



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Identificación de genes de susceptibilidad en yuca, blancos de TALEs de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis***

**Ruben Eduardo Mora Moreno**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de biología  
Bogotá, D.C, Colombia

2017



# **Identificación de genes de susceptibilidad en yuca, blancos de TALEs de *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis**

**Ruben Eduardo Mora Moreno**

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

**Magister en Ciencias - Biología**

Director:

Ph.D. Camilo Ernesto Lopez Carrascal

Línea de Investigación:

Genética y biología molecular

Grupo de Investigación:

Manihot Biotec

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de ciencias, Departamento de biología  
Bogotá, D.C, Colombia

2017



*“Continuará la guerra hasta que la naturaleza nos llame y haga inevitable nuestra civilización”*

Pepe M.



## Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto de investigación “Búsqueda de genes de resistencia y susceptibilidad en yuca: blancos de efectores TAL de la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*” del programa nacional de biotecnología de Colciencias.

Mi más profunda gratitud al profesor Camilo, ud. es ejemplo para mi formación como científico y como persona. Gracias por permitirme ser parte de este proyecto y de su grupo de investigación.

A mis padres y hermanas que influyeron y moldearon la persona que soy.

A mi pareja Paola, piñón indispensable en el engranaje de mi vida.

A mis compañeros del grupo de investigación Manihot Biotec de la Universidad Nacional de Colombia y del grupo de investigación LAMFU de la Universidad de los Andes. Gracias a todos por las enseñanzas, sugerencias, ideas, aportes y espacios de dispersión.



## Resumen

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es considerada el tercer cultivo de mayor importancia en el planeta ya que constituye la principal fuente de calorías para la población de países pobres o en vía de desarrollo. La producción de yuca se ve comprometida por la bacteriosis vascular o CBB (por sus siglas en inglés: Cassava bacterial blight) causada por la bacteria fitopatógena *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) la cual produce pérdidas en el cultivo de la yuca que pueden variar entre 12-100%. *Xam* emplea dentro de su arsenal de virulencia proteínas tipo TALE (por sus siglas en inglés: transcription activator-like effectors) para promover la proliferación bacteriana y la formación de síntomas durante la infección. Los TALEs son translocados al interior de la célula vegetal vía sistema de secreción tipo 3 (SST3) y una vez en el citoplasma son dirigidos al interior del núcleo en donde se unen a secuencias específicas en el ADN de la planta e inducen la expresión de genes que favorecen la patogenicidad de la bacteria. La interacción TALE - ADN es específica debido a la secuencia codificada en las repeticiones del dominio central del TALE llamadas RVDs (por sus siglas en inglés: Repeat variable diresidues).

Tradicionalmente el estudio de la interacción yuca-*Xam* se ha realizado empleando plantas crecidas a partir de estacas. Como alternativa, en este trabajo se implementó el sistema de propagación de plantas de yuca *in vitro* para la obtención de material vegetal. Para esto, plantas *in vitro* de 8 semanas de las variedades CM6438-14 (resistente) y cv.60444 (susceptible) fueron inoculadas con diferentes cepas de *Xam*. La infección bacteriana fue evaluada mediante 1) crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo y 2) evaluación de la inducción del gen de susceptibilidad (S) *MeSWEET10a*. Se logró determinar, que al igual que en plantas adultas, el gen S es inducido tras la infección de *Xam* en plantas *in vitro*. De manera paralela se pudo monitorear la proliferación bacteriana a lo largo del tiempo siendo esta mayor en plantas susceptibles que en las resistentes. Se comprobó que el gen S es inducido en plantas susceptibles y no en resistentes y se confirmó igualmente que TALEs de igual número de RVDs pero que difieren en la secuencia tienen como blanco el

mismo gen MeSWEET10a. Estos resultados permiten validar el sistema de plantas *in vitro* como alternativa en el estudio del patosistema yuca-*Xam*.

Una vez validado el sistema de propagación *in vitro* y con el fin de identificar los genes inducidos en una variedad susceptible de yuca mediados por el repertorio de TALEs de diferentes cepas de *Xam*, se empleó la estrategia de RNAseq. Fueron empleadas plantas *in vitro* de la variedad susceptible cv.60444 inoculadas con las *Xam*681, *Xam*1061, *Xam*394 y *Xam*3995. Se identificaron los 10 genes más inducidos en cada uno de los tratamientos. Así mismo se determinó mediante herramientas bioinformáticas si en la secuencia promotora de estos genes candidatos existen EBEs para los TALEs, encontrando que los genes *Manes.05G068700*, *Manes.13G045100* y *Manes.15G026800* pueden ser blancos de más de un TALE y son los que mayor inducción mostraron y presentan EBEs para los TALEs TALE13*Xam*681, TALE13*Xam*394, TALE22*Xam*681 y TALE14*Xam*1061. Estos genes corresponden a posibles genes blanco S que pueden jugar un papel importante en la virulencia de *Xam*.

De esta manera este trabajo representa un importante aporte al conocimiento de los mecanismos de susceptibilidad de la yuca que podrán ser tenidos en cuenta en programas de mejoramiento para conferir resistencia a diferentes cepas de *Xam*.

**Palabras clave:** CBB, gen de susceptibilidad, *in vitro*, RNAseq, TALEs, yuca.

## Abstract

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is considered the third most important crop on the planet since it is the main source of calories for the population of poor or developing countries. Cassava production is compromised by cassava bacterial blight or CBB caused by the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) which produces losses in the cassava crop that can vary between 12-100%. Among its weapons *Xam* employs proteins type TALE (transcription activator-like effectors) to promote bacterial proliferation and symptom formation during infection. TALEs are translocated into the plant cell via type 3 secretion system (T3SS) and once in the cytoplasm they are directed into the nucleus where they bind to specific sequences in the plant DNA and induce gene expression promote disease development. The TALE-DNA interaction is specific because of the coded sequence in the TALE central domain repeats called RVDs (Repeat variable diresidues).

Traditionally, the study of the cassava-*Xam* interaction has been carried out using plants grown from stem cuttings. As an alternative, in this work, the propagation system of cassava plants *in vitro* was used to obtain vegetal material. For this, 8 week-old plants propagated *in vitro* of the varieties CM6438-14 (resistant) and cv.60444 (susceptible) were inoculated with different strains of *Xam*. Bacterial infection was evaluated by 1) bacterial growth over time and 2) evaluation of the induction of the susceptibility gene (S) *MeSWEET10a*. It was determined that, as in adult plants, the S gene is induced after *Xam* infection in plants propagated *in vitro*. In parallel, it was possible to monitor bacterial proliferation over time, being this higher in susceptible plants than in resistant ones. The S gene was found to be induced in susceptible and it was also confirmed that TALEs of equal number of RVDs but differing in sequence are targeted to the same *MeSWEET10a* gene. These results allowed the validation of the plants propagated *in vitro* as an alternative in the study of the cassava-*Xam* patosystem.

Once the *in vitro* propagation system was validated and in order to identify the genes induced in a cassava susceptible variety mediated by the repertoire of TALEs from different *Xam* strains, RNAseq strategy was used. *In vitro*-propagated plants of the susceptible strain cv.60444 inoculated with the strains *Xam*681, *Xam*1061, *Xam*394 and *Xam*395 were

used. The 10 most induced genes were identified in each treatment. It was also determined by bioinformatic tools if in the promoter sequence of these candidate genes there are EBEs (Effector Binding Element) for TALEs, finding that the genes *Manes.05G068700*, *Manes.13G045100* and *Manes.15G026800* are the ones that showed the greatest induction and presented EBEs for TALEs TALE13*Xam*681, TALE13*Xam*394, TALE22*Xam*681 and TALE14*Xam*1061. These genes correspond to possible susceptibility targets genes that may play an important role in the virulence of *Xam*. In this way this work represents an important contribution to the mechanisms of susceptibility of cassava that can be taken into account in breeding programs to confer resistance to different strains of *Xam*.

**Keywords:** Cassava, CBB, RNAseq, *in vitro*, susceptible gene, TALEs.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen .....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XV</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XVI</b>
<b>Marco teórico.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Desarrollo e implementación del sistema de plantas in vitro de yuca para el estudio de la bacteriosis vascular .....</b>	<b>21</b>
1.1 Resumen .....	21
1.2 Introducción .....	22
1.3 Materiales y métodos.....	25
1.3.1 Propagación in vitro y material vegetal .....	25
1.3.2 Preparación del inoculo e inoculación .....	25
1.3.3 Cuantificación del crecimiento bacteriano .....	25
1.3.4 Evaluación de expresión de genes.....	26
1.4 Resultados.....	26
1.4.1 MeSWEET10a se induce en plantas in vitro.....	26
1.4.2 Crecimiento bacteriano contrastante entre las variedades susceptible y resistente in vitro .....	28
1.4.3 MeSWEET10a es inducido por diferentes cepas de Xam .....	28
1.5 Discusión .....	30
<b>2. Identificación de genes de susceptibilidad en yuca, blancos de TALEs de Xanthomonas axonopodis pv. manihotis .....</b>	<b>35</b>
2.1 Resumen .....	35
2.2 Introducción .....	36
2.3 Materiales y métodos.....	38
2.3.1 Material vegetal.....	38
2.3.2 Cepas de Xam .....	38
2.3.3 Inoculación.....	38
2.3.4 Extracción de ARN.....	39
2.3.5 Secuenciamiento.....	39
2.3.6 Análisis RNAseq .....	39
2.4 Resultados.....	39
2.4.1 Análisis de las librerías de secuenciamiento .....	39
2.4.2 Identificación de genes de susceptibilidad.....	42
2.5 Discusión .....	45

<b>3. Conclusiones y perspectivas.....</b>	<b>49</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>53</b>

## Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 Expresión del gen MeSWEET10a en plantas in vitro de la variedad susceptible cv.60444 y resistente CM6438-14 .....	27
Figura 1-2 Crecimiento bacteriano de Xam668 tras la inoculación en las variedades susceptible (cv.60444) y resistente (CM6438-14).....	28
Figura 1-3. Expresión del gen MeSWEET10a en plantas in vitro de la variedad susceptible cv.60444 inoculadas con las cepas Xam668, Xam531, Xam681, Xam394 y Xam395.....	29
Figura 1-4. Representación del gen MeSWEET10a. ....	32
Figura 2-1. Boxplot del conteo crudo en cada una de las librerías.....	41
Figura 2-2. (MAplot) Log2 fold change vs. expresión media. ....	41

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1-1. Secuencia de los RVDs de los TALEs20 contenidos en las cepas Xam668, Xam531, Xam681. ....	31
Tabla 1-2. Secuencia de los RVDs de los TALEs14.....	33
Tabla 2-1. Resumen descriptivo del número de lecturas obtenidas tras cada etapa del manejo de los datos. Cada tratamiento muestra el promedio de tres réplicas biológicas.	40
Tabla 2-2. Resumen del número de genes expresados diferencialmente en cada tratamiento.....	42
Tabla 2-3. Top10 de genes inducidos en plantas in vitro de la variedad susceptible cv.60444 inoculadas con la cepa Xam681. ....	42
Tabla 2-4. Top10 de genes inducidos en plantas in vitro de la variedad susceptible cv.60444 inoculadas con la cepa Xam1061. ....	43
Tabla 2-5. Top10 de genes inducidos en plantas in vitro de la variedad susceptible cv.60444 inoculadas con la cepa Xam394. ....	43
Tabla 2-6. Top10 de genes inducidos en plantas in vitro de la variedad susceptible cv.60444 inoculadas con la cepa Xam395. ....	44
Tabla 2-7. Genes candidatos de susceptibilidad en yuca inducidos por TALEs de Xam.	45





## Marco teórico

Se puede decir que las plantas han sido, desde su aparición en la tierra, la materia prima para la vida de muchos de los organismos existentes. Particularmente a los humanos las plantas nos proveen oxígeno, alimento, medicinas, materiales de construcción, combustible, entre muchos otros productos. Sin embargo, nuestro conocimiento científico sobre la fisiología, funcionamiento y respuestas de las plantas a diferentes estreses abióticos y bióticos, aunque en ascenso, aún es muy limitado, lo cual es una barrera para el aprovechamiento del potencial que las plantas ofrecen y que podemos usar para mejorar nuestra calidad de vida y nuestra relación con el medio ambiente. Una de las plantas de suma importancia agrícola llamada a ser uno de los cultivos del siglo XXI es la yuca dado que es la principal fuente de calorías para la población oprimida que vive en más de 100 países tropicales en el globo.

### LA YUCA

#### El cultivo

La yuca (*Manihot esculenta*, Crantz), representa la tercera fuente de calorías más importante para cerca de mil millones de personas en el mundo (Liu *et al.*, 2011; Howeler *et al.*, 2013). Es miembro del género *Manihot* (familia Euphorbiaceae) distribuido en su hábitat natural desde el sur de los Estados Unidos, a través de Mesoamérica, el norte de Sudamérica en Colombia y el sur a través de Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay y Argentina. Después del descubrimiento de América, los comerciantes europeos (españoles y portugueses) llevaron la yuca a África como un cultivo alimenticio potencialmente útil. Más adelante en los 1800s fue llevado también a Asia como un cultivo de seguridad alimentaria y además para la extracción de su almidón. De esta manera, en el siglo XX la yuca alcanza un importante posicionamiento como cultivo alimenticio expandiéndose considerablemente en el África subsahariana, la India, Indonesia y Filipinas (Howeler., *et al.* 2012). En países desarrollados es usada como fécula, perlas de almidón o como alimento animal. Por otra parte, en países pobres y en desarrollo su principal uso es como fuente básica de alimento.

Actualmente la yuca es cultivada en América, Asia y África en donde es la principal fuente de calorías para un importante sector de la población en donde en su mayoría son pobres que viven el trópico (CIAT., 2011).

La yuca tiene diferentes nombres locales como por ejemplo: mandioca en Brasil, yuca en Honduras, ketela pohon en Indonesia, mihogo en Kenia, akpu en Nigeria, sǎn en Vietnam, entre otros. Sin embargo, la palabra yuca tiene su origen en la lengua de los indígenas caribe (habitantes de la región caribe suramericana hoy exterminados por la colonia) “yog ca” que significa “que se amasa molida” (FAO., 2013).

La yuca es principalmente un cultivo del trópico que se permite cultivar en terrenos marginales, con largos períodos de sequía y en suelos que pueden ser infértiles y ácidos (Mederos, 2006). Dado que se propaga vegetativamente a partir de estacas de tallos, el material de plantación o semilla es de bajo costo y fácilmente disponible, características que la hacen atractiva para el productor. Sus raíces pueden almacenar hasta el 60% de agua y su materia seca es bastante rica en carbohidratos, vitamina C, tiamina, riovflavina y niacina (FAO., 1997). De acuerdo a la variedad, pueden contener altos niveles de glicosidos cianogenicos, tóxicos especialmente en las capas exteriores (Doran., *et al.* 2000) que fácilmente son eliminados con la cocción para su consumo. En algunos países también son usadas sus hojas las cuales pueden contener, en peso seco, el 25% de proteína (Chavez., *et al.* 2000).

### **Taxonomía**

La yuca pertenece al reino Vegetal, División Spermatophyta, Subdivisión Angiospermae y a la Clase Dicotyledoneae. Se encuentra ubicada en el Orden Euphorbiales y miembro de la Familia Euphorbiaceae, Tribu Manihotae a la que pertenece el género *Manihot* (Suarez y Mederos 2011).

### **Descripción fenotípica**

Para el caso de la yuca, la interacción entre ambiente y variedad es muy notable y dificulta tanto su descripción como su clasificación dado que puede cambiar drásticamente cuando una misma variedad es cultivada en diferentes localidades. La yuca es un arbusto perenne, leñoso de tamaño variable sin exceder los tres metros, es monoica, ramificación simpodial, el tallo compuesto por nudos en donde se inserta el peciolo de la hoja, una yema axilar

protegida por una escama y dos estípulas laterales, la distancia entre nudos es variable y depende tanto de la variedad como del ambiente. Las hojas son caducas, el número, tamaño, longevidad y capacidad fotosintéticas dependen de la variedad y son altamente influenciadas por el ambiente. Las hojas son simples y están compuestas por la laminar foliar palmeada y profundamente lobulada y el peciolo. La inflorescencia puede ser una panícula, un racimo o una combinación de los dos. Las flores no presentan ni cáliz ni corola sino una estructura indefinida denominada perianto compuesto por cinco tépalos de color variable. Como ya se había mencionado, la yuca es una planta monoica con flores masculinas y femeninas, aunque no todas las variedades florecen, las que lo hacen presentan protoginia que favorece la exogamia y de ahí su alta tasa de heterosis. La semilla, su medio de reproducción sexual e importante en el mejoramiento genético, es ovoide-elipsoidal, de testa lisa y de color negruzco con manchas grises. Las raíces, los órganos más importantes desde el punto de vista económico de la yuca, son fibrosas y la acumulación de almidón las agranda. Si la planta proviene de semilla sexual, se desarrolla primero una raíz primaria pivotante y varias de segundo orden. Si por el contrario la planta proviene de estaca o semilla asexual, las raíces son adventicias y se forman en la parte inferior en las yemas que están bajo tierra (Suarez y Mederos 2011).

### **Origen o domesticación**

La descripción global del origen de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz subespecie *esculenta*) requiere considerar tanto su origen botánico (las especies silvestres de las cuales la yuca es descendiente), su origen geográfico (el área en donde el progenitor evolucionó) y su origen agrícola (el área inicial de cultivo del ancestro silvestre).

Por mucho tiempo no se tuvo certeza de su origen botánico. Desde 1972 (previo al auge de la biología molecular) se realizaron acercamientos para determinar la relación de la yuca con especies silvestres de este género, pero debido a características que dificultan la determinación taxonómica tales como poseer pocos rasgos morfológicos que permitan delimitar especies y además mostrar una alta variabilidad morfológica intraespecífica no se pudo llegar a establecer alguna conclusión fiable acerca de esta relación (Rinvoise., *et al.* 1972). La alta variabilidad en rasgos morfológicos de la yuca, compartida también por muchos miembros del género, sirvieron como evidencia para sugerir que el cultivo surgió a través de procesos de hibridación producto de cruzamientos entre uno o más complejos de especies que comparten una misma área (especiación simpátrica) (Rogers y Appan.

1973). En 1982 se encontró una población silvestre de yuca en Goias, Centro de Brasil (Allem, 1987) y con este hallazgo la ilusión de dilucidar el origen botánico de la yuca puesto que proporcionaba por primera vez un enlace importante entre una población silvestre particular con el origen botánico del cultivo de la yuca. En 1994 apareció la primera publicación en donde confirmaban a *Manihot flabellifolia* como la única progenitora de todas las variedades locales de yuca comercial moderna y las cuales probablemente se desarrollaron en un solo evento de domesticación (Allem, 1994). En 1999 se identificaron dos especies, *M. esculenta* ssp. peruviana y *M. pruinosa* como las especies más relacionadas filogenéticamente sugiriendo una ancestría común entre estas especies (Allem, 1999).

La mayor diversidad del género *Manihot* se encuentra en Brasil, en el actual Distrito Federal y el vecino estado de Goias que pertenece a la sabana Cerrado por lo que se sugiere que este es su centro de origen. *M. pruinosa* es exclusiva de Goias y el estado de Mato Grosso y crece también en campo abierto (sabana Cerrado) en donde ocurrió un eventual entrecruzamiento simpátrico con *M. esculenta* ssp. *flabellifolia* según Allen (1994). Estos datos confirman así la relación filogenética y de ancestría que existe entre la yuca y las otras dos especies y además el origen geográfico de la yuca.

Un estudio reciente reportó la secuenciación del genoma de 58 variedades diferentes provenientes de distintos lugares del planeta. Entre ellas se encuentran tanto variedades silvestres, variedades cultivadas y dos especies relacionadas tales como el caucho indio (*M. glaziovii*) y el híbrido *M. catingea*. Este estudio encontró evidencia de hibridación interespecífica e introgresión, con ancestría mixta en yuca y sus parientes, lo cual confirma la mezcla interespecífica que moldeó la domesticación del cultivo sugerida en 1973 por Roger y Appan. También reveló un fuerte cuello de botella materno al inicio de su domesticación partiendo de la observación de la limitada diversidad en la secuencia del genoma de cloroplastos en las variedades cultivadas en relación con las progenitoras silvestres. Así mismo permitió establecer importantes introgresiones de fragmentos cromosomales de variedades africanas en variedades suramericanas sugiriendo que los programas de mejoramiento suramericano partieron de variedades africanas ya mejoradas. Los análisis sugieren que la mayoría de introgresiones se dieron en fragmentos de los cromosomas 1 y 4, proponiendo que en estos cromosomas deben ubicarse los genes de resistencia a enfermedades (Bredeson J. et., al. 2016).

En cuanto al origen agrícola de la yuca, gránulos de almidón de yuca han sido recuperados de diferentes sitios arqueológicos en donde se permite datar la antigüedad de este. Por ejemplo, en el Valle del Cauca en Colombia se encontraron gránulos que datan de 7500 años de antigüedad y en Aguadulce en Panamá de 6900 años (Pohl., *et al.* 1996). Adicionalmente se encontró polen de yuca cultivada en el Golfo de México y Belice con datación de hace 5800 y 4500 años respectivamente (Pope., *et al.* 2001). También se encontraron gránulos de almidón de yuca en Puerto Rico con datación de hace 3300 años (Pagán., *et al.* 2005). Estos resultados sugieren un origen temprano de la yuca y una rápida difusión fuera de la cuenca del Amazonas en todo el neotrópico y el Caribe por los habitantes indígenas suramericanos hace alrededor de 7500 años.

### **Diversidad**

En 1973 fueron identificadas 98 especies de las cuales 80 se encuentran en el norte de Suramérica y el resto se encuentran distribuidas en centro y Mesoamérica siendo los grupos de especies de los hemisferios norte y sur morfológicamente muy distintos. Con excepción de *M. esculenta*, ninguna de las especies mesoamericanas septentrionales se encuentra naturalmente en América del Sur y sólo el *M. brachyloba* ocurre tanto en América Central como en el Sur (Rogers y Appan. 1973). Más adelante en 2002 Allem reduce el tamaño del género a 70 especies con 55 en Suramérica y 15 en América Central y Mesoamérica (Allem. 2002).

### **Usos**

El principal producto económico derivado de la yuca son sus raíces las cuales son utilizadas en un amplio rango de usos, el almidón producido por estas se destina principalmente a cuatro mercados según sus usos: como raíz fresca y procesada para alimentación humana, como materia prima en la industria de alimentos con el fin de producir harina, en la producción de alimentos balanceados para animales (Suárez y Mederos, 2011), y como un producto intermediario en otro tipo de industrias no relacionadas con la alimentación como en la industria textil y en la fabricación de papeles y adhesivos. Aunque también tiene potencial en la producción de dextrosa y múltiples derivados, sin contar con su potencial para producir alcohol, como se ha hecho en Brasil para sustituir petróleo en la producción de combustibles (Suárez y Mederos, 2011).

En Colombia, las pequeñas comunidades productoras tienen a las raíces como alternativa de seguridad alimentaria y muy poco para alimentación animal. A pesar de la diversidad de usos, en Colombia se dificulta la agroindustria debido a que la producción se concentra en unas épocas del año a causa de la estacionalidad de las lluvias, además las raíces que se tardan en cosechar o se almacenan por largos periodos de tiempo pierden calidad y por supuesto valor comercial (Aguilera M. 2012).

### **Producción: Colombia y el mundo**

La yuca es principalmente cultivada por pequeños agricultores, los cuales son en su mayoría de bajos ingresos pero que a pesar de su producción a pequeña escala logran producciones que alcanzan a suplir las demandas de consumo. Se estima que la producción anual de yuca en el mundo para el 2015 fue de 289 millones de toneladas (FAO. 2015). Según la FAO, si la yuca logrará desarrollar su potencial para entrar como materia prima en una gran variedad de productos procesados existiría una mayor demanda de este insumo y a su vez traería como consecuencia no solo una transformación agrícola, sino que apoyaría al crecimiento económico de los pequeños productores localizados en las áreas marginales y oprimidas donde la yuca es cultivada (FAO, 2013).

La importancia de la yuca ha crecido más rápidamente en África que en América y Asia, por ejemplo, en Nigeria se cultiva yuca un 36% más de lo que se cultiva en toda Latinoamérica y mucho más de lo que se siembra en Asia. África es el mayor productor de yuca en el mundo con el 58% de la producción. Sus principales países productores son Nigeria, La República democrática del Congo y Ghana, estos tres países producen alrededor del 30% de la producción mundial, Latinoamérica produce el 11% y Asia el 31% (FAO., 2015).

En Latinoamérica los principales productores son Brasil, Paraguay y Colombia (FAO., 2015). La producción de yuca en Colombia en el 2015 fue de 2,5 millones de toneladas en un área de siembra de 181092 hectáreas. Las principales regiones productoras son la costa caribe, los andes orientales y la amazonia con el 52.2%, 19.6% y el 8.9% respectivamente de la participación en la producción anual (Aguilera M. 2012).

### **Conservación**

La combinación de genes encontrados en diferentes variedades de yuca son normalmente el resultado de décadas o siglos de selección por parte de los cultivadores. Dado que la

yuca es altamente heterocigota, la única manera de conservar la combinación de genes o integridad genética específica de cada variedad es a través de la propagación vegetativa. De esta forma las variedades comerciales son propagadas vegetativamente mientras que las especies silvestres se propagan naturalmente por semillas. La forma de conservación más común es por medio de estacas en campo y plántulas crecidas a partir de meristemas en medio de cultivo estéril y bajo condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura para inducir su crecimiento. Para cualquiera de las dos formas de conservación, en campo o *in vitro*, se requieren de repetidos procesos de regeneración, entre 12 y 24 meses para plantas crecidas en campo y alrededor de 2 meses para plantas *in vitro* (Hershey C y Debouck D. 2010).

Se estima que existen alrededor de 27000 razas locales de yuca in situ y cerca de 10000 son mantenidas en bancos de germoplasma. Se propuso en 2010 que para tener el total de la representatividad de la diversidad genética de yuca deberían ser conservadas ex situ 15000 variedades de razas locales de la especie (Hershey C y Debouck D. 2010).

Las instituciones encargadas de conservar el banco de germoplasma y del mantenimiento de las variedades de yuca in situ en el planeta son el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) para las variedades de América y Asia, el IITA (International Institute of Tropical Agriculture) para las variedades de África, y el EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria) para las variedades silvestres. Esta estrategia de centralización colaborativa inició en 1982 con la idea de lograr mayor eficiencia general en términos de conservación y mejoramiento, desarrollar un registro común de variedades de yuca lo cual incluye estandarización de la información, y al mismo tiempo, apoyar nuevas iniciativas para el desarrollo de estrategias que permitan obtener menores costos de producción, mayores rendimientos y mayor seguridad para el cultivo de la yuca. (Hershey C y Debouck D. 2010).

### **Sistema de propagación *in vitro***

La yuca es una especie perenne, de ciclo de vida largo, monoica y altamente heterocigota. Si bien existen semillas sexuales, es muy poco frecuente la floración en la mayoría de variedades y además la viabilidad de las semillas es baja. El conjunto de estas características hacen que la única forma relativamente fácil de mantener un genotipo deseado sea mediante propagación vegetativa. Las estacas o tallos maduros se utilizan como material de siembra o semilla con fines comerciales. Las estacas, bajo condiciones

adecuadas, solo pueden ser almacenadas por algunas semanas. En este sentido la propagación *in vitro* es una buena alternativa para conservar los materiales seleccionados para cultivo y programas de mejoramiento genético e incluso para preservar la especie (Ashmore, 1997). En Colombia el responsable del sostenimiento y mantenimiento del banco de germoplasma de yuca es el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) el cual salvaguarda alrededor de 6.592 accesiones en total, procedentes de 28 países, los cuales incluyen 5.709 clones de *M. esculenta* y 883 genotipos de las especies silvestres (CIAT sitio web). Este banco es mantenido bajo la forma de material *in vitro*.

La propagación *in vitro* es un sistema de rápida multiplicación clonal en laboratorio el cual pone a disposición plantas limpias libres de patógenos independiente de la época del año y con bajo requerimiento de espacio (Hussey G., 1978). El sistema *in vitro* se define como un método de propagación que comienza, para el caso de la yuca, con el aislamiento de una yema axilar para ser cultivado en un medio nutritivo aséptico y bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad que permite regenerar un nuevo individuo en dos meses (Ashmore, 1997).

### **Patologías de yuca: Riesgo latente**

La yuca es afectada por muchas enfermedades de origen fúngico, bacteriano y viral y que afectan distintos órganos causando diferentes sintomatologías en la planta. Las enfermedades que causan manchas foliares, necrosamiento del tallo y pudriciones radicales son más frecuentes y su distribución es más amplia. Algunas enfermedades importantes ocasionadas por hongos son la mancha parda de la hoja producida por el hongo *C. henningsii*, el añubio pardo fungoso producido por *C. vicosea*, el necrosamiento del tallo debido a *Glomerella* sp. o la pudrición radical inducida por *Phytophthora* spp. También son comunes enfermedades ocasionadas por virus como el virus cuero de sapo (FSD), mosaico de las nervaduras (CsVMV), mosaico común de la yuca (CsCMV) y el X de la yuca (CsVX). Por otra parte, algunas enfermedades importantes producidas por bacterias son la pudrición bacteriana del tallo producida por *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* y el añubio bacteriano o bacteriosis vascular causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* y la cual es el centro de esta investigación. Todas estas enfermedades han sido reportadas en América tropical, y representan un alto riesgo en el cultivo de la yuca para esta región (Alvarez y Llano., 2002).

## **BACTERIOSIS VASCULAR (CBB)**

Uno de los limitantes fitosanitarios más importantes en el desarrollo del cultivo de yuca y quizás uno de los que más incidencia se reporta es la bacteriosis vascular o CBB (por sus siglas en inglés: cassava bacterial blight) producida por la bacteria fitopatógena *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) (Verdier., *et al.*, 2004).

### **La bacteria**

*Xam* pertenece al género *Xanthomonas* el cual incluye un grupo diverso de bacterias Gram-negativas fitopatógenas que infectan más de 200 familias diferentes de plantas de importancia para la agricultura, tales como arroz, tomate, pimentón, yuca, entre otros (Ryan, R.P. *et al.* 2011). Las bacterias de este género viven comúnmente como epifitas sobre la superficie de las hojas y tallo, sin embargo pueden ingresar a la planta a través de aperturas naturales como estomas e hidátodos y otras como heridas. De esta manera son capaces de infectar la planta y producir un rango diferencial de síntomas como manchas angulares y rayado en las hojas, exudados y lesiones en el tallo, marchitez y muerte progresiva (Maraite H, 1993).

### **Síntomas**

La bacteriosis producida por *Xam* es una enfermedad destructiva y ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales donde es endémica y que puede producir importantes pérdidas en el rendimiento de cultivos (12-100%) (Lozano, J. C. 1986). Los síntomas de la enfermedad van desde manchas angulares en la hoja, marchitez y exudación, hasta la necrosis vascular, pudrición del tallo y la muerte de la planta desde el ápice hacia la base (Lozano, J. C., L. Sequeira. 1974a). En Colombia, la enfermedad fue reportada por primera vez en 1971 (Lozano, J. C., L. Sequeira. 1974b) y desde ese momento ha sido reportada en todas las regiones en donde es cultivada en el país.

### **Diversidad de *Xam*: alta variabilidad genética**

Los primeros estudios dirigidos a evaluar la diversidad genética de *Xam* se basaron en ensayos bioquímicos (actividad enzimática, ácidos grasos, respuesta a antibióticos) (Lozano y Sequeira, 1974a) los cuales no permitían la suficiente capacidad discriminatoria.

Con el auge de la biología molecular en los 90s, usando RFLPs un primer estudio en Colombia, identificó 26 haplotipos diferentes de un total de 189 cepas colectadas en 15 localidades diferentes (Restrepo *et al.*, 1997; Restrepo *et al.*, 2000a). Más adelante otra evaluación realizada sobre 736 cepas identificó 45 haplotipos (Restrepo *et al.*, 2004), correlacionando haplotipos particulares con características biológicas del patógeno tales como a la adaptación a una localidad particular y la adaptación a genotipos específicos de yuca presentes en esa localidad. Este tipo de trabajos demostró una altísima variabilidad genética en poblaciones de *Xam* en Colombia y en general en Suramérica (centro de origen de la yuca) respecto a poblaciones africanas. También se logró determinar que las poblaciones de *Xam* en Colombia son inestables y que los cambios pueden ocurrir en menos de un año. Dentro de los principales factores que moldean la dinámica poblacional de *Xam* en Colombia se encuentran la introducción de nuevos genotipos resistentes y el intercambio de material contaminado que acelera la selección de nuevas variantes de *Xam* y contribuye a la migración de cepas.

En los últimos años se ha continuado con la exploración de la diversidad genética y estructura poblacional de *Xam* en Colombia. En un estudio realizado entre 2008 y 2014 con poblaciones de *Xam* en la costa caribe colombiana se logró caracterizar, por medio de marcadores AFLPs, 160 aislamientos colectados en estos años. El estudio permitió identificar 57 haplotipos y determinar la compleja arquitectura poblacional de *Xam* en esta región, medido a través de distancias genéticas más largas, mayores índices de diversidad y poblaciones genéticamente diferenciadas respecto a otras poblaciones. Además confirmó el proceso migratorio de cepas en distintas localidades reportado anteriormente (Trujillo, *et al.*, 2014a). Una segunda investigación empleando de nuevo marcadores AFLPs y además una nueva metodología de discriminación molecular que se conoce como marcadores VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) en poblaciones de *Xam* de la región de los llanos orientales colombianos, permitió la caracterización de 111 aislamientos y la identificación de 28 haplotipos. Los resultados permitieron confirmar que los nuevos marcadores VNTRs son una herramienta más sencilla para la caracterización genética de las poblaciones y se propone esta metodología para posteriores investigaciones. Así mismo, el estudio permitió confirmar la diferenciación temporal de las poblaciones de *Xam* en cortos periodos de tiempo. El estudio comparativo entre las poblaciones de *Xam* de la costa caribe y de los llanos orientales permitió demostrar que en las primeras existe mayor diversidad y que la estructura poblacional es mucho más compleja. También se pudo

determinar que en la actualidad existe menor diversidad de *Xam* en los llanos orientales en relación con la que se presentaba en los años 90s (Trujillo, *et al.*, 2014a).

### **Control de la enfermedad**

En la actualidad no se cuenta con productos químicos o bactericidas que ayuden a prevenir o controlar la enfermedad. Algunas medidas fitosanitarias tradicionales para evitar la aparición y propagación de la enfermedad consisten en la rotación de cultivos, fertilización del suelo, descontaminación de herramientas (machetes, etc.), producción de estacas sanas y cuarentena cuando se es detectada la enfermedad (Lozano, 1986; Boher and Verdier, 1994). Métodos actuales de manejo de la enfermedad consisten en la utilización de variedades naturalmente resistentes (Restrepo *et al.*, 2000;), sin embargo, estas variedades no logran adaptarse en muchos casos o no ofrecen características culinarias deseables (López & Bernal, 2012). Otra manera como se han obtenido variedades resistentes ha sido a través de procesos de fitomejoramiento tradicional (selección fenotípica de materiales y cruza intra/inter específicas) y se ha logrado efectivamente aumentar la resistencia en algunos casos. A pesar de esto, características propias de la planta tales como largo ciclo reproductivo, alta heterocigosidad y floración asincrónica entre otras, hacen más dificultosa este tipo de metodologías (Lopez C. *et al.*, 2006). Por esta razón, una estrategia promisoría para el desarrollo de variedades resistentes es mediante el conocimiento de los mecanismos moleculares de la resistencia/susceptibilidad que combinado con estrategias de transformación o edición genética pueden conducir al desarrollo de nuevos cultivares con resistencia mejorada.

## **INTERACCIÓN MOLECULAR PLANTA – PATÓGENO**

Una de las vías para la implementación de estrategias que busquen el control de enfermedades de cultivos de importancia agrícola (entre ellos la yuca), es mediante el conocimiento de las bases moleculares que subyacen a la interacción planta-microorganismo, tanto los mecanismos de inmunidad en la planta que le permiten reconocer y defenderse, como los de virulencia del patógeno que les permiten evadir la defensa de la planta y colonizar. En términos generales la inmunidad en plantas se ha descrito bajo el modelo zig-zag el cual discrimina en cuatro fases el proceso de interacción

planta-microorganismo. En la primera fase, las plantas reconocen patrones estructurales conservados del patógeno por medio de receptores de membrana conduciendo a la resistencia MTI (por sus siglas en inglés: MAMP-triggered immunity). En la segunda fase el patógeno produce proteínas efectoras que le permiten superar la primera barrera inmune MTI resultando en ETS (por sus siglas en inglés: Effector-triggered susceptibility). En la tercera fase la planta es capaz de reconocer las proteínas efectoras del patógeno por medio de proteínas receptoras intracelulares activando ETI (por sus siglas en inglés: Effector-triggered immunity). Finalmente, en la cuarta fase, el patógeno a su vez es capaz de evadir la ETI y restaurar la ETS.

Sin embargo, el modelo zig-zag define una dicotomía entre MTI y ETI y separa las respuestas a MAMPs y a efectores.

### **MTI**

A nivel molecular, las plantas al igual que los animales se defienden contra potenciales patógenos reconociendo moléculas extrañas o foráneas y distinguiéndolas de las propias. Los microorganismos poseen patrones moleculares o MAMPs (por sus siglas en inglés: microbial associated molecular patterns) los cuales son estructuralmente conservados y vitales para el organismo. Los MAMPs son reconocidos por la planta a través de receptores de membrana denominados PRRs (por sus siglas en inglés: pattern recognition receptor) de tipo RLKs (por sus siglas en inglés: receptor like kinases) (Jones J., Dangl J., 2006). Esta línea de la inmunidad se conoce como MTI (por sus siglas en inglés: MAMP-triggered immunity). Dentro de los MAMPs más ampliamente estudiados se encuentran la flagelina, constituyente estructural del flagelo de bacterias Gram negativas, y el factor de elongación Tu (EF-Tu). Ambos son reconocidos por proteínas RLK de la planta de tipo LRR-RLK (por sus siglas en inglés: leucine-rich repeat RLK) FLS2 y EFR las cuales reconocen el epítipo flg22 de la flagelina y el elf18 del EF-Tu (únicamente en la familia brassicaceae), respectivamente (Park *et al.* 2010). Tras la percepción, FLS2 y EFR se asocian rápidamente con otra proteína LRR-RLK conocida como BAK1 iniciando de esta forma la señalización cascada abajo (Heese, A. *et al.* 2007 y Chinchilla, D. *et al.* 2007). La señalización continua con otro RLK citoplasmático denominado BIK1 que se asocia con los complejos formados FLS2/BAK1 y EFR/BAK1 y es fosforilado directamente por BAK1 (Lu, D. *et al.* 2010). Las cascadas MAPK (por sus siglas en inglés: mitogen-activated protein kinase) y CDPKs (por sus siglas en inglés: calcium-dependent protein kinases)

actúan corriente abajo de los complejos receptores LRR-RLK en los eventos de transducción de señales los cuales conducen finalmente a una reprogramación transcripcional (Asai, T. *et al.* 2002), acompañada de la producción de compuestos antimicrobianos, especies reactivas de oxígeno, fortificación de las paredes celulares, entre otras respuestas, lo que conduce finalmente al control del patógeno (Chisholm *et al.* 2006).

## **ETS**

A la vez que las plantas desarrollaron mecanismos moleculares que les permiten protegerse de potenciales patógenos, estos han logrado igualmente innovaciones a nivel de proteínas que les permiten continuar con su ciclo vital suprimiendo a diferentes niveles la respuesta inmune MTI activada por la planta. Estas proteínas, las cuales son denominadas efectores, inhiben la activación de la defensa por parte de la planta tras el primer reconocimiento, con el fin de lograr infectar la célula vegetal.

En el caso de bacterias, los efectores son secretados y translocados al citoplasma a través del denominado sistema de secreción tipo 3 (SST3), la cual semeja una nanojeringas y que forman un conducto a través de las membranas plasmáticas, la capa de peptidoglicano y el espacio extracelular dándole la posibilidad a la bacteria de introducir directamente los efectores en el citoplasma (Alfano JR, Collmer A. 2004). Estos efectores de tipo 3 o T3E (del inglés: type 3 effectors), una vez en el interior de la célula vegetal son capaces de manipular los procesos fisiológicos normales de la planta para favorecer el crecimiento y el proceso infeccioso del patógeno (Chen *et al.*, 2010). De esta manera el patógeno supera la primera línea de inmunidad de la planta resultando en una ETS (por sus siglas en inglés: effector-triggered susceptibility) (He P. *et al.* 2007). Los T3Es pueden ser agrupados en dos grandes grupos de acuerdo a su naturaleza o función bioquímica: los T3E que actúan a diferentes niveles en el citoplasma vegetal y los TALEs, que actúan como activadores transcripcionales. El primer grupo de T3Es corresponde a proteínas que una vez en el citoplasma suprimen la inmunidad a través de la interrupción de las vías de señalización. Es el caso por ejemplo de AvrPto y AvrPtoB de *P. syringae* que actúan como inhibidores de quinasas y suprimen la MTI interfiriendo la interacción entre los RLKs con los MAMPs (Xiang T., *et al.*, 2008. y Gohre V., *et al.*, 2008). Otra estrategia empleada por los T3E es actuar como regulador postranscripcional bloqueando las vías de RNA como lo hace HopU1 de *P. syringae* que interactúa con GRP7 (glycine-rich RNA-binding protein) que

regula la traducción de productos relacionados con inmunidad en *A. thaliana* (Guo M. *et al.*, 2007). Otros T3Es pueden alterar el tráfico vesicular como HopM1 que interactúa con la proteína MIN7 con en *A. thaliana* degradándola vía proteosoma 26S (Nomura K. *et al.*, 2006). También algunos efectores pueden alterar la función de organelos en la célula vegetal como por ejemplo HopI1 de *P. syringae* el cual entra y remodela el cloroplasto y reduce la producción de la hormona ácido salicílico (SA) relacionada con inmunidad en *A. thaliana* (Jelenska J. *et al.*, 2007),

### **Los TALEs como arma de ataque**

El segundo grupo de efectores está compuesto por proteínas de unión al ADN que actúan como activadores transcripcionales de genes de la planta y son denominados TALEs (por sus siglas en inglés: Transcription-Activator Like Effector) presentes en el grupo de bacterias fitopatógenas *Xanthomonas* (Boch & Bonas, 2010). La función de ellas es dirigirse al núcleo e interactuar directamente con secuencias específicas del ADN, en el promotor de genes blanco, de la planta para inducir la expresión de genes que favorezcan el crecimiento de la bacteria. Algunos genes reportados como inducidos tras la unión de estos efectores tipo TAL son genes pertenecientes a la familia de transportadores de azúcar. Se cree que al ser inducidos estos genes se aumenta el transporte de sacarosa hacia el apoplasto en donde la bacteria la aprovecha como fuente de carbono para su crecimiento (Zhou *et al.*, 2015).

En cuanto a estructura, los TALEs son muy conservados en sus extremos N y C terminales. El C terminal contiene los dominios NLS (del inglés Nuclear Localization Domain) que dirigen la proteína hacia el interior del núcleo a través de la interacción con importinas. También en esta zona se encuentra el AD (del inglés Activation Domain) típico de factores de transcripción. El N terminal es requerido para la secreción por el T3SS. En la parte central se encuentra un dominio formado por un módulo de 34-35 aminoácidos repetido un número variable de veces. La diferencia entre TALEs dentro de una bacteria de una especie particular o entre especies de *Xanthomonas* está dada tanto por el número de repeticiones como por el polimorfismo de los aminoácidos de las posiciones 12 y 13 en cada repetición. Estos dos aminoácidos conocidos como RVDs (por sus siglas en inglés: Repeat-variable diresidues) determinan la especificidad de la unión del TALE a un nucleótido particular en la secuencia de ADN. Estudios estructurales han determinado que el aminoácido 13 controla la especificidad de la unión mientras que el 12 la estabiliza.

De esta manera se ha descifrado el código de los TALEs que muestra que preferentemente cuando el aminoácido en la posición 12 es N (asparagina) y en la posición 13 es I (isoleucina), este RVD NI se une al nucleótido A (adenina). Si en las posiciones 12 y 13 se encuentran los aminoácidos NG el RVD se une al nucleótido T, si las posiciones son NN el RVD se une al nucleótido G y si el RVD es HD se une al nucleótido C (Moscou MJ y Bogdanove AJ. 2009).

### **Blancos de TALEs, el objetivo para la infección**

Muchos genes blancos de TALEs han sido identificados como genes de susceptibilidad (S) dado que su inducción favorece la infección. El grupo mejor estudiado corresponde a los genes de la familia SWEET/MtN3 de transportadores de azúcar. La activación de sus miembros es indispensable para el crecimiento bacteriano y el desarrollo de síntomas (Chen LQ, *et al*, 2010). Otros como OsSULTR3;6 son transportadores de sulfatos y son activados por TAL2g de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) que infecta arroz promoviendo la expansión de la lesión y exudación bacteriana en la superficie de la hoja (Cernadas *et al*. 2014). Otros genes reportados que son activados por TALEs son factores de transcripción como por ejemplo CsLOB1 que es un factor de transcripción en naranja (*Citrus sinensis*) asociado con la expresión de genes involucrados en la expansión celular inducida por el TALE PthA4 de *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcc) la cual promueve formación de pústulas y el crecimiento bacteriano en planta (Hu *et al*. 2014; Li *et al*. 2014). Os11N3 es otro factor de transcripción de la familia de genes MtN3/sativa en arroz inducido por el TALC de *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (Yanhua Y. *et. al*. 2011). Otro ejemplo es AvrBs3 de *Xanthomonas euvesicatoria* (Xcv) el cual induce un activador transcripcional de tipo hélice-loop denominado UPA20 que actúa como regulador del crecimiento y su inducción por la bacteria causa hipertrofia en células de pimiento (*Capsicum annuum*) (Kay *et al*. 2007).

### **Los blancos de TALEs para generar resistencia**

Durante el proceso co-evolutivo, las plantas también han desarrollado estrategias para evitar la enfermedad causada por la activación de genes S mediada por TALEs. Una vía corresponde a la generación de mutaciones en el promotor de los genes S reconocidos por los TALEs. En este caso se originan alelos que evaden esta unión específica resultando en resistencia por pérdida de la susceptibilidad (Hutin, M., *et. al*. 2015). El

segundo mecanismo involucra el reconocimiento directo de la proteína TALE por una proteína de resistencia. El único ejemplo hasta ahora descrito de esta situación corresponde al caso del gen de resistencia Bs4 que codifica una proteína de tipo NBS-LRR en tomate y que reconoce el TALE avrBsP/avrBs4 activando la cascada de señalización propia de la vía de la inmunidad (Bonas *et al.*, 1993; Schornack *et al.*, 2004). En el tercer grupo se encuentran los genes dominantes en donde el TALE se une efectivamente al elemento de unión en el promotor e induce directamente la expresión de un gen que activa o provoca la resistencia y es denominado Ejecutor (*E*). Este tipo de resistencia está asociada a la respuesta hipersensible HR en la planta hospedera lo cual conlleva al control del crecimiento bacteriano en el sitio de infección. Hasta la actualidad han sido reportados cinco genes *E*: *Xa27*, *Xa10* y *Xa23* en arroz inducidos por los TALEs AvrXa27, AvrXa10 y AvrXa27 de *Xanthomonas oryzae oryzae* (*Xoo*) y Bs3 y Bs4C-R en pimiento inducidos por el TALE AvrBs3 de *Xanthomonas campestris vesicatoria* (*Xcv*). (Gu *et al.*, 2005; Römer *et al.*, 2007; Strauss *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015).

## ETI

En la dinámica interacción planta patógeno, las plantas desarrollaron un mecanismo para percibir los efectores dentro de la célula vegetal. Este reconocimiento puede ser directo o indirecto y está mediado por receptores intracelulares NLR (por sus siglas en inglés: NOD-like receptors), los cuales poseen un dominio rico en leucina y otro de unión a nucleótidos o NB (por sus siglas en inglés: nucleotide binding). Estas proteínas pueden tener en el extremo C-Terminal dominios TIR (por sus siglas en inglés: Toll Interleukin Receptor) o No TIR. Existen algunos casos particulares en donde se presenta un dominio WRKY adicional, el cual está involucrado en la unión al DNA (He *et al.*, 2007). Las proteínas NLR tras el reconocimiento de los efectores activan una segunda vía de la inmunidad conocida como ETI (por sus siglas en inglés: effector triggered-immunity) (Dodds, P. N. y Rathjen, J. P. 2010). La ETI incluye la reprogramación transcripcional y una muerte celular programada y localizada conocida como respuesta hipersensible HR (por sus siglas en inglés: Hypersensitive response) (Axtell, M. J. y Staskawicz, B. J. 2003). En 2009 un estudio realizó una evaluación de 171 efectores predichos de diferentes patógenos (*Pseudomonas*, *Ralstonia*, y *Xanthomonas*) expresados tras la infección en 59 plantas de cuatro familias diferentes (Wroblewski T, 2009). Este estudio encontró que cada planta responde en promedio a 19 efectores diferentes, demostrando que la resistencia conferida

por las proteínas NLR no necesariamente se restringe a un único patosistema y de hecho no son específicos para patógenos determinados (Wroblewski T, 2009). Algunos NB-LRR pueden reconocer directamente efectores, en cambio otros son reconocidos indirectamente como el caso que es explicado por los modelos gen guardián y gen señuelo (Van Der Biezen EA y Jones JD 1998). Un ejemplo del modelo gen guardián ocurre en el caso donde el efector AvrRpt2 activa la inmunidad mediada por el NLR RPS2 en *Arabidopsis*. Por otro lado AvrRpm1 y AvrB, dos efectores diferentes activan la resistencia dependiendo de otro NLR, RPM1. En lugar de interactuar directamente con los efectores, RPS2 y RPM1 monitorean el estado o perturbación de la proteína RIN4 que es el blanco real de estos tres efectores. En el caso de RPS2, lo que detecta la proteína NLR es la degradación de RIN4 causada por AvrRpt2, mientras que RPM1 reconoce la fosforilación de RIN4 que es llevada a cabo por AvrB y AvrRpm1. Este modelo de reconocimiento abre el debate sobre la definición del modelo gen por gen en donde cada efector es reconocido una y exclusivamente por una proteína receptora diferente y se le atribuye la capacidad virulenta del patógeno a la ausencia de la proteína R en el hospedero. De esta manera, el modelo gen guardián postula que la proteína R actúa monitoreando la proteína blanco y reconoce la actividad que sobre ella ejercen las proteínas efectoras. Por otro lado, el modelo gen señuelo (gen decoy) postula que la planta por medio de duplicación del gen blanco o por evolución independiente genera un blanco similar a la proteína reconocida por el NLR pero que no tiene una función en inmunidad.

## **BASES MOLECULARES DEL PATOSISTEMA**

### **YUCA - *Xam***

Como se ha mencionado anteriormente, las bacterias fitopatógenas cuentan con un arsenal de proteínas efectoras que interrumpen la inmunidad de la planta y que generan un ambiente favorable dentro de la célula vegetal para su proliferación. Algunos de estos efectores que se dividen en T3E y TALEs han sido relativamente bien estudiados en *Xam* en los últimos años.

#### **Los TALEs en *Xam***

El primer TALE caracterizado en *Xam* fue TALE1*Xam* (denominado anteriormente como Pthb) en la cepa CFBP1851 el cual es importante para la virulencia de esta cepa

(Castiblanco, L.F., *et al.* 2013). Empleando RNAseq a partir de plantas inoculadas con una cepa mutada en TALE1*Xam* (ORST4: *Xam*ΔTALE1*Xam*) y otra complementada para este TALE (*Xam*ΔTALE1*Xam*::TALE1*Xam*) se pudo identificar un gen que codifica para un Heat shock TF como candidato a ser inducido por TALE1*Xam* (Muñoz-Bodnar, M.A., 2012). Más adelante, mediante ensayos de RNAseq, se reportó que TALE14 y TALE20 de *Xam*668 cumplen un papel importante en la agresividad y virulencia de esta cepa y además identificaron MeSWEET10a como el gen que es inducido por el TAL20*Xam*668 en la planta (Cohn, M., *et al.*, 2014). Igualmente mediante RNAseq se determinó que TALEs de igual tamaño pero que difieren en la unión a un solo nucleótido son capaces de inducir genes diferentes en la planta como es el caso de los TALE14 de *Xam*668 y *Xam*CIO151 (Cohn *et al.*, 2015). Al complementar con TALE14Cio151 el mutante *tale14Xam*668, este último recuperó el fenotipo de virulencia sugiriendo que ambos TALEs14 tienen los mismos blancos. Al analizar la expresión diferencial mediada por cada TALE14 independiente se observó que el TALE14*Xam*668 tiene mayor número de blancos (50 aprox.), en cambio el TALE14Cio151 induce muchos menos y que algunos blancos son igualmente inducidos por los dos TALEs, pero la mayoría son diferentes. Todos estos datos sugieren que un solo cambio en la secuencia de RVDs puede alterar drásticamente la afinidad por el sitio de unión EBE.

A partir de los trabajos de colección de cepas de *Xam* en los departamentos de Sucre, Córdoba, Casanare y Meta y la caracterización de su diversidad, ha surgido la necesidad de caracterizar el repertorio completo de TALEs presentes en las cepas mas representativas. En general se ha podido determinar que estas cepas presentan una baja variabilidad de TALEs mostrando un total de nueve TALEs diferentes en 180 cepas evaluadas y un contenido de 2 a 5 TALEs por cepa (Zarate C. 2015. Tesis de maestría). Entre las cepas colectadas en los departamentos de Córdoba y Sucre se encuentran *Xam*1061 y *Xam*681 respectivamente las cuales son virulentas en la mayoría de variedades que se cultivan en la región. (Trujillo, C., *et al.*, 2014). En cuanto al repertorio de TALEs, la cepa *Xam*1061 contiene TALEs de 14 y 21 repeticiones mientras que *Xam*681 presenta cinco TALEs con 13, 14, 15, 20 y 22 repeticiones (Zarate C. 2015. Tesis de maestría).

### **Efectores T3E en *Xam***

Para la cepa de referencia CIO151 se ha determinado que 17 efectores componen el repertorio completo de efectores Xop. Mediante diferentes análisis bioinformáticos se demostró también que esta cepa posee diez clusters de factores de patogenicidad conservados dentro del género *Xanthomonas* lo que sugiere un origen común de efectores de varias especies de *Xanthomonas* (Arrieta-Ortiz *et al.*, 2013). También, a través del análisis de la secuencia del genoma parcial de 65 cepas colectadas en localidades biogeográficamente diferentes existe un repertorio total de 20 T3E (Bart *et al.*, 2012). Recientemente se determinó el rol de 9 de estos efectores tanto en la patogenicidad de *Xam* como en la inmunidad de la planta. Este estudio permitió poner en evidencia la importancia de los efectores XopZ, XopX, XopAO1 y AvrBs2 en la virulencia completa de la cepa CIO151 y demostró que los efectores AvrBs2, XopR y XopAO1 son capaces de suprimir PTI mientras que los efectores XopE4 y XopAO1 suprimen ETI en plantas de yuca. Los efectores AvrBs2 y XopAO1 fueron los que tuvieron una mayor función en la virulencia de *Xam* (Medina *et al.*, 2017).

### **La resistencia de yuca**

Uno de los principales objetivos en el mejoramiento de los cultivos desde el punto de vista del control de la enfermedad es obtener una resistencia durable y de amplio espectro. La resistencia durable se refiere al control de la enfermedad por un largo periodo de tiempo (Kou and Wang, 2010). Por otro lado, la resistencia de amplio espectro se define como la resistencia a dos o más variantes de la especie del patógeno o a la mayoría de razas de la misma especie de patógeno.

Se ha propuesto que la resistencia de la yuca a CBB es cuantitativa, poligénica y heredada aditivamente (Jorge, *et al.*, 2000). A partir del primer mapa genético de yuca se lograron identificar los primeros QTL (Quantitative Trait Loci) asociados con la resistencia a *Xam* (Jorge *et al.*, 2000; 2001). Recientemente se reportó un nuevo mapa genético de yuca basado en 2141 marcadores moleculares tipo SNP los cuales fueron agrupados en 18 grupos de ligamiento con una distancia promedio de 1.26 cM. En este estudio se logró la identificación de 1061 genes que codifican para proteínas relacionadas con inmunidad, algunas de las cuales pudieron ser posicionadas en este mapa (Soto J., *et al.* 2015). A partir de este mapa se lograron ubicar nuevos QTL de resistencia ante dos cepas de *Xam*

evaluadas en tres ambientes y regiones geograficas diferentes (Soto *et al.*, manuscrito en prensa).

Actualmente se han identificado dos genes posiblemente implicados en la resistencia a *Xam* que han sido denominados *RXam1* y *RXam2*, los cuales codifican para proteínas de resistencia de tipo RLK y NB-LRR respectivamente.

El conocimiento sobre la función de los efectores TALEs y de su mecanismo de acción permite no solo identificar genes S blanco, sino que también es posible identificar genes E en yuca que pueden ser importantes en los programas de mejoramiento para lograr variedades con mayor resistencia a *Xam*.

# 1. Desarrollo e implementación del sistema de plantas *in vitro* de yuca para el estudio de la bacteriosis vascular

## 1.1 Resumen

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es considerada como el tercer cultivo de mayor importancia en el planeta ya que constituye la principal fuente de calorías para la población de países pobres o en vía de desarrollo. La producción de yuca se ve comprometida por la bacteriosis vascular o CBB (por sus siglas en inglés: Cassava bacterial blight) causada por la bacteria fitopatógena *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). Tradicionalmente el estudio de la interacción yuca-*Xam* se ha hecho empleando plantas crecidas a partir de estacas. La obtención de este tipo de material propagativo requiere extensiones grandes de terreno para la multiplicación de plantas. Adicionalmente, el tiempo para la obtención de estacas maduras es relativamente largo (entre 8-12 meses), y es necesario esperar entre 6-8 semanas para que las plantas emergidas de las estacas tengan el tamaño apropiado para ser inoculadas. Como alternativa, en este trabajo se implementó el sistema de propagación de plantas de yuca *in vitro* para la obtención de material vegetal. El sistema de plantas *in vitro* permite una rápida multiplicación, menores costos de operación e infraestructura, certeza en fitosanidad. Plantas *in vitro* de 8 semanas de las variedades CM6438-14 (resistente) y cv.60444 (susceptible) fueron inoculadas con diferentes cepas de *Xam*. La infección bacteriana fue evaluada mediante 1) crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo y 2) evaluación de la inducción del gen de susceptibilidad (*S*) *MeSWEET10a*. Se logró determinar, que al igual que en plantas adultas, el gen *S* es inducido tras la infección de *Xam* en plantas *in vitro*. De manera paralela se pudo monitorear la proliferación bacteriana a lo largo del tiempo siendo esta mayor en plantas susceptibles que en las resistentes. Se comprobó que el gen *S* es inducido en plantas susceptibles y no en resistentes y se confirmó igualmente que TALEs de igual número de

RVDs pero que difieren en la secuencia tienen como blanco el mismo gen *MeSWEET10a*. Estos resultados permiten validar el sistema de plantas in vitro como alternativa en el estudio del patosistema yuca-*Xam*.

## 1.2 Introducción

La yuca es una planta monoica y por lo tanto altamente heterocigota, la floración no ocurre en todas las variedades conocidas y además presenta un ciclo de vida largo. Si bien es posible obtener semilla sexual, esto no ocurre en todas las variedades y la tasa de viabilidad es muy baja. Por estas razones la yuca ha sido tradicionalmente propagada vegetativamente a partir de esquejes de tallos maduros (estacas), conocida también como semilla asexual. Una planta tarda entre 12 y 14 meses en madurar y ser apta para obtener nuevas estacas para su posterior propagación. A partir de una planta con buena altura y ramificación se pueden obtener alrededor de 20-25 semillas de buena calidad (Cock JH. y Lozano JC. 1976).

La obtención de suficientes estacas con fines investigativos no solo demanda de espacios convenientes en campo y/o de infraestructura adecuada para garantizar las condiciones edáficas, de temperatura, humedad y fotoperiodo óptimos en invernadero, sino que también requiere de estrategias en cuanto al manejo y control de plagas y de mano de obra para su mantenimiento. Esto hace que el proceso de obtención de nueva semilla para los ensayos de investigación sea dispendioso, prolongado y costoso. El cultivo de tejidos in vitro se constituye en una alternativa ya que es un método de rápida multiplicación clonal (alrededor de dos meses), se produce en un ambiente estéril y controlado, independiente de la época del año y con un reducido requerimiento de espacio, permitiendo obtener plantas libres de enfermedades (Ashmore, 1997 & Hussey G. 1978). El cultivo in vitro de tejidos vegetales comienza, para el caso de la yuca, con el aislamiento de una yema axilar la cual es cultivada en un medio nutritivo aséptico y bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad lo que permite obtener o regenerar un nuevo individuo.

La bacteriosis vascular o CBB (por sus siglas en inglés: cassava bacterial blight) es una enfermedad destructiva y ampliamente distribuida en regiones tropicales y es una de las que tiene mayor incidencia en el cultivo de la yuca reportando pérdidas de entre 12% y 100%. CBB es causada por la bacteria fitopatógena *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) (Lozano, J. C. 1986). Los síntomas de la enfermedad van desde manchas

angulares en la hoja, marchitez y exudación, hasta la necrosis vascular, pudrición del tallo y la muerte de la planta desde el ápice hacia la base (Lozano, J. C., L. Sequeira. 1974a). En Colombia, la enfermedad fue reportada por primera vez en 1971 (Lozano, J. C., L. Sequeira. 1974b) y desde ese momento ha sido reportada en todas las regiones en donde es cultivada en el país.

Estudios de diversidad de *Xam* realizados en Colombia en la última década muestran una compleja arquitectura poblacional medida a través de distancias genéticas más largas, índices de diversidad altos y poblaciones genéticamente diferenciadas, además confirmó el proceso migratorio de cepas en distintas localidades. (Trujillo, *et al.*, 2014a). Por medio de marcadores moleculares tipo AFLPs (por sus siglas en inglés: Amplified fragment length polymorphism) y VNTRs (por sus siglas en inglés: Variable Number of Tandem Repeats) se determinaron 57 y 28 haplotipos de *Xam* en la costa caribe y en los llanos orientales, respectivamente, sugiriendo una alta diversidad del patógeno (Trujillo, *et al.*, 2014a, b).

Los estudios de la interacción yuca-*Xam* se han basado en ensayos realizados en plantas adultas inoculadas a las cuales se les lleva un seguimiento de síntomas mediante una escala y un cálculo de AUDPC (área bajo la curva del progreso de la enfermedad) (Trujillo CA., *et. al* 2014). Este método de fenotipificación ha permitido, por ejemplo, evaluar las respuestas de una población de mapeo y la identificación de QTLs (por sus siglas en inglés: quantitative trait loci) relacionados con la resistencia de la planta a *Xam* (Jorge V., *et al.*, 2001, Soto J., *et al.* 2015). Así mismo ha permitido la identificación de patotipos (Restrepo, *et al.*, 1996; Trujillo *et al.*, 2014). Alternativamente se ha evaluado el crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo sobre la planta adulta por medio del conteo de UFCs (unidades formadoras de colonia) tras la inoculación con *Xam*. El crecimiento bacteriano se ha correlacionado con la determinación de resistencia y susceptibilidad basado en datos de AUDPC (Muñoz B. 2012 & Mbaringong G. *et. al.* 2017).

La virulencia de *Xam*, así como de otras bacterias del genero *Xanthomonas*, depende en gran medida de un grupo especial de proteínas conocidas como proteínas efectoras. Dentro de este grupo de proteínas se encuentran los TALEs (de sus siglas en ingles: Transcriptional Activator Like Effector) (Boch & Bonas, 2010), los cuales son translocados al interior de la célula vegetal a través del sistema de secreción tipo 3 (SST3) para posteriormente dirigirse al núcleo e interactuar directamente con secuencias específicas del ADN de la planta para inducir genes que favorezcan el crecimiento de la bacteria. La interacción TALE-ADN es posible gracias al dominio central del efector conformado por una serie de repeticiones compuestas por 34-35 aminoácidos cada una. La variabilidad

---

entre los TALEs está dada tanto por el número de repeticiones como por el polimorfismo de los aminoácidos de las posiciones 12 y 13 en cada repetición. Estos dos aminoácidos conocidos como RVDs (por sus siglas en inglés: Repeat-variable diresidues) determinan la especificidad de la unión del TALE a un nucleótido particular en la secuencia de ADN. De esta manera se ha cifrado el código de los TALEs que muestra que preferentemente cuando el aminoácido en la posición 12 es N (asparagina) y en la posición 13 es I (isoleucina), este RVD NI se une al nucleótido A (adenina), si las posiciones 12 y 13 se encuentran los aminoácidos NG el RVD se une al nucleótido T, si las posiciones son NN el RVD se une al nucleótido G y si el RVD es HD se une al nucleótido C. (Moscou MJ y Bogdanove AJ. 2009).

El TAL más estudiado en *Xam* es TAL20 el cual fue identificado en la cepa *Xam668*. Estudios recientes lograron demostrar que este TAL se une específicamente a un sitio en el promotor del gen *MeSWEET10a* en yuca e induce su expresión para el beneficio de la bacteria. De esta manera *MeSWEET10a* es considerado como un gen de susceptibilidad (S) (Cohn *et al.*, 2014). La identificación de este gen S se llevó a cabo empleando una aproximación transcriptómica sobre plantas de la variedad cv.60444 obtenidas a partir de estacas maduras. Se cree que al ser inducido este gen S se aumenta el transporte de sacarosa hacia el apoplasto en donde la bacteria lo aprovecha como fuente de carbono para su crecimiento (Zhou *et al.*, 2015). Un mecanismo que le otorga a la planta la posibilidad de evadir la acción de TALEs es por medio de polimorfismos (mutaciones) en el promotor de los genes S blanco, resultando en la resistencia de la planta por pérdida de la susceptibilidad (Hutin, M., *et al.* 2015). Otro mecanismo por el cual la planta es capaz de activar las vías de la inmunidad es valiéndose del acoplamiento efectivo del TAL al elemento de unión en el promotor para inducir en este caso la expresión de un gen de resistencia o ejecutor (E). Este tipo de resistencia está asociada con una respuesta hipersensible (HR) en la planta hospedera lo cual conlleva al control del crecimiento bacteriano en el sitio de infección (Hutin, M., *et al.* 2015).

En este estudio se buscó determinar si el sistema de plantas *in vitro* permite evidenciar la inducción del gen *MeSWEET10a* por inoculación con *Xam* y si existe una correlación entre esta inducción y el fenotipo de resistencia/susceptibilidad evaluado a través del crecimiento bacteriano en plantas *in vitro*.

## 1.3 Materiales y métodos

### 1.3.1 Propagación *in vitro* y material vegetal

Plantas de las variedades cv.60444 y CM6438-14, fueron propagadas *in vitro* a partir de esquejes o yemas axilares en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) a pH 5.7. Posteriormente las plantas se ubicaron en una cámara de crecimiento o fitotrón bajo condiciones de temperatura de 28°C +/- 2 y un fotoperiodo de 12 horas/luz/día. Para los ensayos de propagación se emplearon plantas de dos meses de propagadas o con al menos tres nudos.

### 1.3.2 Preparación del inóculo e inoculación

Las cepas *Xam668* colectada en Indonesia en 1978, *Xam531*, *Xam681* y *Xam1061* colectadas en la costa caribe colombiana en 2009, *Xam394* colectada en Argentina en 1984 y *Xam395* colectada en Nueva Zelanda en 1966 fueron empleadas en este estudio. Dos días antes de la inoculación se realizó un precrecimiento de las cepas almacenadas a -80°C en cajas con medio LPGA (peptona 5g/L, glucosa 5g/L, extracto de levadura 5g/L y agar 15g/L) e incubadas a 28°C por 24 horas. A partir de una colonia se creció la bacteria en medio LPG líquido a 28°C con agitación por 24 horas. El inóculo se preparó mediante dos lavados con MgCl<sub>2</sub> 10 mM y finalmente calibrando a una OD<sub>600nm</sub> de 0,02. La inoculación se realizó en las hojas 2, 3, 4, y 5 desde el ápice hacia la base haciendo cuatro punciones por hoja y esparciendo con un hisopo el inóculo por el haz y el envés de las hojas para la cuantificación del crecimiento bacteriano.

Para la evaluación de expresión del gen de susceptibilidad la inoculación se realizó en las hojas 2, 3, y 4 desde el ápice hacia la base haciendo tres perforaciones en tres lóbulos de la hoja para un total de 9 perforaciones por hoja (27 perforaciones por planta). El inóculo se extendió sobre el haz y el envés de las hojas con un hisopo.

Para todos los experimentos se utilizaron tres plantas, constituyéndose en réplicas biológicas.

### 1.3.3 Cuantificación del crecimiento bacteriano

Posterior a la inoculación se colectaron las hojas a los días 0, 3, 5 y 7 postinoculación (dpi). Empleando un sacabocados de 3mm de diámetro se extrajeron discos que circundaban

cada una de las perforaciones realizadas en las hojas, este tejido fue macerado y resuspendido en 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. Se llevaron a cabo diluciones seriadas las cuales fueron sembradas en cajas con medio LPGA y se incubaron a 28°C para su posterior conteo de UFCs (unidades formadoras de colonia) dos días después.

### 1.3.4 Evaluación de expresión de genes

Para los ensayos de expresión génica, el tejido fue colectado 50 horas post-inoculación empleando el sacabocados como se describió anteriormente. El ARN total fue aislado de plantas propagadas *in vitro* de la variedad susceptible cv.60444 y resistente CM6438-14 mediante el kit de extracción de RNA de STRATEC® específico para plantas. Para eliminar trazas de ADN se realizó un tratamiento con DNasa I (Thermo Scientific®). La calidad del ARN fue determinada empleando el Bioanalizador RNA 6000 nano de Agilent®. La síntesis de cDNA se llevo a cabo con el kit RevertAid de ThermoFisher Scientific®. La qRT-PCR se realizó en un termociclador LightCycler 96 de Roche® con el kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX de Bio-Rad. La evaluación del gen *MeSWEET10a* se realizó utilizando los primers F' AGCACCATCTGGACAATCCCA y R' TCCTCACCTTGACTGCGGTG (Cohn M., *et al.*, 2014). Como gen de referencia (housekeeping) se utilizó el gen cassava4.1\_006776m.g (ZINC FINGER CCCH DOMAIN-CONTAINING) con primers F' TGGTCAGCACATTTGTTTCGT y R' AGCAGACCCCGTCATTGTAG (Hu M., *et al.*, 2016).

## 1.4 Resultados

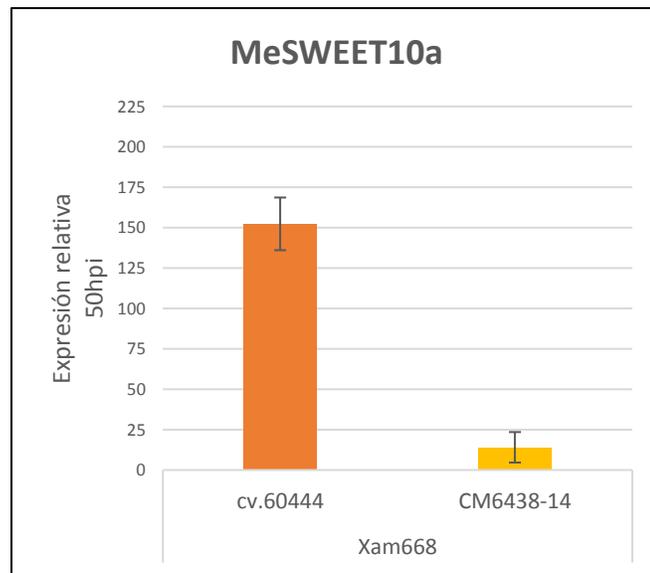
### 1.4.1 *MeSWEET10a* se induce en plantas *in vitro*

Previamente se ha reportado la inducción del gen S *MeSWEET10a* tras la inoculación en hojas de plantas obtenidas a partir de estacas de la variedad susceptible cv.60444 (Cohn *et al.*, 2014). De esta misma manera se buscó determinar si este gen es igualmente inducido en plantas *in vitro*. Para ello se inocularon hojas de plantas de la misma variedad propagadas *in vitro* con la cepa *Xam668*. La expresión del gen se evaluó mediante qRT-PCR a 50hpi. Como se observa en la figura 1, en las las hojas de las plantas susceptibles el gen tiene un incremento en su expresión de casi 150 veces por encima de la expresión

basal tras ser inoculadas con *Xam*, Estos resultados confirman la inducción del gen *MeSWEET10a* mediada por el TALE20 presente en la cepa *Xam668* en plantas *in vitro*. Con el fin de determinar si existen diferencias en la expresión del gen *MeSWEET10a* en una variedad resistente al ser inoculada con la cepa *Xam668*, se evaluó mediante qRT-PCR la expresión del gen *S* en plantas de la variedad resistente CM6438-14 y se comparó

**Figura 1-1 Expresión del gen *MeSWEET10a* en plantas *in vitro* de la variedad susceptible cv.60444 y resistente CM6438-14**

Plantas *in vitro* de la variedad susceptible cv.60444 y resistente CM6438-14 inoculadas con la cepa *Xam668* respecto a plantas de las mismas variedades inoculadas con  $MgCl_2$  10mM como control a 50hpi. Las barras de error corresponden al error estandar entre las tres réplicas biológicas. La normalización se llevó a cabo empleando la expresión del gen *cassava4.1\_006776m.g* (Zinc finger type family protein).



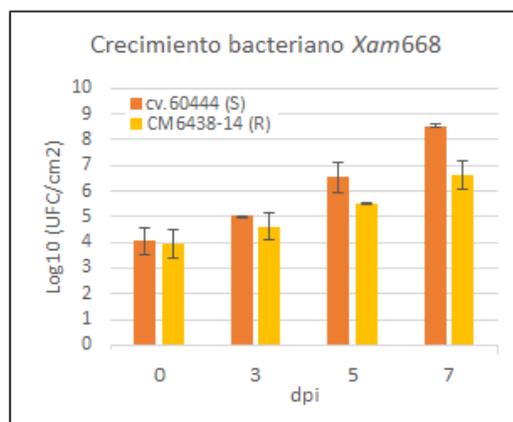
con la expresión del mismo gen en plantas susceptibles cv.60444. Como se observa en la [Figura 1-1](#), el gen *S* no es significativamente inducido en plantas resistentes detectándose una expresión de solo 10 veces por encima de su expresión normal. La diferencia con las plantas susceptibles es altamente significativa. Estos resultados sugieren que la enfermedad mediada por la cepa *Xam668* esta correlacionada consu capacidad de inducir el gen *S*.

### 1.4.2 Crecimiento bacteriano contrastante entre las variedades susceptible y resistente *in vitro*

Al cuantificar la proliferación bacteriana en las variedades tanto susceptible (cv.60444) como resistente (CM6438-14) mantenidas bajo el sistema de propagación *in vitro* luego de ser sometidas a la infección con *Xam668* se observa que en ambos casos se presentó un aumento en la población del patógeno a lo largo del tiempo (Figura 1-2). En el día cero, inmediatamente después de la inoculación, se confirma que las plantas de las dos variedades fueron inoculadas con la misma concentración de bacterias. A medida que transcurre el tiempo, el patógeno aumenta su población bacteriana en las dos variedades, sin embargo se observa un crecimiento más moderado en las plantas de la variedad resistente, comportamiento que se evidencia más conspicuamente al día 7 posinoculación.

**Figura 1-2 Crecimiento bacteriano de *Xam668* tras la inoculación en las variedades susceptible (cv.60444) y resistente (CM6438-14).**

Análisis del conteo de UFCs en las dos variedades a lo largo del tiempo (0, 3, 5 y 7 días posinoculación).



### 1.4.3 *MeSWEET10a* es inducido por diferentes cepas de *Xam*

Con el objetivo de evaluar la expresión del gen S en plantas *in vitro*, mediada por diferentes cepas de *Xam* con diferente contenido de TALEs, fueron inoculadas plantas de la variedad



## 1.5 Discusión

Tradicionalmente el estudio de la interacción yuca-*Xam* se ha llevado a cabo empleando plantas crecidas a partir de estacas (tallos maduros). Sin embargo la obtención de este tipo de semilla asexual es dispendioso por cuanto el ciclo de vida y la maduración de los tallos es largo, se requiere un alto número de plantas y extensión de tierra. El sistema de propagación *in vitro* representa una alternativa para la obtención de material vegetal para el estudio de la interacción yuca-*Xam*. En este estudio, plantas *in vitro* de las variedades cv.60444 y CM6438-14 fueron inoculadas con la cepa *Xam668* con el fin de evaluar el crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo, encontrando un mayor crecimiento en la variedad cv.60444 tal y como se ha descrito para plantas obtenidas a partir de estacas (Muñoz B., 2012). Adicionalmente en estas plantas se evaluó la inducción del gen de susceptibilidad *MeSWEET10a* el cual es inducido por el TAL20*Xam668* (Cohn M., *et al.*, 2014). En este estudio se pudo comprobar igualmente que el gen *S* es inducido solo en la variedad susceptible y no en la resistente. Estos resultados permiten validar el sistema de plantas *in vitro* como alternativa para el estudio del patosistema yuca-*Xam*.

Una de las ventajas del sistema *in vitro* es la posibilidad de contar con un alto número de plantas en poco tiempo y espacio. Para el caso particular del presente trabajo se emplearon 30 plantas de la variedad susceptible y 9 plantas de la variedad resistente. Para obtener estas plantas se contó inicialmente con plantas de mínimo dos meses de edad propagadas *in vitro*. Una vez propagadas se tuvo que esperar dos meses para realizar los ensayos. Para cubrir este mismo requerimiento, en el caso de plantas adultas en invernadero, se hacía necesario contar como mínimo con dos plantas adultas de la variedad susceptible y una de la variedad resistente con 10 meses de edad en campo para obtener la estaca suficiente. Estas estacas deberían ser sembradas en invernadero y esperar alrededor de dos meses para realizar los ensayos sobre plantas maduras. Las plantas *in vitro* fueron mantenidas en una cámara de crecimiento de 1.60cm x 1.50 x 0.80cm junto con otras doscientas más. Este mismo número de plantas en invernadero requieren de un espacio no menor a 30m<sup>2</sup> sin contar el espacio en campo en donde se deben tener las plantas adultas. Esto quiere decir que el sistema *in vitro* ofrece claras ventajas en cuanto a tiempo de obtención de nuevo material y en disponibilidad de infraestructura.

Si bien las plantas propagadas *in vitro* no tienen pared celular y están bajo condiciones ambientales controladas, se podría asumir que no representan un buen modelo para estudiar la interacción con patógenos en tanto no representa la realidad de las plantas en condiciones naturales. Se ha demostrado que los protoplastos son capaces de reconocer y activar las respuestas de inmunidad

tal como ocurre en las células de plantas adultas (Bigeard, J., *et al.*, 2015.). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las plantas in vitro efectivamente representan un buen modelo para el estudio de la inmunidad vegetal como lo son los protoplastos.

En este trabajo se pudo observar una clara diferencia del crecimiento bacteriano entre variedades susceptibles y resistentes. Estas variedades han sido catalogadas de acuerdo a su respuesta medida como AUDPC posterior a la inoculación en tallo de plantas adultas obtenidas a partir de estacas (Trujillo., *et al.*, 2014). En este trabajo se logró observar una diferencia de dos órdenes de magnitud en la cuantificación del crecimiento bacteriano a los 7 días posinoculación entre las variedades. De esta manera se pudo establecer que hay una consistencia en las respuestas de las dos variedades determinada ya sea por AUDPC o por crecimiento bacteriano en plantas in vitro.

La inducción del gen de susceptibilidad *MeSWEET10a* en planta fue uno de los dos parámetros utilizados para validar el sistema de plantas in vitro en el estudio de la interacción yuca-*Xam*. A través de estudios de QRT-PCR se pudo comprobar no solo el efecto de la bacteria sobre la reprogramación directa de la expresión del gen *MeSWEET10a* tal y como se ha descrito previamente en plantas adultas (Cohn *et al.* 2014), sino que permitió también establecer que diferentes cepas con TALEs de 20 RVDs similares tienen como blanco el mismo gen S. Estos datos confirman que a pesar de que los TALEs del mismo tamaño tengan variaciones en la secuencia de RVDs no se genera necesariamente un cambio en el sitio de unión o EBE en el promotor del gen (Zárate C. Tesis de Maestría). Como se mencionó anteriormente, la inducción del gen S tras la infección con la cepa *Xam668* se debe a la acción directa del TALE20. De igual forma las cepas *Xam531* y *Xam681* son capaces de inducir el gen S y ambas poseen un TALE20 dentro de su arsenal de virulencia, sin embargo no son idénticos entre sí ni tampoco respecto al TALE20*Xam668* (Tabla 1-1). Al comparar la secuencia de los RVDs en los TALEs20 de cada una de estas cepas se encuentran cinco diferencias (posiciones 5, 7, 8, 16 y 18). No obstante, la diferencia en los RVDs de las posiciones 7 y 8 no conllevan a un cambio de afinidad.

**Tabla 1-1. Secuencia de los RVDs de los TALEs20 contenidos en las cepas *Xam668*, *Xam531*, *Xam681*.**

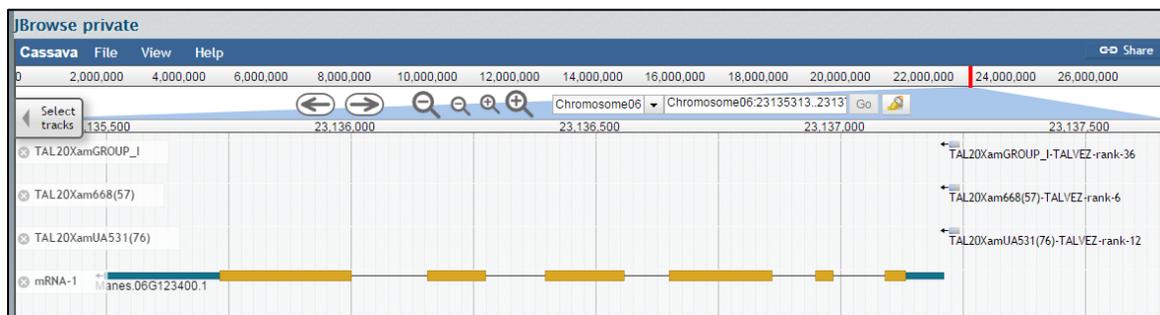
Secuencia de los TALEs de 20 RVDs. Los RVDs resaltados son las variaciones que conllevan a un cambio real en el nucleótido en el EBE. (tomada de Zárate 2015. Tesis de maestría).

Cepa	N. RVDs	Secuencia RVDs																			
<i>Xam668</i>	20	NI	NG	NI	NN	NI	HD	NS	NS	NN	NG	HD	NS	HD	NN	HD	HD	NI	NG	NG	
<i>Xam531</i>	20	NI	NG	NI	NN	NG	HD	NN	HD	NN	NG	HD	NG	HD	NN	HD	NG	HD	NN	NG	
<i>Xam681</i>	20	NI	NG	NI	NN	NG	HD	NN	HD	NN	NG	HD	NS	HD	NN	HD	NG	HD	NI	NG	NG

Por ejemplo, los RVD en la posición 7 de las cepas *Xam531* y *Xam681* presentan los aminoácidos NN en las posiciones 12 y 13 respectivamente que corresponde a una afinidad por G. La cepa *Xam668* presenta NS la cual se une también a G. Por otro lado, los RVDs en la posición 5, 16 y 18 si resultan en cambios en la afinidad por un nucleótido. Por ejemplo, en el TAL de las cepas *Xam531* y *Xam681* se presenta NG que se une a T mientras que en la cepa *Xam668* se presenta NI que se une a A en esa misma posición. Sin embargo, la predicción computacional partiendo de las secuencias de los RVDs de las tres cepas (Figura 1-4) muestra que para el caso del gen *S MeSWEET10a* los tres TALEs20 se posicionan paralelamente indicando que cada uno de los tres tienen la misma preferencia por el EBE del gen blanco. Estos resultados en conjunto permiten confirmar que estas diferencias en los RVDs no son suficientes para generar un cambio en el EBE.

**Figura 1-4. Representación del gen *MeSWEET10a*.**

Se muestra el mRNA del gen *MeSWEET10a* y la ubicación del EBE para los TALE20*Xam668*, TALE20*Xam531* y TALE20*Xam618*. (Tomado de [www.casssavagenome.org](http://www.casssavagenome.org))



Por otra parte, es interesante notar que tras la infección con *Xam1061* también se observó una inducción del gen *S* a pesar de que esta cepa carece del TALE20. Aunque la predicción bioinformática ha sugerido que el TALE14*Xam668* puede unirse específicamente al promotor del gen *MeSWEET10a* (Cohn et al, 2014), ensayos funcionales no han podido confirmar la inducción de este gen (Cohn et al, 2015). Al comparar las secuencias de los RVDs de los TALE14 de cada cepa se pudo confirmar que son idénticas entre sí (Tabla 1-2) lo cual permite afirmar que la inducción del gen *S* mediada por la infección con la cepa *Xam1061* no es producto de la acción del TALE14*Xam1061*.

**Tabla 1-2. Secuencia de los RVDs de los TALEs14**

Secuencia de los RVDs de los TALEs14 contenidos en las cepas *Xam668*, *Xam531*, *Xam681*, *Xam1061*, *Xam394* y *Xam395*, . (tomada de Zárate 2015. Tesis de maestría).

Cepa	N. RVDs	Secuencia RVD													
<i>Xam668</i>	14	NI	NG	NI	NN	NG	HD	NS	NS	NN	NG	HD	NN	NI	NG
<i>Xam531</i>	14	NI	NG	NI	NN	NG	HD	NS	NS	NN	NG	HD	NN	NI	NG
<i>Xam681</i>	14	NI	NG	NI	NN	NG	HD	NS	NS	NN	NG	HD	NN	NI	NG
<i>Xam1061</i>	14	NI	NG	NI	NN	NG	HD	NS	NS	NN	NG	HD	NN	NI	NG
<i>Xam394</i>	14	NI	NG	NI	NN	NG	HD	NS	NS	NN	NG	HD	NN	NI	NG
<i>Xam395</i>	14	NI	NG	NI	NN	NG	HD	NS	NS	NN	NG	HD	NN	NI	NG

Es importante anotar que para esta cepa particular no se cuenta con la secuencia del TALE22*Xam1061*. Solamente cuando se conozca la secuencia del Taloma de esta cepa se podrá determinar cuál TALE es el responsable de la inducción del gen *S* mediado por la infección con *Xam1061*.

Tras la infección con las cepas *Xam394* y *Xam395* no se indujo la expresión del gen *S*. Dado que estas dos cepas no contienen TALEs de 20 RVDs este resultado era el esperado. Sin embargo estas cepas pueden generar enfermedad. Por ejemplo, ensayos previos demostraron que la cepa *Xam394* es la que más agresividad presenta al infectar plantas de la variedad susceptible dentro de una colección de 23 cepas incluidas las que se emplearon en este estudio (Zárate 2015. Tesis de Maestría). Estos resultados en conjunto sugieren, por un lado, que no existe una relación entre el número de TALEs contenidos en una cepa con la agresividad o capacidad virulenta de esta, y por otro lado, que no es completamente necesaria la inducción del gen *MeSWEET10a* para conseguir la susceptibilidad de la planta.

De las cepas empleadas en este estudio solamente aquellas colectadas en Colombia fueron las únicas capaces de inducir la expresión del gen de susceptibilidad. Es posible que esta característica ha sido seleccionada positivamente a favor del patógeno y favorecida por la introducción de cultivares en los cuales se induce la expresión de este gen.

En la variedad resistente CM6438-14 al ser inoculada con la cepa *Xam668* no se logró observar una inducción del gen *S*. Es posible que existan mutaciones en el promotor del gen lo cual conlleva a la pérdida de la afinidad del TALE por su blanco, evitando de esta manera la inducción del gen y en consecuencia la planta logra una resistencia ocasionada por pérdida de la susceptibilidad. La secuencia del promotor en esta variedad particular podría permitir determinar si es esta la situación que se presenta. Alternativamente es posible que la maquinaria de inmunidad de la planta está detectando al patógeno a través de otro mecanismo (p.ej. la acción de otro tipo de efectores) logrando disparar la inmunidad incluso previo a la acción del TALE20*Xam668* al interior del núcleo.

El empleo de plantas de yuca *in vitro* también se ha reportado para el estudio de otras características. Plantas propagadas *in vitro* permitieron dilucidar las vías moleculares de la tolerancia a estreses abióticos (de Nazaré M., *et al.*, 2011). Por ejemplo, se pudo establecer la función de proteínas LEA (del inglés: late embryogenesis abundant) en la tolerancia a la salinidad (de Nazaré M., *et al.*, 2011)

Estos resultados en conjunto aportan evidencia desde diferentes perspectivas que las plantas *in vitro* son un buen modelo para el estudio de la fisiología y biología molecular de la yuca.

## 2. Identificación de genes de susceptibilidad en yuca, blancos de TALEs de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

### 2.1 Resumen

*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) es el agente causal de la bacteriosis vascular (CBB), esta enfermedad causa pérdidas en el cultivo de la yuca que pueden variar entre 12-100%. *Xam* emplea dentro de su arsenal de virulencia proteínas tipo TALE (por sus siglas en inglés: transcription activator-like effectors) para promover la proliferación bacteriana y la formación de síntomas durante la infección. Los TALEs son translocados al interior de la célula vegetal vía sistema de secreción tipo 3 (SST3) y una vez en el citoplasma son dirigidos al interior del núcleo en donde se unen a secuencias específicas en el ADN de la planta, denominadas EBE (Effector Binding Element) e inducen la expresión de genes que favorecen la patogenicidad de la bacteria. La interacción TALE - ADN es específica debido a la secuencia codificada en las repeticiones del dominio central del TALE llamadas RVDs (por sus siglas en inglés: Repeat variable diresidues). En este trabajo se empleó la estrategia de RNAseq con el fin de identificar los genes inducidos en una variedad susceptible de yuca mediados por el repertorio de TALEs contenidos en las cepas *Xam681*, *Xam1061*, *Xam394* y *Xam3995*. Se identificaron los 10 genes más inducidos en cada uno de los tratamientos. Así mismo se determinó mediante herramientas bioinformáticas si en la secuencia promotora de estos genes candidatos existen EBEs para los TALEs, encontrando que los genes *Manes.05G068700*, *Manes.13G045100* y *Manes.15G026800* son los más inducidos y presentan EBEs para los TALEs TALE13*Xam681*, TALE13*Xam394*, TALE22*Xam681* y TALE14*Xam1061*. Estos genes corresponden a posibles genes blanco de susceptibilidad (S) que pueden jugar un papel en la virulencia de *Xam*. De esta manera este trabajo representa un importante aporte al conocimiento de los mecanismos de susceptibilidad de la yuca que podrán ser tenidos en cuenta en programas de mejoramiento para conferir resistencia a diferentes cepas de *Xam*.

**Palabras clave:** Gen de susceptibilidad, CBB, Rnaseq, *Xam*, yuca.

## 2.2 Introducción

Los TALEs (por sus siglas en inglés: Transcription-Activator Like Effector) hacen parte del repertorio de efectores utilizados por la mayoría de especies que componen el género *Xanthomonas*. Este género de bacterias fitopatógenas causa enfermedad en más de 200 especies diferentes de plantas de importancia agrícola como arroz, tomate, pimentón y yuca entre otras (Ryan, R.P. et al. 2011).

Los TALEs son inyectados por las bacterias a las células huésped a través del sistema de secreción tipo (SST3) y una vez en el citoplasma se dirigen al núcleo e interactúan directamente con secuencias específicas del promotor de genes blanco para inducir su expresión con el fin de favorecer el proceso infeccioso. Algunos genes reportados como inducidos por la acción de los TALEs son genes pertenecientes a la familia de transportadores de azúcar (Chen LQ, et al, 2010). Se cree que al ser inducidos estos genes se aumenta el transporte de sacarosa hacia el apoplasto en donde la bacteria la aprovecha como fuente de carbono para su crecimiento (Zhou et al., 2015).

Los TALEs son proteínas cuyos extremos N y C terminales son muy conservados. El C terminal contiene los dominios NLS (del inglés: Nuclear Localization Domain) el cual dirige la proteína hacia el interior del núcleo a través de la interacción con importinas (Moscou MJ y Bogdanove AJ. 2009). También en esta zona se encuentra el AD (del inglés Activation Domain) típico de factores de transcripción. El N terminal es requerido para la secreción por el SST3. En la parte central se encuentra un dominio formado por un módulo de 34-35 aminoácidos repetido un número variable de veces. La diferencia entre TALEs dentro de bacterias de una especie particular o entre especies de *Xanthomonas* está dada tanto por el número de repeticiones como por el polimorfismo de los aminoácidos en las posiciones 12 y 13 de cada repetición. Estos dos aminoácidos, conocidos como RVDs (por sus siglas en inglés: Repeat-variable diresidues), determinan la especificidad de la unión del TALE a un nucleótido particular en la secuencia de ADN. El código de los TALEs muestra que cuando el aminoácido en la posición 12 es N (asparagina) y en la posición 13 es I (isoleucina) este RVD NI se une al nucleótido A (adenina). Si en las posiciones 12 y 13 se encuentran los aminoácidos NG el RVD se une a T. La unión a G requiere que se encuentre NN en el RVD, mientras que si se presentan los aminoácidos HD se unirá al nucleótido C (Moscou MJ y Bogdanove AJ. 2009). Estudios estructurales han determinado que el aminoácido 13 controla la especificidad de la unión mientras que el 12 la estabiliza (Moscou MJ y Bogdanove AJ. 2009). La secuencia en el promotor reconocida por un TALE se denomina EBE (por sus siglas en inglés: Effector binding element).

Muchos genes blancos de TALEs han sido identificados como genes de susceptibilidad (S) dado que su inducción favorece la infección (Chen LQ, et al, 2010, Cernadas et al. 2014, Hu et al. 2014, Li et al. 2014). El grupo mejor estudiado de genes S corresponde a los genes de la familia SWEET/MtN3 que codifican proteínas transportadoras de azúcar. La activación de sus miembros es indispensable para el crecimiento bacteriano y el desarrollo

de síntomas (Chen LQ, et al, 2010). Otros como *OsSULTR3;6* son transportadores de sulfatos y son activados por TAL2g de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) que infecta arroz, cuya inducción promueve la expansión de la lesión y exudación bacteriana en la superficie de la hoja (Cernadas et al. 2014). Otros genes reportados que son activados por TALEs son factores de transcripción como por ejemplo *CsLOB1* que es un factor de transcripción en naranja (*Citrus sinensis*) asociado con la expresión de genes involucrados en la expansión celular y es inducido por el TALE *PthA4* de *Xanthomonas citri* pv. *citri* (*Xcc*) y el cual promueve formación de pústulas y el crecimiento bacteriano en planta (Hu et al. 2014; Li et al. 2014). *Os11N3* es otro factor de transcripción de la familia de genes *MtN3/sativa* en arroz inducido por el TALC de *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) (Yanhua Y. et. al. 2011). Otro ejemplo es *AvrBs3* de *Xanthomonas euvesicatoria* (*Xcv*) el cual induce un activador transcripcional de tipo hélice-loop denominado UPA20 que actúa como regulador del crecimiento y su inducción por la bacteria causa hipertrofia en células de pimiento (*Capsicum annuum*) lo cual favorecería el ingreso de la bacteria al interior de la célula vegetal (Kay et al. 2007). Alternativamente, los TALEs pueden inducir genes que juegan un papel importante en desencadenar la resistencia y se han denominado ejecutores (E) (Gu et al., 2005; Römer et al., 2007; Strauss et al., 2012; Tian et al., 2014; Wang et al., 2015). Otra vía a través de la cual las plantas pueden generar resistencia es a través de mutaciones en los EBEs reconocidos por los TALEs (Hutin, M., et. al. 2015).

La bacteriosis vascular o CBB (por sus siglas en inglés: Cassava bacterial blight) es producida por la bacteria *Xanthomonas axonopidis* pv. *manihotis*. Esta enfermedad representa un alto riesgo fitosanitario para el cultivo de la yuca ya que se ha reportado que puede causar pérdidas entre 12-100% de la producción (Lozano, J.C. 1986). Varios estudios realizados en Colombia han demostrado que existe una alta diversidad del patógeno con una compleja estructura poblacional, así como procesos migratorios de cepas en distintas localidades (Restrepo et al., 1999; Trujillo, et al., 2014a).

El primer TALE caracterizado en *Xam* fue TALE1*Xam* (denominado anteriormente como *Pthb*) en la cepa CFBP1851 el cual es importante para la virulencia de esta cepa (Castiblanco, L.F., et al. 2013). Mediante estrategias basadas en transcriptómica, se identificó un gen que codifica para un Heat shock TF como candidato a ser inducido por este TALE (Muñoz-Bodnar, M.A., 2012). También mediante ensayos de RNAseq se reportó que TALE14 y TALE20 de *Xam668* cumplen un papel importante en la agresividad y virulencia de esta cepa y que el gen *MeSWEET10a* es el blanco del TAL20*Xam668* (Cohn, M., et al., 2014). El TALE14 de las cepas *Xam668* y de CIO151 (TALE14*Xam668* y TALE14*Xam*CIO151, respectivamente) poseen igual tamaño y difieren en un RVD. El EBE que reconocen solo cambia en un nucleótido y en consecuencia inducen genes diferentes en la planta (Cohn et al., 2015). Al complementar con TALE14CIO151 el mutante tale14*Xam668*, este último recuperó el fenotipo de virulencia sugiriendo que ambos TALEs14 tienen los mismos blancos. Al analizar la expresión diferencial mediada por cada TALE14 independientemente se observó que el TALE14*Xam668* tiene mayor número de blancos (aproximadamente 50), algunos de los cuales son también inducidos por TALE14*Xam*CIO151, aunque la mayoría son diferentes. Todos estos datos sugieren que un

solo cambio en la secuencia de RVDs puede alterar drásticamente la afinidad por el sitio de unión EBE.

Recientemente se han destinado esfuerzos en caracterizar la diversidad de TALEs presentes en la colección de cepas de *Xam* (Zárate, 2015). Se ha podido establecer que en las poblaciones estudiadas en Colombia existe un total de nueve TALEs diferentes y que cada cepa puede contener entre 2 y 5 TALEs. El taloma de 15 cepas de *Xam* colectadas en Colombia fue determinado y a partir de las secuencias de los RVDs se realizó una predicción bioinformática de los blancos de estos TALEs (Zarate, 2015). Sin embargo, se requiere demostrar mediante ensayos experimentales que estos correspondan a blancos reales.

En este estudio se buscó identificar genes blanco inducidos por un repertorio amplio de TALEs presentes en diferentes cepas de *Xam* a través de una aproximación transcriptómica.

## 2.3 Materiales y métodos

### 2.3.1 Material vegetal

Las plantas *in vitro* de la variedad susceptible cv.60444 fueron crecidas a partir de esquejes o yemas axilares que se sembraron en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), a pH 5,7. Posteriormente las plantas se ubicaron en una cámara de crecimiento o fitotrón bajo condiciones de temperatura de 28°C +/- 2 y un fotoperiodo de 12 horas/luz/día. Para los ensayos se emplearon plantas de dos meses o con al menos 3 nudos.

### 2.3.2 Cepas de *Xam*

Se emplearon las cepas *Xam*681 y *Xam*1061 las cuales fueron colectadas en 2009 en la costa caribe, así como las cepas de referencia *Xam*394 y *Xam*395 colectadas en Argentina y Nueva Zelanda en 1984 y 1974 respectivamente. Estas cuatro cepas son virulentas en la variedad susceptible cv.60444.

### 2.3.3 Inoculación

La inoculación se realizó en las hojas 2, 3 y 4 desde el ápice hacia la base en donde se realizaron tres perforaciones empleando una aguja de insulina en tres lóbulos. En total se realizaron nueve perforaciones por hoja y 27 perforaciones por planta. La inoculación se llevó a cabo con un hisopo previamente sumergido en la solución bacteriana a una OD<sub>600nm</sub> de 0.02 esparciendo la solución en el haz y el envés de las hojas en donde se perforó. A las 50 horas postinoculación se colectó el tejido circundante al sitio de perforación por

medio de un sacabocado de 3mm de diámetro. Se emplearon tres plantas (réplicas) por cada tratamiento. Como control se incluyeron plantas tratadas de la misma manera, pero empleando solución 10 mM de MgCl<sub>2</sub> (mock). En total se llevaron a cabo cuatro tratamientos (correspondientes a cada cepa) y el control (mock).

### 2.3.4 Extracción de ARN

El ARN total se extrajo empleando el kit de extracción de RNA de STRATEC® específico para plantas. Para eliminar trazas de ADN se llevó a cabo un tratamiento con DNasa I (Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN fue determinada mediante el Bioanalizador RNA 6000 nano de Agilent®.

### 2.3.5 Secuenciamiento

En total se generaron 15 librerías de mRNA, tres réplicas biológicas por cada una de las plantas inoculadas con las cuatro cepas, más las tres replicas biológicas del control. Las librerías fueron preparadas empleando el kit TrueSeq de Illumina (Donnelly sequencing centre, Toronto, Canadá) y secuenciadas en una celda de flujo NextSeq500 de la plataforma Illumina generando lecturas de 150pb PairEnd (PE).

### 2.3.6 Análisis RNAseq

La evaluación de calidad de las lecturas se llevó a cabo con la herramienta FASTQC, se removieron adaptadores y control de calidad con la herramienta Cutadapt manteniendo el tamaño de las lecturas mayor a 90 nucleótidos y calidad mínima de 25. El mapeo y conteo de las lecturas se realizó con el paquete de Bioconductor Rsubread (Liao Y., *et al.*, 2013). Para el mapeo de las lecturas se utilizó la versión 6,1 del genoma de yuca. La determinación de los genes expresados diferencialmente se realizó con el paquete de bioconductor DESeq2 (Love MI, *et al.*, 2014).

## 2.4 Resultados

### 2.4.1 Análisis de las librerías de secuenciamiento

En total se generaron 12 librerías de RNAseq a partir del tejido de hoja de plantas in vitro de la variedad susceptible de yuca cv.60444 inoculado con cuatro cepas de Xam: Xam681, Xam1061, Xam394 y Xam395. Adicionalmente se realizaron 3 librerías a partir de plantas tratadas de la misma manera, pero empleando MgCl<sub>2</sub> las cuales fueron tenidas en cuenta como control. Todas las extracciones se llevaron a cabo 50 horas postinoculación. Por

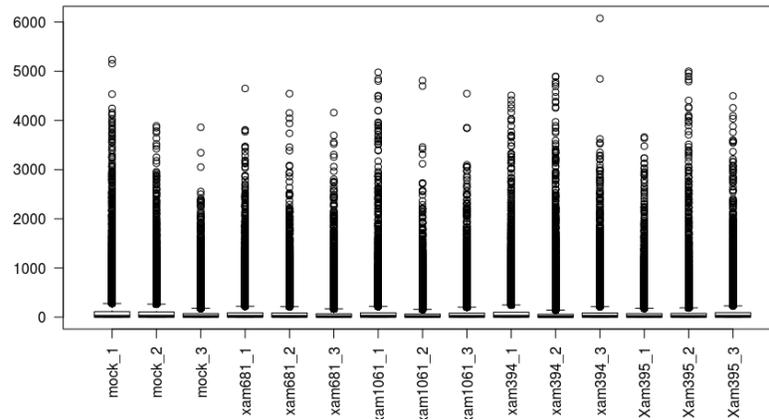
cada una de las librerías se generaron alrededor de ocho millones de lecturas con un tamaño promedio de 151pb. La librería con más lecturas fue la del control con 8,5 millones de lecturas y la que tuvo menos fue la librería de la inoculación con la cepa Xam1061 con 7.1 millones de lecturas. El filtro de calidad mediante Cutadapt eliminó aproximadamente el 10% de las lecturas en cada librería ([tabla 2.1](#)).

**Tabla 2-1. Resumen descriptivo del número de lecturas obtenidas tras cada etapa del manejo de los datos. Cada tratamiento muestra el promedio de tres réplicas biológicas.**

	<b>Mock</b>	<b>Xam681</b>	<b>Xam1061</b>	<b>Xam394</b>	<b>Xam395</b>
<b>Total Lecturas</b>	8534190	8160728	7187980	8000399	7767063
<b>tamaño (pb)</b>	151	151	151	151	151
<b>Control Calidad</b>	7775699	7113869	6485156	7329665	7006227
<b>Tamaño</b>	96	96	96	96	96
<b>Total Conteo</b>	4081175	3229532	3098198	3673506	3261414

Posteriormente se procedió con el mapeo tomando como referencia la versión 6,1 del genoma de yuca. El número de lecturas mapeadas se contó mediante el paquete de Bioconductor Rsubread (Liao Y., et al., 2013). Del conteo se puede anotar que de los 33033 genes de yuca, alrededor de 6500 (20%) no registraron ningún conteo. El boxplot del conteo ([Figura 2-1](#)) muestra que aproximadamente 100 lecturas fueron contadas para cada gen, se observa la misma distribución no solo entre réplicas biológicas sino en general en todas las librerías. Sin embargo se evidencian datos extremos atípicos que llegan hasta los seis mil conteos por gen como es el caso de la librería Xam394\_3 pero que corresponde a menos del 10% de los datos.

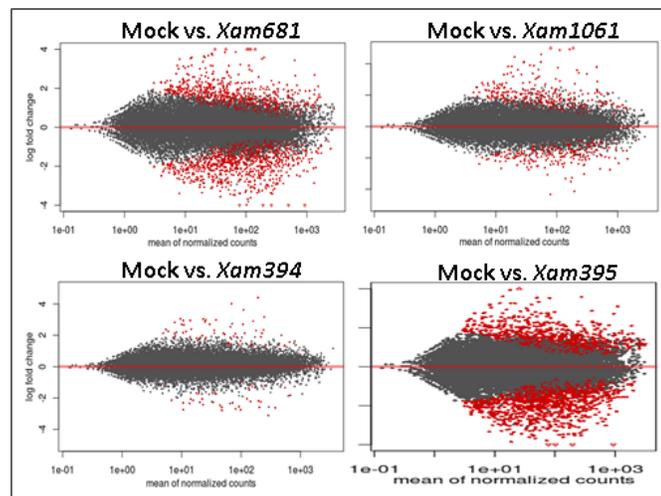
**Figura 2-1. Boxplot del conteo crudo en cada una de las librerías.**



Para la determinación de los genes expresados diferencialmente en la planta tras la infección con cada una de las cuatro cepas de *Xam* respecto al control, se utilizó el paquete de bioconductor DESeq2 (Love MI, Huber W and Anders S (2014)). La expresión de los genes fue filtrada empleando un p-valor de 0.05. (Figura 2-2)

**Figura 2-2. (MAplot) Log2 fold change vs. expresión media.**

Datos en escala logarítmica ajustados por la función “shrink” del paquete DESeq2. Los puntos rojos representan los genes con expresión diferencial significativa.



El número de genes expresados diferencialmente fue de 1532, 559, 101 y 1719 para las plantas inoculadas con las cepas *Xam681*, *Xam1061*, *Xam394* y *Xam395* respectivamente

([tabla 2-2](#)). Se observa que la infección por diferentes cepas de *Xam* promueve una inducción/represión diferencial de genes en la planta. Por ejemplo, la cepa *Xam1061* fue la que más modificó la expresión de genes de los cuales el 61% fueron reprimidos y el 39% fueron inducidos. Caso contrario se observa en la infección con la cepa *Xam394* la cual fue la que menos genes expresó diferencialmente. De esos, el 38% fue reprimido y el 62% fue inducido.

**Tabla 2-2. Resumen del número de genes expresados diferencialmente en cada tratamiento.**

	Genes diferencialmente expresados			
	<i>Xam681</i>	<i>Xam1061</i>	<i>Xam394</i>	<i>Xam395</i>
<b>Total</b>	1532	559	101	1719
<b>Reprimidos</b>	874 (57%)	248 (44%)	38 (38%)	1046 (61%)
<b>Inducidos</b>	658 (43%)	311 (56%)	63 (62%)	673 (39%)

## 2.4.2 Identificación de genes candidatos de susceptibilidad

De los genes expresados diferencialmente se seleccionaron los diez primeros para realizar un análisis detallado. Para estos genes se incluyó la predicción bioinformática de posibles blancos de los TALEs contenidos en una colección de cepas de *Xam* obtenido a partir de las secuencias de los RVDs y del código de los TALEs disponible (Zarate, 2015).

**Tabla 2-3. Top10 de genes inducidos en plantas *in vitro* de la variedad susceptible cv.60444 inoculadas con la cepa *Xam681*.**

Se muestra descripción PANTER de cada gen y la predicción bioinformática cuando existe.

<i>Xam681</i>		
Gen ID	Descripción Gen	TALE
Manes.06G123400	BIDIRECTIONAL SUGAR TRANSPORTER SWEET10	TALE20 <i>Xam681</i>
Manes.05G068700	PAX TRANSCRIPTION ACTIVATION DOMAIN INTERACTING PROTEIN	TALE13 <i>Xam681</i>
Manes.14G044700	AP2 domain (AP2)	-
Manes.13G045100	CLAVATA3/ESR (CLE)-RELATED PROTEIN 41-RELATED	TALE22 <i>Xam681</i>
Manes.05G025000	GLUCOSYL/GLUCURONOSYL TRANSFERASES	-
Manes.07G120000	Wall-associated receptor kinase galacturonan-binding	-
Manes.15G026800	MEMBRANE-ASSOCIATED KINASE REGULATOR 1-RELATED	TALE13 <i>Xam681</i>
Manes.04G033900	Any process that modulates the frequency, rate or extent of cellular DNA-templated transcription.	TALE14 <i>Xam681</i>
Manes.14G014900	Protein kinase domain (Pkinase)	-
Manes.05G167700	Cytochrome P450 CYP2 subfamily	TALE22 <i>Xam681</i>

De los 10 genes más inducidos tras la infección con las cepas *Xam681* (tabla 2-3) y 394 (tabla 2-5), la predicción indica que seis y tres de estos genes respectivamente pueden ser blancos de los TALEs de estas cepas. Para la cepa *Xam1061* no fue posible realizar la predicción bioinformática ya que no se tiene la secuencia disponible de los RVDs de los TALEs. Sin embargo, como se observa en la tabla 2-4, la infección con esta cepa activa

**Tabla 2-4. Top10 de genes inducidos en plantas *in vitro* de la variedad susceptible cv.60444 inoculadas con la cepa *Xam1061*.**

Se muestra descripción PANTER de cada gen y la predicción bioinformática cuando existe.

<i>Xam1061</i>		
Gen ID	Descripción Gen	TALE
Manes.06G123400	BIDIRECTIONAL SUGAR TRANSPORTER SWEET10	-
Manes.13G045100	CLAVATA3/ESR (CLE)-RELATED PROTEIN 41-RELATED	-
Manes.12G085500	TRANSFORMER-2-RELATED	-
Manes.08G080400	REGULATOR OF CHROMOSOME CONDENSATION	-
Manes.17G106700	<i>FAMILY NOT NAMED</i>	-
Manes.09G041900	ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER	-
Manes.09G025200	TRANSCRIPTION FACTOR NF-Y ALPHA-RELATED	-
Manes.15G026800	MEMBRANE-ASSOCIATED KINASE REGULATOR 1-RELATED	TALE14 <i>Xam1061</i>
Manes.04G033900	Any process that modulates the frequency, rate or extent of cellular DNA-templated transcription.	TALE14 <i>Xam1061</i>
Manes.16G038400	CYSTEINE PROTEASE FAMILY C1-RELATED	-

de igual manera dos genes inducidos por la infección con *Xam681*, los cuales son blancos predichos por el TALE20*Xam681* y el TALE22*Xam681* respectivamente y cuyos tamaños son compartidos con la cepa *Xam1061*.

**Tabla 2-5. Top10 de genes inducidos en plantas *in vitro* de la variedad susceptible cv.60444 inoculadas con la cepa *Xam394*.**

Se muestra descripción PANTER de cada gen y la predicción bioinformática cuando existe.

<i>Xam394</i>		
Gen ID	Descripción Gen	TALE
Manes.15G006300	Glycosyl hydrolase family 3 N terminal domain	TALE15 <i>Xam394</i>
Manes.05G068700	PAX TRANSCRIPTION ACTIVATION DOMAIN INTERACTING PROTEIN	TALE13 <i>Xam394</i>
Manes.14G047800	BIDIRECTIONAL SUGAR TRANSPORTER SWEET10	-
Manes.16G040500	CYSTEINE PROTEASE FAMILY C1-RELATED	-
Manes.17G069300	VOLTAGE AND LIGAND GATED POTASSIUM CHANNEL	-
Manes.04G021300	<i>FAMILY NOT NAMED</i>	-
Manes.18G087400	ALCOHOL DEHYDROGENASE CLASS-P	-
Manes.14G014900	Protein kinase domain (Pkinase)	-
Manes.01G124500	spermine and spermidine degradation	-
Manes.11G075100	chalcone synthase (CHS)	TALE15 <i>Xam394</i>

El TALE15*Xam*394 muestra tener dos genes blancos diferentes que se ubican dentro del top10 de los genes reprogramados por la cepa *Xam*394 (Tabla 2-5).

A pesar de que la infección con la cepa *Xam*395 en plantas propagadas *in vitro* mostró el mayor número de genes expresados diferencialmente, ninguno de los que se ubicaron en el top10 muestran alguna predicción para alguno de los TALEs contenidos en esta cepa (Tabla 2-6).

**Tabla 2-6. Top10 de genes inducidos en plantas *in vitro* de la variedad susceptible cv.60444 inoculadas con la cepa *Xam*395.**

Se muestra descripción PANTER de cada gen y la predicción bioinformática cuando existe.

<i>Xam</i> 395		
Gen ID	Descripción Gen	TALE
Manes.11G029700	TRANSCRIPTION FACTOR BHLH87	-
Manes.02G050400	putative transcriptional regulator (algH)	-
Manes.02G107900	triacylglycerol degradation	-
Manes.02G146000	solute carrier family 25 (mitochondrial oxoglutarate transporter), member 11	-
Manes.09G025200	TRANSCRIPTION FACTOR NF-Y ALPHA-RELATED	-
Manes.13G006800	BIDIRECTIONAL SUGAR TRANSPORTER SWEET15	-
Manes.06G050100	ZINC FINGER PROTEIN	-
Manes.10G034600	EamA-like transporter family (EamA)	-
Manes.16G038400	CYSTEINE PROTEASE FAMILY C1-RELATED	-
Manes.14G173500	Peroxidase / Lactoperoxidase // Acid phosphatase / Phosphomonoesterase	-

Como factor común en las cuatro inoculaciones, independiente si son inducidos por TALEs o no, es la expresión significativa de genes involucrados en la transcripción como son muchos factores de transcripción, genes relacionados con proteínas quinasas y de genes involucrados en el transporte de azúcar como lo son la familia MeSWEET10.

Se encontraron genes inducidos por más de una cepa y que son blancos de más de un TALE diferente. Es el caso del gen Manes.05G068700 el cual es inducido por el TALE13*Xam*681 y el TALE13*Xam*394 que son diferentes entre sí y del gen Manes.15G026800 el cual es inducido por el TALE13*Xam*394 y el TALE14*Xam*1061. Esto demuestra que TALEs diferentes de distintas cepas tienen en común un mismo gen blanco y a su vez que un solo TALE puede tener más de un blanco efectivo de acción. Se obtuvieron de esta manera un total de 8 genes candidatos de susceptibilidad en yuca los cuales son inducidos por TALEs de *Xam* (tabla 2-7).

**Tabla 2-7. Genes candidatos de susceptibilidad en yuca inducidos por TALEs de *Xam*.**

Se muestra el genID, la descripción PANTER de cada gen y el (los) TALE(s) para los cuales son blanco. TALE?Xam1061 indica que ese gen se encuentra en el top10 de genes diferenciados para esa cepa sin embargo no se conoce la secuencia de ese TALE y se asume como si fuese un inducido por un TALE contenido en esa cepa.

Genes candidatos de susceptibilidad en yuca inducidos por TALEs de <i>Xam</i>		
Gen ID	Descripción Gen	TALE
Manes.06G123400	BIDIRECTIONAL SUGAR TRANSPORTER SWEET10	TALE20Xam681, ()
Manes.05G068700	PAX TRANSCRIPTION ACTIVATION DOMAIN INTERACTING PROTEIN*	TALE13Xam681, TALE13Xam394,
Manes.13G045100	CLAVATA3/ESR (CLE)-RELATED PROTEIN 41-RELATED *	TALE22Xam681,
Manes.15G026800	MEMBRANE-ASSOCIATED KINASE REGULATOR 1-RELATED*	TALE13Xam681, TALE14Xam1061
Manes.04G033900	Any process that modulates the frequency, rate or extent of cellular DNA-templated transcription.*	TALE14Xam681, TALE14Xam1061
Manes.05G167700	Cytochrome P450 CYP2 subfamily*	TALE22Xam681
Manes.15G006300	Fibronectin type III-like domain, Glycosyl hydrolase family 3 N terminal domain - PERIPLASMIC BETA-GLUCOSIDASE-RELATED	TALE15Xam394
Manes.11G075100	Oxoacyl-[acyl-carrier-protein (ACP)] synthase III C terminal, chalcone synthase (CHS) - HYDROXYMETHYLGLUTARYL-COA SYNTHASE	TALE15Xam394

## 2.5 Discusión

La expresión génica está determinada por el tipo de célula y su entorno. Frente a variaciones ambientales y a condiciones particulares las células reprograman la expresión de los genes necesarios para mantenerse en homeostasis. Sin embargo, en el caso de las enfermedades, algunos patógenos son capaces de manipular la expresión génica del hospedero con el fin de beneficiarse del producto de la inducción de un determinado gen. Tal es el caso de los efectores TALEs que se unen de manera específica a promotores de genes blanco para inducir su expresión. En este trabajo, mediante una aproximación transcriptómica, se logró identificar 8 genes los cuales son blancos posibles para 7 diferentes TALEs ([tabla 2-7](#)) entre los que se encuentra el gen *S MeSWEET10a* reportado

por Cohn en 2014, y el cual es inducido por el TALE20*Xam*668. Este resultado confirma a su vez la inducción de este gen en plantas susceptibles *in vitro* inoculadas con las cepas *Xam*681 y *Xam*1061.

Reportes previos en el patosistema arroz-*Xoo* (*X. oryzae oryzae*), identificaron mediante análisis de microarreglos el gen *S Os8N3* el cual es blanco del TALE PthXo1 de *Xoo* (Yang B., *et al.*, 2006) y el gen *Os11N3* el cual es blanco del TALC de *Xoo* (Yu Y., *et al.*, 2011). En el patosistema naranja-*Xcc* (*X. citri citri*) se identificó el gen CsLOB1 como el blanco del TALE *pthA4* de *Xcc* igualmente en análisis de microarreglos (Hu Y., *et al.* 2014). En todos los casos se relacionó la inducción de los genes con la virulencia del patógeno. Para el caso particular del patosistema yuca-*Xam*, se han identificado hasta la actualidad mediante RNAseq los genes HS-TF el cual es blanco candidato del TALE1*Xam* de la cepa *Xam*CIO151 (Muñoz B., *et al.*, 2014), el gen *MeSWEET10a* blanco del TALE20*Xam*668 y se encuentra en validación un gen del grupo MtN21/EamA-like transporter el cual es blanco del TALE14*Xam*CIO151 (Cohn M., *et al.*, 2015).

Aunque es alta la diversidad genética de *Xam* en Colombia (Trujillo C., *et al.*, 2014), la diversidad en términos de TALEs no lo es (Zárate C., 2015). En las poblaciones estudiadas de Colombia existe un total de nueve TALEs diferentes y cada cepa puede portar entre 2 y 5 TALEs diferentes. Estos son números bajos si se compara por ejemplo con poblaciones de *Xoo* que pueden contener entre 10 y 30 TALEs (Yu Y., *et al.*, 2015), *Xoc* que pueden portar entre 1 y 17 TALEs diferentes (Wonni I., *et al.*, 2013) o *Xcc* en donde pueden existir entre 3 y 6 TALEs diferentes (Ye G., *et al.*, 2013). A pesar de estas diferencias en contenido de TALEs, no se ha logrado relacionar la cantidad de TALEs presentes en una especie o cepa particular con el tamaño del genoma ni con el número de genes en la planta huésped. Sin embargo, el número de TALEs presentes en una población determinada del patógeno y contenidos en cada cepa puede ser indicador de la diversidad del hospedero lo cual sugiere que el cultivo de yuca en Colombia es homogéneo y se restringe a pocas variedades comerciales mejoradas distribuidas a lo largo del territorio.

Nuestros resultados permiten observar que TALEs contenidos en cepas diferentes confluyen en un mismo blanco, ya sean del mismo tamaño como es el caso de los TALE13*Xam*681 y TALE13*Xam*394 que inducen el gen *Manes.05G068700*, o sean de tamaño diferente como es el caso de los TALE13*Xam*681 y TALE14*Xam*1061 que inducen el gen *Manes.15G026800*. También permite la observación que un mismo TALE puede

inducir más de un gen como es el caso del TALE13*Xam*681 que es capaz de inducir los genes *Manes.15G026800* y *Manes.05G068700*.

La confluencia de diferentes TALEs en un mismo promotor sugiere la relevancia de estos genes en la susceptibilidad de la planta, candidatizándolos como genes mayores de susceptibilidad. Situación similar ha sido reportada en el patosistema arroz-*Xoo* en donde se ha mostrado que el gen de susceptibilidad *OsSWEET14* no solo es inducido por más de un TALE sino que aumenta significativamente su expresión mediado por la acción sinérgica de varios TALEs que se ubican en diferentes posiciones dentro del promotor del gen (Streubel J., 2017).

Cabe resaltar que las cepas *Xam*681 y *Xam*394 tienen una procedencia geográfica y temporal distinta. *Xam*681 fue colectada en el departamento de Córdoba en Colombia en 2014 mientras que la cepa *Xam*394 fue colectada en Argentina en 1984. Aún así, sus TALEs muestran tener en común al menos un mismo blanco. Esto también ha sido observado en *Xoo* en donde se ha reportado que cepas colectadas en lugares biogeográficamente diferentes contienen TALEs diferentes dirigidos al mismo blanco, el gen *S OsSWEET14* considerado por esta razón como un gen mayor de susceptibilidad (Zhou *et al.*, 2015).

La identificación de los genes relacionados con la susceptibilidad de la yuca promovidos por el patógeno pueden ser tenidos en cuenta en programas de mejoramiento que busquen conferirle al cultivo resistencia a *Xam* como se ha logrado en investigaciones en otros cultivos en donde usando tecnologías de edición de genomas por medio de TALENs y CRISPR/Cas9 se han generado plantas resistentes al mutar o editar los EBEs de genes de susceptibilidad en arroz los cuales son blancos de diferentes TALEs de *Xoo* (Servane B., *et al.*, 2016).

En este sentido, el actual trabajo representa un nuevo aporte al conocimiento de las bases moleculares de la susceptibilidad de la yuca y podrá ser explotado con el objetivo de mitigar el riesgo que el CBB representa para el cultivo.



### 3. Conclusiones y perspectivas

La bacteriosis vascular causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) es la enfermedad bacteriana más importante en la yuca la cual es catalogada por la FAO como el cultivo del siglo XXI por considerarse la principal fuente de alimento para la población en países pobres o en vía de desarrollo (FAO. 2015).

Dado que *Xam* es un patógeno vascular y la yuca es propagada vegetativamente por medio de estacas, el control de la bacteriosis se dificulta. Por otro lado, el mejoramiento tradicional en yuca es un proceso laborioso que debido al ciclo de vida de la yuca, requiere de largos periodos de tiempo que no siempre resultan en la selección adecuada de cultivares con características óptimas de rendimiento y de resistencia a la vez.

Por tales razones, la investigación de las bases moleculares que subyacen a la resistencia y susceptibilidad de la yuca frente a *Xam* es un recurso promisorio para ser implementado en estrategias modernas de mejoramiento molecular. El estudio de la interacción molecular del patosistema yuca-*Xam* usualmente ha venido siendo desarrollado utilizando plantas crecidas a partir de estacas o plantas adultas. Debido a lo dispendioso y exigente que resulta el cultivo de la yuca, se hace necesaria la evaluación de alternativas que permitan la obtención de material vegetal de manera más sencilla, rápida y con certeza en la reproducibilidad.

Dentro de las posibilidades, el sistema de propagación *in vitro* representa una alternativa a la provisión de material vegetal constante, sencilla y fácil de implementar en cualquier laboratorio.

Estudios anteriores utilizando el sistema de propagación *in vitro* han conseguido identificar y validar funcionalmente genes implicados en la tolerancia a la salinidad del cultivo de la yuca (de Nazaré M., *et al.*, 2011). Se demostró igualmente que entre plantas de la misma variedad mantenidas en campo y en propagación *in vitro* no existe variabilidad genética confirmando una alta fidelidad genética en las plantas mantenidas en el sistema de propagación *in vitro* (Vidal *et al.*, 2015). Estos reportes apoyan el sistema de propagación *in vitro* como un sistema adecuado para ser evaluado desde el punto de vista de la interacción planta patógeno. Nuestros resultados de inoculación en plantas *in vitro* concuerdan con lo reportado en plantas adultas. El crecimiento bacteriano se muestra diferencial al inocular *Xam* en plantas de las variedades susceptible y resistente (Muñoz B. 2012 y Mbaringong G. *et al.* 2017) observándose mayor crecimiento de la bacteria en

plantas de la variedad susceptible *in vitro* y un control de la proliferación bacteriana en plantas de la variedad resistente *in vitro*. Esta observación demuestra que los procesos que ocurren durante las etapas iniciales de la infección son similares en plantas adultas y en plantas *in vitro*.

Una de las características patogénicas de *Xam* es la presencia de proteínas tipo TALE dentro de su arsenal de efectores, estos efectores actúan como activadores transcripcionales induciendo la expresión de genes mediante la unión específica a secuencias en el promotor del gen aumentando la susceptibilidad de la planta y promoviendo la patogenicidad.

Los resultados obtenidos demuestran que el gen de susceptibilidad (S) *MeSWEET10a* es inducido de la misma forma en plantas crecidas a partir de estacas y en plantas *in vitro*. Se demostró además que el gen S es inducido solo en plantas de la variedad susceptible y no en plantas de la variedad resistente, y que el gen S es inducido por la infección de diferentes cepas sugiriendo un vínculo entre la inducción de este gen con el desarrollo de síntomas de la planta.

Si bien las plantas *in vitro* no están sometidas al efecto medioambiental ejercido naturalmente sobre plantas adultas, las condiciones del sistema *in vitro* son propicias para que la interacción entre la planta y el patógeno ocurra de manera similar. Diferentes sistemas han sido utilizados para el estudio por ejemplo de las vías de la inmunidad, es así que empleando protoplastos (células sin pared celular) se ha demostrado el reconocimiento del patógeno y la activación de vías de inmunidad como la PTI (Bigeard, J., *et al.*, 2015). Esto demuestra que este tipo de ensayos con plantas mantenidas en ambientes controlados efectivamente representan un buen modelo para el estudio de la inmunidad vegetal.

La validación e implementación del sistema de propagación *in vitro* de yuca en el estudio de su interacción con *Xam* ofrece a los investigadores la posibilidad de contar con mayor cantidad de material vegetal, disminución en el tiempo de obtención y menores requerimientos en infraestructura propios del exigente cultivo de yuca.

De esta manera se llevó a cabo, en plantas *in vitro*, un ensayo de RNAseq en donde se secuenció y analizó mediante herramientas computacionales el transcriptoma proveniente de tejido foliar de plantas de la variedad susceptible cv.60444 inoculadas con las cepas *Xam681*, *Xam1061*, *Xam394* y *Xam395* comparadas con plantas control tratadas de la misma forma, pero inoculando MgCl<sub>2</sub> a manera de mock.

La investigación de los mecanismos de patogenicidad del grupo *Xanthomonas* al que pertenece *Xam* no es reciente. Otros estudios han identificado genes de susceptibilidad en diferentes patosistemas que incluyen plantas de importancia agrícola como el arroz que es infectado por *Xoo* (Yang B., *et al.*, 2006), pimiento infectado por *Xcv* (Kay *et al.* 2007), naranja infectada por *Xcc* (Hu Y., *et al.* 2014), tomate infectado por *Xcv* (Schornack *et al.*, 2004), entre otros.

De la misma forma han sido identificados genes de susceptibilidad en el patosistema yuca-*Xam*, por ejemplo el gen HS-TF el cual es blanco candidato del TALE1*Xam* de la cepa *Xam*CIO151 (Muñoz B., *et al.*, 2014), el gen MeSWEET10a blanco validado del TALE20*Xam*668 (Cohn M., *et al.* 2014) y se encuentra en validación un gen del grupo MtN21/EamA-like transporter el cual es blanco del TALE14*Xam*CIO151 (Cohn M., *et al.*, 2015).

La identificación de genes relevantes blancos de susceptibilidad de TALEs de *Xam* (y en general de todo el género *Xanthomonas*) es un proceso complicado dado que algunos TALEs tienen diferentes blancos como es el caso del TALE14*Xam*668 (Wilkins *et al.*, 2015).

Combinando la tecnología de secuenciamiento NGS (por sus siglas en inglés: next generation sequencing) y el uso de herramientas computacionales se consiguió obtener una lista de genes cuya expresión se vio alterada durante el proceso de infección por cepas de *Xam* a las 50hpi. La búsqueda se centró en los genes que presentaron mayor inducción y que fueron reportados previamente como blancos de TALEs según una predicción bioinformática realizada sobre los TALEs de *Xam* (Zárate C. 2015). De esta manera se consiguió depurar la lista de varios cientos de genes para finalmente postular 8 genes como candidatos de susceptibilidad en yuca los cuales son blanco de siete diferentes TALEs contenidos en cuatro cepas de *Xam*.

La baja variabilidad de *Xam* en términos de contenido de TALEs puede ser tenida en cuenta como un indicador de la baja variabilidad genética de las variedades que componen el cultivo de yuca en Colombia en la actualidad. La baja variabilidad de TALEs en *Xam* puede deberse también a las escasas alternativas de susceptibilidad que le impone la planta a la bacteria.

La confluencia de diferentes TALEs a un mismo gen blanco y su persistencia en el tiempo indicaría que esta característica viene siendo seleccionada positivamente a favor de la bacteria con la complicidad de la introducción de cultivares mejorados.

Las respuestas observadas en yuca frente a las distintas infecciones incluyen varios procesos posiblemente relacionados con respuesta a defensa conocidos, particularmente respuesta contra patógenos vasculares (Yadeta & Thomma., 2013), Según nuestros resultados, algunos genes inducidos directamente por TALEs son factores de transcripción lo cual es consistente con reportes que indican cambios múltiples en la transcripción de genes en el hospedero promovidos directamente por la acción de TALEs (Hu *et al.*, 2014 & Li *et al.* 2014). Sobresale de igual forma la inducción de la expresión de genes involucrados en el transporte de azúcares lo cual concuerda con los reportes previos, no solo en yuca, que determinaron la importancia de este tipo de genes y relacionados en la capacidad virulenta de muchas especies de *Xanthomonas* (Cohn M., *et al.*, 2015 & Zhou *et al.*, 2015).

Es posible que existan otros blancos de susceptibilidad mediados por la acción de los TALEs contenidos en las cepas de *Xam* empleadas en este experimento los cuales no han

sido detectadas por el background genético utilizado para esta identificación, la variedad susceptible cv.60444.

En resumen, esta investigación validó el sistema de propagación de yuca *in vitro* como una alternativa en el estudio de la interacción yuca-*Xam*. Una vez implementado el sistema de propagación *in vitro* se realizó un ensayo de RNAseq que permitió la identificación y selección de genes inducidos tras la infección y que son blancos efectivos de los TALEs de *Xam*.

La validación funcional de los genes aquí reportados conducirá a correlacionar el efecto de la inducción de los genes con la susceptibilidad de la planta y el progreso de la enfermedad colocando a estos genes en una posición relevante para ser tenidos en cuenta en programas de mejoramiento.

# Bibliografía

- Liu J, Zheng Q, Ma Q, Gadidasu KK, Zhang P.** (2011). Cassava genetic transformation and its application in breeding. *Journal of Integrative Plant Biology* **53**: 552–569
- Á.M. Vidal, L.J. Vieira, C.F. Ferreira, F.V.D. Souza, A.S. Souza and C.A.S. Ledo.** (2015). Genetic fidelity and variability of micropropagated cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) evaluated using ISSR markers. *Genetics and Molecular Research* **14** (3): 7759-7770. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015>
- Aguilera M.** (2012). La yuca en el caribe colombiano: De cultivo ancestral a agroindustrial. *BanRep*, **158**. ISSN 1692-3715.
- Allem, A. C.** (1987). *Manihot esculenta* is a native of the neotropics. *Plant Genetic Newsletter*. **1**. 22-24.
- Allem, A. C.** (1994). The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). *Genetic Resources and crop evolution* **41**. 133-150.
- Allem, A. C.** (1999). The closest wild relatives of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphitica* **107**. 123-133.
- Allem, A.C.** (2002). The origin and taxonomy of cassava. In: R.J. Hillocks, J.M. Thresh and A.C. Bellotti (Eds.). *Cassava: Biology, Production and Utilization*. CABI Publishing, New York, USA. pp. 1-16.
- Alvarez E., Llano G.** (2002). Enfermedades del cultivo de la yuca y métodos de control. En: *La yuca en el Tercer Milenio. Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización*. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Ospina y Ceballos (eds). Cali, Colombia. **21**: 130-147
- Arrieta-Ortiz, M. L., Rodriguez, R. L., Perez-Quintero, A., Poulin, L., Diaz, A. C., Arias Rojas, N., et al.** (2013) Genomic survey of pathogenicity determinants and VNTR

markers in the cassava bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis strain CIO151. PLoS One, **8**, e79704.

**Asai, T. et al.** (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. Nature **415**: 977–983.

**Ashmore S.** (1997). Status report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 67 p

**Axtell, M. J. & Staskawicz, B. J.** (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in Arabidopsis is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. Cell **112**: 369–377.

**Bart, R., Cohn, M., Kassen, A., McCallum, E. J., Shybut, M., Petriello, A., et al.** (2012). Highthroughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance. Proc Natl Acad Sci U S A, **109**, E1972-1979.

**Bigeard, J., Colcombet, J., Hirt, H.** (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). Molecular Plant, **8** (4), 521-539. DOI : 10.1016/j.molp.2014.12.022 <http://prodinra.inra.fr/record/339958>

**Boch, J. and Bonas, U.** (2010). Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. Annu Rev Phytopathol, **48**, 419-436.

**Bogdanove, A. J., Schornack, S., and Lahaye, T.** (2010). TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. Curr. Opin. Plant Biol. **13**, 394–401. doi: 10.1016/j.pbi.2010.04.010

**Bredeson Jessen V, Jessica B Lyons, Simon E Prochnik, G Albert Wu, Cindy M Ha. et., al.** (2016). Sequencing wild and cultivated cassava and related species reveals extensive interspecific hybridization and genetic diversity. Nature Biotechnology, DOI: 10.1038/nbt.3535

**Castiblanco, L. F., Gil, J., Rojas, A., Osorio, D., Gutierrez, S., Munoz-Bodnar, A., et al.** (2013). TALE1 from *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis acts as a transcriptional

activator in plant cells and is important for pathogenicity in cassava plants. *Mol Plant Pathol*, **14**:84-95.

**Cernadas, R. A, Doyle, E. L., Niño-Liu, D. O., Wilkins, K. E., Bancroft, T., Wang, L., Schmidt, C. L., Caldo, R., Yang, B., White, F. F., Nettleton, D., Wise, R. P., and Bogdanove, A. J.** (2014). Code-assisted discovery of TAL effector targets in bacterial leaf streak of rice reveals contrast with bacterial blight and a novel susceptibility gene. *PLoS Pathog.* 10:e1003972. Published online.

**Chavez, A.L., Bedoya, J.M., Sanchez, T., Iglesias, C., Ceballos, H. & Roca, W.** (2000). Iron, carotene, and ascorbic acid in cassava roots and leaves. *Food Nutr. Bull.*, **21**: 4

**Chen LQ, Hou B, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X, Guo W, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB.** (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**:527–532. doi:10.1038/nature09606

**Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., et al.** (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, **468**:527-532.

**Chinchilla, D. et al.**(2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–500.

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

**Cloonan N, et al.** (2008). Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nature Methods* **5**:613–619

**Cock JH, Wholey D, Lozano JC.** (1976). A rapid propagation system for cassava. CIAT Series EE-20. CIAT, Cali, Colombia.

**Cohn, M., Bart, R. S., Shybut, M., Dahlbeck, D., Gomez, M., Morbitzer, R., et al.** (2014). *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector-mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. *Mol Plant Microbe Interact*, **27**:1186-1198.

- Cohn, M., Morbitzer, R., Lahaye, T. and Staskawicz, B. J.** (2015). Comparison of gene activation by two TAL effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* reveals candidate host susceptibility genes in cassava. *Molecular Plant Pathology*, **17**: 875–889. doi:10.1111/mpp.12337
- de Nazaré Monteiro Costa, C., Brígida, A.B.S., do Nascimento Borges, B. et al.** (2011). Levels of MeLEA3, a cDNA Sequence Coding for an Atypical Late Embryogenesis Abundant Protein in Cassava, Increase Under In Vitro Salt Stress Treatment. *Plant Mol Biol Rep.* **29**: 997. doi:10.1007/s11105-011-0292-7
- Dodds, P. N. & Rathjen, J. P.** (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 539–548.
- Doran, J.W. & Zeiss, M.R.** (2000). Soil health and sustainability: Managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, **15**: 3-11.
- FAO (Food and agriculture organization).** (1997). Feeding pigs in the tropics. FAO Animal Production and Health Paper 132. Rome.
- FAO (Food and agriculture organization).** (2013). Save and grow: Cassava. A guide to sustainable production intensification. E-ISBN 978-92-5-107642-2.3- 7
- FAO (Food and agriculture organization).** (2015). Food Outlook BIENNIAL REPORT ON GLOBAL FOOD MARKETS. ISBN: 9781370289257. 32-34.
- Feng, F., Yang, F., Rong, W., Wu, X., Zhang, J., Chen, S., et al.** (2012). A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature*, **485**:114-118.
- Gao, X. et al.** (2013). Bifurcation of Arabidopsis NLR immune signaling via Ca(2+)-dependent protein kinases. *PLoS Pathog.* **9**, e1003127.
- Gohre V, Spallek T, Haweker H, Mersmann S, Mentzel T, et al.** (2008) Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr Biol* **18**: 1824–1832

- Gu, K. Y., Yang, B., Tian, D. S., Wu, L. F., Wang, D. J., Sreekala, C., et al.** (2005). R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* **435**: 1122–1125. doi: 10.1038/nature03630
- Guo M, Jeong BR, Tian F, Elthon TE, Cerny RL, Staiger D, Alfano JR.** (2007). A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature*. **447**:284–288.
- He P, Shan L & Sheen J.** (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cellular Microorganismology* **9**: 1385-96.
- Heese, A. et al.** (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**: 12217–12222 .
- Hershey C., Debouck D.** (2010). A Global Conservation Strategy for Cassava (*Manihot esculenta*) and Wild *Manihot* Species. CIAT. 4-16.
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K. and Mudgett, M. B.** (2003). Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Molecular microbiology*, **50**:377-389.
- Howeler R, Litaladio N, Thomas G.** (2013). Save and grow: cassava – a guide to sustainable production intensification. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United States of America.
- Howeler. R.H.** (2012). Cassava leaf production for animal feeding. ed. The cassava handbook – A reference manual based on the Asian regional cassava training course, held in Thailand. Cali, Colombia, CIAT. pp. 626-648.
- Hu, M., Hu, W., Xia, Z., Zhou, X., & Wang, W.** (2016). Validation of Reference Genes for Relative Quantitative Gene Expression Studies in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by Using Quantitative Real-Time PCR. *Frontiers in Plant Science*, **7**, 680. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00680>
- Hu, Y., Zhang, J., Jia, H., Sosso, D., Li, T., Frommer, W. B., Yang, B., White, F. F., Wang, N., and Jones, J. B.** (2014). Lateral organ boundaries 1 is a disease

susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111:E521-9

**Hussey G.** (1978). The application of tissue culture for the vegetative propagation of plants. Sci Prog **65**:185-208

**Hutin, M., Pérez-Quintero, A. L., Lopez, C. and Szurek, B.** (2015). MorTAL Kombat: the story of defense against TAL effectors through loss-of-susceptibility. Front. Plant Sci. **6**:535. doi: 10.3389/fpls.2015. 00535

**Jelenska J, Yao N, Vinatzer BA, Wright CM, Brodsky JL, Greenberg JT.** (2007). A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. Curr Biol. **17**:499–508

**Jones JDG, Dangl JL.** (2006). The plant immune system. Nature **444**:323–29

**Jorge V, Fregene M, Vélez CM, Duque MC, Tohme J, Verdier V.** (2001). QTL analysis of field resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in cassava. Theor Appl Genet. **102**(4):564–71.

**Jorge V, Fregene MA, Duque MC, Bonierbale MW, Tohme J, Verdier V.** (2000). Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). TAG Theor Appl Genet. **101**(5):865–72.

**Kamalam P, Rajendran PG, Hrishii N.** (1977) A new technique for the rapid propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Trop Agric (Trinidad) **54**:213- 217

**Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., and Bonas, U.** (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. Science **318**:648–651. doi: 10.1126/science.1144956

**Keene JD.** (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. Nat Rev Genet. **8**: 533–543.

**Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B.** (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. Nat Biotechnol **30**: 390–392.

- Liao Y, Smyth GK & Shi W.** (2013). The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Research*, **41**, pp. e108)
- Lopez C, Restrepo S, Verdier V.** (2006). Limitaciones de la bacteriosis vascular de yuca: Nuevos avances. *Acta Biologica Colombiana* ISSN: 0120-548X. **11**: 21 - 45.
- López, C.E. & Bernal, A.J.** (2012). Cassava Bacterial Blight: Using Genomics for the Elucidation and Management of an Old Problem. *Trop. Plant Biol.* **5**: 117–126.
- Lopez, C. E., Quesada-Ocampo, L. M., Bohorquez, A., Duque, M. C., Vargas, J., Tohme, J., et al.** (2007) Mapping EST-derived SSRs and ESTs involved in resistance to bacterial blight in *Manihot esculenta*. *Genome*, **50**:1078-1088
- Love MI, Huber W and Anders S.** (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, **15**:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8).
- Lozano JC.** (1986). Cassava bacterial blight: a manageable disease. *Plant Dis* **70**:1089–1093
- Lozano JC., Sequeira L.** (1974a). Bacterial blight of cassava in Colombia. I: Etiology. *Phytopathology* **64**:74-82.
- Lozano JC., Sequeira L.** (1974b). Bacterial blight of cassava in Colombia. II: Epidemiology and control. *Phytopathology* **64**:83-88.
- Maekawa, T., Kufer, T. A. & Schulze-Lefert, P.** (2011). NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nat. Immunol.* **12**: 817–826.
- Maraite H.** (1993). *Xanthomonas campestris* pathovars on cassava: cause of bacterial blight and bacterial necrosis. In: Swings JG, Civerolo EL (eds) *Xanthomonas*. Chapman and Hall, London, pp 18–24.
- Mbaringong Gladys Ada , Nyaboga Evans N. , Wang'ondy Virginia , and Kanduma Esther.** (2017). Evaluation of Selected Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Cultivars Grown in Kenya for Resistance to Bacterial Blight Disease. *World Journal of Agricultural Research*, vol. 5, no. **2**: 94-101. doi: 10.12691/wjar-5-2-5.

- Medina, C. A., Reyes, P. A., Trujillo, C. A., Gonzalez, J. L., Bejarano, D. A., Montenegro, N. A., Jacobs, J. M., Joe, A., Restrepo, S., Alfano, J. R. and Bernal, A. J.** (2017). The role of type three effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis in virulence and suppression of plant immunity. *Molecular Plant Pathology*. Accepted Author Manuscript. doi:10.1111/mpp.12545
- Moscou MJ, Bogdanove AJ.** (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*. **326**:1501.
- Muñoz-Bodnar, A., Perez-Quintero, A. L., Gomez-Cano, F., Gil, J., Michelmore, R., Bernal, A., et al.** (2014). RNAseq analysis of cassava reveals similar plant responses upon infection with pathogenic and non-pathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis. *Plant cell reports*, **33**:1901-1912
- Muñoz B. M.A.** (2012). Function of TALE1*Xam* in cassava bacterial blight: a transcriptomic approach, in *Biology*. Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 193.
- Nomura K, Debroy S, Lee YH, Pumplin N, Jones J, He SY.** (2006). A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science*. **313**:220–223
- Pagán, J.R. et al.** (2005). La temprana introducción y uso de algunas plantas domésticas, silvestres y cultivos en Las Antillas precolombinas. *Diálogo Antropológico* **3**, 7–33.
- Park. C.J. Han S.W. Chen X.W. et al.** (2010). Elucidation of Xa21-mediated innate immunity. *Celular Microbiology* **12**:1017-1025.
- Pohl, M.D. et al.** (1996) Early agriculture in the Maya lowlands. *Latin American Antiquity*. **7**:355–372.
- Pope, K.O. et al.** (2001). Origin and environmental setting of ancient agriculture in the lowlands of Mesoamerica. *Science* **292**, 1370–1373.
- Rabbi I, Hamblin M, Gedil M, Kulakow P, Ferguson M, Ikpan AS, et al.** (2014). Genetic mapping using genotyping-by-sequencing in the clonally propagated cassava. *Crop Sci*. **54**(4):1384–96.

- Rinvoise, B. S.** (1972). The área of origin of *Manihot esculenta* as a crop plant - A review of the evidence. *Economic Botany* **26**: 352-360
- Roden, J., Eardley, L., Hotson, A., Cao, Y. and Mudgett, M. B.** (2004). Characterization of the *Xanthomonas AvrXv4* effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Mol Plant Microbe Interact*, **17**:633-643
- Rogers, D. J. & S. G Appan.** (1973). *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae): A computer- assisted study. New York: Hafner Press.
- Rogers, D. J. and S. G Appan.** (1973). *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae): A computer- assisted study. New York: Hafner Press.
- Römer P., Hahn S., Jordan T., Straub T., Bonas U., Lahaye T.** (2007). Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science* **318**(5850):645–648. doi: 10.1126/science.1144958
- Ryan, R. P. et al.** (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 344–355.
- Servane Blanvillain-Baufumé, et al.** (2016). Targeted promoter editing for rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals differential activities for SWEET14-inducing TAL effectors. *Plant Biotechnol J.* **15**(3): 306–317.
- Singer, A. U., Schulze, S., Skarina, T., Xu, X., Cui, H., Eschen-Lippold, L., et al.** (2013). A pathogen type III effector with a novel E3 ubiquitin ligase architecture. *PLoS Pathog*, **9**: e1003121.
- Soto, J. C., Ortiz, J. F., Perlaza-Jiménez, L., Vásquez, A. X., Lopez-Lavalle, L. A. B., Mathew, B., López, C. E.** (2015). A genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with integrated physical mapping of immunity-related genes. *BMC Genomics*, **16**(1), 190. doi 10.1186/s12864-015-1397-4.
- Stork, W., Kim, J. G. and Mudgett, M. B.** (2015) Functional Analysis of Plant Defense Suppression and Activation by the *Xanthomonas* Core Type III Effector *XopX*. *Mol Plant Microbe Interact*, **28**:180-194.

- Strauss, T., van Poecke, R. M. P., Strauss, A., Römer, P., Minsavage, G. V., Singh, S., et al.** (2012). RNA-seq pinpoints a *Xanthomonas* TAL-effector activated resistance gene in a large-crop genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**: 19480–19485. doi: 10.1073/pnas.1212415109
- Streubel J, Baum H, Grau J, Stuttman J, Boch J.** (2017). Dissection of TALE-dependent gene activation reveals that they induce transcription cooperatively and in both orientations. *PLoS ONE* **12**(3): e0173580
- Suarez L, Mederos V.** (2011). Apuntes sobre el cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) tendencias actuales. *Cultivos Tropicales.* **32**(3):27-35
- Taylor, K. W., Kim, J. G., Su, X. B., Aakre, C. D., Roden, J. A., Adams, C. M., et al.** (2012). Tomato TFT1 is required for PAMP-triggered immunity and mutations that prevent T3S effector XopN from binding to TFT1 attenuate *Xanthomonas* virulence. *PLoS Pathog*, **8**, e1002768.
- Tian, D., Wang, J., Zeng, X., Gu, K., Qiu, C., Yang, X., et al.** (2014). The rice TAL effector-dependent resistance protein XA10 triggers cell death and calcium depletion in the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* **26**: 497–515. doi: 10.1105/tpc.113.119255.
- Trujillo, C. A., Arias-Rojas, N., Poulin, L., Medina, C. A., Tapiero, A., Restrepo, S., et al.** (2014b) Population typing of the causal agent of cassava bacterial blight in the Eastern Plains of Colombia using two types of molecular markers. *BMC microbiology*, **14**: 161.
- Trujillo, C. A., Ochoa, J. C., Mideros, M. F., Restrepo, S., Lopez, C. and Bernal, A.** (2014a) A complex population structure of the cassava pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis in recent years in the Caribbean Region of Colombia. *Microbial ecology*, **68**:155-167
- Van Der Biezen EA, Jones JDG.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* **23**:454–56
- van der Hoom Renier and Kamoun Sophien.** (2008). From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell*, Vol. 20:2009-2017.

- Vera JC, et al.** (2008). Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. *Mol. Ecol.* **17**:1636–1647.
- Verdier, V.r., et al.** (2004). Recent progress in the characterization of molecular determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* cassava interaction. *Plant Molecular Biology.* **56**(4): p. 573-584.
- Wang, C., Zhang, X., Fan, Y., Gao, Y., Zhu, Q., Zheng, C., et al.** (2015). XA23 is an executor R protein and confers broad-spectrum disease resistance in rice. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 290–302. doi: 10.1016/j.molp.2014.10.010
- Wonni, I., et al.** (2013). Analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* Population in Mali and Burkina Faso Reveals a High Level of Genetic and Pathogenic Diversity. *Phytopathology.* **104**(5): p. 520-531.
- Wroblewski T, Caldwell KS, Piskurewicz U, Cavanaugh KA, Xu H, et al.** (2009). Comparative large-scale analysis of interactions between several crop species and the effector repertoires from multiple pathovars of *Pseudomonas* and *Ralstonia*. *Plant Physiol.* **150**:1733–49
- Wydra, K., Zinsou, V., Jorge, V. and 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.
- Xiang T, Zong N, Zou Y, Wu Y, Zhang J, et al.** (2008) *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol* **18**: 74–80
- Yadeta KA, Thomma BPHJ.** (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front Plant Sci* **4**:97. doi:10.3389/fpls.2013.00097.
- Yang B, Sugio A, White FF.** (2006). Os8N3 is a host disease- susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:10503-10508.
- Yanhua Yu, Jana Streubel, Sandrine Balzergue, Antony Champion, Jens Boch, Ralf Koebnik, Jiaxun Feng, Valérie Verdier, and Boris Szurek.** (2011). *Molecular Plant-Microbe Interactions.* **24**:9, 1102-1113.

- Ye, G., et al.** (2013). Tale-Based Genetic Diversity of Chinese Isolates of the Citrus Canker Pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Disease*. **97**(9):1187-1194.
- Yu, Y., Streubel, J., Balzergue, S., Champion, A., Boch, J., Koebnik, R., et al.** (2011). Colonization of rice leaf blades by an African strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* depends on a new TAL effector that induces the rice nodulin-3 Os11N3 gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **24**:1102–1113.
- Yu, Y.-H., et al.** (2015). Rapid and efficient genome-wide characterization of *Xanthomonas* TAL effector genes. *Scientific Reports*. **5**:13162.
- Zárate C.** (2015). Diversity of TALE content in *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strains is a valuable tool to improve target gene searching methodologies. Tesis de maestría. U. Andes. Bogotá. Colombia.
- Zhong Wang, M Gerstein, M Snyder.** (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**: 57-63. 10.1038/nrg2484
- Zhou, J., Peng, Z., Long, J., Sosso, D., Liu, B., Eom, J. S., et al.** (2015). Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J*, **82**: 632-643
- Zhu W, Yang B, Wills N. et al.** (1999) The C terminus of AvrXa10 can be replaced by the transcriptional activation domain of VP16 from the the herpes simplex virus. *Plant Cell* **11**:1665–1674
- Zinsou, A.V.** (2003). Studies on host plant resistance to cassava bacterial blight in combination with cultural control measures in ecozones of West Africa. Doctoral thesis. University of Hannover. Germany.