21-45.

López, C., Soto, M., Restrepo, S., Piegu, B., Cooke, R., Delseny, M., Tohme, J., & Verdier, V. (2005). Gene expression profile in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* infection in cassava using a cDNA microarray. *Plant molecular biology* 57, 393-410.

López CE, Zuluaga AP, Cooke R, Delseny M, Tohme J, Verdier V. (2003). Isolation of Resistance Gene Candidates (RGCs) and characterization of an RGC cluster in cassava. *Mol Genet Genom* 269:658–671.

Lozano, J.C. (1986). Cassava bacterial blight: a manageable disease. *Plant Disease* 70: 1089–1093.

Lozano, J.C., Sequeira, L. 1974. Bacterial blight of cassava in Colombia: etiology. *Phytopathology*, 64: 74–81.

Macho, A. P., Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell*. 54:263-272.

Magoon, M. L., Krishnan, R., Bai, K. V. (1969). Morphology of the pachytene chromosomes and meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. *Cytologia* 34: 612–626.

Maraite, H., (1993). *Xanthomonas campestris* pathovars on cassava: cause of bacterial blight and bacterial necrosis. In: Swings, J.G., Civerolo, E.L. (Eds.), *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London, UK, pp. 18–25.

McDonald, B. A., Linde, C. (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 40:349–379.

Mendes, B.M.J., Cardoso, S.C., Boscariol-Camargo, R.L., Cruz, R.B., Mourao Filho F.A.A. & Bergamin Filho, A. (2010). Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. *Plant Pathology* 59(1):68–75.

Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 245-266.

Mentlak, T.A., Anja, K., Tomonori, S., Ryder, L. S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B.P.H.J., Tabot, N. J. (2012). Effector-mediated

suppression of chitin- triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell* 24, 322–335.

Mitsuhara, I., Iwai, T., Seo, S., Yanagawa, Y., Kawahigasi, H., Hirose, S., Ohkawa, Y., Ohashi, Y. (2008). Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds. *Molecular Genetics and Genomics*. 279(4),415–427.

Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H & Shibuya N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 19613–19618.

Monaghan, J., & Zipfel, C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current opinion in plant biology* 15:349-357.

Muñoz Bodnar, A. (2012). Function of TALE1_{xam} in Cassava bacterial blight: a transcriptomic approach. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia. Université Montpellier 2.

Neuhaus, J. M., Fritig, B., Linthorst, H. J. M., Meins, F., Mikkelsen, J. D., & Ryals, J. (1996). A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Molecular Biology Reporter*, 14(2), 102-104.

Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., & Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198, 249-266.

Ogunjobi, A. A., Dixon, A. G. O., Fagade, O. E. (2006) Molecular variation in population structure of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in the south- eastern Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 5:1868–1872.

Olsen, K. M., Schaal, B. A. (1999). Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 96:5586-5591.

Onyeka, T. J., Owolade, O. F., Ogunjobi, A. A., Dixon, A. G. O., Okechukwu, R., Bandyopadhyay, R., Bamkefa, B. (2008). Prevalence and severity of bacterial blight and anthracnose diseases of cassava in different agro-ecological zones of Nigeria. African Journal of Agricultural Research 3: 297-304.

Ospina, B., Ceballos, H. (2012). Cassava in the third millennium. Modern production, processing, use, and marketing systems. CIAT publicación 377, Cali, Colombia.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29: e45.

Park, C.J., Han, S.W., Chen, X., & Ronald, P.C. (2010). Elucidation of XA21-mediated innate immunity. Cell Microbiology 12, 1017-1025.

Park, C. J., Kim, K. J., Shin, R., Park, J. M., Shin, Y. C., & Paek, K. H. (2004). Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. The Plant Journal, 37(2), 186-198.

Pasternak O, Biesiadka J, Dolot R, Handschuh L, Bujacz G, Sikorski MM, Jaskolski M (2005) Structure of a yellow lupin pathogenesis-related PR-10 protein belonging to novel subclass. Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr 16:99–107.

Pérez-Quintero, Á. L., Quintero, A., Urrego, O., Vanegas, P., & López, C. (2012). Bioinformatic identification of cassava miRNAs differentially expressed in response to infection by *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis. BMC Plant Biology, 12(1), 29.

Porta, H., Figueroa-Balderas, R. E., & Rocha-Sosa, M. (2008). Wounding and pathogen infection induce a chloroplast-targeted lipoxygenase in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Planta. 227(2):363-373.

Rabbi, I.Y., et al., (2014) High-resolution mapping of resistance to cassava mosaic geminiviruses in cassava using genotyping-by-sequencing and its implications for breeding. *Virus Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.028>

Restrepo, S., Duque, M.C., & Verdier, V. (2000a). Characterization of pathotypes among isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Plant Pathology* 49, 680-687.

Restrepo, S., Valle, T. L., Duque, M. C., & Verdier, V. (1999). Assessing genetic variability among Brazilian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* through restriction fragment length polymorphism and amplified fragment length polymorphism analyses. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(9), 754-763.

Restrepo, S., Velez, C.M., Duque, M.C., & Verdier, V. (2004). Genetic structure and population dynamics of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia from 1995 to 1999. *Appl Environ Microbiol* 70, 255-261.

Restrepo, S., Velez, C.M., & Verdier, V. (2000b). Measuring the Genetic Diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. Roca, W.M. 1984. Cassava. In *Handbook of plant cell culture* (Macmillan Publishing; London, GB : Collier Macmillan Publishers. New York, NY, USA.), pp. 269-301.

Restrepo, S., Verdier, V. (1997) Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4427–4434.

Rogers, D. J., Appan, S. G. (1973). *Flora Neotropica Monograph No 13: Manihot Manihotoides 2. (Euphorbiaceae)*. New York: Hafner Press.

Román, V., Bossa-Castro, A. M., Vásquez, A., Bernal, V., Schuster, M., Bernal, N. & López, C. (2014), Construction of a cassava PR protein-interacting network during *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* infection. *Plant Pathology* 63,792–802.

Ryan, R.P., Vorhölter, F.J., Potnis, N., Jones, J.B., Van Sluys, M.A., Bogdanove, A.J., Dow, J.M. (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nature. Reviews. Microbiology.* 9:344–355.

Santaella, M., Suarez, E., López, C., Gonzalez, C., Mosquera, G., Restrepo, S., Tohme, J., Badillo, A., & Verdier, V.R. (2004). Identification of genes in cassava that are differentially expressed during infection with *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Molecular Plant Pathology* 5, 549-558.

Schwessinger, B., & Zipfel, C. (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 389-395.

Segonzac, C., Zipfel, C. (2011). Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Current. Opinion in. Microbiology.* 14: 54–61

Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B., Cammue, B., & De Bolle, M. F. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(11), 941-950.

Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H. et al.(2010): Two LysM receptor molecules CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant Journal*, 64:204-214.

Song W, Wang G, Chen L, Kim H, Pi L, *et al.* (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* 270: 1804–1806.

Strange, R. N., Scott, P. R. (2005). Plant disease: A Threat to Global Food Security. *Annual Review of Phytopathology.* 43:83–116

Sudisha, J., Sharathchandra, R. G., Amruthesh, K. N., Kumar, A., & Shetty, H. S. (2012). Pathogenesis related proteins in plant defense response. In *Plant Defence: Biological Control* (pp. 379-403). Springer Netherlands.

Taylor, N.J., Edwards, M., Kiernan, R.J., Davey, C.D., Blakesley, D., & Henshaw, G.G. (1996). Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology* 14, 726-730.

Taylor T., Gaitán-Solís E., Moll T., Trauterman B., Jones T., Pranjali A., et al. (2012). A High-throughput platform for the production and analysis of transgenic cassava (*Manihot esculenta*) plants. *Tropical Plant Biology*. 5:127–139.

Tripathi, J. N., Lorenzen, J., Bahar, O., Ronald, P., & Tripathi, L. (2014). Transgenic expression of the rice Xa21 pattern-recognition receptor in banana (*Musa* sp.) confers resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *Plant Biotechnology Journal* 12(6), 663-673.

Troisfontaines, P., Cornelis, G.R. (2005). Type III secretion: more system than you think. *Physiology (Bethesda)* 20:326-339.

Trujillo, C. A., Ochoa, J.C., Mideros, M. F., Restepo, S., López, C., Bernal, A (2014). A complex population structure of the Cassava Pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in recent years in the Caribbean Region of Colombia. *Microbial Ecology*. 67(4).

Tuzun, S. (2001). The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1), 85-93.

Untergrasser. A., Cutcutache, I., Koressaar. T., Ye. J., Faircloth. B.C., Remm. M., Rozen S.G. (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 40(15):e115.

Van Damme, E. J., Charels, D., Roy, S., Tierens, K., Barre, A., Martins, J. C., ... & Peumans, W. J. (1999). A gene encoding a hevein-like protein from elderberry fruits is homologous to PR-4 and class V chitinase genes. *Plant Physiology*, 119(4), 1547-1556.

Van Loon LC. (1999a). Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. 1-19 150. En: Datta SK, Muthukrishnan S. Pathogenesis-Related Proteins in Plants. Boca Raton, FL: CRC Press. 288 pp.

Van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T. H., & Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(3), 245-264.

Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A. (1999b). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), 85-97.

Verdier, V. (2002). Bacteriosis vascular (o añublo bacteriano) de la yuca causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. . En: Ceballos H, Ospina B (eds.) La Yuca en el Tercer Milenio; Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT, Cali, Colombia, pp. 148 - 159.

Verdier, V., Boher, B., Maraite, H., & Geiger, J. P. (1994). Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*). *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4478-4486.

Verdier, V., Dongo, P., & Boher, B. (1993). Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Journal of General Microbiology*, 139(11), 2591-2601.

Verdier, V., Restrepo, S., Mosquera, G., Jorge, V. & López, C. (2004). Recent Progress in the Characterization of Molecular Determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*-Cassava Interaction. *Plant Molecular Biology* 56:573-584.

Wydra, K., Zinsou, V., Jorge, V. & Verdier, V.(2004). Identification of Pathotypes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Africa and Detection of Quantitative Trait Loci and Markers for Resistance to Bacterial Blight of Cassava. *Phytopathology* 94:1084-1093.

Wydra, K. & Verdier, V. (2002) Occurrence of cassava diseases in relation to environmental, agronomic and plant characteristics. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 93:211–226.

Xiang, T. et al. (2008) *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr. Biol.* 18:74–80.

Zhang, J, Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., et al (2007). A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe*, 1:175-185.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T., & Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125, 749–760.

Anexo A. Composición de medios

Medio de cultivo	Composición
LB	Extracto de levadura 10 g, Triptona 5 g, NaCl 5 g y Agar-agar 15 g pH 7.0 L ⁻¹
YEP	Extracto de levadura 10 g, peptona 10 g y NaCl 5 g pH 7.0 L ⁻¹
LPGA	Extracto de levadura 5 g, Peptona 5 g, Glucosa 5 g y Agar-agar 15 g pH 7.0 L ⁻¹
LPG	Extracto de levadura 5 g, Peptona 5 g y Glucosa 5 g pH 7.0 L ⁻¹
PSA	Peptona 10 g, Sacarosa 10 g, ácido glutámico 1 g y Agar-agar 16 g pH 7.0 L ⁻¹
CBM	Sales MS suplementadas con vitaminas MS , Sacarosa 2%, CuSO ₄ 2 µM, Agar-agar 0.8 pH 5.7 (Bull <i>et al</i> 2009)
MS2-50pi	Sales MS suplementadas con vitaminas MS, Sacarosa 2%, CuSO ₄ 2 µM, caseína hidrolizada 50 mg/L, Picloram 12 mg/L , Gelrite 0.25% pH 5.7 (Bull <i>et al</i> 2009)
GD2-50pi	Sales Greshoff y Doy (GD) suplementadas con vitaminas GD, Sacarosa 2%, Picloram 50 µM, Agar-agar 0.8% pH 5.7 (Taylor 1996)
MBI	Sales MS suplementadas con vitaminas MS, Sacarosa 2%, CuSO ₄ 2 µM, BAP 1 ppm, IBA 0.5 ppm, Agar-agar 0,8% pH 5.7 (Li et el 1996)
MS2-0.5 C.A.	Sales MS suplementadas con vitaminas MS, Sacarosa 2%, Carbón activado 0.5%, Agar-agar 0.6% (Beltrán <i>et al</i> 2010)

Anexo B. Protocolo de transformación CIAT

Actividad	Objetivo	Tiempo en días	Sales/Vits	Hormonas	Efecto esperado
Crece <i>Agrobacterium</i>	Inducir genes <i>vir</i>	1	YM; LB;	ninguna	
Cocultivo	Transferencia del T-DNA	3	GD	Picloram	División celular y selección de células (CEF) que adquieren el T-DNA
Lavado-Recuperación	Eliminar <i>Agrobacterium</i> ; Descanso celular	4	GD	Picloram	
Selección I		21	GD	Picloram	
Selección II		21	GD	Picloram	
Selección III		21	MS	NAA	Diferenciación de embriones
Germinación		20-40	MS	BAP	Germinación de embriones (emiten ápice y hojas)
Selección IV-Enraiza		20-30	MS	ninguna	Diferenciar transgénicas: a los 20-30 días, las transgénicas producirán raíz abundante y habrán crecido más que los escapes
Total días		111-141			

Anexo C. Familias de proteínas relacionadas con patogenicidad (PR)

Family	Type member	Typical size (kDa)	Properties	Proposed microbial target
PR-1	Tobacco PR-1a	15	Antifungal	Unknown
PR-2	Tobacco PR-2	30	β -1,3-Glucanase	β -1,3-Glucan
PR-3	Tobacco P, Q	25-30	Chitinase (class III, IV, V, VI, VI)	Chitin
PR-4	Tobacco W	15-20	Chitinase-class III	Chitin
PR-5	Tobacco S	25	Thaumatin-like	Membrane
PR-6	Tomato Inhibitor I	8	Proteinase-inhibitor	.. ^a
PR-7	Tomato P _{1a}	75	Endoproteinase	.. ^a
PR-8	Cucumber chitinase	28	Chitinase-class III	Chitin
PR-9	Tobacco 'signin-forming peroxidase'	35	Peroxidase	.. ^a
PR-10	Barley PR1'	17	'Ribonuclease-like'	.. ^a
PR-11	Tobacco 'class V' chitinase	40	Chitinase-class I	Chitin
PR-12	Radish Rs-APP3	5	Defensin	Membrane
PR-13	Arabidopsis TH2.1	5	Thiolein	Membrane
PR-14	Barley LTP4	9	Lipid-transfer protein	Membrane
PR-15	Barley OxCa (germin)	20	Oxalate oxidase	.. ^a
PR-16	Barley OxCaLP	20	'Oxalate oxidase-like'	.. ^a
PR-17	Tobacco PRp27	27	Unknown	.. ^a

(Tomado de Sels *et al.*, 2008)

Anexo D. Genes de yuca candidatos a PR

PR	Proteína	Pfam	Candidatos en yuca	Elección	N.R
1	P08299 (PR1A_TOBAC) [31-168]	Pfam:00188. CAP. 1 hit.	cassava4.1_023198m, cassava4.1_026516m,cassava4.1_017950m, cassava4.1_017929m, cassava4.1_018017m	NF	
1	07053 (PR1B_TOBAC) [31-168]	Pfam:00188. CAP. 1 hit.	cassava4.1_023198m, cassava4.1_017950m, cassava4.1_017929m, cassava4.1_026516m	NF	
1	P09042 (PR1C_TOBAC) [31-138]	Pfam:00188. CAP. 1 hit.	cassava4.1_023198m, cassava4.1_017950m, cassava4.1_017929m, cassava4.1_026516m	NF	
1	P33154 (PR1_ARATH) [27-161]	Pfam:00188. CAP. 1 hit.	cassava4.1_017950m, cassava4.1_023198m, cassava4.1_017929m, cassava4.1_026516m, cassava4.1_018017m	NF	
1	Q0H8U4 (Q0H8U4_SOLLC)	PF00188. CAP. 1 hit.	cassava4.1_017929m, cassava4.1_017950m, cassava4.1_018017m, cassava4.1_023198m	N	*
1	P04284 (PR06_SOLLC) [25-159]	PF00188. CAP. 1 hit.	cassava4.1_017929m, cassava4.1_017950m, cassava4.1_018017m, cassava4.1_023198m	NF	
1	Q08697 (PR1A_SOLLC) [22-175]	PF00188. CAP. 1 hit.	cassava4.1_023198m, cassava4.1_017929m, cassava4.1_017950m, cassava4.1_026516m, cassava4.1_018017m	NF	
1	Q40374 (PR1_MEDTR)[24-173]	PF00188. CAP. 1 hit.	cassava4.1_017915m, cassava4.1_026516m, cassava4.1_030866m, cassava4.1_023198m	NF	
2	P23547 (E13G_TOBAC) [30-343]	Pfam:00332. Glyco_hydro_17. 1 hit.	cassava4.1_009799m, cassava4.1_010983m, cassava4.1_007073m, cassava4.1_007423m, cassava4.1_005968m	N	

2	P23432 (E13C_TOBAC) [33-351]	Pfam:00332. Glyco_hydro_17. 1 hit.	cassava4.1_009799m, cassava4.1_010983m, cassava4.1_007423m, cassava4.1_007073m	T	
2	P23433 (E13D_TOBAC) [33-351]	Pfam:00332. Glyco_hydro_17. 1 hit.	cassava4.1_009799m, cassava4.1_010983m, cassava4.1_007423m, cassava4.1_007073m	T	
2	Q8LG04 (Q8LG04_ARATH)	Pfam:00332. Glyco_hydro_17. 1 hit.	cassava4.1_009799m, cassava4.1_010983m, cassava4.1_023576m	T	
2	P19171 (CHIB_ARATH) [34-328]	PF00187. Chitin_bind_1. 1 hit. PF00182. Glyco_hydro_19. 1 hit.	cassava4.1_012136m, cassava4.1_012170m, cassava4.1_011797m, cassava4.1_011409m, cassava4.1_032694m	N	
2	P32045 (PRP2_SOLLC) [24-143]	PF00967. Barwin. 1 hit.	cassava4.1_016261m, cassava4.1_032659m, cassava4.1_030975m, cassava4.1_026892m, cassava4.1_025410m	NF	
2	P27538 (PR2_PETCR)[1-158]	PF00407. Bet_v_1. 1 hit.	cassava4.1_027975m, cassava4.1_027376m, cassava4.1_028271m	NF	
2	P25986 (PR2_PHAVU) [1-155]	PF00407. Bet_v_1. 1 hit.	cassava4.1_027376m, cassava4.1_022277m, cassava4.1_018033m	NF	
3	P17513 (CHIP_TOBAC) [22-253]	Pfam:00182 Glycoside hydrolase family 19	cassava4.1_011797m, cassava4.1_012136m, cassava4.1_012170m, cassava4.1_032694m, cassava4.1_011409m	NF	
3	P17514 (CHIQ_TOBAC)[25-253]	Pfam:00182 Glycoside hydrolase family 19	cassava4.1_011797m, cassava4.1_012136m, cassava4.1_012170m, cassava4.1_011409m, cassava4.1_032694m	NF	
3	Q05539 (CHIA_SOLLC) [25-253]	Pfam:00182 Glycoside hydrolase family 19	cassava4.1_011797m, cassava4.1_032694m, cassava4.1_011409m, cassava4.1_012136m, cassava4.1_012170m	F	
4	P13046 (PRR1_TOBAC) [26-226]	Pfam:00314 Thaumatin I	cassava4.1_014739m, cassava4.1_025976m, cassava4.1_030758m, cassava4.1_024651m	NF	
4	P07052 (PRR2_TOBAC) [22-226]	Pfam:00314 Thaumatin I	cassava4.1_014739m, cassava4.1_025976m, cassava4.1_030758m, cassava4.1_024651m	NF	
4	P29062 (PR4A_TOBAC) [26-147]	Pfam:00967 Barwin family	cassava4.1_016261m, cassava4.1_032659m, cassava4.1_030975m, cassava4.1_026892m, cassava4.1_025410m	NF	
4	P29063 (PR4B_TOBAC) [26-147]	Pfam:00967 Barwin family	cassava4.1_016261m, cassava4.1_030975m, cassava4.1_032659m, cassava4.1_026892m, cassava4.1_025410m	NF	
4	P43082 (HEVL_ARATH)[21-212]	PF00967. Barwin. 1 hit. PF00187. Chitin_bind_1. 1 hit.	cassava4.1_016261m, cassava4.1_030975m, cassava4.1_026892m, cassava4.1_025410m	T	

4	P83343 (PR4_PRUPE) [1-107]	PF00967. Barwin. 1 hit.	cassava4.1_032659m, cassava4.1_030975m, cassava4.1_016261m, cassava4.1_026892m, cassava4.1_025410m	NF	
5	P25871 (OLPA_TOBAC)[22-251]	Pfam:00314 Thaumatin I	cassava4.1_014739m, cassava4.1_025976m, cassava4.1_030758m, cassava4.1_024651m	NF	
5	P14170 (OSMO_TOBAC) [22-246]	Pfam:00314 Thaumatin I	cassava4.1_014739m, cassava4.1_025976m, cassava4.1_030758m, cassava4.1_024651m	F	
5	Q75W82 (Q75W82_TOBAC)	Pfam:00314 Thaumatin I	cassava4.1_014739m, cassava4.1_025976m, cassava4.1_030758m, cassava4.1_024651m	N	*
5	Q75W83 (Q75W83_TOBAC)	Pfam:00314 Thaumatin I	cassava4.1_014739m, cassava4.1_025976m, cassava4.1_030758m, cassava4.1_024651m	N	*
5	P28493 (PR5_ARATH) [24-239]	Pfam:00314. Thaumatin. 1 hit.	cassava4.1_014857m, cassava4.1_011211m, cassava4.1_027365m, cassava4.1_011970m, cassava4.1_012383m	NF	
5	P50700 (OSL3_ARATH)[23-244]	PF00314. Thaumatin. 1 hit.	cassava4.1_014739m, cassava4.1_025976m, cassava4.1_030758m, cassava4.1_024651m	T	
5	P12670 (NP24_SOLLC) [22-247]	PF00314. Thaumatin. 1 hit.	cassava4.1_014739m, cassava4.1_025976m, cassava4.1_030758m, cassava4.1_024651m	NF	
5	Q01591 (TPM1_SOLLC) [14-238]	PF00314. Thaumatin. 1 hit	cassava4.1_014739m, cassava4.1_025976m, cassava4.1_030758m, cassava4.1_024651m	NF	
6	Q2XXA8 (Q2XXA8_ZEAMP)	PF00332. Glyco_hydro_17. 1 hit.	cassava4.1_009799m, cassava4.1_010983m	N	*
6	Q6XNP7 (HPI_HEVBR) [2-70]	Pfam:00280. potato_inhibit. 1 hit.	cassava4.1_027997m, cassava4.1_027109m, cassava4.1_028648m, cassava4.1_029340m	T	
7	Q96478 (Q96478_SOLLC)	PF05922. Inhibitor_I9. 1 hit. PF02225. PA. 1 hit. PF00082. Peptidase_S8. 1 hit.	cassava4.1_028395m, cassava4.1_025874m, cassava4.1_028465m, cassava4.1_026825m	N	*
8	P17541 (CHIA_CUCSA)[26-292]	PF00704. Glyco_hydro_18. 1 hit.	cassava4.1_012935m, cassava4.1_025190m, cassava4.1_029485m, cassava4.1_012979m, cassava4.1_026904m	T	
8	A4IEB1 (A4IEB1_MALDO)	PF00704. Glyco_hydro_18. 1 hit.	cassava4.1_025190m, cassava4.1_012935m, cassava4.1_029485m, cassava4.1_026904m, cassava4.1_023457m	N	*
9	Q42964 (Q42964_TOBAC)	Pfam:00141 Haem peroxidase	cassava4.1_030160m, cassava4.1_011305m, cassava4.1_023402m, cassava4.1_011142m	T	*
9	P11965 (PERX_TOBAC) [23-324]	Pfam:00141 Haem peroxidase	cassava4.1_030160m, cassava4.1_011305m, cassava4.1_023402m, cassava4.1_011142m	T	
9	Q02200 (PERX_NICSY) [28-322]	PF00141. peroxidase. 1 hit.	cassava4.1_021696m, cassava4.1_029862m, cassava4.1_011787m, cassava4.1_023529m, cassava4.1_033835m	T	

9	Q43774 (Q43774_SOLLC)	Pfam:00141 Haem peroxidase	cassava4.1_030160m, cassava4.1_011305m, cassava4.1_023402m, cassava4.1_011142m, cassava4.1_032435m	T	*
10	H2ESL0 (H2ESL0_TOBAC)	Pfam:00407 Pathogenesis-related protein Bet v I family	cassava4.1_022277m, cassava4.1_018042m, cassava4.1_017971m, cassava4.1_027975m	NF	*
10	Q940E9 (Q940E9_TOBAC)	Pfam:00407 Pathogenesis-related protein Bet v I family	cassava4.1_027975m, cassava4.1_022277m, cassava4.1_018042m, cassava4.1_027376m	NF	*
10	Q53U35 (Q53U35_SOLLC)	PF00407. Bet_v_1. 1 hit.	cassava4.1_018042m, cassava4.1_022277m, cassava4.1_017971m, cassava4.1_027975m	NF	*
10	P19417 (PR11_PETCR) [1-155]	PF00407. Bet_v_1. 1 hit.	cassava4.1_027376m, cassava4.1_027975m, cassava4.1_017971m, cassava4.1_018015m	NF	
11	P24091 (CHI2_TOBAC) [24-317]	PF00187. Chitin_bind_1. 1 hit. PF00182. Glyco_hydro_19. 1 hit.	cassava4.1_012136m, cassava4.1_012170m, cassava4.1_011797m, cassava4.1_011409m	F	
14	Q43767 (NLT41_HORVU) [26-115]	PF00234. Tryp_alpha_amyl. 1 hit.	cassava4.1_019489m, cassava4.1_019504m, cassava4.1_033622m, cassava4.1_019423m	T	
17	Q9XIY9 (Q9XIY9_TOBAC)	Pfam:04450 Peptidase of plants and bacteria	cassava4.1_034317m, cassava4.1_024155m, cassava4.1_015503m, cassava4.1_023657m	N	
PTI	O04681 (PTI5_SOLLC)[1-161]	PF00847. AP2. 1 hit.	cassava4.1_017103m, cassava4.1_022781m, cassava4.1_015856m, cassava4.1_025572m	N	

Anexo E. Cebadores de genes PR candidatos en yuca

PR	Sp / Proteína / El similar en Yuca	Nombre cebador	Cebador FW	Cebador RV	Longitud amplicón/ Tm
1	Tabaco P08299 (PR1A_TOBAC) [31-168]	PR1a_F	11	182	194
	cassava4.1_023198m	PR1a_R	GCAAGCTCCATTAGTCTAT	GCAGTCGATAATACGTTGTTTG	62
	Athaliana P33154 (PR1_ARATH) [27-161]	PR1b_F	74	244	190
	cassava4.1_017950m	PR1b_R	CCCAGGACTCACACAAGAC	CCGGTGCTCATAGCAAGATT	62
	Tomate P04284 (PR06_SOLLC) [25-159]	PR1c_F	270	448	199
	cassava4.1_017929m	PR1c_R	TTCAGGCAGAGATGCTGTAAA	GTTGCCAGGAGGATCATAGTT	62
2	Tabaco P23547 (E13G_TOBAC) [30-343]	PR2a_F	121	288	188
	cassava4.1_009799m	PR2a_R	CAGCATTGGAAGCCCTTAGA	GCCTCCATTCACAGGACTAAT	62
	Phaseolus P25986 (PR2_PHAVU) [1-155]	PR2b_F	74	239	188
	cassava4.1_027376m	PR2b_R	GATTGAAGGCGACATGTTGATG	CAACAGCCTTGAACATTCTAAG	62
3	Tabaco P17513 (CHIP_TOBAC) [22-253]	PR3a_F	67	245	200
	cassava4.1_011797m	PR3a_R	GGCGACAGATCCAGTCATTT	CATTTGGCCTTTACCACATTC	62
	Athaliana P19171 (CHIB_ARATH) [34-328]	PR3b_F	69	245	198
	cassava4.1_012136m	PR3b_R	CCACGGATCCAGTCATTTCT	CATTCCAGCCTTTACCACATTC	62
4	Tabaco P13046 (PRR1_TOBAC) [26-226]	PR4a_F	95	273	200
	cassava4.1_014739m	PR4a_R	ACTGCTTTATCCGTTTGG	CCATGCTTGGCAATTTAGAACT	62
	Tabaco P29062 (PR4A_TOBAC) [26-147]	PR4b_F	91	264	195
	cassava4.1_016261m	PR4b_R	GGCCAGCTTTGCCCTAATA	CCATCCATGGTTCTGTGGATTA	62
	Durazno P83343 (PR4_PRUPE) [1-107]	PR4c_F	4	156	169
	cassava4.1_032659m	PR4c_R	ACCTATCATGTCTACAATCCTCAAC	AGCACTTGCCACAAGCA	62
8	Pepino P17541 (CHIA_CUCSA)[26-292]	PR8a_F	19	197	199
	cassava4.1_012935m	PR8a_R	TACCGTTTCTCCCTACTTCTCT	CTAGTTTCAGCACTGGAGTTT	62

	Manzana A4IEB1 (A4IEB1_MALDO) cassava4.1_025190m	PR8b_F PR8b_R	491 CCAAGGCCCTTAGTGAGTTAG	665 CCATGCCCTCAAGAGATTGT	194 62
9	Tabaco P11965 (PERX_TOBAC) [23-324] cassava4.1_030160m	PR9_F PR9_R	229 TCCAGACCGATCAGGAACT	405 GTCTGCTCCGACTCCATTAAC	197 62
10	Tabaco H2ESL0 (H2ESL0_TOBAC) cassava4.1_022277m	PR10a_F PR10a_R	80 TGGTGATGGATTGCTGGATAAG	255 GCAGGAGATATCCTTCGACAAC	197 62
	Tomate Q53U35 (Q53U35_SOLLC) cassava4.1_018042m	PR10b_F PR10b_R	68 TACTCTGATTGAGGGAGATCCA	229 TATCCCTACAGCCTTGCCT	181