



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Identificación y validación de genes
ejecutores en yuca blancos de TALEs de la
bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv.
*manihotis***

Edilene Ramírez Vargas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2019

**Identificación y validación de genes
ejecutores en yuca blancos de TALEs de la
bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv.
*manihotis***

Edilene Ramírez Vargas

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Doctora en Ciencias Biología

Director (a):
Ph.D. Camilo Ernesto López Carrascal
Codirector (a):
Ph.D. Boris Szurek

Línea de Investigación:
Fitopatología Molecular
Grupo de Investigación:
Manihot Biotec

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2019

*A mis padres, a mis hijos Dylan y Thiago que
dan sentido a mi vida y que siempre están y estarán
en mi corazón*

Agradecimientos

A ese **Dios** que todos en el fondo sabemos que existe sin importar la religión, por sus múltiples bendiciones.

A mi **familia**, en especial a mis padres por todos sus esfuerzos por brindarme lo mejor de sí, por su apoyo incondicional durante todas las etapas de mi vida, por la humildad con la que fui criada, porque gracias a estas condiciones valoro cada meta alcanzada. Mis padres y la gran mayoría de mi entorno familiar no son profesionales, pero este aspecto me ha motivado más a esforzarme y mejorar las condiciones de vida de ellos y de mis próximas generaciones.

A mis **hijos Dylan y Thiago**, porque son mi motor para levantarme todos los días y sacar adelante mis sueños y proyectos.

A mi pareja **Mayer Rojas** porque cree en mí y me apoya en mis sueños.

A **Camilo López** por su inmensa paciencia y preocupación durante esta etapa doctoral. Por sus enseñanzas, consejos, risas y llantos que compartimos. Te agradezco por confiar y creer en mí. Me siento muy afortunada por haber contado con tu dirección y haber sido parte de su grupo de investigación.

A **Boris Szurek**, por su hospitalidad y generosidad, por su apoyo en el desarrollo de mi proyecto, mis estancias en Francia y los congresos. Ya que han sido de las mejores etapas de mi vida.

A mi segundo hogar la **Universidad Nacional de Colombia**, por ser testigo del crecimiento académico e investigativo y por el apoyo económico en la asistencia a congresos nacionales e internacionales. Porque gracias a ella he alcanzado mis metas

profesionales.

Al **programa de becas doctorales de Colciencias** convocatoria 647 por financiar mis estudios.

A **Agropolis Foundation grant PAIX (#1403-073), Ecos North, Vicerrectoria de investigación y Colciencias** por su financiación para la ejecución de este proyecto.

A todos los miembros del Grupo **Manihot Biotec** que han compartido mi estancia doctoral. Paola, Rubén, Paula, Lina, Maria Alejandra (la primera estudiante a la cual le dirigí un proyecto), Mauricio, Catalina, Daniela (te aprecio mucho), Jose Daniel, Danilo, Adrian, Juan Sebastian (por las largas charlas en el laboratorio, mi pana), Andrea, Yoyo, Marcel. Tengo un bonito recuerdo de cada uno de ustedes. Gracias por las risas y los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

Al grupo **GTIPP del instituto IRD** en Montpellier Francia, en especial a Valerie, Sandrine, Florence, Sebastian Cunnac, Hamidou, Carolina Flores, Juan, Emilie, Marion por su hospitalidad, su acogida, por ayudarme a adaptar y apoyarme en algún aspecto de mi proyecto.

A **Leidy Rache** por los viajes, las risas y el apoyo psicologico en nuestros proyectos.

A **German Bedoya** por su ayuda en los últimos experimentos de la tesis, por su apoyo en el trabajo relacionado con el invernadero.

A **Adriana Bernal** por su asesoría en el desarrollo del proyecto.

A **Carlos Zarate** por su asesoría, por sus enseñanzas y por los buenos momentos que compartimos en Francia

A mis amigos del colegio **Liliana, Carito, Angie, Ruben y Victor**, porque siempre están han estado muy pendientes de mis avances en este proyecto.

A mis amigos de la universidad **Jimmy, Miyer, Sara y Andres** porque compartieron una de mis mejores etapas de la vida durante nuestra carrera, porque compartimos este amor por la ciencia y porque aún nos reunimos a recordar viejos tiempos.

A **Mayra Quintero** por ser incondicional mi mejor amiga, confidente, consejera. No tengo palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí.

A todas las personas que directa o indirectamente tuvieron que ver con este trabajo... mil y un **GRACIAS**

Resumen

La bacteriosis vascular generada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), es una de las principales enfermedades en yuca. La búsqueda de nuevas fuentes de resistencia hacia esta, ha conducido al uso del mecanismo de acción de los: Transcription Activator like effectors (TALEs) presentes en *Xpm*. Los TALEs son efectores de la bacteria que poseen actividad transcripcional, induciendo genes de resistencia (E) en la planta. La investigación actual explotó este mecanismo para la búsqueda de genes E candidatos en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Para alcanzar este objetivo, fue necesario evaluar algunos sistemas de liberación, determinar un fenotipo de resistencia por parte de algún TALE y optimizar la metodología para el estudio de este patosistema. Los resultados obtenidos permitieron, identificar la infiltración como método para la inoculación bacteriana en yuca, seleccionar *Xpm* como sistema para la liberación de los TALEs y determinar las condiciones más adecuadas para la evaluación del crecimiento bacteriano y del índice de progreso de la enfermedad, tanto en plantas adultas como en plantas crecidas *in vitro*. Adicionalmente, la búsqueda de fuentes de resistencia condujo a un análisis transcripcional en plantas inoculadas con *Xpm*318 y *Xpm*681, las cuales generan una respuesta de susceptibilidad (S) y de resistencia (R) en la variedad MBRA685. Los resultados permitieron concluir que la respuesta de resistencia, se caracteriza por la activación de una mayor cantidad de genes con altos niveles en su expresión. Finalmente, el uso de los parámetros optimizados anteriormente, propició la búsqueda de genes ejecutores. El efecto de las inoculaciones de TALEs en yuca, favoreció la identificación de una respuesta hipersensible (HR) en plantas inoculadas con el TAL15, los genes ejecutores candidatos fueron buscados mediante un experimento de RNAseq y validados mediante qRT-PCR. Los resultados revelan que los genes *Manes.11G030700*, *Manes.08G002700* y *Manes.07G050200* son potenciales candidatos ejecutores de la respuesta de resistencia de la planta.

X Identificación y validación de genes ejecutores en yuca blancos de TALEs de la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

Palabras clave: bacteriosis vascular, yuca, *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, TALEs, gen ejecutor, RNAseq, respuesta hipersensible.

Abstract

Cassava bacterial blight generated by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), is one of the main diseases in cassava. The search for new sources of resistance to it has led to the use of the mechanism of action of: Transcription Activator like effectors (TALEs) present in *Xpm*. TALEs are effectors of the bacteria that possess transcriptional activity, inducing resistance genes (E) in the plant. Current research exploited this mechanism for the search for candidate E genes in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). To achieve this objective, it was necessary to evaluate some release systems, determine a resistance phenotype by some TALE and optimize the methodology for the study of this patosystem. The results obtained allowed us to identify infiltration as a method for bacterial inoculation in cassava, select *Xpm* as a system for the release of TALEs and determine the most appropriate conditions for the evaluation of bacterial growth and the rate of disease progress, both in adult plants as in plants grown *in vitro*. Additionally, the search for sources of resistance led to a transcriptional analysis in plants inoculated with Xpm318 and Xpm681, which generate a susceptibility response (S) and resistance (R) in the MBRA685 variety. The results allowed us to conclude that the resistance response is characterized by the activation of a greater number of genes with high levels of expression. Finally, the use of the parameters optimized above, led to the search of executor R genes. The effect of the inoculations of TALEs in cassava, favored the identification of a hypersensitive response (HR) in plants inoculated with TAL15, the executor R genes candidates were searched by means of an RNAseq experiment and validated by qRT-PCR. The results reveal that the genes Manes.11G030700, Manes.08G002700 and Manes.07G050200 are potential executor R genes candidates in cassava.

Keywords: bacterial blight, cassava, *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, TALEs, executor gen, RNAseq, hypersensitive response.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas	XVII
Lista de abreviaturas.....	XVIII
Introducción	1
Capítulo 1. Marco teórico.....	7
1.1 Inmunidad en planta.....	7
1.2 Efectores bacterianos.....	12
1.2.1 TALEs	13
1.2.1.1 Funciones biológicas de los TALEs	16
1.3 Modelo Experimental: <i>Manihot esculenta</i> Crantz - <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	26
1.3.1 Generalidades de la yuca	26
1.3.1 <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i> (<i>Xpm</i>)	29
Capítulo 2. Liberación de TALEs.....	37
2.1 Liberación de TALEs para el estudio de su función al interior de la célula vegetal.....	39
2.1.1 Introducción.....	39
2.1.2 Materiales y métodos	45
2.1.3 Resultados	47
2.1.4 Discusión.....	60
2.2 Factores que afectan la expresión transitoria del gen <i>GUS</i> en yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	65
2.2.1 Introducción.....	65
2.2.2 Materiales y métodos	66
2.2.3 Resultados	69
2.2.4. Discusión.....	75
2.3 Determinación de la virulencia de <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i> mediante cuantificación de crecimiento bacteriano y seguimiento de síntomas en estacas y plantas crecidas <i>in vitro</i>	78
2.3.1 Introducción.....	78
2.3.2 Materiales y métodos	82

2.3.3 Resultados	87
2.3.4 Discusión	93
Capítulo 3. Resistance and susceptibility to <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i> in cassava: a transcriptomic comparison (or two sides of the same coin)	101
3.1 Introduction	101
3.2 Material and methods.....	103
3.3 Results.....	108
3.3.2. A large number of differentially expressed genes is induced during Cassava resistance response to <i>Xpm</i>	109
3.3.3 Differences in R and S responses are quantitative	116
3.4 Discussion	119
Capítulo 4. A candidate cassava Executor (E) gene targeted by TAL15 from <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	125
4.1 Introduction	125
4.2 Material and methods.....	128
4.3 Results.....	132
4.3.1 Gain-of-function screening for <i>Xpm</i> TAL effectors with avirulence activity upon infection of multiple cassava varieties	132
4.3.2 TAL15 acts as an avirulence factor in <i>Xpm</i>	135
4.3.3 Mutation of the NLS or the AAD in TAL15 abrogate its ability to suppress CBB symptoms in TMS60444	136
4.3.3 RNA-seq-based search for TAL15 executor gene candidates in TMS60444.....	139
4.4 Discussion	141
4.5 Supporting information	145
Capítulo 5. Discusión general	153
Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas	157
Bibliografía	159

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Estructura de los TALEs	16
Figura 1-2: Funciones biológicas de los TALEs.....	17
Figura 1-3: Blancos de susceptibilidad de los TALEs.....	19
Figura 1-4: Edición de genomas empleando TALENs.....	23
Figura 1-5: Síntomas de la bacteriosis vascular.....	31
Figura 2-1-1: Activación de una respuesta tipo HR en plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>Xanthi</i>	49
Figura 2-1-2: Cepas Xpm150 y Xpm394 utilizadas para evaluar el efecto de los TALEs....	50
Figura 2-1-3: TAL20C activa una respuesta tipo HR en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	51
Figura 2-1-4: Evaluación del efecto de la inoculación de Xe en hojas de yuca de plantas adultas.....	52
Figura 2-1-5: Síntomas generados con Xe cepa 85-10 con y sin el plásmido pHM1.....	53
Figura 2-1-6: Expresión de TALEs en <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	54
Figura 2-1-7: Liberación de TALEs en yuca empleando <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	55
Figura 2-1-8: Síntomas CBB mediante infiltración en hojas de yuca.....	56
Figura 2-1-9: Comparación de los síntomas de CBB utilizando tres cepas de <i>Xpm</i> que varían en el contenido de TALEs.....	57
Figura 2-1-10: Evaluación de la expresión de proteínas tipo TALEs mediante Western blot.....	58
Figura 2-1-11: Liberación de TALEs en yuca utilizando <i>Xpm</i>	59
Figura 2-2-1: Evaluación de la coloración GUS en hojas de yuca inoculadas con <i>A. tumefaciens</i> usando diferentes metodologías.....	70
Figura 2-2-2: Determinación del tiempo y de la cepa de <i>A. tumefaciens</i> óptimos para la detección de la expresión del gen <i>GUS</i> en hojas de yuca.....	71

Figura 2-2-3: Efecto de la introducción del gen <i>VirG</i> en la expresión del gen <i>GUS</i>	73
Figura 2-2-4: Actividad GUS en cinco variedades de yuca inoculadas con la cepa GV3101 transformada con el gen <i>VirG</i>	74
Figura 2-3-1: Inoculación plantas crecidas <i>in vitro</i> y estacas.....	84
Figura 2-3-2: Cuantificación de población bacteriana.....	85
Figura 2-3-3: Inoculación para determinar el AUDPC en plantas crecidas <i>in vitro</i>	86
Figura 2-3-4: Efecto de la concentración de inóculo en el crecimiento bacteriano en plantas crecidas <i>in vitro</i>	88
Figura 2-3-5: Crecimiento bacteriano en plantas crecidas <i>in vitro</i> inoculadas con la cepa Xpm531.....	89
Figura 2-3-6: Efecto de la concentración de inóculo en el crecimiento bacteriano en plantas obtenidas a partir de estacas.....	91
Figura 2-3-7: Crecimiento bacteriano en estacas inoculadas con las cepas Xpm318.....	92
Figura 2-3-8: Síntomas en plantas crecidas <i>in vitro</i>	93
Figure 3-1: Experimental design and workflow of transcriptome analyses.....	107
Figure 3-2: Growth levels for two <i>Xpm</i> strain on the MBRA685 cassava variety.....	109
Figure 3-3: Longitudinal differential gene expression of bacterial blight in cassava.....	111
Figure 3-4: Gene ontology functional analyses of DEGs.....	114
Figure 3-5: Gene expression profile.....	117
Figure 3-6: Log2FC of expression levels of genes regulated in both resistant and susceptible response after <i>Xpm</i> inoculation.....	118
Figure 3-7: qRT-PCR validation of differentially expressed 3 genes related to defense response at 50 h post-inoculation.....	119
Figure 4-1: Screening of <i>Xpm</i> TAL effectors with Avr activity	123
Figure 4-2: TAL15 strongly affects CBB symptoms and reduces <i>Xpm</i> growth <i>in planta</i>	134
Figure 4-3: The NLS1.2 and AAD are required for TAL15 activity.	138
Figure 4-4: Strategy for experimental identification of TAL15 targets.....	140
Figure 4-5: Validation by qRT-PCR of candidates genes activated by TAL15.....	141

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Programas para la predicción de genes blancos de TALEs.....	26
Tabla 2-1-1: Contenido de TALEs en cepas de <i>Xpm</i> y su efecto en la inducción de HR.....	49
Tabla 2-2-1: Detalles de las cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> empleadas	67
Tabla 2-3-1: Descripción de los síntomas y su respectiva escala de valores utilizada para su evaluación en plantas crecidas <i>in vitro</i> inoculadas con <i>Xpm</i>	86
Tabla 2-3-2: AUDPC en plantas crecidas <i>in vitro</i>	93
Table 3-1: qRT-PCR primer sets used in this study and their target genes.....	105
Table 3-2: Area Under Disease Progression Curve (AUDPC) of MBRA685 plants inoculated with two <i>Xpm</i> strains.	108
Table 3-3: Summary of clean reads alignment to the reference genome.....	110
Table 3-4: Top 20 significantly upregulated/downregulated genes in MBRA685 activated with <i>Xpm</i> 681 and <i>Xpm</i> 318.....	112
Table 3-5 BioCyc metabolic pathways enriched by the effect of <i>Xpm</i> 318 and <i>Xpm</i> 681 in cassava plants (top five in each).....	115

Lista de abreviaturas

AAD	Dominio de activación acídica
DAAD	Mutación en el dominio de activación acídica.
AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
DNLS1	Mutación en la señal de localización nuclear 1
DNLS2	Mutación en la señal de localización nuclear 2
DNLS1.2	Mutación en la señal de localización nuclear 1 y 2
artTALE	TALEs artificiales
AUDPC	Under Disease Progress Curve
BAK1	BRI1-Associated Kinase1)
BSR	Residuo de especificidad hacia la base
CBB	Cassava Bacterial Blight
CC	Coiled-Coil
CBSD	Cassava brown streak disease
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CMD	Cassava mosaic disease
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DEGs	Differentially expressed genes
DSB	ADN de doble cadena roto
E	Gen ejecutor
EBE	Elemento de unión del efector
ECZ	Zonas edafoclimáticas

EF-Tu	Factor de elongación
EGF	Epidermal Growth Factor
ET	Ethylene
ETI	Inmunidad activada por efectores
ETI	Effector-Triggered Immunity
ETS	EffectorTriggered Susceptibility
FLS2	Flagellin-Sensitive2
FPKM	Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Millions base pairs sequenced
GTF	General Transcription Factor
HE+IN	Herida más aplicación del inóculo
HE+VA	Herida más vacío
HLR	Hypersensitive like-response
HR	Respuesta hipersensible
IITA	International Institute for Tropical Agriculture
IF	Infiltración
JA	Jasmonate
JA	Ácido jasmónico
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LRR	Repeticiones ricas en leucina
LRR-RK	Receptores tipo quinasa que contienen repeticiones ricas en leucina
LRR	Leucine-Rich Repeat
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase),
MLVAs	Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis
MS	Murashige and Skoog
NBS	Sitios de unión a nucleótidos
NLR	Nucleotide-binding Leucine-rich repeat Receptor
NLS	Nuclear Localization Signal

NPR1	NON-EXPRESSER OF PR GENES 1
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns ó
PAL	Fenil amonio liasa
PR	Proteína relacionada con la patogénesis
PRRs	Pattern-Recognition Receptors
PTI	Inmunidad activada por PAMPs
PTIPAMP	Triggered Immunity)
PVDF	Polyvinylidene fluoride
PWM	Position Weight Matrix
QR	Quantitative resistance
qRT-	Transcripción Reversa cuantitativa por PCR en tiempo real
QTLs	Loci de caracteres cuantitativos
R	Gen de resistencia
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RLCK	Receptor-Like Cytoplasmic Kinases)
RLK	Receptor tipo quinasa
RLKs	receptor-like kinases)
RLP	Receptor tipo proteína
RNAseq	Secuenciación de RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPKM	Reads Per kilobase of Transcript Per Million Mapped Reads
RVD	Diresiduos de variable repetición
S	Gen de susceptibilidad
SA	Salicylic acid
SAR	Systemic Acquired Resistance
SEM	Standard Error of the Mean

T3Es	Efectores inyectados mediante un sistema de secreción tipo tres
TALEs	Efectores similares a activadores transcripcionales
TALENs	Transcription activator-like effector nucleases
TF	Transcription Factor
TIR	Toll-Interleukin-1 Receptor
T3SS	Type III secretion system
T3Es	Type III Secreted Effectors
TTSS	Sistema de secreción tipo tres
VA	Vacío
XCV	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Xoo	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
Xoc	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>
Xe	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
ZFN	Endonucleasas dedos de zinc

Introducción

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un alimento básico, fuente de carbohidratos y rico en almidón, el cual es cultivado en zonas tropicales y subtropicales. Este alimento es consumido por más 500 millones de personas alrededor del mundo. Las raíces de la yuca aportan un mayor contenido energético por hectárea, frente a otros cultivos consumidos por el ser humano como son el maíz, la papa y el arroz (Montagnac et al. 2009). La producción mundial de yuca a nivel mundial se estimó en alrededor de 277 millones de toneladas para el año 2018 (FAO 2018). La yuca es un cultivo de gran importancia económica, ya que también se puede utilizar para la alimentación animal y porque a partir de sus raíces es posible obtener productos y subproductos como almidón y bioetanol (Rosenthal & Ort 2011; FAO 2018).

La producción de yuca puede ser afectada por diferentes causas bióticas y abióticas. Dentro de los limitantes bióticos más importantes se encuentra la bacteriosis vascular generada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, bacteria renombrada como *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*) la cual es capaz de infectar a la mayoría de los miembros del género *Manihot* (Plantwise Technical Factsheets, CABI Agosto, 2018). Esta enfermedad se ha reportado en todas las regiones donde se cultiva yuca. El control de la bacteriosis vascular a través del uso de químicos no arroja los mejores resultados para reducir la incidencia de la enfermedad, además de ser un tratamiento costoso. Es por esta razón que una alternativa es la identificación de genes de resistencia para poder transferirlos a variedades comerciales mediante fitomejoramiento ó biotecnología.

La ausencia de respuesta hipersensible (HR del inglés *Hypersensitive Response*) en yuca (Verdier 2002) y la diferencia en la intensidad de reacción entre cultivares resistentes y susceptibles muestran que la resistencia hacia la bacteriosis vascular es de tipo cuantitativo (Lopez et al. 2005). En los últimos años han sido varias las estrategias empleadas con el objetivo de identificar genes de resistencia hacia diferentes cepas de

Xpm (Jorge et al. 2000; Jorge et al. 2001; Soto Sedano et al. 2017; Díaz Tatis et al. 2018). Dentro de los estudios más importantes cabe destacar el mapeo de QTL asociados a la resistencia (Jorge et al. 2000; Jorge et al. 2001; Wydra et al. 2004; Soto Sedano et al. 2017; Tappiban et al. 2018), la identificación y validación funcional de genes candidatos (Lopez et al. 2003; Díaz Tatis et al. 2018) y el análisis del transcriptoma en respuesta a la infección con *Xpm* (Lopez et al. 2004; Lopez et al. 2005; Muñoz-Bodnar et al. 2014; Cohn et al. 2014; Mora 2017).

Uno de los mecanismos que emplea *Xanthomonas* para causar la enfermedad es la inyección de proteínas efectoras, hacia el interior de la célula del hospedero mediante el sistema de secreción tipo tres (TTSS) (Diepold & Armitage 2015). Entre las proteínas efectoras se encuentra una familia denominada efectores similares a activadores transcripcionales ó TALEs (del inglés *Transcription Activator-Like Effectors*). Los TALEs se caracterizan por contener dominios en las regiones N y C terminal, que permiten su translocación al interior de la planta. El N-terminal contienen una señal de secreción y translocación bacteriana, mientras que el C-terminal contiene señales para su importación hacia el núcleo (NLS del inglés *Nuclear Localization Signal*) y además un dominio de activación ácido (AAD del inglés *Acidic Activation Domain*) (Boch et al. 2009; Boch & Bonas 2010). La región central de la proteína determina la unión a una secuencia específica de ADN la región promotora de un gen propio del hospedero conocida como elemento de unión al efector (EBE del inglés *Effector Binding Element*) (Moscou & Bogdanove 2009). La región central posee un número variable de dominios repetidos en tándem de 34 aminoácidos cada uno, cuyas posiciones 12 y 13 son polimórficas y se conocen como díresiduos de repetición variable (RVDs del inglés *Repeat-Variable Di-residues*) (Jankele & Svoboda 2014a). Los RVDs determinan la unión específica de un determinado TALE a una región promotora de genes para activar la transcripción (Moscou & Bogdanove 2009). De esta forma, cuando el gen blanco inducido por un TALE favorece el crecimiento bacteriano es denominado gen de susceptibilidad (S) porque promueve la infección del patógeno y aumenta los síntomas de la enfermedad del hospedero. Alternativamente, en el caso de plantas resistentes, los TALEs pueden inducir la expresión de genes de la planta que contribuyen a la activación de la inmunidad vegetal impidiendo la colonización del tejido vegetal por parte del microorganismo. Estos genes han sido denominados ejecutores de resistencia (E) (Zhang et al. 2015).

La identificación de genes *S* ha sido posible gracias al empleo de diferentes aproximaciones transcriptómicas. Los genes *S* activados por los TALEs identificados hasta el momento, incluyen transportadores de azúcar de la familia SWEET/MtN3 (Chen 2014), un posible transportador de sulfato de arroz OsSULTR3,6 (Cernadas et al. 2014) y ciertos factores de transcripción cuya inducción provoca hipertrofia (Kay et al. 2007) ó hiperplasia de las células vegetales (Brunings & Gabriel 2003; Hu et al. 2014).

El primer gen de resistencia tipo ejecutor identificado fue el gen de arroz *Xa27*, cuya activación se da por la unión del TALE AvrXa27 de *X. oryzae* pv. *oryzae* (Gu et al. 2005). Otro ejemplo es el gen *Bs3* aislado en pimentón, el cual es inducido por el TALE AvrBs3 de *X. euvesicatoria* (Römer et al. 2007). Tanto la expresión de *Xa27* y *Bs3* resulta en una HR en el hospedero, sin embargo, su mecanismo de acción es desconocido. El gen *Bs3* es además inducido por AvrHah1, un TALE de *X. gardneri* (Schornack et al. 2008). A pesar de que AvrBs3 y AvrHah1 poseen estructuras diferentes, el código de reconocimiento de secuencias de ADN es idéntico. De esta forma el gen *Bs3* confiere resistencia en plantas de pimentón a cepas de *X. euvesicatoria* y *X. gardneri* que porten dichos efectores (Schornack et al. 2008).

El conocimiento de la diversidad y dinámica de las poblaciones de *Xpm* es un parámetro importante para obtener información acerca de los TALEs. En Colombia, las poblaciones de *Xpm* han sido estudiadas en diferentes zonas edafoclimáticas (ECZ del inglés *Edaphoclimatic Zones*) (Restrepo et al. 2004). Los resultados revelaron una alta diversidad del patógeno principalmente en 2 de las 10 ECZs estudiadas (Restrepo et al. 2004; Restrepo & Verdier 1997; Trujillo et al. 2014). El análisis de secuencias de 65 cepas de *Xpm* evidenció un contenido de entre 18 y 25 efectores incluidos los TALEs (Bart et al. 2012). Algunos de estos efectores como el homólogo de AvrBs2, XopR y XopAO1 son capaces de suprimir la inmunidad basal, mientras que otros como XopE4 y XopAO1 inhiben la inmunidad de tipo ETI (del inglés *Effector Trigger Immunity*) (Medina et al. 2018).

El primer TALE de *Xpm* identificado fue denominado TALE1_{xpm} y su función en yuca es contribuir al crecimiento bacteriano y al desarrollo de los síntomas de la bacteriosis vascular (Castiblanco et al. 2013). Uno de sus blancos relevantes para susceptibilidad es el factor de transcripción de choque térmico (*HSTF*, del inglés *Heat Shock Transcription*

Factor) (Muñoz-Bodnar et al. 2014). Otros TALEs que contribuyen al crecimiento bacteriano son TAL20Xpm668 y TAL14Xpm668. De igual manera, sus perfiles de expresión en planta mostraron la activación de múltiples genes blancos por parte del TAL14Xpm668 mientras que el TAL20Xpm668 activa el gen transportador de azúcar *MeSWEET10a*, (Cohn et al. 2014). A pesar de diferir en un solo RVD, el TAL14CIO151 presente en la cepa CIO151 es capaz de complementar al mutante de TAL14Xpm668, indicando genes blancos compartidos importantes para la colonización del hospedero y desarrollo de los síntomas de bacteriosis (Cohn, Morbitzer, et al. 2015).

Estudios para determinar el contenido de TALEs (TALoma) en cepas de *Xpm*, demostraron un contenido natural de 2 a 5 TALEs, con RVDs de 13, 14, 15, 20, 21 y 22 (Bart et al. 2012; Zarate 2015). La agresividad de la bacteria se incrementa si posee TALEs con 20 y 22 RVDs (Zarate 2015). Las predicciones bioinformáticas de los EBEs de estos TALEs cuyas secuencias de RVDs son diferentes, revelaron que los genes blancos son virtualmente los mismos y pueden ser organizados en grupos (Zarate, 2015). Estudios transcriptómicos de las cepas Xpm681, Xpm1061, Xpm394 y Xpm395 en plantas de una variedad susceptible, permitieron identificar los genes más inducidos blancos de los TALEs presentes en cada una de las cepas inoculadas (Mora 2017).

A pesar del conocimiento generado sobre los TALEs presentes en *Xpm*, es necesario dirigir esfuerzos hacia el estudio de nuevas fuentes de resistencia a través del uso de TALEs. En consecuencia, el objetivo de este proyecto está enmarcado en la optimización de metodologías necesarias para el estudio del patosistema yuca-*Xpm*, aspectos indispensables para lograr identificar genes ejecutores en yuca blancos de TALEs.

El documento actual consta de cinco capítulos. El primer capítulo corresponde a una revisión bibliográfica del estado actual del tema, comenzando con aspectos conceptuales de las interacciones planta-patógeno, seguido de los mecanismos que utilizan las bacterias para colonizar una planta, los TALEs y las características generales de la yuca. En el segundo capítulo se describen algunas estrategias para liberar TALEs utilizando *Agrobacterium tumefaciens* y *Xanthomonas euvesicatoria* en yuca ó *Xpm* en tabaco y yuca. Este capítulo finaliza con la estandarización del crecimiento bacteriano en plantas crecidas *in vitro* y en estacas, junto con la evaluación de AUDPC en plantas crecidas *in*

in vitro, metodologías utilizadas en los siguientes capítulos para la búsqueda de fuentes de resistencia en yuca.

Las diferencias a nivel transcripcional entre una respuesta de resistencia *R* y una de susceptibilidad *S*, se evaluaron en el tercer capítulo mediante un experimento de RNAseq utilizando una sola variedad de yuca. Mientras que, la identificación de los genes ejecutores candidatos se abordó en el cuarto capítulo. La búsqueda de genes ejecutores involucró varios pasos *i)* evaluación del efecto de varios TALEs en yuca, *ii)* selección de un único TALE por su capacidad para reducir los síntomas de la bacteriosis vascular, *iii)* elaboración de dos mutantes del TALE candidato para corroborar su actividad como activador transcripcional, *iv)* obtención de un perfil transcripcional mediante RNAseq y *v)* la validación de los candidatos por qRT-PCR. Finalmente, se discuten algunos aspectos generales del trabajo, así como las perspectivas para futuros proyectos.

Capítulo 1

“No deseo que las mujeres tengan más poder que los hombres, sino que tengan más poder sobre sí mismas”.

Mary Shelley

Capítulo 1. Marco teórico

1.1 Inmunidad en planta

En la naturaleza, las plantas coexisten con diversos microrganismos. Como consecuencia de esta interacción, las plantas han evolucionado su propio mecanismo de defensa con el objetivo de detectar y limitar aquellos patógenos potenciales (Jones & Dangl 2006). A pesar de que este mecanismo carece de células especializadas y de un sistema inmune adaptado comparado al de los animales, cada célula de la planta es capaz de contener el avance del patógeno (Jones & Dangl 2006; Boller & Felix 2009; Spoel & Dong 2012; Cook et al. 2014). Los mecanismos de defensa en planta pueden ser clasificados como constitutivos e inducibles. Los mecanismos constitutivos se pueden dividir en *i*) estructurales, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula o la deposición de calosa y *ii*) químicos, tales como la acumulación de compuestos tóxicos (Underwood 2012; Maag et al. 2015). Por otro lado, la resistencia inducida requiere la acción de sistemas de reconocimiento específico, los cuales activan posteriormente cambios en el metabolismo (Yu et al. 2017).

La resistencia inducida involucra dos líneas de defensa. En la primera línea el patógeno es reconocido a través de receptores específicos PRRs (del inglés *Pattern-Recognition Receptors*), los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos o microorganismos (MAMPs del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns* ó PAMPs del inglés *Microbial-Associated Molecular Patterns*) (Boller & Felix 2009). Mientras que, el segundo nivel de defensa utiliza proteínas de resistencia (R) para responder al ataque de los efectores secretados por el patógeno (Upson et al. 2018). La percepción de MAMPs mediada por PRRs activa el primer nivel de defensa denominado PTI (del inglés *PAMP-Triggered Immunity*) (Jones & Dangl 2006; Zipfel 2014). Los PRRs identificados en plantas son receptores tipo quinasas (RLKs del inglés *receptor-like kinases*) ó proteínas tipo receptores (RLPs del inglés *Receptor-Like Proteins*) que no tienen dominio quinasa. Los RLKs se caracterizan por un dominio extracelular encargado de la percepción del

ligando, un dominio transmembranal y un dominio quinasa intracelular (Couto & Zipfel 2016; Zipfel & Oldroyd 2017). El dominio extracelular de los PRRs es altamente variable y puede contener repeticiones ricas en leucina (LRR del inglés *Leucine-Rich Repeat*), motivos de lisina (LysM), dominios de lectina ó dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF del inglés *Epidermal Growth Factor*) y de esta forma reconocer un amplio rango de ligandos (Yu et al. 2017). La secuencia de eventos activados durante la PTI resultado del reconocimiento por PRRs involucran cambios en los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} , flujo de cationes y aniones, alcalinización extraceular, activación de cascadas mediadas por MAPK (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase*), producción de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés *Reactive Oxygen Species*) como ánion superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y óxido nítrico, deposición de calosa para reforzar la pared celular, cierre de estomas para prevenir la entrada de patógenos, y alteración de la expresión de genes relacionados con la patogénesis (PR del inglés *Pathogenesis-Related*) (Couto & Zipfel 2016; Yu et al. 2017) entre otros.

Entre los PRRs mejor caracterizados se encuentran FLS2 y EFR, los cuales corresponden al receptor de la flagelina bacteriana y al receptor del factor de elongación Tu (EF-Tu). Tanto FLS2 como EFR pertenecen a la familia de receptores tipo quinasa que contienen repeticiones ricas en leucina (LRR-RK) en *Arabidopsis* (Bigeard et al., 2015). Los PRRs de tipo RLK, PEPR1 y PEPR2 en *Arabidopsis* (Krol et al. 2010) son capaces de reconocer Pep1, el cual es un péptido endógeno con función elicitora, considerado como un patrón molecular asociado a daño (DAMPs del inglés *Damage Associated Molecular Patterns*). En *Arabidopsis* se han caracterizado receptores del tipo LysM-RLPs y LysM-RLKs. Estos receptores contienen dominios LysM y se encargan de reconocer la quitina, uno de los mayores componentes de la pared celular de los hongos (Boller & Felix 2009). CERK1 es un receptor LysM-RLK encargado del reconocimiento directo de quitina en *Arabidopsis* (Miya et al. 2007). Los receptores LysM-RLKs LYK4 y LYK5 se asocian a CERK1, median su homodimerización y fosforilación en respuesta a quitina (Wan et al. 2012; Cao et al. 2014). Mientras que, los receptores LysM-RLPs LYM1 y LYM3 reconocen peptidoglicanos mediante su unión a CERK1 (Willmann et al. 2011). CeBiP el receptor homólogo de CERK1 en arroz, carece del dominio quinasa y se une únicamente a quitina (Kaku et al. 2006). Algunos RLPs que se han estudiado hasta el momento en *Arabidopsis* son: ReMAX y RLP30. ReMAX percibe un MAMP de naturaleza proteica aún desconocida denominado eMAX presente en bacterias del género

Xanthomonas (Jehle et al. 2013) y RLP30 reconoce un MAMP (SCFE1) presente en el patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Zhang et al. 2013). Por otro lado el receptor tipo RLP de tomate LeEIX1/2 percibe una xilanasa que induce la biosíntesis de etileno (Ranganathan 2018).

Durante el proceso co-evolutivo algunas bacterias, virus y patógenos filamentosos, han buscado nuevas formas de adaptación a la planta. Aquellos patógenos adaptados han optado por el uso de proteínas efectoras para suprimir la PTI (Jones & Dangl 2006). Los blancos de las proteínas efectoras se conocen como proteínas de susceptibilidad (S), porque su activación promueve el proceso de infección, el desarrollo de la enfermedad y la activación una de la rama de la inmunidad en planta conocida como ETS (del inglés *Effector-Triggered Susceptibility*) (Jones & Dangl 2006). Funcionalmente, las proteínas S están involucradas en diferentes estados del proceso de infección como *i*) el establecimiento del patógeno antes de su ingreso, *ii*) la modulación de la defensa de la planta y *iii*) el mantenimiento del patógeno en el interior de esta (Van Schie & Takken 2014).

Una de las estrategias utilizada por las bacterias para evadir el reconocimiento, consiste en modificar sus PAMPs entre especies ó patovares de la misma especie (Gómez-gómez & Boller 2002). Un solo polimorfismo en flg22 de *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) y *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) desactiva el reconocimiento mediado por el receptor FLS2 en *Arabidopsis* y arroz (Sun et al. 2013; Wang et al. 2015). En el patosistema *Xoo*-arroz, las cepas deficientes en el PAMP RaxX ó que contienen una mutación en este efector evaden la PTI mediada por Xa21 (Pruitt et al. 2015). La glicosilación de la flagelina es otra estrategia para enmascarar el reconocimiento de la planta (Hirai et al. 2011). Además de interferir en el reconocimiento mediado por los PRR, los efectores también pueden modificar las proteínas S dentro de la planta. El patógeno fúngico *Botrytis cinerea* utiliza pequeños RNA no codificantes (sRNA del inglés *small RNAs*) como efectores, para silenciar genes de inmunidad BC-DCL en *Arabidopsis* y tomate, los sRNA son transcolados a la célula huésped usando vesículas extracelulares (Wang et al. 2017). Mientras que, el efector AvrAc de *X. campestris* pv. *campestris* inhibe la PTI mediante modificaciones en el sitio de fosforilación. Este efector posee actividad uridiltransferasa la cual genera disminución en la actividad quinasa de varios RLCK (del inglés *Receptor-Like Cytoplasmic Kinases*)

incluyendo BIK1 y RIPK, receptores importantes para iniciar la cascada de señalización que activa la inmunidad en planta (Feng et al. 2012).

Para contrarrestar las estrategias de infección del patógeno, la planta utiliza proteínas de resistencia (*R*). Estas proteínas median el reconocimiento del efector de manera directa ó mediante la percepción de modificaciones realizadas en moléculas del hospedero. Si el reconocimiento es efectivo el segundo nivel de defensa es activado, obteniendo como resultado la inmunidad activada por efectores (ETI del inglés *Effector-Triggered Immunity*) (Kourelis & van der Hoorn 2018). La ETI usualmente induce una muerte celular en el sitio de infección, conocida como respuesta hipersensible (HR del inglés *Hypersensitive Response*) (Lam et al. 2001). La HR ocurre localmente de manera rápida para prevenir el crecimiento y propagación de patógenos o insectos cuyo ciclo de vida depende de células vivas de la planta (Chisholm et al. 2006; Jones & Dangl 2006).

La mayoría de las proteínas *R* involucradas en la activación de la ETI pertenecen a la familia NLR (del inglés *Nucleotide-binding Leucine-rich repeat Receptor*) (Collier et al. 2011). Las NLR poseen un dominio N-terminal variable, un dominio central de unión a nucleótidos (NBS del inglés *Nucleotide Binding-site leucine-rich*) y un dominio C-terminal que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR del inglés *Leucine-Rich Repeat*). Basados en la diversidad del dominio N-terminal las proteínas NLR pueden ser clasificadas en proteínas TIR (del inglés *Toll-Interleukin-1 Receptor*) ó CC (del inglés *Coiled-Coil*) (Collier et al. 2011). Recientemente han sido descritos distintas clases de dominios CC y muchas proteínas clasificadas inicialmente como CC-NLRs (CNLs) fueron definidas como RPW8-CC-NLRs (RNL) (Monteiro & Nishimura 2018). La oligomerización de ambos dominios CC y TIR, es un evento crítico para desencadenar la cascada de señalización corriente abajo (Schreiber et al. 2016). El dominio NBS de las NLR media el estado activo ó inactivo de estas proteínas. La unión a ADP promueve la conformación activa, mientras que la unión a ATP el estado inactivo (Mo & Duncan 2014). A pesar de que las proteínas NLR son conocidas por tener un dominio estructural conservado. Existen versiones truncadas que carecen de dominios LRR ó NBS. Tal es el caso de la proteína RBA1 de *Arabidopsis* que contiene únicamente un dominio TIR y es requerida para inducir la muerte celular en respuesta al efector HopBA1 (Monteiro & Nishimura 2018).

Las proteínas NLR actúan como receptores intracelulares ubicados en diferentes compartimientos, con el objetivo de detectar la presencia de los efectores al interior de la célula. Las proteínas NLR reconocen estos efectores a través de unión directa ó indirecta (Chakraborty et al. 2018; Santos et al. 2018). En el modelo directo la proteína NLR actúa como sustrato para la actividad enzimática del efector (Van der Biezen & Jones 1998). Un ejemplo de reconocimiento directo es la unión entre GmGIP1 y PsXEG1, GmGIP1 es una proteína NLR que contribuye a la resistencia en soya por unión directa con el efector PsXEG1 de *Phytophthora sojae* (Ma et al. 2017). En el modelo indirecto, las proteínas NLR interactúan con otras proteínas del hospedero modificadas por el efector (Wu et al. 2015). El reconocimiento indirecto de los efectores mediada por proteínas NLR se propuso por primera vez en 1998, para describir la interacción entre Pto y los efectores de *P. syringae* AvrPto y AvrPtoB, ambos efectores fosforilan a Pto y esta modificación es detectada por la proteína NLR Prf (Van der Biezen & Jones 1998). En escenarios donde las modificaciones realizadas por el efector en planta no representan blancos de virulencia, los blancos del efector se conocen como señuelos (Khan et al. 2016). El papel principal de las proteínas señuelos es detener el avance de patógeno más que participar en la inmunidad. ZED1 es una proteína señuelo de *Arabidopsis* acetilada por el efector de *P. syringae* HopZ1a, la acetilación de ZED1 es reconocida por la proteína NLR ZAR1 (Lewis et al. 2013). El modelo gen guardian es otro modelo de reconocimiento indirecto, en donde las proteínas NLR actúan como guardianes de las proteínas del hospedero que son modificadas por el efector (Khan et al. 2016). RIN4 representa el ejemplo más convincente de una proteína guardián. Múltiples proteínas NLR custodian y detectan las modificaciones realizadas por los efectores a RIN4. RPM1 y RPS2 son dos ejemplos de proteínas NLR encargadas de reconocer las modificaciones de RIN4. RPS2 detecta la degradación de RIN4 realizada por el efector AvrRpt2 (Kim et al. 2005), mientras que RPM1 reconoce la fosforilación de RIN4 efectuada por los efectores AvrB y AvrRpm1 (Chung et al. 2011).

Muchos de los eventos activados durante la PTI son compartidos durante la ETI, aunque todavía no se conoce exactamente cómo convergen estas dos líneas de defensa (Peng et al. 2017). La ETI es usualmente más fuerte y prolongada que la PTI y a menudo activa una HR y una resistencia sistémica adquirida (SAR del inglés *Systemic Acquired Resistance*) en el hospedante. En el caso de la SAR, ésta es una respuesta prolongada, de amplio espectro y sistémica que se activa luego de ocurrir una infección local (Spoel &

Dong 2012). La ETI es producto de una continua coevolución tanto del patógeno como de la planta, durante la cual los patógenos responden con mutaciones en las moléculas efectoras o con el desarrollo de nuevos efectores para evadir la ETI, mientras las plantas desarrollan nuevas proteínas R mediando el reconocimiento de esos nuevos efectores (Jones & Dangl 2006; De Wit 2007). La activación de la ETI mediada por receptores localizados en el núcleo, indica que esta rama de la inmunidad está asociada directamente con la regulación transcripcional de genes (Peng et al. 2017). A pesar de que la PTI y ETI se diferencian en magnitud y tiempo de respuesta, los eventos moleculares desencadenados después de la percepción del patógeno son muy similares (Wu et al. 2017).

1.2 Efectores bacterianos

Durante el proceso de infección, muchas bacterias gram negativas permanecen en el espacio extracelular y liberan proteínas efectoras dentro de la célula de la planta a través de un sistema de secreción tipo tres (T3SS del inglés *Type III Secretion System*) (Diepold & Armitage 2015; Deng et al. 2017). El T3SS involucra un complejo de proteínas que se expande desde el interior de la célula bacteriana hasta el interior de la célula hospedera atravesando las membranas bacterianas y la pared celular de la planta. Los componentes estructurales están codificados por un clúster de genes de patogenicidad conocido como *hrp* (Diepold & Armitage 2015; Deng et al. 2017). Dentro de la célula de la planta las proteínas efectoras inyectadas mediante este sistema de secreción tipo tres (T3Es), realizan modificaciones cuya clasificación dependerá del tipo de modificación, de su localización en la célula hospedera o del tipo de actividad biológica que presenta (Büttner 2016). Por ejemplo, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, secreta cerca de 30 efectores dentro de la célula hospedera los cuales impactan sobre distintos procesos biológicos importantes que ocurren en varios organelos al interior de la planta (Xin & He 2013). La membrana celular de la planta es uno de los primeros blancos de los efectores, ya que de esta forma suprimen la señalización seguida de la percepción. AvrPto y AvrPtoB interactúan con los receptores FLS2 (del inglés Flagellin-Sensitive2) y BAK1 (de inglés BRI1-Associated Kinase1) suprimiendo la cascada de señalización en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) y de *Arabidopsis* (Xiao et al. 2007; Xiang et al. 2008). El cloroplasto es un organelo atractivo para los efectores, porque es el centro de producción de hormonas relacionadas con la defensa y moléculas antimicrobianas. Tal

es el caso de, HopI1 un efector que se dirige al cloroplasto de la planta y secuestra la chaperona HSP70, suprimiendo la acumulación de ácido salicílico y generando un cambio en la estructura del tilacoide (Jelenska et al. 2010). Las MAPKs son otro blanco común de los efectores con actividad fosfatasa, metil-transferasa, acetiltransferasa y proteasa (Su et al. 2018). HopF2 bloquea la activación de MKK5 a través de su actividad ADP-ribosiltransferasa (Wang et al. 2010). Mientras que, HopAI1 inactiva las cascadas de señalización mediadas por MPK4 y MPK3/MPK6 a través de su actividad fosfatasa (Zhang et al. 2012). HopM1 y HopW1 también son efectores de *P. syringae* que poseen una característica distinta al resto de los efectores, ya que sus proteínas dianas están ubicadas en diferentes organelos celulares como la membrana, cloroplasto y citosol (Nomura et al. 2006; Lee et al. 2008; Kang et al. 2014; Lozano-durán et al. 2014; Üstün et al. 2016).

Los efectores bacterianos son dirigidos a diferentes compartimientos subcelulares donde son capaces de manipular diversas funciones y componentes tanto de la PTI como de la ETI (M. Khan et al. 2018). En general, los efectores bacterianos afectan en un 40% las proteínas del hospedero ubicadas en la membrana, en un 30% las del núcleo y en un 24% las proteínas citoplasmáticas. Otros organelos como cloroplastos, mitocondria, peroxisoma y retículo endoplásmico son afectados en menor porcentaje (M. Khan et al. 2018). Dentro de las especies bacterianas existen diferencias en la localización subcelular de las proteínas diana, *P. syringae* interactúa en un 52% con proteínas de membrana, *Xanthomonas* sp. en un 45% con proteínas del núcleo mientras que *Ralstonia solanacearum* afecta en un 50% proteínas citoplasmáticas y en un 36% las del núcleo (M. Khan et al. 2018).

1.2.1 TALEs

Existe una clase particular de proteínas efectoras, responsable de la activación del 45% de las proteínas diana del huésped en el núcleo. Estos efectores pertenecen al género *Xanthomonas* y son denominadas proteínas similares a activadores transcripcionales (TALEs del inglés *Transcriptional Activator Like Effector*) (Boch & Bonas 2010). Los TALEs utilizan la maquinaria transcripcional del hospedero para regular la expresión de los genes de la planta (Boch et al., 2014). En *Ralstonia solanacearum* y *Burkholderia rhizoxinica* se encuentran proteínas homólogas a los TALEs, sin embargo sus blancos aún no han sido identificados (Schandry et al. 2016; de Lange et al. 2014).

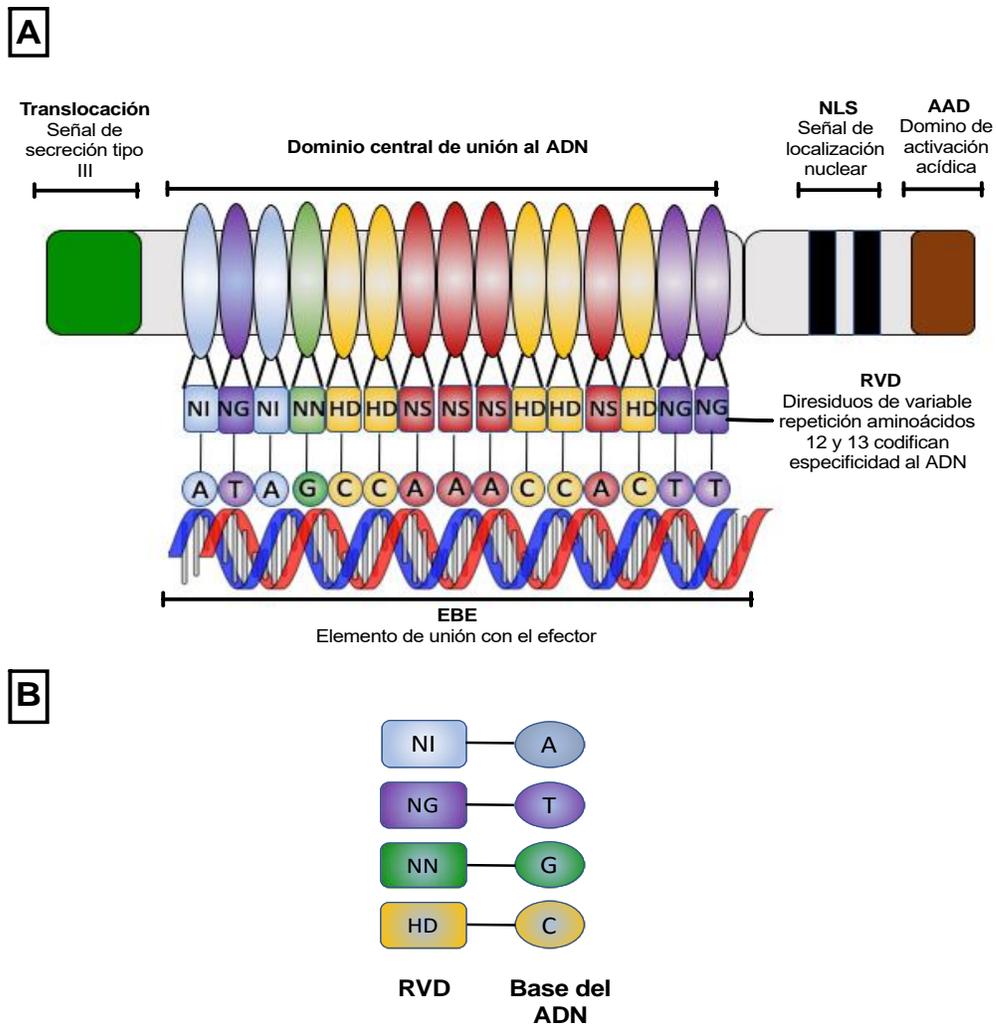
Los TALEs tienen una estructura modular que consiste en tres regiones con funciones conocidas: una señal de secreción y translocación en el N-terminal, una región central de unión al ADN y una región C-terminal que contiene señales de localización nuclear (NLS del inglés *Nuclear Localization Signal*) para su ingreso y un dominio de activación acídica (AAD del inglés *Acidic Activation Domain*), importante para la unión con la maquinaria transcripcional (Figura 1-1A) (Boch & Bonas 2010). El N-terminal incluye una señal de secreción y translocación no conservada a nivel de aminoácidos entre los T3Es. La señal es reconocida por la chaperona HpaB, quien acompaña y controla el reconocimiento de la señal de translocación de los T3Es (Scheibner et al. 2018; Szurek et al. 2002). Estudios realizados con el N-terminal de AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* determinaron la importancia de los aminoácidos 10 a 50 en la translocación (Scheibner et al. 2017). El TALE es transportado al núcleo por α -importinas de la planta, las cuales interactúan directamente con el NLS (Szurek et al. 2001; Schornack et al. 2013). El NLS puede funcionar en otras posiciones en los TALEs, por ejemplo, si el NLS está en el N-terminal de la proteína, no afecta la unión al ADN ni la activación de la transcripción (Miller et al. 2011). La unión del AAD a la subunidad γ del factor de transcripción TFIIA, induce el reclutamiento de la maquinaria de transcripción (Yuan et al. 2016; Streubel et al. 2017). El dominio central es indispensable para todos los TALEs, ya que confiere la función y especificidad de unión al ADN (Figura 1-1A). Esta región central está formada por una serie de repeticiones. Cada repetición contiene secuencias idénticas de 34 a 35 aminoácidos donde las posiciones 12 y 13 son variables y se conocen como diresiduos de variable repetición (RVDs del inglés *Repeat-Variable Di-residues*) (Jankele & Svoboda 2014a). Se requiere un mínimo de 6.5 repeticiones para inducir la expresión de un gen blanco (Boch et al. 2009). La región a la cual se unen los RVDs puede recibir otros nombres como: cajas UPA (subreguladas de AvrBs3), cajas UPT (subreguladas de TALE) o EBE (del inglés *Effector Binding Elements*) (White et al. 2009). La regulación de la transcripción en el EBE, puede ocurrir en cualquiera de las dos hebras y en ambas direcciones (Wang et al. 2017). Análisis de la estructura cristalina demostraron que cada repetición de un TALE, consta de dos α -hélices conectadas por un bucle corto que contiene el aminoácido cuya unión es específica al ADN. Las dos α -hélices forman una estructura superhélice que gira hacia la derecha y rodea el surco mayor del ADN (Mak et al. 2012; Cuculis et al. 2015). Estudios de este tipo también

demonstraron que el contacto se establece con el aminoácido 13, por esta razón se ha denominado residuo de especificidad hacia la base (BSR del inglés *Base-Specifying Residue*) (Deng et al. 2012; Mak et al. 2012).

Los RVDs se unen a nucleótidos específicos (Figura 1-1B), definiendo de este modo el siguiente código que fue predicho computacionalmente (Moscou & Bogdanove 2009) y validado experimentalmente (Boch et al. 2009): NI:A; HD:C; NN ó NK:G; NG:T y NS : N (A, C, G, or T) (Streubel et al. 2012). No todas las posibles combinaciones entre dos aminoácidos para generar un RVD son funcionales, solamente aquellas encontradas en la naturaleza son las más activas (Yang et al. 2014). AvrBs3 y AvrHah1 son dos efectores que poseen estructuras de unión al ADN divergentes: AvrBs3 tiene 17.5 repeticiones de 34 aa y AvrHah1 tiene 13.5 repeticiones de 35-aa. Sin embargo, ambos son capaces de unirse a la región promotora del gen de resistencia *Bs3* de pimienta (Schornack et al. 2008), ya que comparten una secuencia similar de RVDs que confiere el reconocimiento (Kay et al. 2007). La longitud de las repeticiones es un parámetro que también afecta la unión al ADN. TALEs con número de repeticiones muy cortas ó largas se unen a una gran cantidad de blancos ó son excluidos de la unión (Richter et al. 2014). Cada repetición adicional provee energía extra para la unión hacia ADN, sin embargo, esta energía de unión decae porque se satura en el sitio de unión. Los TALEs alcanzan un alto grado de especificidad con una longitud óptima que se encuentra en 15 y 19 repeticiones (Rinaldi et al. 2017).

Figura 1-1: Estructura de los TALEs.

A. dominios funcionales del TALE. El N terminal se requiere para la secreción y translocación dentro de la célula hospedera. El dominio central consiste de repeticiones variables de diresiduos de amino ácidos (RVDs) que se asocian a una secuencia específica de ADN. El C terminal confiere activación transcripcional de un marco abierto de lectura. **B.** Set de RVDs y sus bases de ADN preferenciales.



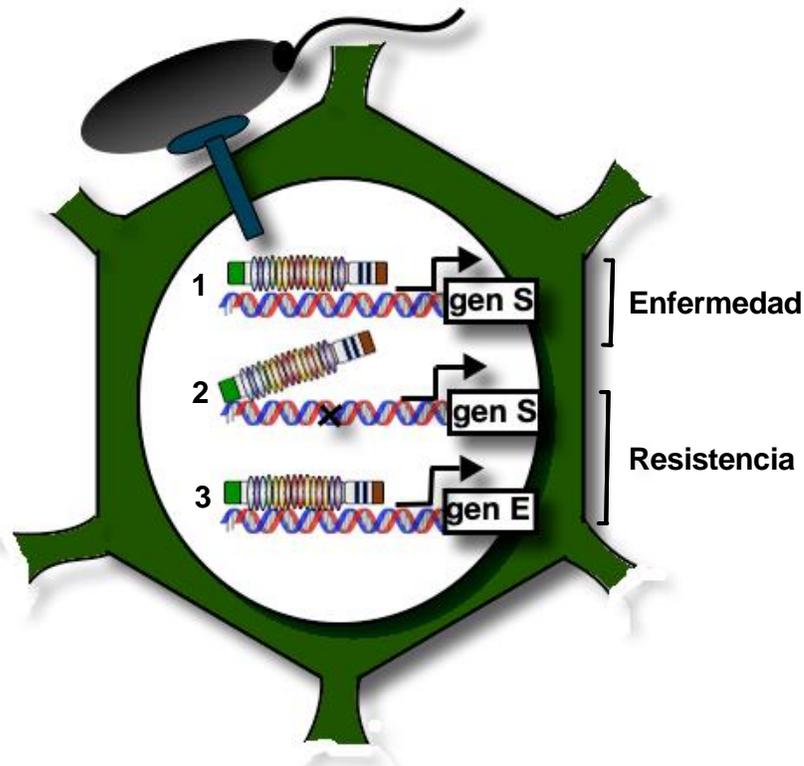
1.2.1.1 Funciones biológicas de los TALEs

Los TALEs inducen la activación de genes al interior de la célula hospedera. En la mayoría de los casos conocidos activan genes de susceptibilidad (*S*) que representan un beneficio para el crecimiento y la colonización del patógeno, ocasionando enfermedad en la planta (Figura 1-2). Las plantas al mismo tiempo han evolucionado un mecanismo para

resistir a la infección a través de dos estrategias: 1) por mutaciones en el sitio de unión de los TALEs para reducir la activación de genes *S* ó 2) activando genes trampas que involucran la activación de genes de resistencia (*R*) bajo el control transcripcional de TALEs (Figura 1-2) (Hutin et al. 2015). Los genes de resistencia que son inducidos por TALEs se denominan genes ejecutores (*E*) (Zhang et al. 2015).

Figura 1-2: Funciones biológicas de los TALEs.

Al interior de la célula hospedera los TALEs se unen a genes de susceptibilidad (*S*) que facilitan la colonización del patógeno. Las mutaciones en regiones promotoras impiden la inducción del gen *S* y en consecuencia el progreso de la enfermedad. Las plantas han evolucionado mecanismos de resistencia, como el uso de genes ejecutores que están bajo el control de TALEs.



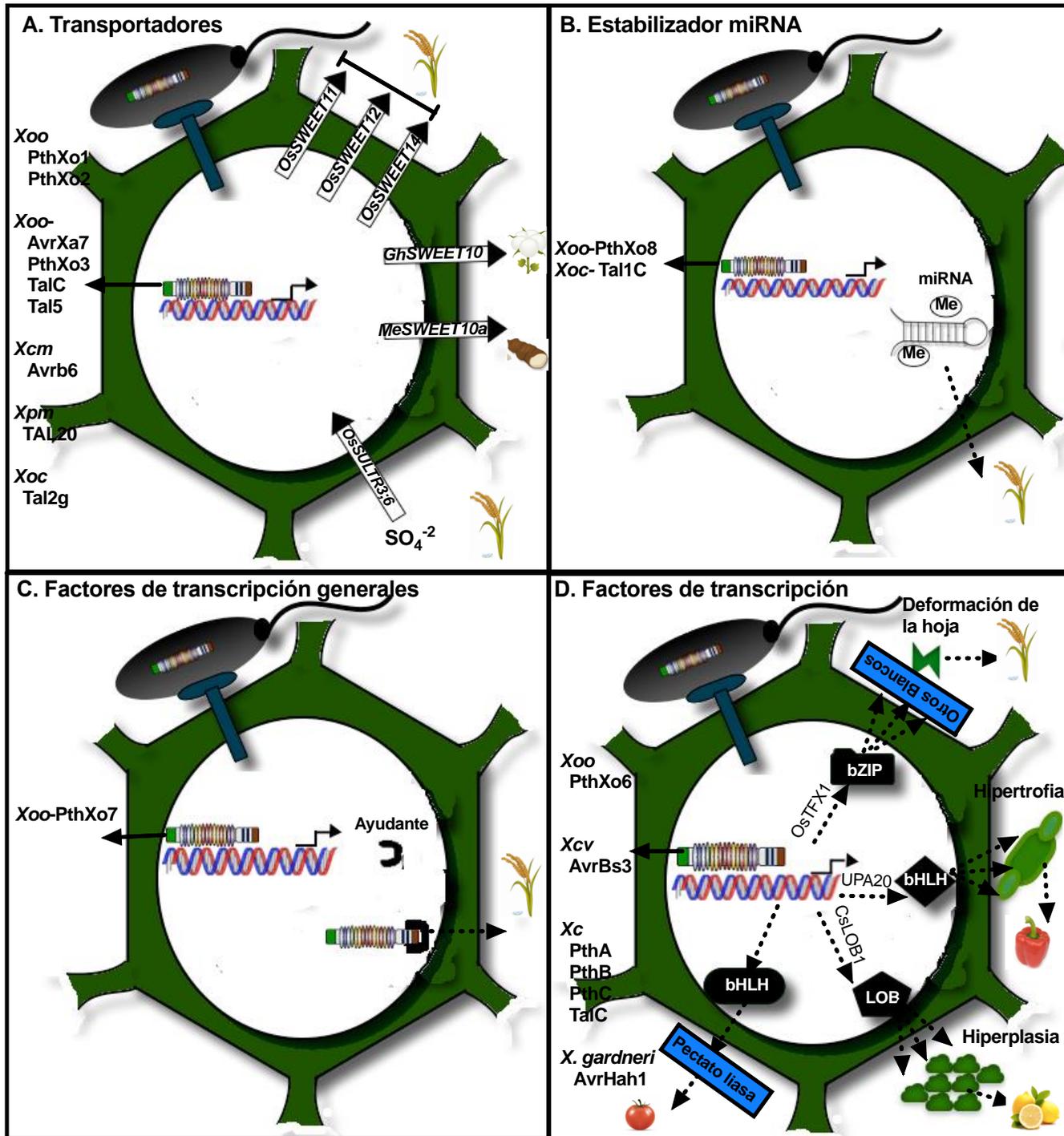
1.2.1.1.1 Activación de genes de Susceptibilidad (S)

Los genes de susceptibilidad blancos de TALEs desempeñan diversas funciones. Estos se pueden dividir en *i*) transportadores, *ii*) estabilizadores de miARNs, *iii*) factores de transcripción generales (GTF del inglés General Transcription Factor) y *iv*) factores de transcripción (TF del inglés Transcription Factor). La familia génica *MtN3/SWEET* o simplemente *SWEET*, es un grupo de transportadores muy estudiado en planta, cuya función es exportar glucosa y sucrosa

al exterior de la célula de la planta. Los genes SWEET fueron los primeros blancos de TALEs encontrados (Figura 1-3 A) (Yang et al. 2006; Chen 2014). Estos genes codifican proteínas que están involucradas en desarrollo reproductivo, senescencia, respuesta a estrés y transporte de iones/azúcares (Yuan & Wang 2013). Los genes *SWEET* son importantes para la virulencia, ya que el incremento en estos azúcares favorece el crecimiento bacteriano. En arroz, cítricos, yuca y algodón han sido descritos blancos de TALEs pertenecientes a la familia SWEET (Figura 1-3 A) (Yang et al. 2006; Antony et al. 2010; Hu et al. 2014; Cohn et al. 2014; Cox et al. 2017; Chen et al. 2012; Li-Qing et al. 2010) . Otro tipo de transportadores, cuya inducción es mediada por TALEs son los transportadores de sulfatos. Tal2g es el primer TALE identificado en arroz, el cual contribuye a la virulencia de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, e induce la expresión de un probable transportador de sulfato (Figura 1-3 A) (Cernadas et al. 2014). PthXo8 y Tal1C son dos TALEs de *Xoo* y *Xoc*, respectivamente, los cuales se unen al promotor del gen *OshEN1* cuya función es estabilizar pequeños ARNs (Moscou & Bogdanove 2009). *OshEN1* codifica una metil transferasa. En plantas la pérdida de *OshEN1* resulta en una oligo-uridilación de los miARN, lo que conlleva a una degradación acelerada. Las plantas utilizan la metilación del miARN para modular su acumulación, sin embargo, el mecanismo de cómo la inducción de estos genes permite la colonización bacteriana todavía no se conoce (Figura 1-3 B). Otro grupo de genes blanco de TALEs son los factores de transcripción de plantas (Figura 1-3). Su activación induce la expresión de otros genes cuyo efecto final es la inducción de cambios celulares complejos. Por ejemplo, AvrBs3 un TALE de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) activa la expresión del factor de transcripción *UPA20*, el cual a su vez induce un set de varios genes que tienen como efecto el alargamiento de las células (hipertrofia) en pimentón y *N. benthamiana* (Kay et al. 2007). Al igual que AvrBs3, PthA, PthB, PthC y TalC son TALEs de *Xanthomonas citri* (*Xc*) que también inducen la expresión del factor de transcripción *CsLOB1* y su activación ocasiona hipertrofia y además hiperplasia (división celular), generando ruptura de la epidermis y un incremento en la liberación de la bacteria a la superficie de la planta (Li et al. 2014; Hu et al. 2014; Brunings & Gabriel 2003). AvrHAh1 es un TALE homólogo de AvrBs3 presente en *Xanthomonas gardneri*, el cual induce la expresión de dos factores de transcripción con motivos hélice-bucle-hélice. Estos factores de transcripción regulan la inducción de una pectato liasa, la cual induce el desarrollo de las manchas acuosas de la cepa mutante *X. gardneri*Δ*avrHah1* en tomate, pimentón y *Nicotiana benthamiana* (Schwartz et al. 2017).

Figura 1-3: Blancos de susceptibilidad de los TALEs.

Los genes blancos pueden ser organizados en cuatro categorías: A) transportadores, B) estabilizadores del miRNA, C) Factores de transcripción generales (GTF) y D) factores de transcripción (TF).



1.2.1.1.2 Activación de genes de Resistencia (*R*)

La estrategia más común para la identificación de genes ejecutores, es aprovechando la unión de los TALEs a las regiones promotoras de estos genes (promotor trampa) (Figura 2). La inducción de estos genes activa en la mayoría de los casos una respuesta hipersensible (HR) (Zhang et al. 2015). Durante la colonización los TALEs permiten la inducción de genes ejecutores que limitan el crecimiento del patógeno. Hasta el momento han sido identificados cinco genes ejecutores (*E*) activados por TALEs : *Xa27*, *Bs3*, *Bs4C-R*, *Xa10* y *Xa23* (Gu et al. 2005; Römer et al. 2007; Strauss et al. 2012; Tian et al. 2014; Wang et al. 2015). Tres de estos genes *E* han sido clonados en arroz *Xa27*, *Xa10* y *Xa23*, inducidos por *AvrXa27*, *AvrXa10* y *AvrXa23*, respectivamente. El primer gen de resistencia tipo ejecutor identificado fue el gen de arroz *Xa27* el cual contiene un EBE para el efector *AvrXa27* de *X. oryzae* pv. *oryzae* (Gu et al. 2005). El mecanismo de acción de *Xa27* es desconocido, pero esta proteína de 113 aminoácidos confiere resistencia a cepas de *X. oryzae* pv. *oryzae* y *X. oryzae* pv. *oryzicola* que contienen *AvrXa27* (Hummel et al. 2012). Se han reportado experimentos que muestran que la proteína *Xa27* se localiza en la membrana citoplasmática y en el apoplasto (Wu et al. 2008). El EBE para este gen está localizado corriente abajo de la caja TATA. El alelo recesivo de *xa27* en la variedad susceptible de arroz IR24 codifica la misma proteína pero tiene una delección de tres nucleótidos y un cambio en un nucleótido en la región promotora con respecto a la del alelo dominante *Xa27* haciendo que el TALE no sea capaz de unirse e impidiendo la transcripción del gen *S* (Römer et al. 2009). Otro caso es *Xa10* que codifica una proteína de 126 aminoácidos, cuya estructura tridimensional está formada por cuatro hélices, similar a una proteína transmembranal (Tian et al. 2014). Un análisis funcional de la proteína *Xa10* reveló que se localiza en el retículo endoplasmático y media la reducción de los niveles de Ca^{2+} (Williams et al. 2014). Experimentos de expresión transitoria de *Xa10* en plantas de *N. benthamiana* y arroz demostraron que genera HR acompañada de producción de peróxido de hidrógeno, hinchazón y degradación del cloroplasto. Asimismo en células HeLa induce muerte celular programada (PCD) (Tian et al. 2014). Otro de los genes *E* es el gen *Xa23* el cual codifica una proteína de 113 aminoácidos que comparte 50% de identidad con la secuencia de aminoácidos de *XA10* y 64% de similitud en la secuencia de nucleótidos con *Xa1*. La caracterización del EBE de *AvrXa23* en un alelo recesivo idéntico mostró un polimorfismo

de siete pares de bases y su expresión transitoria induce HR en *N. benthamiana* y en tomate (Wang et al. 2015). Tanto XA10 como XA23 tienen un motivo en la región C-terminal conformado por cinco residuos de aminoácidos (EDDEE y DNDDD, respectivamente), que al ser alterados interfieren en la HR (Tian et al. 2014). Otro ejemplo de un gen *E* es *Bs3* aislado del ecotipo de pimentón ECW- 30R, el cual confiere resistencia a la cepa *X. euvesicatoria* que posee el TALE *AvrBs3*. El gen *Bs3* codifica una proteína de 342 aminoácidos cuya función es desconocida, sin embargo presenta un alto grado de similitud con la familia de las flavon monooxigenasas YUCCA, pero carece de un dominio común con otros miembros de la misma (Römer et al. 2007). Las proteínas de esta familia juegan un papel importante en la defensa hacia el patógeno, la biosíntesis de auxinas y metabolismo de glucosinatos (Römer et al. 2007). Como con *Xa27*, la expresión de *Bs3* resulta en una HR y su mecanismo de acción también es desconocido, no obstante Römer et al. 2007, demostraron que *Bs3* no se expresa en plantas inoculadas con cepas de *Xanthomonas* carentes de *AvrBs3*, pero es inducido específicamente por *AvrHah1*, un TALE de *X. gardneri* (Schornack et al. 2008). Así, el gen *Bs3* confiere resistencia a *X. euvesicatoria* y *X. gardneri*, dos patógenos que causan manchas bacterianas en pimentón (Schornack et al. 2008). Finalmente, *Bs4C-R* es un gen *E* que es expresado en presencia del efector *AvrBs4*. *AvrBs4* es capaz de activar HR en plantas de tomate y de pimentón. Un polimorfismo de dos nucleótidos en el EBE de un alelo susceptible conduce a una falla en la inducción de HR dependiente de *AvrBs4*, este alelo es conocido como *Bs4C-S*. Ambos alelos (*Bs4C-R* y *Bs4C-S*) producen proteínas cuya expresión en hojas de *N. benthamiana* activan HR (Strauss et al. 2012).

1.2.1.1.3 Estrategias para la obtención de plantas resistentes

La capacidad de unión de los TALEs a una secuencia específica de ADN para modificar la expresión génica en plantas es de gran interés como una herramienta dirigida hacia la expresión específica de un gen endógeno. Por esta razón, se han diseñado algunas técnicas basadas en el uso de TALEs para la obtención de una resistencia de amplio espectro en plantas hacia diferentes cepas de *Xanthomonas*. La estrategia se basa ya sea *i)* en la remoción de los sitios blancos de TALEs en la región promotora de genes *S* conocidos ó *ii)* en la adición de sitios blancos de TALEs en la región promotora de genes de resistencia (promotor trampa) (Figura 1-2). La primera opción, se presenta de forma natural en alelos de genes *S* en plantas de arroz (*xa13* y *xa25*). En estos alelos el EBE

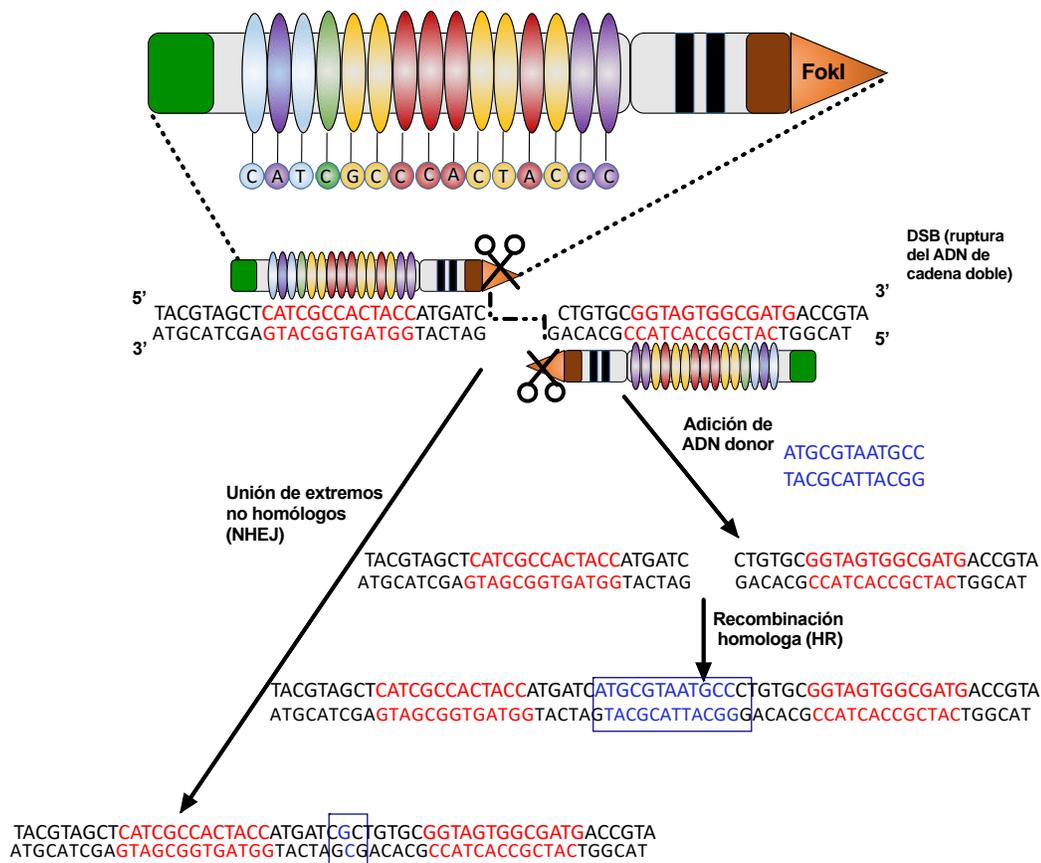
ha sido modificado para dos genes de susceptibilidad conocidos: *OsSWEET11* y *OsSWEET13*, lo cual impide su activación, disminuyendo el crecimiento bacteriano (Chu et al. 2006; Yang et al. 2006; Liu et al. 2011). Este hallazgo ha sido utilizado para modificar otros promotores de genes S de arroz a través de la tecnología de TALEs para la edición génica, utilizando nucleasas (TALENs) (Li et al. 2012).

En la tecnología TALENs, los TALEs son fusionados a la endonucleasa FokI (Carroll 2011). Cuando FokI forma un homodímero, la endonucleasa es capaz de cortar el ADN de manera no específica. Los TALENs funcionan como dímeros, donde cada monómero está compuesto por el TALE fusionado al dominio catalítico de FokI (Figura 1-4). Cada monómero es diseñado para unirse a una de las dos hebras de ADN generando una ruptura en el ADN de doble cadena (DSB del inglés *Double Strand DNA Breaks*) (Figura 1-4). El DSB puede ser corregido mediante ciertos sistemas de reparación endógenos de las células eucariotas. Los dos mecanismos más importantes de reparación son la unión de extremos no homólogos NHEJ (del inglés *Non Homologous End-Joining*) y la recombinación homóloga HR (del inglés *Homologous Recombination*) (Jankele & Svoboda 2014b; Chen & Gao 2015). La NHEJ produce inserciones ó deleciones en el ADN, lo cual puede conllevar a alterar el marco de lectura del gen blanco si ésta ha ocurrido dentro de una secuencia codificante. Mientras que en el mecanismo de recombinación homóloga (HR), la recombinación ocurre entre una secuencia exógena de ADN y la región de DSB, permitiendo la incorporación del ADN exógeno en el genoma (Figura 1-4) (Jankele & Svoboda 2014b; Chen & Gao 2015).

En arroz, se diseñaron dos TALENs para dirigir mutaciones hacia el EBE del gen *Os11N3*, las mutaciones ocasionaron pérdida de la virulencia de los TALEs AvrXa7 y PtoXo3 de *Xoo*, pero no de la función del gen *Os11N3*. Utilizando esta estrategia se generaron 16 mutaciones (pequeñas deleciones) que no afectaron el sitio de unión de la transcripción. De esta forma las plantas editadas con TALENs perdieron la susceptibilidad a *Xoo*, debido a la incapacidad del TALE de unirse e inducir la expresión del gen de susceptibilidad *Os11N3* (Li et al. 2012). Los TALENs representan una poderosa herramienta para generar deleciones ó inserciones en genomas complejos. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el mejoramiento de cultivos, ganado y en investigaciones clínicas (Bacman et al. 2018; Curtin et al. 2018; Khan et al. 2018).

Figura 1-4: Edición de genomas empleando TALENs.

Un par de TALENs artificiales directo y reverso son diseñados hacia un blanco específico en una región del genoma. Como resultado de la fusión al dominio FokI, el TALENs produce un DSB. Luego de la ruptura dos posibles sistemas de reparación pueden ocurrir: NHEJ ó HR. Por la vía de recombinación homóloga el ADN donador permite la corrección del ADN ó la edición del genoma.



La segunda opción para obtener una resistencia de amplio espectro en plantas hacia cepas de *Xanthomonas*, corresponde a la adición de sitios blancos de TALEs en la región promotora de genes de resistencia (promotor trampa). Los promotores trampa pueden ser generados *in vitro* e introducidos en plantas y los EBEs diseñados pueden ser insertados corriente arriba de genes *R* conocidos, no solo con un EBE sino con múltiples. Este concepto ha sido validado en experimentos de transformación estable para el gen *Bs3*, en cuya región promotora se introdujo el EBE del TALE AvrXa27 de *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) (Römer et al. 2009) y en expresión estable en arroz para el gen *Xa27*, al

cual se le adicionaron seis EBEs, que correspondían a tres TALEs de *Xoo* cepa PXO99A y a tres efectores de *Xoc* cepa BLS256, en su región promotora (Hummel et al. 2012). Dependiendo de la estrategia diseñada, es posible obtener resistencia de amplio espectro hacia cepas de *Xanthomonas* con diferentes TALEs (Hummel et al. 2012) ó proporcionar una resistencia más durable frente a una cepa individual por incorporación de EBEs de algunos TALEs presentes en una cepa en particular (Hummel et al. 2012). Estudios recientes demostraron un incremento en los niveles de resistencia en líneas de arroz editadas en el promotor del gen *OsSWEET14*. Las líneas mutadas en el promotor, fueron inoculadas con cepas *Xoo* que contenían los TALEs TaIF y TaIC cuyo blanco es el gen *OsSWEET14* (Blanvillain-Baufumé et al. 2017).

Existe otra herramienta para dirigir la expresión de un gen endógeno, a través del uso de arTALEs (del inglés *artificial TALEs*) (Cermak et al. 2011). El protocolo de clonación más utilizado para la construcción de arTALEs se basa en el sistema Golden Gate, este sistema emplea enzimas de restricción de tipo II, la cuales reconocen secuencias de ADN asimétricas, clivan fuera de su sitio de reconocimiento y crean extremos únicos sobrelapantes de 4pb (Engler et al. 2009). La clonación es facilitada puesto que la digestión y la ligación ocurren en una misma reacción (Cermak et al. 2011). Aunque los arTALEs pueden ser diseñados para que se unan a cualquier secuencia de ADN, existen algunas reglas que deben ser consideradas (Schreiber & Tissier 2017). Los máximos niveles de actividad de los arTALEs se obtienen con 17.5 RVDs, se recomienda incluir dos ó tres RVDs fuertes (HD ó NN) distribuidos a lo largo de la secuencia del arTALE, la posición de los EBEs debe estar cerca de la caja TATA para favorecer la inducción medida por TALEs y a 70 nucleótidos de distancia corriente arriba del codón de inicio (Schreiber & Tissier 2017). Cada uno de los arTALEs se diseña para que activen un gen candidato blanco de TALE. El arTALE complementa funcionalmente una cepa mutante de ese TALE de *Xanthomonas*, mediante la activación de la susceptibilidad ó de la defensa de la planta. La eficiencia de este concepto ha sido demostrada en un número reciente de estudios (Hu et al. 2014; Li et al. 2014; Cernadas et al. 2014). El gen candidato de resistencia en yuca *Rxam2* fue validado mediante el uso de tres arTALEs dirigidos hacia su promotor. Plantas inoculadas con los tres arTALEs sobreexpresaron al gen *RXam2*, el cual incrementó la resistencia hacia *Xpm* en plantas adultas y en plantas crecidas *in vitro* (Rodríguez-Puerto et al. 2017).

1.2.1.2 Predicción de sitios blancos de TALEs

El descubrimiento del código modular de los TALEs es una herramienta importante para la predicción *in silico* de EBEs. Es por esta razón que se han diseñado varios algoritmos para predecir los sitios blancos de TALEs (Tabla 1-1). La mayoría de estos programas emplean una matriz de asociación RVD-nucleótido para convertir secuencias de RVDs para un TALE dado en una matriz de peso posicional (PWM del inglés *Position Weight Matrix*). En la matriz se asignan recuentos idénticos a todos los RVDs que comparten el segundo residuo hipervariable igual (por ejemplo, HG, NG), ya que se ha demostrado que solamente este residuo es responsable de la especificidad hacia los nucleótidos (Deng et al. 2012). Sin embargo, a menudo estos programas predicen una cantidad sustancial de falsos positivos. Estos errores ocurren porque las repeticiones hacia la región N-terminal son más astringentes que otras repeticiones presentes en el código TALE (Meckler et al. 2013; Schreiber & Bonas 2014) y porque además no se consideran las modificaciones epigenéticas en las regiones N y C-terminal del TALE y las interacciones de los EBEs con factores de transcripción de la planta (Boch et al. 2014; Schreiber et al. 2015). A pesar de las anteriores limitaciones estos programas han sido de gran utilidad para la predicción de blancos de susceptibilidad y de resistencia de TALEs (Castiblanco et al. 2013; Cohn et al. 2014; Cohn, Morbitzer, et al. 2015; Muñoz-Bodnar et al. 2014; Tian et al. 2014; Wang et al. 2015; Mora 2017; Cernadas et al. 2014). Los patrones de diversificación y convergencia de los TALEs pueden ser revelados, si se recopila toda la información obtenida por algunos de los algoritmos para predecir los EBEs (Tabla 1-1) y los resultados experimentales de expresión. daTALbase es una base de datos que integra los datos actuales de los TALEs, incluyendo secuencias bacterianas, secuencias de los promotores de plantas, EBEs para TALEs, datos transcriptómicos de plantas inoculadas con *Xanthomonas* y sus datos asociados. Esta base de datos puede ser utilizada para explorar nuevos genes *S* candidatos, así como variaciones en el repertorio de TALEs. La primera versión de daTALbase incluye datos de la interacción *Oryza* spp.–*Xanthomonas* pv. *oryzae*. Sin embargo, actualmente se trabaja en futuras versiones para incorporar información de otros patosistemas (Pérez-Quintero et al. 2018).

Tabla 1-1: Programas para la predicción de genes blancos de TALEs

Programa	Link	Referencia
TALgetter	http://galaxy.informatik.uni-halle.de	(Grau et al. 2013)
Target Finder	https://tale-nt.cac.cornell.edu/	(Doyle et al. 2012)
TALE-NT	https://tale-nt.cac.cornell.edu/	(Doyle et al. 2012)
Storyteller	http://bioinfo-prod.mpl.ird.fr/xantho/tales/	(Pérez-Quintero et al. 2013)
TALVEZ	http://bioinfo.mpl.ird.fr/cgi-bin/talvez/talvez.cgi	(Pérez-Quintero et al. 2013)
PrediTALE	http://galaxy.informatik.uni-halle.de	(Erkes et al. 2019)

1.3 Modelo Experimental: *Manihot esculenta* Crantz - *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*

1.3.1 Generalidades de la yuca

Manihot esculenta Crantz conocida comúnmente como yuca, aipim, mandioca, guacamota, mhogo, casabe o casava, es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia *Euphorbiaceae* (Rogers & Appan 1973). El nombre científico de la yuca, *Manihot esculenta*, fue acuñado por el botánico luxemburgués Heinrich von Crantz en 1976. Posteriormente, fue clasificada por Pohl en 1827 y Pax en 1910 como dos especies diferentes dependiendo si se trataba de yuca dulce *M. aipi* ó amarga *M. utilissima*. Finalmente, se planteó un árbol filogenético de la yuca compuesto por tres subespecies principales (*Manihot esculenta* ssp. *esculenta*, *Manihot esculenta* ssp. *flabellifolia* y *Manihot esculenta* ssp. *peruviana*) y una especie silvestre (*Manihot pruinosa*): *Manihot esculenta* ssp. *esculenta*, corresponde a la forma cultivada de la yuca; *Manihot esculenta* ssp. *flabellifolia*, es el pariente silvestre más cercano; *Manihot esculenta* ssp. *peruviana*, posee una morfología similar a la subespecie *flabellifolia*, pero con una menor probabilidad de estar involucrada directamente en la domesticación de la yuca; y *Manihot pruinosa*, la especie silvestre más cercana. Este grupo primario de especies silvestres y cultivadas formaría la reserva genética primaria de la yuca (Allem 1994; Olsen 2004; OECD 2014; Bredeson et al. 2016).

El cultivo de la yuca se originó hace 6.000 años en la orilla sur del río Amazonas, cultivándose ampliamente en Brasil y Paraguay antes de la llegada de los españoles en el siglo XV (Ospina & Ceballos 2012). Actualmente, la yuca se cultiva en todas las zonas tropicales del mundo y representa la tercera fuente más importante de carbohidratos en el trópico, después del arroz y el maíz (FAO 2018). La yuca es considerada una fuente eficiente de energía, ya que la producción de calorías por hectárea por día es de 250.000 comparado con 176.000 de arroz, 110.000 de trigo y 200.000 de maíz (Mowang et al. 2017). Su costo de producción es relativamente bajo porque los terrenos en donde se cultiva suelen ser infértiles, ácidos y con largos períodos de sequía. Esta raíz rústica no solo es un alimento básico para muchas familias campesinas de escasos recursos, es además un valioso alimento desde las civilizaciones precoloniales (FAO 2013).

Para las comunidades indígenas del Amazonas, la yuca no es simplemente un alimento, representa un símbolo de la identidad de un pueblo y el eje que fortalece las estructuras de parentesco dentro del mismo (Núñez-Pérez et al. 2018). Estas comunidades cultivan la yuca en una chacra tradicional, un espacio cargado de misticismos en donde se cultivan especies necesarias para la alimentación familiar. La dinámica de las chacras favorece un intercambio de semillas de yuca entre miembros de la familia, de la comunidad y de otras comunidades cercanas, incrementando la variabilidad de yuca en la Amazonía. Este intercambio ha permitido el enriquecimiento de sus chacras con variedades que no eran consideradas como míticas por esos pueblos, ampliando la posibilidad de que en la chacra se lleven a cabo una serie de cruces entre las diferentes variedades autóctonas (Núñez-Pérez et al. 2018).

La cosecha de las raíces de la yuca es obtenida entre los 6 y 18 meses después de su siembra, dependiendo de la variedad cultivada (Sagrilo et al. 2003). Una vez cosechadas, las raíces son empleadas como alimento humano, para el ganado o vendida para su transformación en una amplia gama de productos de valor agregado. Las raíces tienen un valor nutricional alto comparado con tubérculos como la papa. Se caracterizan por un alto contenido de carbohidratos, fibra, lípidos, calcio, vitamina C, riboflavina y niacina. Sin embargo, la composición nutricional está influenciada por la variedad de yuca, la localización geográfica, la edad de la planta y el método de procesamiento utilizado (Li et al. 2017). Otros órganos de la planta como son hojas y raíces pueden ser utilizadas para

consumo humano o animal debido a su alto contenido de proteína, vitaminas, carotenoides y minerales como fósforo, magnesio y calcio, además, a la cantidad de aminoácidos esenciales que es mayor comparado con la espinaca, soya y granos de arroz (Li et al. 2017).

El almidón modificado de yuca es utilizado como materia prima para la producción de edulcorantes, fructosa, alcohol y glutamato monosódico, así como también en madera, papel y textiles (Ospina & Ceballos 2012). La cantidad de etanol obtenido a partir de raíces de yuca es rentable. En una destilería típica se puede producir potencialmente alrededor de 280 litros de etanol (222 kg) al 96% puro a partir de 1 tonelada de raíces de yuca con un 30% de contenido de almidón (FAO 2015).

El CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) en Colombia es un centro de investigación en donde se encuentra el germoplasma más grande de yuca. El banco consiste principalmente de material propagado *in vitro*. En total, posee 6.155 accesiones de las cuales 5.690 son cultivadas y 465 son silvestres, procedentes de 28 de los 61 países en donde se cultiva esta raíz. El banco contiene un 37% de clones de Colombia, 24% de clones de Brasil, 21 % de otros países de sur América, 7% de centro América y del caribe y un 7% de Asia. El germoplasma de clones de África es conservado en el IITA (*International Institute for Tropical Agriculture*) en Nigeria. Los nombres asignados a las variedades de esta colección se basan en un código alfanumérico que es único para cada clon (<https://ciat.cgiar.org/what-we-do/crop-conservation-and-use/cassava-diversity/11/02/2019>).

Colombia se encuentra dentro de los tres principales productores de yuca en América Latina. El país logró ubicarse en el ranking de los 20 principales productores del mundo según la FAO (FAO 2018). Se estimó una producción de yuca fresca para el 2018 de 2.250 millones de toneladas, lo cual constituyó una cifra significativa dentro de la economía agrícola del país (FAO 2018). La producción de yuca en Colombia se encuentra ampliamente distribuida a través de la geografía nacional, ubicándose principalmente en los pisos térmicos entre 0 y 1.800 msnm. El 65% de la producción se concentra en la Costa Atlántica, 10% en los Santanderes, 5% en el Valle del Cauca y Norte del Cauca, 5% en los Llanos Orientales y 15% en otras regiones. Cada región se destaca por la generación de uno ó varios productos a partir del cultivo de la yuca. Los

santanderes producen yuca fresca, la Costa Atlántica yuca seca y almidón natural, el Valle del Cauca y Norte del Cauca generan almidón agrio, mientras que los Llanos Orientales producen yuca fresca tipo exportación y harina de yuca. Los departamentos con mayor área sembrada son Bolívar, Córdoba, Magdalena y Sucre (<https://sioc.minagricultura.gov.co/Yuca/Documentos/002%20%20Cifras%20Sectoriales/Cifras%20Sectoriales%20-%202018%20Septiembre%20Yuca.pdf> 12/02/2019)

1.3.1.1 Fitosanidad del cultivo de yuca en el mundo

El cultivo de yuca no solo en Colombia sino a nivel mundial es afectado por varias enfermedades que pueden ser de naturaleza viral, fúngica ó bacteriana, así como también por algunas plagas cuya distribución geográfica e importancia varían considerablemente (Ospina and Ceballos, 2012; p131). La enfermedad del mosaico de la yuca (CMD del inglés *cassava mosaic disease*) y del rayado marrón de la yuca (CBCD del inglés *cassava brown streak disease*), son de origen viral y generan grandes pérdidas en la producción de yuca en África (Harris et al. 2015). La CMD causa distorsión foliar y crecimiento atrofiado de la planta. Esta enfermedad se encuentra en todos los países productores de yuca en África, así como en el Subcontinente Indio (Bart & Taylor 2017). La CBCD ataca las raíces de la yuca dejándolas poco apetecibles e inadecuadas para el mercado. Esta enfermedad afecta principalmente la costa Oriental Africana, así como en Malawi, Mozambique y Uganda (Bart & Taylor 2017). La mosca blanca es quizás uno de los insectos plaga más difundidos de la yuca. Se alimenta del floema de las hojas de yuca y actúa como vector transmisor de virus que afectan el cultivo. El vector se encuentra en India y Sri Lanka y en muchas otras regiones donde se encuentra este cultivo (Njoroge et al. 2017). El ácaro verde de la yuca es otra plaga que solo ataca este cultivo, se alimenta de sus hojas, reduciendo la capacidad de fotosíntesis de la planta. Esta plaga se ha reportado actualmente en el continente África y América del Sur (Ezenwaka et al. 2018). Las enfermedades asociadas con manchas foliares, necrosis en el tallo y pudriciones radicales se presentan con mayor frecuencia y se distribuyen ampliamente, causando pérdidas en el rendimiento de la producción (Ospina & Ceballos 2012). *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* actualmente renombrado como *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*) (Constantin et al. 2016), es un patógeno que causa este tipo de síntomas en yuca y cuya enfermedad es conocida como bacteriosis vascular. Esta enfermedad puede causar pérdidas que varían entre 20-100% en el

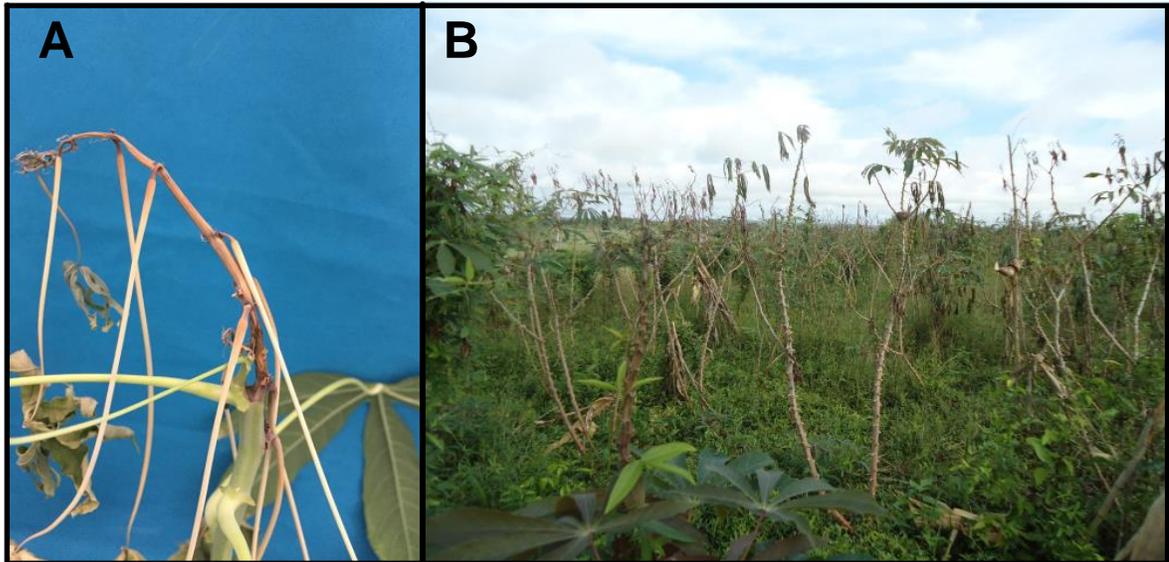
rendimiento del cultivo (Harris et al. 2015; Lozano 1986; Wydra & Verdier 2002a; Graziosi et al. 2016).

1.3.1 *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Xpm)

Xanthomonas phaseoli pv. *manihotis* (Xpm) es una bacteria Gram negativa con forma de bastón lo que le permite movilizarse al interior de la planta infectada (Lozano and Sequeira 1974). Al igual que muchas bacterias gram-negativas, dependen de un sistema de secreción tipo III para transportar y secretar *proteínas* hacia el hospedero (Ryan et al. 2011). Xpm es capaz de infectar a la mayoría de los miembros del género *Manihot*, el cual abarca unas 100 especies de plantas y está presente en todas las zonas donde se cultiva la yuca (Lozano 1986). Durante periodos de sequía, Xpm puede sobrevivir de manera asintomática en tallo, tejido, semilla y en desechos de plantas por periodos largos de tiempo, hasta que la temporada de lluvia inicie (Verdier et al. 1998; Restrepo et al. 2000; Wydra & Verdier 2002a). Los síntomas característicos de la bacteriosis vascular son manchas foliares que inicialmente son pequeñas y angulares y de apariencia acuosa en el envés, luego crecen cubriendo totalmente la hoja y adquieren un color marrón de añublo o quemazón foliar. Posteriormente se produce la marchitez, muerte descendente, exudación gomosa en los tallos jóvenes infectados, en los peciolo y en las manchas foliares; además, los haces vasculares de los peciolo y de los tallos infectados se necrosan, tomando la apariencia de bandas de color marrón o negro (Figura 1-5) (Maraite and Meyer, 1975; Hillocks and Wydra, 2002). Los síntomas se presentan 11 a 13 días después de la infección (Boher et al. 1995). La incidencia de esta enfermedad varía dependiendo de la región biogeográfica en la cual esté cultivada la yuca. Estudios realizados por Wydra & Verdier (2002) encontraron una incidencia que va desde el 33,7 % (en bosque húmedo) a más del 90 % (en las sabanas del sur y norte de Guinea y en las sabanas de Sudán). Es una enfermedad tan devastadora que ha ocasionado grandes pérdidas en la producción. Experimentos en campos de Brasil usando un cultivar susceptible revelaron que el rendimiento en la producción de yuca disminuía a medida que el porcentaje de esquejes infectados aumentaba, llegando a pérdidas de hasta del 72 % en campos totalmente infectados (Harris et al. 2015). Hace algunos años la bacteriosis fue considerada como la segunda enfermedad más severa de la yuca en términos de pérdidas de rendimiento, después de la enfermedad causada por el mosaico de la yuca en el continente Africano (Harris et al. 2015).

Figura 1-5: Síntomas de la bacteriosis vascular.

A. Marchitez de la planta **C.** Bacteriosis vascular en campo. Fotos: Edilene Ramírez y Cesar Trujillo.



1.3.1.1 Ciclo de la enfermedad

El proceso de infección inicia con la multiplicación epífita de *Xpm* en la hoja, luego se produce su entrada a través de las aberturas estomáticas y heridas en la hoja. Una vez entra al hospedero, *Xpm* tiene una fase de desarrollo en el espacio intercelular del mesófilo, donde genera grandes cantidades de una matriz de exopolisacáridos (xantano) que sirven para degradar la lamela media y la pared celular y así acceder al tejido vascular. Dicha matriz es producida en todas las fases de la infección (Boher et al. 1997). Al interior del tejido vascular, *Xpm*, al igual que muchos patógenos vasculares, prefiere multiplicarse en el xilema (Mensi et al. 2014; Ryan et al. 2011). Posteriormente, en el envés de las hojas aparecen unas manchas que exudan una sustancia amarillenta y pegajosa que se concentra en gotas cargadas con el microorganismo. Los exudados bacterianos se diseminan a otras plantas cuando las gotas de lluvia caen y salpican durante la estación lluviosa. La multiplicación del patógeno y la consecuente producción de exudado bacteriano bloquean los tejidos vasculares, llevando al marchitamiento de las hojas (Verdier 2002). Cuando las plantas son infectadas, su parte aérea puede ser

destruída por completo. Nuevos rebrotes se desarrollan del tallo, ya sea por encima o por debajo del suelo, sin embargo, éstos son susceptibles y en condiciones de lluvia se infectan rápidamente. Si el material de siembra está infectado, los brotes que produzca se marchitarán y pronto morirán (Verdier 2002).

1.3.2.2 Diversidad de poblaciones de *Xpm*

El desarrollo de estrategias efectivas para la obtención de plantas resistentes a la bacteriosis vascular requiere información acerca de la diversidad y distribución geográfica del patógeno. Por esta razón, se han realizado varios estudios dirigidos hacia el conocimiento de la diversidad de *Xpm* tomando aislamientos de diferentes regiones del mundo como África (Verdier et al. 1993; Wydra et al. 2004), y Sur América (Restrepo & Verdier 1997; Verdier et al. 1998) particularmente en Colombia (Restrepo et al. 1999; Restrepo & Verdier 1997; Restrepo et al. 2000; Trujillo et al. 2014). La mayoría de estas investigaciones han analizado caracteres genómicos como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Verdier et al. 1993; Verdier et al. 1998; Restrepo & Verdier 1997) o polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP del inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Verdier et al. 1993; Verdier et al. 1998; Restrepo & Verdier 1997; Gonzalez et al. 2002). En algunos de estos estudios se utilizó una sonda ampliamente distribuida en cepas de *Xpm*, obtenida a partir del plásmido p44 (Verdier 1988) para realizar un análisis de diversidad de poblaciones de *Xpm* (Trujillo et al. 2014; Gonzalez et al. 2002; Restrepo & Verdier 1997; Restrepo et al. 2000; Verdier et al. 1998). El uso de estos marcadores, permitieron determinar que las poblaciones del patógeno en África son muy homogéneas respecto a las poblaciones aisladas de Latinoamérica (Verdier et al. 1993), lo cual se corroboró en estudios más recientes donde se analizaron cepas de *Xpm* en Kenya, indicando que el desarrollo y uso de variedades resistentes de yuca podría controlar la bacteriosis vascular (Njeri-Chege 2017). En América Latina reportes de aislamientos tomados en diferentes regiones en Venezuela y Brasil mostraron alto grado de polimorfismo (Restrepo et al. 1999; Verdier et al. 1998) y no se observó correlación entre el origen geográfico y la diversidad genética (Verdier et al. 1998).

En Colombia, las poblaciones de *Xpm* han sido estudiadas en diferentes zonas edafoclimáticas (ECZ del inglés *edaphoclimatic zones*), establecidas de acuerdo a

regiones geográficas donde es cultivada la yuca, las condiciones climáticas, el tipo de suelo y la incidencia de la enfermedad (Restrepo et al. 2004). El resultado de este tipo de estudio permitió encontrar una alta diversidad del patógeno principalmente en dos de las 10 ECZs estudiadas, lo que podría estar indicando que las diferentes condiciones medioambientales a las cuales está sometido el cultivo de yuca en Colombia son un factor determinante para la evolución y diversidad del patógeno (Restrepo et al. 2004; Restrepo & Verdier 1997). Trujillo y colaboradores (2014) determinaron el estado actual de las poblaciones de *Xpm* en la región Caribe empleando AFLPs. Los resultados revelaron poblaciones complejas del patógeno y confirmaron un proceso migratorio para las cepas presentes en la región Caribe. Uno de los lugares muestreados, municipio de Chinú, mostró varios factores en la dinámica de población como largas distancias genéticas, altos índices de diversidad y una población genéticamente diferenciada con relación a otros sitios muestreados. Además se evaluaron los patrones de virulencia de 10 aislados en nueve variedades de yuca, mostrando que la variedad de yuca más cultivada en la costa caribe (MCOL2215) es susceptible a la mayoría de las cepas de *Xpm* evaluadas, caso contrario ocurre con la variedad CM6438-14 la cual presentó resistencia a la mayoría de las cepas de *Xpm* evaluadas (Trujillo et al. 2014). No obstante, el estudio de poblaciones utilizando AFLPs es costoso y su poder discriminatorio no es alto. Una alternativa para resolver estos problemas es el uso de MLVAs (del inglés *Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*), para el estudio de poblaciones. Mediante esta estrategia se analizó la diversidad de poblaciones de cepas de *Xpm* colectadas de 2008 a 2010 y de 2013 a 2014 en el Caribe Colombiano. Los resultados determinaron alta diversidad genética entre poblaciones, logrando discriminar cepas a nivel local (Rache et al. 2016).

Actualmente se han desarrollado algunos métodos de detección de *Xpm* en plantas colectadas en campos infectados. Uno de estos métodos amplifica mediante PCR multiplex anidada, secuencias de genes constitutivos como *RpoB* y regiones de proteínas relacionadas con la virulencia de *Xpm*, lo que permite detectar desde 10^2 hasta 10^8 UFC/mL (UFC Unidades formadoras de colonias) (Bernal-galeano et al. 2018). Otra estrategia utilizada para monitorear *Xpm* y además diferenciarla de *Xanthomonas cassavae* (*Xc*) es mediante una PCR-duplex. Esta metodología permite detectar la bacteria *in silico* y en planta con un límite de detección en cultivo puro de 10^5 UFC/mL y de 10^3 UFC/mL en planta (Flores et al. 2018).

1.3.2.3 TALEs en *Xpm*

El aislamiento y secuenciación completa de los TALEs presentes en una especie ó cepa de *Xanthomonas* recibe el nombre de TALoma. Los TALomas aportan información que podría ayudar a comprender ciertas características de la virulencia de la bacteria. El repertorio de TALEs varía entre patovares y entre cepas (Schandry et al. 2018). Existen cepas que no poseen ningún TALE como es el caso de *X. albilineans*, *X. sacchari*, *X. vasicola*, *X. campestris* pv. *campestris* cepa 8004 y *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* cepa 85–10. Mientras que en otras cepas se pueden encontrar TALomas pequeños que contienen de uno a cinco TALEs, como es el caso de *X. euvesicatoria*, *X. citri* subsp. *citri* (*Xci*) y *Xpm*. Algunos TALomas son de tamaño medio (de cinco a ocho), como los encontrados en *X. translucens*, y otros son considerados expandidos como los encontrados en *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* (por encima de diez), *X. citri* ssp. *malvacearum* (por encima de 12) y *X. oryzae*, con nueve TALEs por cepa en aislamientos tomados de África ó 29 TALEs en algunas cepas asiaticas de *Xoc* (Schandry et al. 2018).

El análisis del número de TALEs en *Xpm* y en diferentes cepas inició hace tres años. Mediante el análisis de las secuencias genómicas de 65 cepas de *Xpm* aisladas de diferentes lugares del mundo se logró identificar un repertorio de efectores para cada una de ellas, encontrando que todas contienen al menos un TALE y que la cantidad de estos varían entre cepas. El análisis del TALoma de las cepas CIO151 y *Xpm*668, permitió determinar TALEs con 13, 14, 15, 18, 21 y 22 RVDs. Sin embargo, no se encontró correlación entre la virulencia de la bacteria y la cantidad de TALEs, lo que sugiere que estos efectores pueden contribuir diferencialmente para la virulencia del patógeno (Bart et al. 2012). Estudios de caracterización y evaluación funcional con TALEs de diferentes cepas de *Xpm* aisladas en Colombia y en otras partes del mundo encontraron que estas cepas poseen naturalmente de 2 a 5 TALEs, además que la cantidad de TALEs en las cepas y su tamaño son homogéneos entre las cepas aisladas en la Costa Caribe y Meta, en comparación con los efectores presentes en las cepas aisladas en Casanare. Además, se determinó un incremento en la agresividad en cepas que contenían TALEs con 22 RVDs. Por último, predicciones bioninformáticas de los EBEs determinaron que a

pesar de tener secuencias de RVDs diferentes, la afinidad de esos efectores hacia los EBEs es virtualmente la misma y pueden ser organizados en 5 grupos (Zarate 2015).

Estudios recientes en la cepa *Xpm* 668 determinaron la presencia de cinco TALEs, de los cuales dos contribuyen al crecimiento bacteriano y fueron denominados: TAL20*Xpm*668 y TAL14*Xpm*668 (Cohn et al. 2014). El TAL20 se caracteriza porque además contribuye al desarrollo de manchas acuosas angulares. Un análisis de expresión diferencial durante la infección en hojas de yuca inoculadas con cepas que contienen estos dos TALEs, mostró que el TAL14 posee múltiples genes blanco mientras que el TAL20 activa un solo gen, correspondiente al *MeSWEET10a*, el cual es un transportador de azúcar (Cohn et al. 2014). Para determinar la relación entre dos TALEs con el mismo contenido de RVDs y sus genes blanco, se evaluó el perfil de expresión de los genes activados por los TALEs: TAL14C1O151 y TAL14*Xpm*668, provenientes de cepas distintas de *Xpm*. En este estudio se encontró que cada TALE induce la expresión de diferentes genes blanco, debido a que difieren en un RVD. Además el TAL14C1O151 es capaz de complementar al mutante en el TAL14*Xpm*668, demostrando que los genes blanco que comparten son importantes para el desarrollo de síntomas en plantas de yuca susceptibles (Cohn et al. 2015). La identificación de nuevos genes blanco de TALEs inducidos por otras cepas de *Xpm*, se realizó mediante estudios transcriptómicos en donde se inocularon plantas de una variedad susceptible de yuca con las cepas *Xpm*681, *Xpm*1061, *Xpm*394 y *Xpm*395. Este último estudio permitió identificar a los genes Manes.05G068700, Manes.13G045100 y Manes.15G026800 como blancos de los TALEs TALE13*Xam*681, TALE13*Xam*394, TALE22*Xam*681 y TALE14*Xam*1061 (Mora 2017).

El conocimiento sobre el contenido de TALEs, las secuencias de sus RVDs y sus genes blancos, permiten entender el mecanismo de acción de los TALEs al interior de la planta. Actualmente se han identificado algunos genes *S* inducidos por TALEs presentes en cepas de *Xpm*. Sin embargo, aún no se conocen genes *E* en yuca, información relevante para entender la interacción yuca-*Xpm* y su aplicación en programas de mejoramiento que permitan la obtención de variedades con mayor resistencia a *Xpm*.

Capítulo II

« Pour chaque fin il y a toujours un nouveau départ ».

Le petit prince

Capítulo 2. Liberación de TALEs

El estudio de un patosistema requiere la estandarización de una serie de etapas que permitan reproducir y estudiar los síntomas típicos de la enfermedad. Estas etapas deben *i)* asegurar el ingreso del patógeno, *ii)* proveer las condiciones adecuadas para favorecer el proceso de infección y diseminación y *iii)* permitir el seguimiento y cuantificación del patógeno. El ingreso del patógeno a la planta es la primera etapa y quizás la más crítica, ya que de no lograr su ingreso no se avanzará en el estudio del patosistema. La penetración del patógeno requiere a su vez, de una metodología de inoculación que contemple el ciclo de vida del patógeno, el tejido y la anatomía de la planta, la concentración de inóculo y las condiciones atmosféricas. Es importante resaltar la necesidad de detectar el ingreso del patógeno en el tejido de la planta. Porque si el ingreso es exitoso, el avance del patógeno puede ser determinado visualmente mediante el desarrollo de síntomas, tinciones, cortes histológicos y cuantificado a través de técnicas moleculares o microbianas.

En el caso del patosistema yuca-*Xpm* la metodología de inoculación más ampliamente utilizada ha sido la punción en tallo, debido a la dificultad de la inoculación en hoja (Muñoz Bodnar et al. 2015; Jorge et al. 2000; Mbaringong et al. 2017; Restrepo et al. 2000). Esta metodología permite el ingreso directo de la bacteria a los haces vasculares y el desarrollo de un espectro variado de síntomas. Sin embargo, el desarrollo de los síntomas requiere tiempos largos y altas cantidades de material vegetal por tratamiento (Trujillo et al. 2014). El seguimiento y cuantificación de *Xpm* en la planta, ha sido evaluado mediante el uso de genes reporteros (Cohn, Shybut, et al. 2015; Cook et al. 2014) o el seguimiento del crecimiento bacteriano (Muñoz Bodnar et al. 2015; Cohn, Shybut, et al. 2015). No obstante, es necesario establecer otras metodologías que permitan evaluar el sistema de manera rápida y eficaz.

Una dificultad adicional, es la búsqueda de un sistema de liberación que permita evaluar el efecto individual de una proteína del patógeno. El sistema de liberación ideal corresponde a la bacteria con su estructura básica, mutada en el efector objeto de estudio. En algunas especies del género *Xanthomonas* es posible encontrar este sistema de forma natural, pero este no ha sido el caso para *Xpm*. Por esta razón se han dirigido esfuerzos que permitan entender la función de los efectores, empleando sistemas alternativos. Dentro de las estrategias se encuentra el uso de *i)* sistemas heterólogos, *ii)* bacterias de otras especies sin un contenido natural del efector o *iii)* bacterias de la misma especie que no contengan el efector objeto de estudio. El estudio de la función de los TALEs en la activación de mecanismo de resistencia de la planta, requiere la búsqueda de un método de inoculación en yuca, un sistema de liberación de los TALEs y la estandarización de algunas metodologías para realizar el seguimiento del patógeno y de la enfermedad en la planta.

El capítulo actual consta de tres secciones que abordarán las problemáticas previamente mencionadas. En el primer subcapítulo titulado “Liberación de TALEs para el estudio de su función al interior de la célula vegetal” se presentan los resultados de las inoculaciones utilizando *Xanthomonas euvesicatoria* (*Xe*) y *Xpm* como sistemas de liberación en yuca y tabaco, utilizando como técnica de inoculación la infiltración. En el segundo subcapítulo titulado “Factores que afectan la expresión transitoria del gen *GUS* en yuca (*Manihot esculenta* Crantz)” se indican los resultados de la evaluación del gen *GUS* mediante expresión transitoria, utilizando distintos métodos de inoculación, tiempos, cepas y variedades. Por último, en el subcapítulo titulado “Determinación de la virulencia de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* mediante cuantificación de crecimiento bacteriano y seguimiento de síntomas en estacas y plantas crecidas *in vitro*” se presentan los resultados de la estandarización de algunos parámetros como el tiempo y la concentración, en la cuantificación de *Xpm* tanto en estacas como en plantas crecidas *in vitro*. Se presenta también la validación del sistema de plantas crecidas *in vitro* para el estudio de este patosistema.

2.1 Liberación de TALEs para el estudio de su función al interior de la célula vegetal

2.1.1 Introducción

Gran parte de los microorganismos están obligados a obtener los nutrientes de fuentes disponibles, como las células vegetales. Para acceder a estos nutrientes necesitan evadir ó contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta e invadir y adaptarse al tejido del hospedero para alimentarse y reproducirse (Cook et al. 2014). Muchos de estos patógenos permanecen en el espacio extracelular en donde logran evadir ó alterar los mecanismos de defensa de la planta mediante la liberación de proteínas efectoras (Toruño et al. 2016). Para el caso particular de bacterias fitopatógenas, la liberación de estas proteínas efectoras dentro de la célula de la planta se realiza a través de un sistema de secreción tipo tres (T3SS del inglés *Type III Secretion System*) (Diepold & Armitage 2015). El T3SS involucra un complejo de proteínas que se expande desde el interior de la célula bacteriana hasta el interior de la célula hospedera atravesando sus propias membranas y la pared celular de la planta. Los componentes estructurales del T3SS están codificados por un clúster de genes de patogenicidad conocido como *hrp* (Diepold & Armitage 2015). Aquellos efectores translocados a través del T3SS son denominados T3E (del inglés *Translocate type III Effector*) y pueden ser dirigidos a diferentes compartimientos subcelulares donde son capaces de manipular diversas funciones y componentes de la célula vegetal como la membrana, cloroplastos, el tráfico vesicular, la señalización por MAPK (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*) ó componentes en el núcleo (Toruño et al. 2016). Tal es el caso por ejemplo de los efectores AvrPto y AvrPtoB de *P. syringae*, los cuales interactúan con los receptores FLS2 (del inglés Flagellin-Sensitive2) y BAK1 (de inglés BRI1-Associated Kinase1) suprimiendo la señalización seguida de la percepción de la flagelina en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) y de *Arabidopsis* (Xiao et al. 2007; Xiang et al. 2008). HopF2 es otro efector de *P. syringae* que al igual que AvrPto y AvrPtoB bloquean la respuesta inmune corriente abajo del receptor de membrana, mediante su interacción con BAK1 y MAPK5 (Zhou et al. 2014). Además de estos mecanismos AvrPtoB se une a la proteína NPR1 (del inglés NON-EXPRESSER OF PR GENES 1), la cual actúa como un regulador clave de la transcripción de genes de respuesta basal de la planta (Chen et al. 2017). La unión de AvrPtoB a NPR1 promueve su poli-ubiquitinación y degradación. Otro efector

bien estudiado es HopM1 también de *P. syringae*, el cual se acumula en el trans-Golgi interfiriendo con el tráfico vesicular al interior de las células de *Arabidopsis*. HopM1 es capaz de interactuar y mediar la degradación de AtMIN7 por el proteosoma 26S. Se ha postulado que AtMIN7 es un elemento clave del tráfico vesicular el cual está implicado en la deposición de calosa en la pared celular (Gangadharan et al. 2013; Lozano-durán et al. 2014). Aunque la función de los efectores de bacterias diferentes a *P. syringae* no han sido estudiados en detalle, vale la pena destacar el efector AvrAC de *X. campestris* un T3E capaz de uridilar varios RLCKs (del inglés *Receptor-Like Cytoplasmic Kinase*) incluido BIK1. La uridilación inhibe la actividad quinasa del receptor interfiriendo con la cascada de señalización corriente abajo de la percepción (Guy et al. 2013). No obstante, durante el proceso evolutivo *Arabidopsis* generó una proteína capaz de detectar la uridilación mediada por AvrAC del RLCK, la cual se ha denominado PBL2 y que es capaz de inducir la inmunidad de la planta (G. Wang et al. 2015). Estudios recientes han demostrado el bloqueo de la señalización en arroz por el efector XopK de *X. oryzae* pv. *oryzae*. Este efector ubiquitina al receptor de tipo RLKs (del inglés *Receptor-Like Kinases*) OsSERK2, bloqueando el desarrollo e inmunidad de la planta (Qin et al. 2018).

Los TALEs (del inglés *Transcriptional Activator Like Effector*) son una clase particular de T3E los cuales son translocados al núcleo de la célula del hospedero en donde modulan la expresión de genes de la plantas (Boch & Bonas 2010). Los TALEs contienen una señal de localización nuclear en el extremo C-terminal (NLS del inglés *Nuclear Localization Signal*) para su importación al núcleo (Boch & Bonas 2010). También poseen una región central con un número variable de repeticiones de 34 aminoácidos, la cual determina la unión específica al ADN de la planta (Boch & Bonas 2010). Ha sido posible determinar que las posiciones de los aminoácidos 12 y 13 son altamente variables entre las diferentes repeticiones y se conocen como diresiduos de variable repetición (RVDs del inglés *Repeat-Variable Di-residues*) (Jankela & Svoboda 2014a). Los RVDs determinan la unión específica de un TALE particular a una secuencia de nucleótidos determinada a manera de código, en donde HD determina C; NI corresponde A; NN ó NK se une a G, NG a T y NS puede corresponder a cualquier nucleótido, (A, C, G, or T) (Moscou & Bogdanove 2009; Jana Streubel et al. 2012). La secuencia de ADN en el promotor de los genes blanco a la cual se unen los TALEs se conoce como EBE (*Effector Binding Element*). La modulación de la transcripción por medio de los TALEs depende del dominio de activación ácida

(AAD del inglés Activation Acidic Domain) localizado en el C-terminal (Boch & Bonas 2010). Los TALEs de diferentes cepas pueden ser idénticos a nivel de RVD y por ende en sus blancos, mientras que otros pueden tener RVDs diferentes tanto en su composición como en su longitud (Erkes et al. 2017). El número de TALEs presentes en una bacteria varía entre especies y cepas. Así por ejemplo, en *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) el contenido varía entre 8-26, en *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) entre 19–27. Existen algunos casos donde no contienen ningún TALE, como *X. campestris* pv. *campestris* cepa 8004, cepas norte americanas de Xoo y *X. euvesicatoria* cepa 85–10 (Boch & Bonas 2010; Erkes et al. 2017). Cuando las proteínas TALEs se encuentran al interior de la célula hospedera, se translocan hacia el núcleo donde se unen a regiones promotoras del ADN de la planta y activan genes de susceptibilidad (S). La inducción de estos genes representa un beneficio para el crecimiento y la expansión del patógeno, ocasionando enfermedad en la planta. Las plantas al mismo tiempo han evolucionado un mecanismo para resistir a la infección a través de dos estrategias: 1) por mutaciones en el sitio de unión de los TALEs para reducir la activación de genes S ó 2) activando genes trampas que involucran la activación de genes de resistencia (R) bajo el control transcripcional de TALEs. Los genes R que son inducidos por TALEs se denominan genes ejecutores (E) (Zhang et al. 2015).

Hasta el momento la función de los efectores bacterianos se ha estudiado por diferentes aproximaciones. La primera de ella es la transformación genética estable, en donde se han transformado plantas con el gen de un efector de un patógeno bajo el control de un promotor inducible. De esta manera bajo condiciones controladas la planta expresa el efector (Tsuda et al. 2012; Germain et al. 2018; Ma et al. 2018). Empleando esta aproximación, por ejemplo, se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* conteniendo efectores como AvrRpt2, AvrRpm1, AvrB y AvrPto de *P. syringae*, y se pudo establecer que esta expresión generaba una supresión de la inmunidad de la planta, haciendolas más susceptibles a la infección por *Agrobacterium* y mejorando así los ensayos de expresión transitoria del gen *GUS* (Tsuda et al. 2012). En *Arabidopsis* también se generaron plantas transgénicas para evaluar la función de 16 proteínas efectoras secretadas por el hongo *Melampsora larici-populina*. Cada línea fue analizada a través de microscopía confocal para determinar el compartimiento celular blanco de cada efector (Germain

et al. 2018). Una estrategia alternativa que también se ha empleado extensamente para el estudio de la función de efectores es el sistema de expresión transitoria empleando *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum*. Este sistema tiene una amplia aceptación por las ventajas que ofrece dentro de las cuales vale la pena destacar el ciclo de vida corto que tienen estas plantas (3-4 semanas desde semilla hasta obtener plantas completamente desarrolladas), sus hojas son fáciles de infiltrar y la hoja no muestra necrosis tras la infiltración con la mayoría de las cepas de *Agrobacterium*. En este sentido, tabaco se ha considerado como planta modelo ya que reproduce muchas de las respuestas de inmunidad observadas en otras especies vegetales (Ma et al. 2012). Varios T3Es de *Xanthomonas euvesicatoria* inducen reacciones de muerte celular en *Nicotiana*, probablemente como resultado del reconocimiento del efector de la bacteria por alguna proteína de resistencia presente en tabaco. Los efectores XopJ (Thieme et al. 2007), XopE1 (Thieme et al. 2007), XopL (Singer et al. 2013) al ser expresados transitoriamente en tabaco utilizando *Agrobacterium* logran generar una muerte celular rápida en el sitio de la infección, conocida como respuesta hipersensible (HR por sus siglas en inglés Hypersensitive Response). Un tercer sistema menos empleado, pero en ciertos casos efectivo aprovecha el hecho de que la bacteria *Pseudomonas fluorescens* 55 (*Pf55*) no posee el T3SS. De esta manera la bacteria puede ser transformada con el cósmido pLN1965 el cual contiene el T3SS de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Thomas et al. 2009). En un vector adicional se pueden clonar y expresar de manera específica los efectores objeto de estudio, para que posteriormente *Pf55* los libere dentro de la célula vegetal. Algunos efectores estudiados mediante este sistema han sido AvrB de *P. syringae* el cual elicitó HR en *N. tabacum* (Schechter et al. 2004), ó los T3Es XopE4 y XopAO1 de *Xanthomonas phaseoli* pv *manihotis* (*Xpm*) los cuales suprimen la HR (Medina et al. 2018). Finalmente, otra estrategia que ha sido empleada más puntualmente hace uso de bacterias no patógenas de una planta para liberar efectores. Tal es el caso de *X. euvesicatoria*, la cual se utilizó para liberar el TALE20 de *Xpm* en yuca (Cohn et al. 2014).

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un alimento básico, fuente de carbohidratos y rico en almidón, el cual es cultivado en zonas tropicales y subtropicales del mundo (FAO 2017). La yuca ocupa el primer lugar como fuente de calorías entre los cultivos de raíces y tubérculos (Montagnac et al. 2009). La productividad de la yuca

es afectada principalmente por enfermedades causadas por virus y bacterias (Mccallum et al. 2017). La enfermedad bacteriana más importante es la bacteriosis vascular de la yuca (CBB del inglés Cassava Bacterial Blight) causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*) (López & Bernal 2012). Esta enfermedad se ha reportado en todas las regiones donde se cultiva yuca (López & Bernal 2012). Los síntomas que se presentan son manchas angulares en las hojas, añublo (quemazón), marchitamiento, exudados y lesiones en el tallo que finalmente conducen a la muerte de la planta (Verdier et al. 1998). El desarrollo de estrategias efectivas para la obtención de plantas resistentes a la CBB requiere información acerca de la diversidad y distribución geográfica del patógeno. Por esta razón se han realizado varios estudios dirigidos hacia el conocimiento de la diversidad de *Xpm* (Verdier et al. 1993; Restrepo & Verdier 1997; Verdier et al. 1998; Wydra et al. 2004; Trujillo et al. 2014). Durante finales de los 80s, 90s y más recientemente en el periodo de 2013-2014 la poblaciones de *Xpm* se estudiaron en Sur América, África y Asia, mediante marcadores moleculares (AFLPs y VNTRs), encontrando alta diversidad del patógeno en Sur América (Verdier et al. 1993; Restrepo & Verdier 1997; Verdier et al. 1998; Restrepo et al. 2000). En Colombia, la costa Caribe es la región geográfica con más alta diversidad del patógeno (Trujillo et al. 2014). El análisis del secuenciamiento de 65 cepas de *Xpm* mostró un contenido de 18-25 T3Es incluidos los efectores tipo TALEs (Bart et al. 2012). Algunos de estos efectores como el homólogo de AvrBs2, XopR y XopAO1 fueron capaces de suprimir la inmunidad basal, mientras que XopE4 y XopAO1 inhibieron la inmunidad de tipo ETI (del inglés Effector Trigger Immunity) (Medina et al. 2018).

El primer TALE identificado en *Xpm* fue reportado por Castiblanco et al. (2013). Este TALE fue encontrado en la cepa CFBP1851 de *Xpm* y fue denominado TALE1_{xam} el cual se demostró actuar como un activador transcripcional funcional y que contribuía al crecimiento bacteriano y al desarrollo de síntomas en plantas de yuca susceptibles (Castiblanco et al. 2013). Mediante una aproximación de RNAseq se lograron identificar potenciales genes blanco de este TALE (Muñoz-Bodnar et al. 2014), sin embargo, al no disponer de una cepa mutante para este TALE no fue posible validar y demostrar que los blancos candidatos correspondan a verdaderos genes S. Estudios recientes en la cepa *Xpm* 668 permitieron identificar el contenido de TALEs de esta cepa, en donde se pudo demostrar que los TAL20Xpm668 y

TALE14Xpm668 contribuyen al crecimiento bacteriano de la bacteria en la planta. Los análisis de expresión diferencial de plantas de yuca, inoculadas con la cepa 85-10 de *Xe* conteniendo el TALE20Xpm668 en yuca mostraron que el TALE20 activa un solo gen, *MeSWEET10a*, el cual codifica para un transportador de azúcar promoviendo la virulencia (Cohn et al. 2014). Un aspecto interesante demostrado en otro estudio en donde se determinaron los blancos para el TAL14Xpm668 utilizando el sistema de liberación *Xe*, es que el TAL14CIO151 presente en la cepa CIO151 es capaz de complementar los blancos activados por TAL14Xpm668 en la cepa mutante *Xam668*ΔTAL14. Aunque los TALEs TAL14CIO151 y TAL14Xam668 difieren en un solo RVD, comparten los mismos genes importantes para el desarrollo de síntomas en plantas de yuca susceptibles (Cohn, Morbitzer, et al. 2015).

Respecto a la diversidad de los TALEs, estudios recientes de caracterización y evaluación funcional en diferentes cepas de *Xpm* colectadas durante los estudios de diversidad en el Caribe colombiano, permitieron encontrar que estas cepas poseen naturalmente de 2 a 5 TALEs, con RVDs de 13, 14, 15, 20, 21 y 22, cuya virulencia incrementa si contienen TALEs con 20 y 22 RVDs. Las predicciones bioinformáticas de los EBEs de estos TALEs, determinaron que a pesar de tener secuencias de RVDs diferentes, la afinidad de esos efectores hacia los EBEs es virtualmente la misma y pueden ser organizados en grupos (Zarate, 2015). Estudios transcriptómicos de las cepas *Xam681*, *Xam1061*, *Xam394* y *Xam395* en plantas de la variedad susceptible TMS60444, permitieron identificar los genes más inducidos blancos de los TALEs presentes en cada una de las cepas inoculadas. Los resultados encontraron mayor inducción para los genes *Manes.05G068700*, *Manes.13G045100* y *Manes.15G026800*, además de presentar EBEs para los TALEs TALE13Xam681, TALE13Xam394, TALE22Xam681 y TALE14Xam1061.

Si bien se han identificado TALomas y predicho posibles blancos es necesario dirigir esfuerzos hacia el desarrollo de sistemas que permitan estudiar la función de efectores y en particular los efectores tipo TALE dentro de la célula vegetal y de manera individual. El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes sistemas de liberación de efectores, focalizándose en los TALEs. Se evaluaron como posibles sistemas de liberación la utilización de la propia bacteria *Xpm* primero en plantas de

Nicotiana, posteriormente en plantas de yuca y la expresión mediada por *Xe* en yuca. En la mayoría de los sistemas utilizados se evaluó el efecto sobre las plantas al inocular cepas silvestres y cepas transformadas con cada uno de los TALEs (13, 14, 15, 20 y 21).

2.1.2 Materiales y métodos

Preparación del Inóculo

Las cepas de *Xpm* empleadas fueron Xpm226, Xpm306, Xpm318, Xpm522, Xpm531, Xpm681, Xpm1061, Xpm1069, Xpm1357, ORST4, Xpm150, CFBP1851, CFBP1851 Δ p44, CIO151, CIAT1241, Xpm1211, Xpm1245 y Xpm394 (Tabla 2-1-1). Los aislamientos de *Xpm* se obtuvieron mediante siembra por estría en medio LPGA (5 % extracto de levadura, 5 % peptona, 5 % glucosa y 15 % agar) a partir de stocks a -80 °C del cepario de la Universidad de los Andes. Se incubaron a 28 °C durante 48 h. Para cada cepa se tomó una colonia aislada que fue transferida a medio LPG líquido, se incubaron a 28 °C y 250 rpm durante 18 h antes de la inoculación. El inóculo fue lavado y resuspendido en MgCl₂ 10 mM hasta una DO_{600nm} = 0.2 ó 0.002, (aproximadamente 10⁸ o 10⁶ unidades formadoras de colonia) dependiendo del experimento. Para la selección de los transformantes *Xpm* con el vector pSKX1 se realizó en medio LPGA adicionado con gentamicina (20 µg/mL).

Las cepas de *Xcv* utilizadas fueron 85-10, 75-3 y 82-8, las dos primeras fueron aisladas de *Solanum lycopersicum* y la última se aisló de *Capsicum annum*. Estas cepas crecieron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. El medio utilizado fue NYG agar (5 % peptona, 3 % extracto de levadura, 20 % glicerol y 16 % agar). Al medio en que crecieron aquellas cepas transformadas con el vector pHM1 se le adicionó ampicilina (100 µg/mL).

Material vegetal

Nicotiana tabacum cv. Xanthi

Para el crecimiento de plantas de *Nicotiana tabacum*, se germinaron semillas en turba-tierra. Las plantas permanecieron en un ambiente controlado a 25 °C, la humedad relativa se mantuvo alrededor de 85% y con un fotoperiodo de 16 h Luz / 8

h oscuridad. Después de ocurrido el proceso de geminación las plantas se transplantaron y se mantuvieron bajo las condiciones anteriores por 3-4 semanas, momento en el cual se utilizaron para la inoculación.

Manihot esculenta

Se emplearon plantas adultas de las variedades TMS60444, CM6438-14, MBRA685, SG107-35 y MTAI-8. Las estacas fueron obtenidas de la colección de germoplasma del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). La temperatura del invernadero durante el día osciló entre 28-35°C y durante la noche entre 22-27°C. La humedad se mantuvo alrededor de 80 % y un fotoperíodo de 12 h luz/ 12h oscuridad. Las plantas permanecieron en bandejas con agua para permitir la continua disponibilidad de humedad.

Inoculación

Para todos los ensayos se utilizó la infiltración como técnica de inoculación, en todos los casos se seleccionaron hojas jóvenes y verdes de plantas de yuca y de tabaco. Las hojas se mantuvieron en la planta durante y después de la infiltración. La infiltración se realizó mediante una jeringa de 1 mL sin aguja permitiendo la entrada de la suspensión bacteriana. Las infiltraciones se realizaron a la temperatura del invernadero (28°C) y las plantas se mantuvieron en estas condiciones medioambientales. Se llevó a cabo la inspección visual a dos días después de la infiltración (dpi) para tabaco y a 4 dpi para yuca y el registro fotográfico.

Cada uno de los experimentos fue realizado por triplicado y repetido tres veces en diferentes períodos de tiempo.

Extracción de proteínas totales:

Las cepas de *Xpm* y *Xcv* transformadas con el vector pSKX1 conteniendo los TALEs 13A, 14B, 15B, 20C y 21A crecieron durante toda la noche en el medio respectivo y con gentamicina (20 µg/mL). A partir del medio de cultivo se tomó 1 mL, el cual fue centrifugado a 6000 rpm por 5 min, el pellet fue resuspendido en 100 µL de buffer de carga 1X denaturante (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% v/v Glicerol, 0.2 M DTT, 0.02% azul de bromofenol, pH 6.8), las muestras se calentaron a 92°C por 7 min, se les realizó vortex y un spin antes de ser cargadas en el gel.

SDS-PAGE

Las proteínas se separaron mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Para ello 10 µL de cada una de las muestras fueron cargadas en un gel concentrador de 3,9% (concentración final de acrilamida en el gel) y un gel separador de 8% (concentración final de acrilamida en el gel), manteniendo una diferencia de potencial de 120V. La visualización de las bandas se logró mediante tinción del gel en solución de Coomassie.

Western Blot

Los ensayos de inmunodetección (western blot) se realizaron empleando proteínas transferidas a membranas PVDF (Polyvinylidene fluoride), mediante electrotransferencia a 200 mA por 1 hora. La membrana PVDF y el gel a transferir se equilibraron previamente en buffer de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol 10% V/V). La detección se realizó a partir del siguiente procedimiento: a) bloqueo de la membrana por 1 hora en buffer TBST-L (leche 5%, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween 20 0,1% V/V), b) incubación durante 1 hora con el anticuerpo primario policlonal anti-TALE de conejo en TBST-L (1:10.000), c) incubación durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a peroxidasa en TBST-L (1:5000, cat No A0545 Sigma Aldrich), e) revelado con 1 ml de solución de peróxido (Kit Superscript West Femto ref 34094 Thermo) y f) las bandas se visualizaron con el analizador de imágenes ChemiDoc Touch (BioRad Ltd.). Entre cada incubación con los anticuerpos se realizaron 3 lavados sucesivos de 10 min en TBST-L.

2.1.3 Resultados

2.1.3.1 Liberación de TALEs en plantas de *Nicotiana tabacum* mediada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*

Con el objetivo de determinar la capacidad de *Xpm* de liberar efectores y en particular TALEs en células de tabaco se evaluó el efecto de la inoculación de *Xpm* en plantas de tabaco mediante la visualización de la capacidad de generar una HR. En total se inocularon 16 cepas, cuatro de referencia (CFBP1851, CFBP1851Δp44, CIO151 y CIAT1241) y 12 cepas colectadas en diferentes regiones de Colombia (Xpm226, Xpm306, Xpm318, Xpm522, Xpm531, Xpm681, Xpm1061, Xpm1069, Xpm1357, Xpm1381, Xpm1211 y Xpm1245) (Tabla 2-1-1). Al evaluar en tabaco la cepa CFBP1851

que contiene los TALEs TAL14B y TAL21A (Tabla 2-1-1), se encontró que al cabo de dos días se generó una gran mancha de color café en la zona en donde se infiltró (Figura 2-1-1A). La reacción generada por esta cepa produjo una respuesta tipo HR, indicando que el efector de *Xpm* pudo ser liberado y ejerce alguna función y/o es reconocido por proteínas de las células de tabaco. No obstante la misma cepa con una delección de 8Kb dentro del plásmido p44 la cual contiene el TAL14B (ORST4) (Castiblanco et al. 2013) es incapaz de ejecutar una respuesta de HR (Figura 2-1-1A). Estos resultados sugieren que la activación de la respuesta tipo HR puede ser consecuencia del efecto del TAL14. Para corroborar esta hipótesis se seleccionaron otras cepas de *Xpm* (Xpm306, Xpm531, Xpm318, Xpm226 y Xpm681) las cuales contienen el TAL14 (tabla 2-1-1). Las cepas se evaluaron en tabaco y los síntomas fueron monitoreados 2 días después de la inoculación, en donde se pudo observar que las cepas Xpm531, Xpm318 y Xpm306 generaron manchas de color amarillo tipo respuesta HR, mientras que las cepas Xpm681 y CIO151 no generaron HR a pesar de tener el TAL14 (Figura 2-1-1B y 2-1-1C). Por otro lado, al evaluar el efecto de la inoculación con las cepas Xpm522, Xpm1357, Xpm1381, Xpm1211 y Xpm1245, las cuales no poseen el TAL14 se pudo observar la activación de HR (Tabla 2-1-1). Estos resultados permiten afirmar que *Xpm* es capaz de introducir efectores, incluyendo TALEs, dentro de las células de tabaco y que se puede estudiar su función en un sistema heterólogo a través de la visualización de la capacidad o no de generar una HR. Adicionalmente se puede concluir que la activación de HR en tabaco no está relacionada con la presencia del TAL14 de *Xpm*.

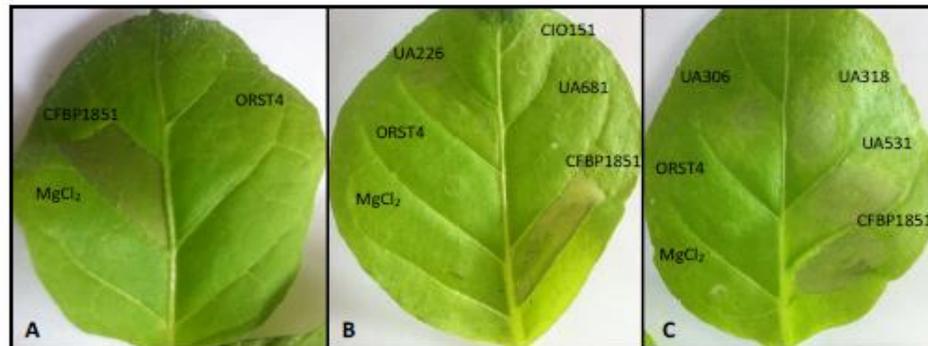
Tabla 2-1-1: Contenido de TALEs de algunas cepas de *Xpm* y su efecto en la inducción de HR.

El contenido de TALEs presentes en las cepas seleccionadas fue tomado de Zarate (2015) y la inducción de HR fue obtenida como resultado de las infiltraciones en plantas de *Nicotiana tabacum* inoculadas a una DO_{600nm} de 0.2 con las cepas de *Xpm*.

No Cepas <i>Xpm</i>	RVD							HR
	13	14	15	20	21	22		
UA226								Si
UA306								Si
UA318								Si
UA522								No
UA531								Si
UA681								No
UA1061								Si
UA1069								Si
UA1357								No
UA1381								No
CFBP1851 $\Delta p44$ (ORST4)								No
CFBP1851								Si
CIO151								No
CIAT1241								Si
UA1211								No
UA1245								No

Figura 2-1-1: Activación de una respuesta tipo HR en plantas de *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*.

Evaluación del efecto de algunas cepas de referencia (CFBP1851, CFBP1851 $\Delta p44$ y CIO151) y otras cepas colectadas en Colombia (Xpm306, Xpm531, Xpm318, Xpm226 y Xpm681) en plantas de *Nicotiana tabacum*. Las hojas fueron inoculadas a una DO_{600nm} de 0.2 y fotografiadas 2 días después de la inoculación.



A partir de los resultados obtenidos anteriormente no fue posible establecer una correlación entre el contenido de algún TALE específico y la activación de HR, por esta razón se decidió realizar un nuevo experimento para evaluar el efecto individual de cada TALE. Previamente los TALEs 13A, 14B, 15B, 20C y 21A fueron clonados en el vector de alto número de copias pSKX1 y transformados en las cepas Xpm150 y Xpm394 (Zarate 2015). La cepa Xpm150 contiene únicamente el TAL21 y fue utilizada para evaluar el efecto de los TALEs 13A, 14B, 15B y 20C, mientras que la segunda cepa Xpm394 contiene TAL13, TAL14 y TAL15 y se utilizó para evaluar el efecto de los TALEs 20C y 21A (Figura 2-1-2). Al inocular con la cepa Xpm150 silvestre se pudo observar la activación de HR pero esta respuesta disminuyó por la introducción del vector pSKX1 (Figura 2-1-3A). Al introducir uno a uno los TALEs 13A, 14B, 15B y 20C, no se pudo reestablecer la HR observada inicialmente. Al emplear la cepa Xpm394 se observó una respuesta tipo HR cuya intensidad disminuyó al inocular la misma cepa con el vector vacío. Sin embargo, al introducir el TAL20C este fue capaz de restablecer la respuesta HR. Finalmente, cuando se introdujo el TAL21A se observó una represión de la respuesta tipo HR, sugiriendo que dentro de las células de tabaco el TAL21A es capaz de reprimir la respuesta HR activada por algunos de los T3E ó TALEs presentes en la cepa 394.

Figura 2-1-2: Cepas Xpm150 y Xpm394 utilizadas para evaluar el efecto de los TALEs.

La cepa Xpm150 contiene únicamente el TAL21 y fue transformada individualmente con los TALEs 13A, 14B, 15B y 20C. La cepa Xpm394 contiene TAL13, TAL14 y TAL15 y se transformó con los TALEs 20C y 21A.

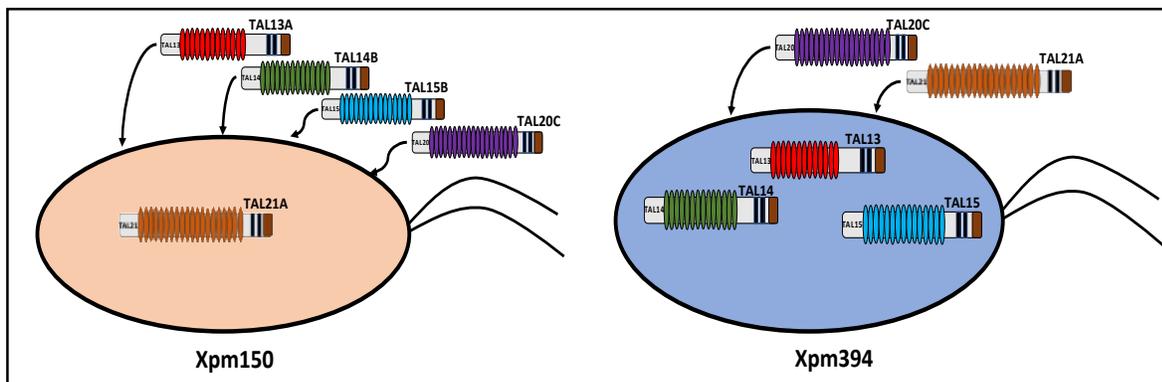
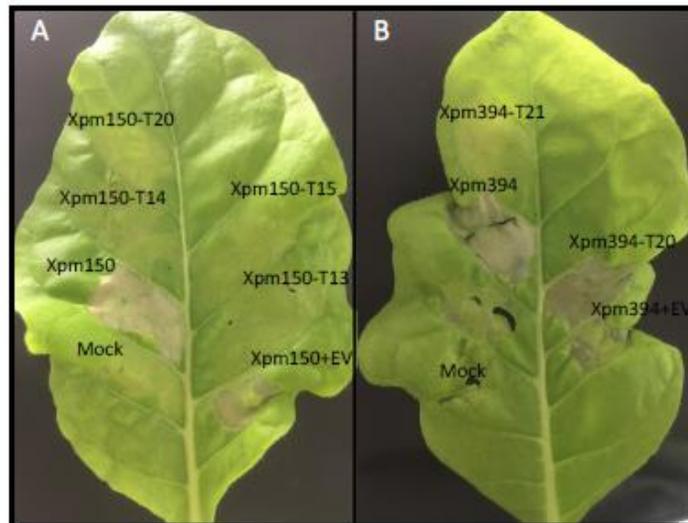


Figura 2-1-3: TAL20C activa una respuesta tipo HR en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

Evaluación del efecto de las cepas Xpm150 y Xpm394 transformadas con TALEs representativos de las cepas colombianas (13A, 14B, 15B, 20C y 21A) en plantas de *Nicotiana tabacum*. Las hojas fueron inoculadas a una DO_{600nm} de 0,2 y fotografiadas 2 días después de la inoculación.



2.1.3.2 Liberación de TALEs en plantas de yuca mediada por *Xanthomonas euvesicatoria*

La cepa 85-10 de *X. euvesicatoria* (*Xe*) se caracteriza por no contener efectores TALs. Previamente esta cepa se empleó como sistema de liberación de TALEs en yuca sin elicitar síntomas ni una HR (Cohn et al. 2014). Basados en esta información, en este trabajo se decidió apelar a este sistema para estudiar el efecto de los TALEs más conservados de las cepas colombianas en yuca. Con el objetivo de ratificar si la cepa 85-10 es la más adecuada para liberar los efectores en yuca, se seleccionaron tres cepas de *Xe* 85-10, 75-3 y 82-8, las cuales no contienen TALEs. Las tres cepas de *Xe*, junto con la cepa de referencia CIO151 de *Xpm* fueron inoculadas mediante infiltración en dos variedades de yuca (SG107-35 y TMS60444) (Figura 2-1-4). En la zona donde se infiltró la cepa CIO151, se observaron manchas acuosas alrededor del punto de inoculación y en el centro una mancha seca color café, mientras que para las tres cepas de *Xe* se observaron manchas de color marrón en la parte interna del punto de inoculación, las cuales son muy similares entre sí y a las observadas con *Xpm*. A pesar de los síntomas obtenidos con las tres cepas de *Xe* se decidió continuar con la cepa 85-10, la cual fue

transformada con el vector de amplio rango de huéspedes pHM1. Se ha demostrado que este plásmido genera una disminución de la virulencia de la cepa (Sugio et al. 2007). De esta manera se esperaba disminuir ó suprimir el fenotipo obtenido por la cepa 85-10 en yuca. El efecto de la cepa silvestre y la cepa transformada con el vector pHM1 se determinó en plantas de yuca de las variedades SG107-35 y TMS6044 las cuales fueron inoculadas con la bacteria empleando dos densidades ópticas ($DO_{600nm} = 0.2$ y 0.02) (Figura 2-1-5). En la zona infiltrada se observaron manchas secas de color marrón como las observadas con las tres cepas de *Xe* evaluadas anteriormente. Las manchas fueron más intensas en la variedad SG107-35 inoculada con la cepa silvestre a una OD_{600nm} de 0.2, mientras que la intensidad de los síntomas disminuyó drásticamente al transformar la cepa con el vector pHM1 y al inocular a una OD_{600nm} más baja (0.02). Sin embargo, los síntomas no desaparecieron. Los resultados demuestran que los síntomas generados por *Xe* en yuca pueden ser atenuados transformando la cepa con un plásmido de alto número de copias y disminuyendo la concentración del inóculo.

Figura 2-1-4: Evaluación del efecto de la inoculación de *Xe* en hojas de yuca de plantas adultas.

Cada cepa fue infiltrada en las variedades de yuca TMS60444 y SG107-35 a una DO_{600nm} de 0.2. Tres plantas fueron inoculadas con cada cepa. Como control positivo de la enfermedad se empleó la cepa CIO151 de *Xpm*. Las hojas fueron fotografiadas 4 días después de la inoculación.

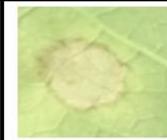
Tratamiento	Mock	<i>Xpm</i> _(CIO151)	<i>Xe</i> ₍₈₅₋₁₀₎	<i>Xe</i> ₍₇₅₋₃₎	<i>Xe</i> ₍₈₂₋₈₎
Variedad					
SG107-35					
TMS60444					

Figura 2-1-5: Síntomas generados con *Xe* cepa 85-10 con y sin el plásmido pHM1.

Cada cepa fue infiltrada en hojas de yuca de estacas de dos variedades TMS60444 y SG107-35 a una $OD_{600nm} = 0.2$ y 0.02 . Se inocularon tres plantas para cada cepa y cada OD_{600nm} obteniendo resultados muy similares. Como control positivo de la enfermedad se utilizó la cepa CIO151 de *Xpm*. Las hojas fueron fotografiadas 4 días después de la inoculación.

Tratamiento \ Variedad	Mock		<i>Xpm</i> _(CIO151)		<i>Xe</i> (85-10)		<i>Xe</i> (pHM1)	
	$OD_{600nm}: 0,2$	$OD_{600nm}: 0,02$	$OD_{600nm}: 0,2$	$OD_{600nm}: 0,02$	$OD_{600nm}: 0,2$	$OD_{600nm}: 0,02$	$OD_{600nm}: 0,2$	$OD_{600nm}: 0,02$
SG107-35								
TMS60444								

A partir de estos resultados se decidió emplear la cepa 85-10 de *Xe* transformada con el vector de alto número de copias pSKX1 a la densidad óptica más baja (OD_{600nm} de 0.02) para liberar los TALEs 13A, 14B, 15B, 20C y 21A en hojas de yuca de las variedades MTAI-8, CM6438-14, MBRA685, SG107-35 y TMS60444. En primera instancia se buscó determinar la capacidad de *Xe* de expresar cada uno de los diferentes TALEs. Para ello se llevó a cabo un Western blot sobre extractos bacterianos de *Xe* transformada con cada uno de los TALEs individualmente y se utilizó como anticuerpo primario un anti-TALE (Figura 2-1-6). Mediante esta técnica se logró evidenciar la expresión de cada una de estas proteínas de acuerdo al tamaño esperado, siendo de 108 kDa para TAL13A, 111 kDa para TAL14B, 116 kDa para TAL15B, 133 kDa para TAL20C y 137 kDa para TAL21A (Figura 2-1-6). Posteriormente se determinó el efecto individual de cada uno de los TALEs en las plantas de yuca (Figura 2-1-7). En las variedades CM6438-14, SG107-35, MBRA685 y MTAI-8 no se observó una reducción significativa en los síntomas entre la cepa silvestre y la cepa con el vector vacío (Figura 2-1-7). Para cada una de las cinco variedades de yuca inoculadas se realizó un análisis del efecto individual de cada TALEs, para el caso de las variedades SG107-35 y CM6438-14 se observaron manchas café intensas, las cuales no presentaron mayores cambios con ninguno de los TALEs inoculados. En la variedad MTAI-8 las manchas café obtenidas con el vector vacío disminuyeron con los TALEs 13A, 14B y 20C y se intensificaron tras la inoculación con

Figura 2-1-7: Liberación de TALEs en yuca empleando *Xanthomonas euvesicatoria*.

La cepa 85-10 fue utilizada para evaluar el efecto de los TALEs 13, 14, 15, 20 y 21 en hojas de yuca de 5 variedades (MTAI, CM6438-14, MBRA685, SG107-35 y TMS6044), usando DO_{600nm} de 0.02. Los síntomas fueron fotografiados a los 4 dpi.

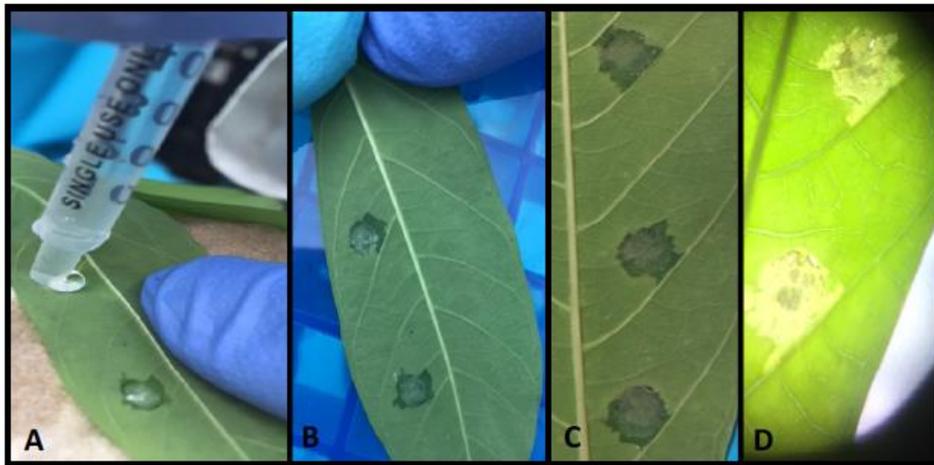
Tratamiento Variedad	Mock	Xe	Xe (pSKX1)	Xe (TAL13A)	Xe (TAL14B)	Xe (TAL15B)	Xe (TAL20C)	Xe (TAL21A)
MTAI-8								
CM6438-14								
MBRA685								
SG107-35								
TMS60444								

2.1.3.3 Liberación de TALEs en plantas de yuca mediada por *Xanthomonas phaseoli* pv *manihotis* – yuca

Con el objetivo de evaluar la infiltración como técnica de inoculación en yuca, se evaluó inicialmente la cepa Xpm318 la cual contiene naturalmente los TALEs 13, 14, 20 y 22. Estudios previos han demostrado que esta es una cepa virulenta (Zarate 2015). Tras la inoculación con la bacteria Xpm318 en la variedad TMS6044 se observó la formación de manchas acuosas alrededor del punto de infiltración, síntomas típicos de la enfermedad los cuales fueron obtenidos bajo condiciones de alta humedad relativa antes y después de la inoculación (Figura 2-1-8C y D). Estos resultados permitieron corroborar la susceptibilidad de la planta, como se ha reportado previamente mediante inoculación en tallo y seguimiento del progreso de la enfermedad en una ventana de 30 dpi (Trujillo et al. 2014).

Figura 2-1-8: Síntomas CBB mediante infiltración en hojas de yuca

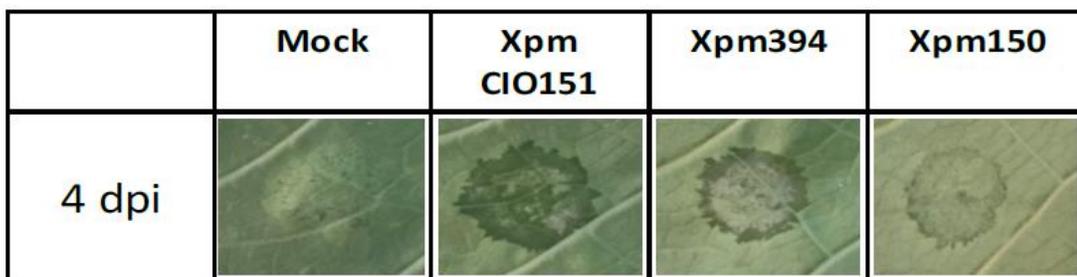
A. Demostración de la infiltración en hoja utilizando jeringa sin aguja. B. Fotografía mostrando la suspensión bacteriana que ingresa en la hoja con esta técnica. C. Síntomas 2 días después de la inoculación fotografía tomada con luz natural. D. Síntomas 4 días después de la inoculación fotografía tomada con alto contraste de luz.



Una vez verificado que la infiltración es una técnica válida para inocular *Xpm* en hojas de yuca, se evaluaron algunas cepas de *Xpm* las cuales varían en el contenido de TALEs y por tanto en su virulencia (Zarate 2015). Las cepas seleccionadas fueron CIO151 la cual contiene cinco TALEs, la cepa *Xpm*394 la cual contiene tres TALEs y la cepa *Xpm*150 que contiene solamente un TALE (Tabla 2-1-1). En la Figura 2-1-9 se observa el efecto de la inoculación de estas tres cepas en plantas de la variedad TMS60444. Después de la inoculación con la cepa CIO151 se generaron mayor cantidad de manchas acuosas, mientras que con la cepa *Xpm*150 la cantidad de manchas acuosas fue la más baja de las tres cepas. Los resultados obtenidos con las tres cepas de *Xpm* permitieron evidenciar la colonización de todas las cepas en el tejido de la planta usando como técnica la infiltración y diferentes síntomas al inocular cepas las cuales varían en el contenido de TALEs. Los síntomas incrementaron en aquellas cepas con mayor contenido de TALEs.

Figura 2-1-9: Comparación de los síntomas de CBB utilizando tres cepas de *Xpm* que varían en el contenido de TALEs.

Plantas de la variedad TMS60444 fueron inoculadas por infiltración con las cepas CIO151, *Xpm394* y *Xpm150* a una $DO_{600nm}:0.2$, los síntomas fueron tomados 4 días después de la inoculación.



Una vez determinado que la infiltración es un sistema adecuado para introducir *Xpm* en hojas de yuca permitiendo la colonización del tejido vegetal, se procedió a evaluar el efecto de la inoculación por infiltración con las cepas *Xpm394* y *Xpm150* silvestres y transformadas con los TALEs 13A, 14B, 15B, 20C y 21A y así para determinar si este sistema de inoculación permite liberar efectores en las células de yuca. Antes de realizar las inoculaciones en yuca se verificó la capacidad de *Xpm* para expresar cada uno de los diferentes TALEs. Para ello se llevó a cabo un Western blot sobre extractos de la bacteria *Xpm* transformada con cada uno de los TALEs individualmente y se utilizó como anticuerpo primario un anti-TALE (Figura 2-1-10). Mediante esta técnica se logró corroborar la expresión de cada una de estas proteínas de acuerdo al tamaño esperado (Figura 2-1-10). Considerando que las cepas *Xpm394* y *Xpm150* expresan correctamente cada uno de los TALEs se procedió a utilizar las cepas silvestres y las cepas transformadas con los TALEs para inocular las variedades de yuca MTAI-8, CM6438-14, MBRA685, SG107-35 y TMS6044 (Figura 2-1-11). La cepa *Xpm150* silvestre mostró diferencias con la cepa transformada con el vector vacío (EV) en todas las variedades de yuca, las manchas acuosas generadas por la cepa silvestre alrededor del punto de infiltración disminuyeron por efecto del vector vacío. En el caso de las hojas de yuca inoculadas con las cepas transformadas con los TALEs se observaron diferencias entre cada efector y entre las variedades. En las plantas inoculadas con la cepa *Xpm150* transformada con TAL13A, desaparecieron casi por completo las manchas acuosas generadas por efecto del EV y se generaron manchas café muy similares a la HR. La cepa que contenía el TAL14B reactivó nuevamente los síntomas incluso más que los

Figura 2-1-11: Liberación de TALEs en yuca utilizando *Xpm*.

Evaluación del efecto de dos cepas (*Xpm150* y *Xpm394*) transformadas con los TALEs 13A, 14B, 15B, 20C y 21 A en plantas de yuca de las variedades MTAI-8, CM6438-14, MBRA685, SG107-35 y TMS6044. Las hojas fueron inoculadas a una DO_{600nm} : 0.2 y fotografiadas 4 días después de la inoculación.

Variedad Tratamiento	MBRA685	CM6438-14	SG107-35	TMS60444	MTAI-8
Mock					
<i>Xpm150</i>					
<i>Xpm150</i> (pSKX1)					
<i>Xpm150</i> (TAL13A)					
<i>Xpm150</i> (TAL14B)					
<i>Xpm150</i> (TAL15B)					
<i>Xpm150</i> (TAL20C)					
<i>Xpm394</i>					
<i>Xpm394</i> (pSKX1)					
<i>Xpm394</i> (TAL21A)					

2.1.4 Discusión

La función de muchos T3Es ha sido determinada utilizando aproximaciones en donde se ha utilizado el hospedero natural o modelos heterólogos como tabaco. Al seleccionar el hospedero natural es posible emplear la expresión estable como técnica para expresar constitutivamente o condicionalmente la proteína efectora en todos los tejidos de la planta, no obstante esta alternativa requiere de tiempos largos para generar una planta transgénica y un sistema de regeneración, lo que hace de esta estrategia laboriosa y demorada (Hwang et al. 2017). Si por el contrario se selecciona un modelo heterólogo para la evaluación rápida de una proteína efectora, es posible utilizar plantas modelo de *Nicotiana* para expresar transitoriamente y de manera focalizada la proteína, usando tiempos cortos y con métodos de inoculación fáciles (Nanjareddy et al. 2016). Alternativamente es posible mantener el hospedero natural y utilizar un patógeno filogenéticamente cercano el cual no contenga idealmente los efectores objeto de estudio, de tal forma que el sistema permita la evaluación del efector de manera individual (Cohn et al. 2014). En este estudio en particular se evaluaron diferentes sistemas con el objetivo de liberar TALEs dentro de las células en plantas y observar respuestas diferenciales en las plantas, no obstante, no se utilizó la expresión estable debido a los tiempos largos que se requieren y en su lugar se usaron los patógenos *Xpm* y *Xe* para liberar los TALEs en plantas de *N. tabacum* y de yuca. Los resultados obtenidos empleando las diferentes estrategias de liberación de efectores fueron variados. Sin embargo, de manera consistente se observó que el fenotipo obtenido tanto en *Nicotiana* como en yuca fue una HR ó lo que se denominó respuesta tipo HR para el caso de yuca, dada su similitud con la HR reportada en otras plantas modelo (Jordan et al. 2006; Strauss et al. 2012; Tian et al. 2014; C. Wang et al. 2015). Otros fenotipos observados fueron la supresión de HR y las manchas acuosas características de la CBB con el patosistema *Xpm*-yuca. En el caso de las plantas de tabaco inoculadas con *Xpm* se logró observar activación ó no de HR por parte de varias cepas de *Xpm*. No obstante, cuando se utilizó este sistema para liberar los TALEs y establecer una correlación entre el contenido de un TALE en específico y el fenotipo, fue difícil porque la mayoría de los TALEs suprimieron la HR, incluso si la cepa había sido transformada únicamente con el vector vacío (Figura 2-1-2). Estos resultados indican que probablemente existe alguna interferencia en la planta al sobreexpresar los TALEs con el

vector pSKX1 (Triplett et al. 2016). No obstante, este sistema ha sido ampliamente utilizado para el estudio de muchos efectores de *Pseudomonas* sp. (Chisholm et al. 2005; Lozano-durán et al. 2014; Schultink et al. 2017), *Xanthomonas* sp. (Schultink et al. 2017; Adlung et al. 2016; Qin et al. 2018) e incluso de oomycetes como *Phytophthora* sp. (Mafurah et al. 2015; Yin et al. 2017).

La cepa 85-10 de *X. euvesicatoria* ha sido utilizada ampliamente para estudiar la función de T3E (Thieme et al. 2007; Schulze et al. 2012; Singer et al. 2013; Adlung et al. 2016; Schultink et al. 2017) y para liberar TALEs en yuca (Cohn et al. 2014). En los experimentos donde se infiltró esta cepa se encontró la activación de respuesta por parte de la planta, efecto que disminuyó con la variedad, una DO_{600nm} más baja y con la transformación del vector pHM1 (Figura 2-1-5). No obstante, la respuesta en planta no desapareció. Estos resultados no son comparables con un reporte en donde se utilizó esta cepa para liberar los TALEs en yuca, sin generar ningún efecto en la planta (Cohn et al. 2014). Algunas causas que podrían explicar los resultados encontrados podrían ser la metodología de inoculación, la DO empleada, las condiciones atmosféricas de las plantas posteriores a la inoculación, etc. La principal diferencia entre la metodología utilizada en este trabajo y la reportada radica en las heridas que se hacen a las hojas previas a la infiltración (Cohn, Shybut, et al. 2015), sin embargo esta diferencia no explica los fenotipos observados ya que en ambos casos se asegura el ingreso del inóculo en el área de la jeringa (Figura 2-1-9). La segunda causa que podría ocasionar cambios en los resultados son las condiciones ambientales de las plantas, en esta investigación las plantas fueron mantenidas en condiciones de humedad relativa alta antes y después de la inoculación, condiciones que favorecen la proliferación y el desarrollo de muchos microorganismos (Aung et al. 2017). Estas condiciones pudieron favorecer a *Xe* y la generación de los síntomas que se observaron en las plantas de yuca durante este trabajo.

En yuca si bien se han estudiado algunos T3E (Medina et al. 2018) y se han identificado TALEs y sus blancos funcionales (Bart et al. 2012; Cohn, Morbitzer, et al. 2015; Zarate 2015; Mora 2017), aún queda mucho por conocer sobre la biología de los efectores. Los estudios sobre poblaciones de *Xpm* han permitido caracterizar el TALoma de algunas cepas y se han predicho algunos de sus genes blanco (Bart et al. 2012; Zarate 2015). Un posible efecto que pueden generar los efectores es la activación de síntomas de susceptibilidad ó de resistencia, caracterizada por una HR en la planta (Boch & Bonas 2010). En el caso particular de los TALEs la activación de la HR puede ser consecuencia ya sea del

reconocimiento del TALE por una proteína R o por la activación de la expresión de un gen ejecutor. Sin embargo, no se cuenta con un estudio del efecto de esos TALEs en planta debido a que no existe un método estandarizado y de amplia difusión que permita liberarlos dentro de plantas de yuca u otros sistemas heterólogos como tabaco. En este trabajo se buscó llenar este vacío a través de la evaluación de la liberación de TALEs de *Xpm* en tabaco, el uso de *Xe* como vehículo de infección en plantas de yuca y mediante *Xpm* directamente sobre plantas de yuca. Si bien con los tres sistemas se pudieron obtener resultados promisorios, el más adecuado es el de *Xpm* en yuca porque es posible: i) estudiar el patosistema natural causante de la CBB. ii) evaluar la respuesta diferencial de la planta hacia distintas proteínas efectoras de un patógeno adaptado como *Xpm* spp. iii) determinar el grado de virulencia de una cepa en una variedad específica de yuca o iv) identificar factores de avirulencia y virulencia en yuca. El estudio del patosistema natural es una de las razones más importante, al momento de seleccionar alguna metodología para el estudio de la interacción *Xpm*-yuca, ya que *Xpm* ha evolucionado para atacar, sobrepasar el sistema de reconocimiento y mediar la supresión o activación de los mecanismos de resistencia de la planta. De ahí la necesidad de seleccionar sistemas lo más cercanos al patosistema de estudio.

La infiltración facilita el seguimiento de los síntomas causados por efectores y se puede aplicar de manera rápida. Aunque la infiltración se ha logrado en algunos casos, se requiere realizar pequeñas heridas para lograr el ingreso de la solución debido al grosor de las hojas, lo cual puede afectar los síntomas o efectos de los T3Es bajo estudio (Cohn, Shybut, et al. 2015). En este trabajo se evaluaron diferentes condiciones ambientales lo que permitió establecer que un parámetro crítico para la infiltración es la humedad. Al establecer un cuarto húmedo y someter las plantas por 24 horas antes de la inoculación se crearon las condiciones adecuadas para poder llevar a cabo la infiltración de manera adecuada y sencilla, sin necesidad de causar heridas significativas en las hojas de las plantas. Esto se considera un gran éxito puesto que durante varios años se ha intentado estandarizar este método (Verdier y López, comunicación personal). La infiltración posee la ventaja de ser sencilla, permite la evaluación de varias muestras al mismo tiempo y en la misma planta, además los síntomas aparecen al poco tiempo (2 a 4 días). Con este método fue posible estudiar y diferenciar el efecto de algunos TALEs. Sin embargo, la manera más limpia para poder estudiar la función de TALEs es a través de la inoculación de una cepa *Xpm* sin TALEs y compararlo cuando se le introduce el TALE bajo estudio. Existen reportes de

estrategias para mutar TALEs (Shybut 2015) y en nuestro laboratorio han sido varios los esfuerzos para generar una cepa de *Xpm* sin TALEs, pero los resultados no han sido positivos. Actualmente se cuenta con una cepa con estas características obtenida mediante dos metodologías, la primera consistió en una doble recombinación homóloga para eliminar uno de los dos TALEs que contenía la cepa y la segunda metodología involucró una mutación insercional para interrumpir el TALE restante. La cepa resultante podría ser utilizada en posteriores estudios. Una segunda posibilidad es buscar alguna cepa que naturalmente no contenga TALEs. Sin embargo, este no ha sido el caso hasta el momento para *Xpm*. No obstante, en otros sistemas se han encontrado cepas con estas características por ejemplo en *X. campestris* pv. *campestris* cepa 8004, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* cepa 85–10 y en cepas norteamericanas de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Boch & Bonas 2010; Erkes et al. 2017).

Mediante el sistema de liberación de efectores por infiltración utilizando *Xpm* se pudieron identificar algunos aspectos interesantes respecto a los TALEs. En este trabajo se evaluaron TALEs de diferentes tamaños (13A, 14B, 15B, 20C y 21A) y se seleccionaron las como *Xpm394* y *Xpm150* que contenían exclusivamente unos u otros TALEs para introducir individualmente un TAL del grupo contrario y así tratar de establecer una asociación entre la presencia de un TALE específico y un fenotipo. Una vez estandarizado el método de infiltración se logró asegurar que los TALEs estaban siendo introducidos de manera indirecta por el fenotipo observado. En la infiltración en hojas adultas se evidenciaron diferencias en la virulencia de las bacterias, a través del desarrollo de mayor ó menor área de las manchas acuosas (Figura 2-1-11). También se observó un incremento en los síntomas por parte de los TALEs 14 y 20, resultados que concuerdan con reportes previos que han demostrado la importancia de ambos TALEs para la virulencia de *Xpm* (Castiblanco et al. 2013; Cohn et al. 2014; Cohn, Morbitzer, et al. 2015). Además, se destaca la reducción considerable de los síntomas por parte de los TALEs 13, 15 y 21 en algunas de estas variedades. A futuro por ejemplo sería interesante determinar cuál ó cuales son las proteínas de las células vegetales capaces de interactuar con cada uno de los TALEs evaluados. Esto con el objetivo de conocer los mecanismos que utiliza la bacteria para infectar y proliferar y las proteínas que utiliza la planta para su defensa. Una vez identificadas estas proteínas sería posible generar nuevas fuentes de resistencia utilizando el mecanismo acción de los TALEs.

En conclusión, este trabajo permitió identificar que la mejor metodología para liberar efectores, en particular TALEs es mediante infiltración en hojas de yuca bajo condiciones de alta humedad. Las inoculaciones en planta de los TALEs 13A, 14B, 15B, 20C y 21A, permitieron observar respuestas diferenciales para cada uno los TALEs en plantas de yuca. Algunos TALEs como el 14 y 20 aumentaron los síntomas, mientras que los TALEs 13, 15 y 21 los disminuyeron.

2.2 Factores que afectan la expresión transitoria del gen *GUS* en yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

2.2.1 Introducción

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia Euphorbiaceae, la cual se cultiva en regiones tropicales y subtropicales por el alto contenido de almidón en sus raíces (Ospina & Ceballos, 2012). Este almidón es usado como fuente de carbohidratos para la dieta humana, para la producción de bioetanol y en industrias como la textil, de alimentos y de combustible (FAO, 2017). La yuca se ha convertido en un cultivo básico para aproximadamente 800 millones de personas en países en vía de desarrollo (Rosenthal & Ort, 2011; FAO, 2017). Su importancia ha impulsado diferentes investigaciones encaminadas a dar luces sobre las bases moleculares que conduzcan al mejoramiento de este cultivo, reducir el ataque de patógenos o mejorar las condiciones de su producción. De manera general, una de las técnicas que ha sido empleada para el estudio de la función de genes ha sido la expresión transitoria (Jelly *et al.*, 2014).

La expresión transitoria en plantas es una técnica utilizada para el estudio de localización subcelular de proteínas (Aung *et al.*, 2017; Cheng *et al.*, 2017), la función de promotores, silenciamiento de genes (Matsuo & Matsumura, 2017), la interacción proteína-proteína y la transducción de señales (Jelly *et al.*, 2014; Yasuda *et al.*, 2017). Comparada con la expresión estable, la expresión transitoria es un sistema rápido, sencillo y eficiente donde se puede obtener altos niveles de expresión de una proteína (Nanjareddy *et al.*, 2016).

Existen varios métodos para evaluar la expresión transitoria de un gen en una planta, como la transfección de protoplastos (Luong *et al.*, 1995; Nanjareddy *et al.*, 2016), el bombardeo de partículas (Takemoto & Jones, 2014) y la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* (agroinfiltración) (Takemoto & Jones, 2014). Entre estos tres métodos la agroinfiltración es más sencilla por cuanto no requiere la preparación de protoplastos, como tampoco el uso de equipos costosos (pistola de biobalística ó electroporador). Además, permite realizar ensayos funcionales de genes con altos rendimientos y tiempos cortos comparada con la expresión estable (Kapila *et al.*, 1997). La agroinfiltración consiste en el proceso de forzar el ingreso de una suspensión de *Agrobacterium*

tumefaciens al interior de un tejido de la planta empleando una jeringa (Solliman *et al.*, 2017). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en diferentes estudios en un amplio número de especies de plantas, incluyendo papa (*Solanum tuberosum*) (Du *et al.*, 2014), Iridaceae (*Dierama erectum*) (Koetle *et al.*, 2017), lechuga (*Lactuca sativa*) (Wroblewski *et al.*, 2005), uva (*Vitis vinifera*) (Jelly *et al.*, 2014), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Chetty *et al.*, 2013), soya (*Glycine max*) (Li *et al.*, 2017), *Arabidopsis thaliana* (Lee & Yang, 2013), Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) (Cui *et al.*, 2017), entre otros. Estos estudios han demostrado que la expresión transitoria en plantas difiere entre monocotiledóneas y dicotiledóneas y que es afectada por el tejido de la planta, el plásmido y la compatibilidad hospedero-patógeno (Shah *et al.*, 2013; Wroblewski *et al.*, 2005).

En yuca se han realizado algunos estudios para evaluar la expresión transitoria del gen *GUS* en embriones somáticos, empleando electroporación (Luong *et al.*, 1995) en protoplastos mediada por PEG (polietilenglicol) (Wu *et al.*, 2017) en hojas de plantas adultas mediante bombardeo de micropartículas (Franche *et al.*, 1991) y en hojas de plantas de yuca endurecidas (Díaz *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito un protocolo de agroinfiltración para plantas adultas. Este trabajo se centra en la optimización de algunos parámetros con el objetivo de mejorar la expresión del gen *GUS*, tales como el tiempo post- inoculación, el efecto de diferentes cepas de *Agrobacterium*, la introducción de un gen de virulencia y el efecto en diferentes variedades de yuca.

2.2.2 Materiales y métodos

Material vegetal

Se emplearon plantas cultivadas “*in vitro*” de la variedad MCOL1505 y plantas adultas de las variedades TMS60444, MCOL1505, MCOI2215, SG107-35, MTA1 y TMS30572. Tanto las plantas adultas como las plantas cultivadas “*in vitro*” fueron obtenidas de la colección de germoplasma del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Plantas cultivadas *in vitro* de un mes o con mínimo cuatro entrenudos se transfirieron a suelo y se mantuvieron en el invernadero de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. La temperatura del invernadero durante el día osciló entre 28-35°C y durante la noche entre 22-27°C. La humedad se mantuvo alrededor de 70% y con un fotoperíodo de 12 h luz/ 12h oscuridad. Las plantas permanecieron en bandejas con agua para permitir la continua disponibilidad de humedad.

Cepas de *Agrobacterium tumefaciens*.

Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas fueron GV3101, AGL1, EHA105 y C58C1 (Tabla 2-2-1). Para cada una de estas cepas se prepararon células competentes empleando la metodología descrita por Zottini *et al.* (2008). Las cepas fueron electroporadas con el plásmido pCambia1305.2 (Canberra, Australia), el cual contiene el gen *gusPlus* en el ADN-T interrumpido por un intrón de catalasa, con el objeto de evaluar la expresión del gen producido por la planta. La selección se realizó en medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, agar 15 g/L) utilizando los antibióticos para cada cepa (Tabla 2-2-1) y kanamicina (50 µg/mL) para la selección del plásmido.

Tabla 2-2-1: Detalles de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* empleadas

Cepa de <i>Agrobacterium</i>	Plásmido Ti	Opina	Gen Marcador
AGL1	pTiBo542DT-ADN	Succinamopina	Rifampicina, Carbenicilina
EHA105	pEHA105 (pTiBo542DT-ADN)	succinamopina	Rifampicina
GV3101	Curada	Nopalina	Rifampicina
C58C1	Curada	Nopalina	Rifampicina

Cultivo de *Agrobacterium*

De cada una de las cepas de *Agrobacterium* se tomó una colonia, se inoculó en medio LB con rifampicina a 100 µg/mL, kanamicina a 50 µg/mL y se incubó a 28°C y 250 rpm en oscuridad hasta que alcanzó una $DO_{600nm} = 0,8$ ó 1,0. El cultivo de *Agrobacterium* fue colectado y centrifugado a 3000 rpm por 10 min, el sobrenadante fue descartado y se realizó un lavado con la solución de infiltración a una concentración 0,5 X (MES 5 mM, $MgCl_2$ 5 mM, acetosiringona 75 µM, pH 5.6). El cultivo fue centrifugado nuevamente y resuspendido en solución de agroinfiltración 1X (MES 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM, acetosiringona 150 µM, pH 5.6), hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,8 ó 1,0 (dependiendo del experimento) y se incubó a 18°C por 3 horas.

Metodologías para introducir *Agrobacterium* en hojas de yuca

Para los ensayos de agroinfiltración se utilizaron plantas cultivadas *in vitro* y posteriormente endurecidas, se seleccionaron hojas jóvenes y verdes. Las infiltraciones

se realizaron a temperatura ambiente (20°C), por triplicado y las plantas se mantuvieron en estas condiciones hasta la realización de la tinción GUS.

Vacío (VA)

En esta técnica las plantas endurecidas fueron sumergidas en 100 mL del cultivo de *Agrobacterium* descrito anteriormente y se les aplicó vacío. El vacío fue mantenido a un mínimo de 20 mmHg por 1 min y fue liberado lentamente. Este proceso se repitió tres veces con cada muestra. El excedente de la solución fue eliminado de las hojas usando papel filtro (Cui *et al.*, 2017; Kapila *et al.*, 1997).

Herida más vacío (HE+VA)

Previo a la aplicación de vacío en las hojas de las plantas, se realizaron varias punciones pequeñas cerca al nervio central por el haz de la hoja, empleando una aguja. Posteriormente se realizó el procedimiento de vacío descrito en Díaz *et al.* (2014).

Herida más aplicación del inóculo (HE+IN)

En esta metodología se realizaron heridas cerca al nervio central de la hoja usando una aguja y el inóculo de la bacteria fue esparcido sobre la hoja mediante un copo estéril.

Infiltración (IF)

La infiltración se realizó con una jeringa de 1 mL sin aguja, permitiendo la entrada de la solución por el lado abaxial de la hoja (Schöb *et al.*, 1997). Las hojas se mantuvieron en la planta durante y después de la agroinfiltración y se colectaron justo antes de realizar la tinción para visualizar la actividad de la enzima β -glucuronidasa (producto del gen *GUS*). En dependencia del estadio de la planta, la expresión del gen *GUS* fue evaluada en las hojas inoculadas, dos días post inoculación (dpi) para plantas endurecidas y de 5 a 7 dpi para plantas adultas.

Evaluación de la expresión del gen *GUS*

Las hojas de las plantas inoculadas se separaron y se sumergieron en el buffer X-Gluc (NaH₂PO₄ 0.02 M, Na₂HPO₄ 0.03 M, K₃Fe(CN)₆ 0.25 mM, K₄Fe(CN)₆ 0.25 mM, tritón X-100 0.5 % (v/v), DMSO 10 % (p/v) y X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucuronido) 1 mg/mL (Sigma, St. Louis, MO, USA). Las muestras fueron ubicadas en una cámara de vacío durante 15 y 30 min (dependiendo del ensayo) a una presión de 20 mmHg y

se incubaron a 37°C durante 16 h sin agitación (Jefferson *et al.*, 1987). Como control positivo se evaluó la expresión del gen *GUS* en plantas de *Nicotiana tabacum* y como control negativo la expresión del vector vacío en la misma planta.

Conjugación triparental para introducir un gen de virulencia en la cepa de *Agrobacterium* GV3101.

Para realizar la conjugación triparental se empleó *Escherichia coli* HB101 como cepa donadora y movilizadora y la cepa GV3101 de *Agrobacterium* como cepa receptora. La cepa donadora fue transformada con el plásmido pTiBo542 que contenía el gen *VirG*, la cepa movilizadora con el plásmido movilizador en trans pRK2013 y la receptora contenía previamente el plásmido pCAMBIA1302.5 con el gen *GUS*. Tanto la cepa donadora como la cepa movilizadora fueron incubadas a 37°C por 16 horas y la cepa receptora a 28°C por 48 horas. Pasado este tiempo las tres cepas fueron mezcladas en proporción 5:1:1 receptor:donador:movilizador, esta mezcla fue sembrada en LB e incubada toda la noche a 28°C. Transcurrido el tiempo la mezcla fue resuspendida en LB con rifampicina, lavada y sembrada en medio sólido con Rf-Kan-Spec-Gen para obtener colonias aisladas.

2.2.3 Resultados

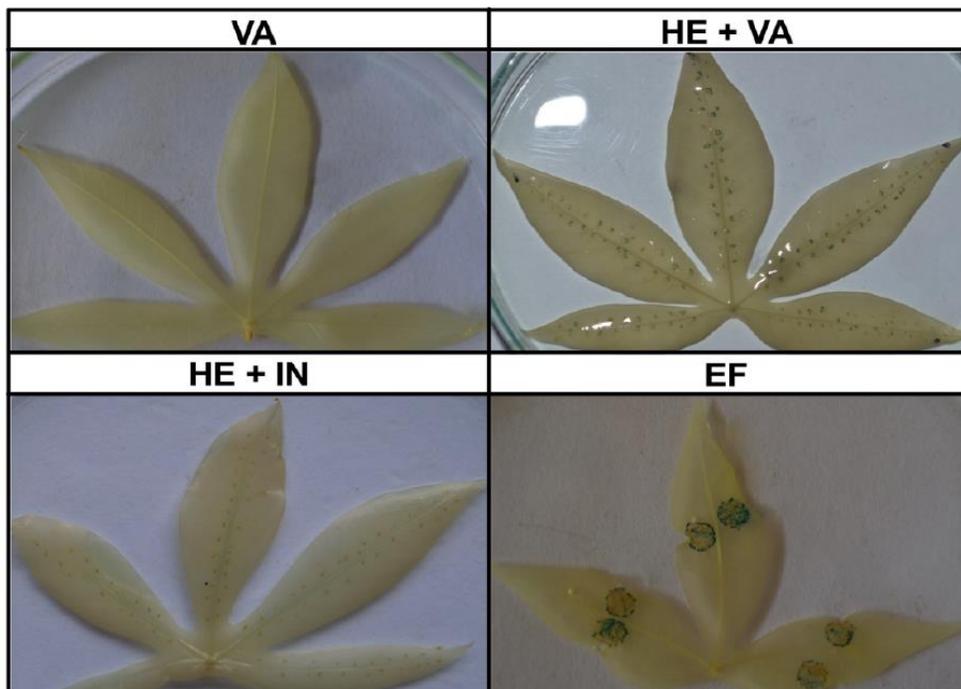
2.2.3.1 Evaluación de diferentes metodologías para introducir *Agrobacterium tumefaciens* en hojas de yuca.

Para determinar la capacidad de *Agrobacterium* de introducir el ADN-T en las células de yuca, estas fueron tratadas con una suspensión de la bacteria ya sea por vacío (VA), herida más vacío (HE+VA), herida más aplicación del inóculo (HE+IN) e infiltración (IF). La actividad del gen que codifica para la β -glucoronidasa solo se evidenció en dos de las cuatro metodologías utilizadas, HE+VA e IF mientras que en los tratamientos con VA y HE+IN no se observó la coloración azul característica del gen *GUS* (Figura 2-2-1). En el tratamiento HE+VA se evidenció una coloración azul cobalto, solamente alrededor de los puntos donde se generaron las heridas y a pesar de aplicar vacío no se observó la difusión del X-gluc más allá del punto de origen de la herida. En el caso de IF, se observaron manchas azules de mayor intensidad y una mayor área teñida alrededor del punto de inserción del X-gluc. Los resultados demostraron el

ingreso de la bacteria en la hoja en aquellas metodologías en donde se generó una fuerte presión mecánica. La infiltración fue la técnica que permitió el ingreso de una mayor cantidad de bacteria y por esta razón se seleccionó para los experimentos subsiguientes.

Figura 2-2-1: Evaluación de la coloración GUS en hojas de yuca inoculadas con *A. tumefaciens* usando diferentes metodologías.

Plantas de yuca endurecidas de la variedad TMS60444 fueron inoculadas mediante VA: vacío, HE+VA: herida más vacío, HE+IN: herida más aplicación del inóculo e IF: infiltración. Se empleó *A. tumefaciens* cepa GV3101 a una $DO_{600nm}:0,3$. La coloración GUS fue realizada dos días después de la inoculación.



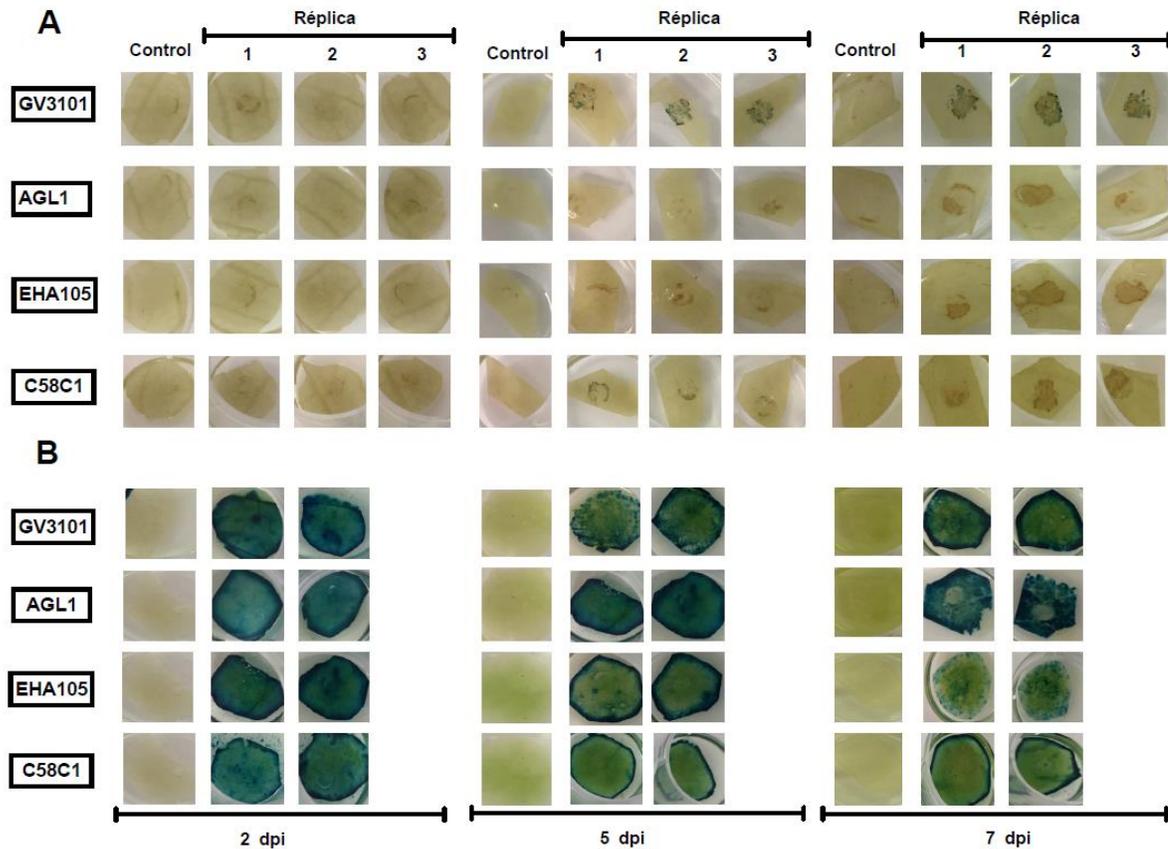
2.2.3.2 Efecto de la cepa de *Agrobacterium* y del tiempo post inoculación

Una vez seleccionada la metodología de inoculación, se decidió evaluar el efecto de otras cepas ya que es un factor determinante para la expresión transitoria de un gen (Chetty *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017). Dos días después de la inoculación (dpi) con las cepas AGL1, EHA105, GV3101 y C58C1, las hojas no mostraron la coloración azul (figura 2-2-2A). Tras la inoculación con las cepas AGL1, EHA105 y C58C1 se observaron

manchas marrón típicas de una respuesta necrótica por parte de la planta desde los 2 hasta 7 dpi. Sin embargo, al realizar la evaluación de la actividad del gen *GUS* a los 5 y 7 dpi se observó una coloración azul cobalto en las hojas inoculadas con la cepa GV3101. En el caso de las plantas de tabaco empleadas como control se presentó una clara actividad de la enzima β -glucoronidasa en las hojas infiltradas con las cuatro cepas a los 2 dpi (Figura 2-2-2B). Esta actividad disminuyó a los 5 y 7 dpi. Estos resultados indican que las cepas AGL1, EHA105 y CS8C no son adecuadas para los ensayos de expresión transitoria en yuca bajo las condiciones evaluadas.

Figura 2-2-2: Determinación del tiempo y de la cepa de *A. tumefaciens* óptimos para la detección de la expresión del gen *GUS* en hojas de yuca.

A. Plantas de yuca adultas de la variedad MCOL1505 fueron inoculadas con cuatro cepas de *Agrobacterium* GV3101, AGL1, EHA105 y C58C1 a una $DO_{600nm}:1,0$. La coloración *GUS* fue realizada 2, 5 y 7 días después de la inoculación. **B.** Plantas de *Nicotiana tabacum* infectadas con los mismos tratamientos los cuales fueron utilizados como controles positivos del experimento.

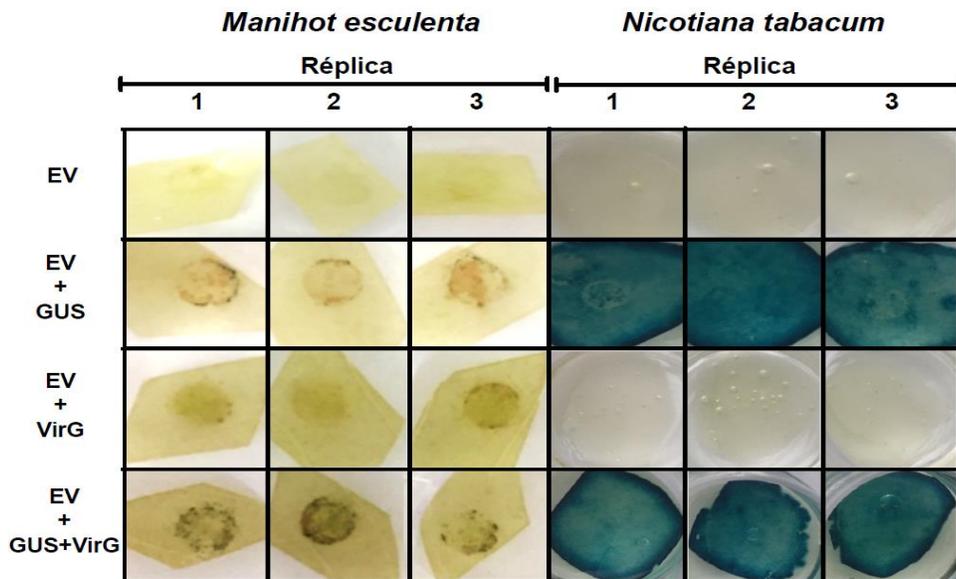


2.2.3.3 Efecto de la introducción del gen *VirG* en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

Debido a que la reacción enzimática del gen *GUS* no mejoró con el uso de otras cepas de *Agrobacterium*, se decidió incrementar la virulencia de la cepa GV3101 mediante la introducción del plásmido pTiBo542 el cual contiene el gen *virG*. Este plásmido, y en particular el gen *virG*, se caracteriza por conferir un fenotipo de supervirulencia (Chen *et al.*, 1991). Las hojas infiltradas con la cepa que contiene solamente el vector con el gen *VirG*, mostraron manchas cafés más intensas comparadas con aquellas hojas infiltradas con la cepa que contiene solamente el vector vacío (Figura 2-2-3). Además, se evidenció un incremento en la cantidad de puntos azules en hojas inoculadas con la cepa GV3101 transformada con los plásmidos que poseen el gen *GUS* y el gen *VirG*, respecto a las hojas inoculadas con la cepa GV3101 conteniendo el plásmido con el gen *GUS*. El incremento en la coloración azul y en la necrosis no fueron observados en las plantas de *N. tabacum* utilizadas como control. Las evidencias anteriores indican un incremento en la proporción de células de yuca que expresan el transgen *GUS*, como consecuencia de la introducción del gen *VirG* en la cepa GV3101.

Figura 2-2-3: Efecto de la introducción del gen *VirG* en la expresión del gen *GUS*.

Plantas de yuca adultas de la variedad MCOL1505 fueron inoculadas con la cepa de *Agrobacterium* GV3101 transformada con las construcciones pCAMBIA1302.5:*GUS* y pTiBo542:*VirG* a una de DO_{600nm} :1,0. La coloración GUS fue realizada a los 7 dpi. Plantas de *Nicotiana* fueron utilizadas como controles positivos del experimento.



2.2.3.4 Efecto de la introducción del gen *VirG* en la cepa GV3101 en diferentes variedades de yuca.

El gen *VirG* efectivamente incrementó la virulencia de la cepa GV3101, es por esta razón que se decidió emplearla sobre diferentes variedades de yuca. Tras la inoculación de las cinco variedades de yuca se evidenció una mayor cantidad de puntos azules en aquellas hojas donde se empleó la cepa GV3101 transformada simultáneamente con los plásmidos que poseen el gen *GUS* y el gen *VirG* que la cepa GV3101 conteniendo únicamente el plásmido con el gen *GUS* (Figura 2-2-4). Así mismo se observó mayor intensidad en la coloración azul en las variedades MCOL1505, SG107-35 y MTAI8. Para las variedades TMS60444 y TMS30572 la cantidad de puntos azules en la zona de inoculación fueron pocos y enmascarados por manchas cafés oscuras. Finalmente, las plantas de tabaco utilizadas como control presentaron actividad GUS con la cepa normal y la cepa complementada con el gen *VirG*.

Figura 2-2-4: Actividad GUS en cinco variedades de yuca inoculadas con la cepa GV3101 transformada con el gen *VirG*.

Plantas de yuca adultas de las variedades MCOL1505, TMS60444, SG107-35, TMS30572 y MTAI-8 fueron inoculadas con la cepa de *Agrobacterium* GV3101 transformada con las construcciones pCAMBIA1302.5:*GUS* y pTiBo542:*VirG* a una de $DO_{600nm}:1,0$. La coloración GUS fue realizada a los 7 dpi. En la parte inferior se observan plantas de *Nicotiana tabacum* utilizadas como controles positivos del experimento.

		Sin gen <i>VirG</i>			Con gen <i>VirG</i>		
		Réplica			Réplica		
		1	2	3	1	2	3
MCOL1505	EV						
	GUS						
TMS60444	EV						
	GUS						
SG107-35	EV						
	GUS						
TMS30572	EV						
	GUS						
MTAI-8	EV						
	GUS						
<i>Nicotiana tabacum</i>	EV						
	GUS						

2.2.4. Discusión

Aunque la transformación estable permite el estudio de la función de un gen *in planta*, esta técnica requiere más trabajo y está acompañada de un proceso largo de regeneración de todo el individuo y su eficacia es dependiente de la especie vegetal. Por el contrario la transformación transitoria, es una técnica fácil y rápida la cual no interfiere con la estabilidad del genoma de la planta (Lu *et al.*, 2013) y permite igualmente el estudio de la función de un gen (Cui *et al.*, 2017). En yuca hasta el momento no se ha reportado algún estudio en donde se emplee la expresión transitoria para la determinación de la función de un gen en plantas adultas. Este trabajo representa una primera contribución al estudio funcional de genes empleando esta aproximación.

En este trabajo se desarrolló una metodología para evaluar la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* en hojas de yuca de plantas adultas. El primer paso fue seleccionar una técnica para introducir la bacteria dentro del tejido vegetal, una vez allí la bacteria podrá transferir el ADN-T conteniendo el gen reportero. Los resultados aquí obtenidos permitieron evidenciar que para el caso de yuca se deben realizar heridas para que la solución que contiene *Agrobacterium* logre ingresar. Los mejores resultados se obtuvieron a través de la infiltración de hojas (Figura 2-2-1). Estos resultados son opuestos a algunos otros trabajos donde reportan muy buena eficiencia en la transformación con la aplicación de vacío (Cui *et al.*, 2017; Leuzinger *et al.*, 2013). Sin embargo, para nuestro caso esta eficiencia pudo disminuir como consecuencia de exponer al vacío la suspensión de *Agrobacterium* por un tiempo prolongado, ya que esto genera disminución en la temperatura, factor relevante en la expresión transitoria (Wroblewski *et al.*, 2005). Un factor importante que se observó al realizar la infiltración en yuca es que la cantidad de solución que logra ingresar no sobrepasa el área de la jeringa, mientras que para el caso de *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis* y *Nicotiana* la infiltración permite el ingreso de grandes cantidades de la solución (Jelly *et al.*, 2014; Schöb *et al.*, 1997). Esta limitación puede ser considerada teniendo en cuenta el carácter altamente coriáceo que caracteriza las hojas de yuca (Ospina & Ceballos, 2012).

Muchos parámetros han sido investigados que afectan la eficiencia de la transformación. Dentro de los parámetros evaluados en este trabajo se encuentran el tipo y fondo genético de la planta, la cepa de *Agrobacterium* y el tiempo post- inoculación. En primer

lugar se observaron grandes diferencias respecto al tipo de planta utilizado. Al emplear plantas cultivadas *in vitro* y luego endurecidas se obtuvo una eficiencia de transformación más alta (Figura 2-2-1) respecto a las plantas adultas (Figura 2-2-4). Resultados similares han sido encontrados en *Vitis vinifera* (Jelly *et al.*, 2014) y en *Fragaria x ananassa* Duch (Cui *et al.*, 2017). Es posible que al ser las plantas cultivadas *in vitro* mucho más jóvenes, suaves y menos gruesas, sea más fácil la entrada de la solución que contiene la bacteria y en consecuencia la transferencia del ADN-T. Otro aspecto a considerar es que en plantas cultivadas *in vitro* se requiere menos tiempo para evaluar la expresión de un gen, respecto a las plantas adultas.

Dentro de las cepas de *Agrobacterium* que fueron evaluadas se encuentra la cepa AGL1, la cual se conoce como una cepa hipervirulenta y que ha sido ampliamente empleada para la transformación estable de callo embriónico en yuca (Beltran *et al.*, 2010). En contraste, la cepa EHA105 es usada rutinariamente para la transformación en otras especies de interés agronómico incluido *Musa* spp. (Escuela *et al.*, 2011), *Vitis vinifera* L. (Torregrosa *et al.*, 2002), *Zingiber officinale* Rosc. (Suma *et al.*, 2008) y *Brassica napus* L. (Radchuk *et al.*, 2000). Por otro lado, la cepa C58C1 ha permitido obtener altos niveles de actividad de la enzima GUS en *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis* entre 4-5 dpi (Wroblewski *et al.*, 2005). En la literatura se encuentra que el orden de eficiencia para liberar el ADN-T en plantas es el siguiente: AGL1 • EHA105 • GV3101 • C58C1 (Chen *et al.*, 2010). Sin embargo, para el caso de yuca la eficiencia fue más alta con la cepa GV3101 que con AGL1 y EHA105, indicando que puede existir un efecto de compatibilidad entre la cepa de *Agrobacterium* y el hospedero.

Una modificación que logró incrementar ligeramente la virulencia de la cepa GV3101 fue la introducción del gen de virulencia *VirG*. Este gen codifica para una proteína la cual se une corriente arriba a las regiones promotoras del grupo de genes *vir* para activar su transcripción. Esta unión incrementa la eficiencia para liberar el ADN-T dentro de la planta (Buchanan *et al.*, 2015). El gen *VirG* presente en el plásmido pTiBo542 posee diferencias en el promotor, en la secuencia codificante y en la región 3'UTR respecto a la versión original presente en la mayoría de las cepas, lo que le confiere un fenotipo superactivador a la cepa que lo contenga (Chen *et al.*, 1991).

El hecho de observar claras diferencias en los niveles de expresión del gen reportero entre variedades (Figura 4), demuestra que el factor genético es clave en la eficiencia de la agroinfiltración, tal como se ha demostrado en algunos ecotipos de *Arabidopsis* (Wroblewski et al., 2005) y en otras especies vegetales (Bhaskar et al., 2009; Sheludko et al., 2007; Zottini et al., 2008).

Este trabajo permitió identificar que la mejor metodología para inducir la expresión transitoria del gen *GUS* en hojas de yuca es mediante agroinfiltración y que la cepa más adecuada de *Agrobacterium* es GV3101. Se logró evidenciar un sutil incremento en la expresión transitoria cuando se introdujo el gen *VirG* en la cepa de *Agrobacterium*. Adicionalmente existe una fuerte dependencia de la variedad de yuca para que el proceso de agroinfiltración sea eficiente.

2.3 Determinación de la virulencia de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* mediante cuantificación de crecimiento bacteriano y seguimiento de síntomas en estacas y plantas crecidas *in vitro*

2.3.1 Introducción

La gran mayoría de los patógenos de plantas se adhieren a su superficie y luego ingresan de forma directa ó indirecta (Rathore & Ghosh 2018). Para el caso de los hongos éstos pueden penetrar por cualquiera de las dos vías, mientras que las bacterias ingresan en la mayoría de los casos a través de heridas ó por aberturas naturales (métodos indirectos). Por su lado, los virus utilizan medios mecánicos (heridas) ó vectores (métodos directos) (Yadav & Chhibbar 2018; Geeta & Mishra 2018). Una vez ingresan a la planta los patógenos colonizan e inician su ciclo de vida en diferentes partes de la planta. Los patógenos pueden cumplir sus ciclos de vida como biótrofos si son capaces de desarrollarse y reproducirse solo en tejidos vivos del huésped, como necrótrofos si producen la muerte de las células hospedantes para obtener los nutrientes a partir del tejido muerto y como hemibiótrofos si son biótrofos durante los primeros estadios de infección y necrótrofos durante los últimos estadios de la enfermedad. Gran parte de las bacterias y hongos fitopatógenos son biótrofos, hemibiótrofos ó necrótrofos, mientras que los virus son estrictamente biótrofos (Masurkar et al. 2018). El tipo de tejido de la planta que es invadido por un patógeno varía en el contenido de nutrientes y en el grado de accesibilidad, para el caso de las bacterias fitopatógenas éstas se limitan a invadir el apoplasto, el xilema ó el floema para obtener sus nutrientes (Fatima & Senthil-Kumar 2015).

La determinación del fenotipo resistente/susceptible de una planta, así como el carácter virulento/avirulento de un patógeno es posible llevarlo a cabo mediante cuantificación bacteriana y/o a través de la observación de los síntomas generados (Xiong & Yang 2003; Yang et al. 2006; Bart et al. 2012; Castiblanco et al. 2013; Muñoz Bodnar et al. 2015; Cohn et al. 2014). El desarrollo de síntomas de una planta depende en gran medida de la base genética de la resistencia. Clásicamente la resistencia vegetal se ha dividido en dos grandes grupos de acuerdo a su determinismo genético. La resistencia cualitativa es gobernada por un solo gen

dominante en la planta y el factor ambiental tiene poca o ninguna influencia en la expresión del fenotipo. En este tipo de resistencia la planta es considerada como resistente (ausencia total de síntomas) o susceptible, con síntomas claros y fuertes que pueden llegar a la muerte completa de la planta. En la segunda categoría, la resistencia se denomina cuantitativa y es gobernada por varios genes. En este caso, el fenotipo se presenta como una degradación entre los dos extremos, resistente y susceptible (López, 2011). La evaluación cuantitativa de la resistencia suele expresarse con un parámetro conocido como AUDPC (del inglés *Area Under Disease Progress Curve*). Esta medida realiza un seguimiento de los síntomas generados por un patógeno a través del tiempo. Los síntomas son asignados a categorías numéricas según diferentes escalas definidas previamente (Jorge et al. 2000).

Alternativamente, el seguimiento del crecimiento del patógeno en la planta es una buena medida que permite determinar el fenotipo de la planta y la virulencia del patógeno (Mutka et al. 2016). Cuando la planta logra restringir la multiplicación y expansión del patógeno a tejidos no infectados se puede considerar que ella es resistente o que el patógeno es avirulento. Mientras que cuando el patógeno logra multiplicar y diseminarse en el huésped la planta es susceptible y el patógeno es virulento (Glazebrook & Roby 2018). Este seguimiento del crecimiento del patógeno sobre la planta suele monitorearse a través de la colección del tejido en el sitio donde ha ocurrido la infección/inoculación y en ocasiones en regiones distales de este punto (Muñoz Bodnar et al. 2015). Para el caso de patógenos bacterianos el tejido es macerado y a partir de diluciones seriadas sembradas en cajas de Petri con el medio correspondiente se establece el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) (Contois 1959).

El seguimiento o estudio de la interacción planta patógeno requiere el establecimiento de un método de inoculación controlado por el experimentador, el cual simule de la mejor manera la entrada del patógeno en el proceso de infección natural y que además permita evidenciar tanto las respuestas de las plantas (de resistencia o susceptibilidad), así como el nivel o grado de virulencia del patógeno. Para seleccionar un método de inoculación adecuado se debe tener en cuenta tanto el tejido que es naturalmente colonizado por el patógeno, el ciclo de vida del patógeno y la anatomía de la planta (McNabb et al. 1993; Meyer et al. 2005; Tefera & Vidal 2009).

Por ejemplo, en arroz la bacteriosis vascular generada por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), la cual es una enfermedad vascular y el rayado foliar bacteriano generado por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*), enfermedad no vascular, fueron estudiadas por distintos métodos de inoculación artificial en hoja. Estos métodos incluyeron la aspersión, la punción con aguja, el corte con tijeras contaminadas con el inóculo y la inmersión de otras partes de la planta en la suspensión bacteriana. No obstante, el método de inoculación más apropiado para el estudio de la infección con *Xoo* fue el corte de las hojas con una tijera previamente sumergida en la suspensión bacteriana, ya que esto garantiza el ingreso a los haces vasculares. Mientras que la infiltración fue el mejor método para *Xoc* ya que infecta el parénquima de las hojas de arroz (Yang & Bogdanove 2013).

A pesar de que en principio se ha establecido que las plantas no poseen un sistema inmune como tal, formado por células especializadas, sino que cada célula vegetal es capaz de reconocer un patógeno y activar la respuesta, varios estudios han mostrado que puede existir una respuesta tisular diferencial. Así por ejemplo, para introducir el efector *AvrAC* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) se debe realizar una herida en la vena central para que la proteínalogre ser reconocida en el tejido vascular y así activar una respuesta inmune. La infiltración permite la introducción del efector en el parénquima en donde no se activa la respuesta de la planta (Meyer et al. 2005; Xu et al. 2008; Feng et al. 2012).

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una de las especies más representativas del género *Manihot* (Rogers & Appan 1973). Esta planta fue domesticada al sur-este del borde del río Amazonas, sin embargo su cultivo actualmente se distribuye en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Allem 1994). Entre los cultivos de raíces y tubérculos la yuca se destaca por ser la principal fuente de calorías en países del trópico (Cock 1982; FAO 2017). La yuca se caracteriza por ser fuente de almidón, el cual tiene múltiples aplicaciones en diferentes industrias textiles, de aceites, pinturas y en la producción de bioetanol (FAO 2017). La yuca se multiplica principalmente a partir de tallos maduros, conocidos como estacas. Si bien existe la reproducción sexual, no es el medio más empleado para la propagación agrícola. El sistema de propagación de yuca *in vitro* ha sido establecido desde hace ya varios años y ha permitido la transformación genética a partir de callos embriogénicos (Vidal

et al. 2015). La colección de germoplasma de yuca es mantenida *in vitro* y distribuida de esta manera a través del mundo. El sistema de crecimiento de plantas crecidas *in vitro* ofrece grandes oportunidades dado que se requiere condiciones controladas para su crecimiento (28°C con un fotoperiodo de 16h luz día y 8h oscuridad), poco espacio para su multiplicación y obtención de plantas.

La enfermedad bacteriana más importante que afecta la yuca es la bacteriosis vascular (López & Bernal 2012) causada por la bacteria gramnegativa *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*) la cual está presente en todas las regiones donde la yuca es cultivada (Lozano 1986). La bacteriosis es capaz de causar pérdidas devastadoras en el rendimiento de la raíz y su grado de incidencia varía entre el 13-100% (Harris et al. 2015). Los síntomas de la bacteriosis se caracterizan por la presencia de manchas acuosas en las hojas en los estadios tempranos y por marchitamiento y defoliación en los estados tardíos (Lozano 1986). Actualmente no existen tratamientos químicos para el control de la bacteriosis y la mejor aproximación para el manejo de la enfermedad es el uso de variedades resistentes. Sin embargo, algunas de las variedades resistentes reportadas no se adaptan a las condiciones medioambientales de las regiones en donde es cultivada y han mostrado bajos rendimientos agronómicos (Verdier et al. 2004). Las respuestas de defensa de la planta hacia *Xpm* son activadas tanto en variedades susceptibles como en resistentes, siendo más rápidas, efectivas e intensas en variedades resistentes (Kpémoua et al. 1996; Lopez et al. 2005). La resistencia a la bacteriosis es cuantitativa (Hahn et al. 1980) y varios loci de rasgos cuantitativos (del inglés *Quantitative Trait Loci*) asociados con la resistencia han sido identificados en yuca (Jorge et al. 2000; Jorge et al. 2001; Wydra et al. 2004; Soto Sedano et al. 2017). Los estudios realizados sobre la diversidad y distribución geográfica de *Xpm* revelaron que es un patógeno con una amplia diversidad y que sus poblaciones fluctúan en el tiempo (Restrepo et al., 2004; Trujillo et al., 2014).

En yuca se han evaluado varios métodos de inoculación a partir de estacas y en plantas crecidas *in vitro* (Jorge y Verdier, 2002; Cohn et al., 2015; Muñoz Bodnar et al., 2015). Estos métodos incluyen el corte de hojas con tijeras contaminadas con *Xpm* (Lozano & Laberry 1982), la aspersion del inóculo en el follaje (Restrepo et al. 2000), el depósito de la suspensión bacteriana sobre heridas realizadas sobre las hojas

(Jorge & Verdier 2002), la infiltración (Cohn, Shybut, et al. 2015), la punción en el tallo (Mutka et al. 2016) y en la vena central de las hojas (Cohn, Shybut, et al. 2015; Muñoz Bodnar et al. 2015). La inoculación en tallo de plantas adultas obtenidas a partir de estacas ha sido utilizada mayoritariamente y como método de referencia para evaluar el desarrollo de la enfermedad a través de los síntomas de las plantas según una escala a lo largo del tiempo y así determinar el AUDPC. Mediante esta aproximación ha sido posible la determinación de patotipos (Trujillo et al. 2014) y el análisis de QTL (Soto Sedano et al. 2017). Por el contrario, la infiltración ha sido poco utilizada debido al grosor de las hojas y a su consistencia ligeramente coriácea. Este sistema de inoculación se utilizó en plantas adultas para cuantificar la población bacteriana, los síntomas y el avance del patógeno en cepas de *Xpm* silvestres y cepas mutantes en distintos efectores (Mutka et al. 2016).

Si bien se han identificado variedades resistentes y susceptibles mediante AUDPC y se ha evaluado el grado de virulencia de cepas de *Xpm* mediante el desarrollo de síntomas y curvas de crecimiento en estacas, es necesario establecer otros sistemas que permitan el estudio de la interacción yuca - *Xpm*. El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes condiciones para estandarizar las curvas de crecimiento bacteriano en estacas y plantas crecidas *in vitro* y además validar la AUDPC en el sistema de plantas *in vitro*.

2.3.2 Materiales y métodos

Material vegetal

Las plantas crecidas *in vitro* de las variedades TMS60444, CM2177-2, MCOL2215 y NGA2 fueron facilitadas por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Estas plantas fueron propagadas a partir de entrenudos y ápices, en medio basal Murashige and Skoog (MS) con pH 6.2, suplementado con myo-inositol 100 ppm, CuSO₄ 2μM, sacarosa 2% y vitaminas. Las plantas fueron mantenidas en un ambiente controlado en una cámara de crecimiento a 28°C, con una humedad relativa de 39% y un fotoperiodo de 12 h luz/ 12h oscuridad. Las plantas crecidas *in vitro* fueron utilizadas en los ensayos de AUDPC y crecimiento bacteriano.

Los ensayos de crecimiento bacteriano en plantas adultas fueron realizados a partir de plantas obtenidas de estacas de la variedad TMS60444 suministradas por el CIAT. Las estacas de esta variedad fueron cultivadas en un invernadero en donde la temperatura en el día osciló entre 28-35°C y en la noche entre 22-27°C. La humedad se mantuvo alrededor de 80 % y se mantuvo un fotoperíodo de 12 h luz/ 12h oscuridad. Las plantas permanecieron en bandejas con agua para permitir una alta humedad relativa.

Inóculo

Las cepas de *Xpm* utilizadas fueron: Xpm531, Xpm645, y Xpm318. Los aislamientos de *Xpm* se obtuvieron mediante siembra por estría en medio LPGA (5 % extracto de levadura, 5 % peptona, 5 % glucosa y 15 % agar), a partir de stocks a -80 °C del cepario de la Universidad de los Andes. Los aislamientos se incubaron a 28°C durante 48 h. Para cada cepa se tomó una colonia aislada y se preparó un inóculo en medio líquido LPG (5 % extracto de levadura, 5 % peptona y 5 % glucosa) y se incubó por 24h a 28°C con agitación.

Para la preparación del inóculo se midió la DO a 600nm del inóculo, se realizó un lavado del pellet de la bacteria con MgCl₂ 10 mM y se resuspendió en la solución de MgCl₂ 10 mM hasta una DO_{600nm} final de 0.2. A partir de esta solución se prepararon diluciones seriadas de 0.02, 0.002 y 0.0002 para estandarizar las curvas de crecimiento bacteriano en plantas *in vitro* y adultas. Para los ensayos de AUDPC en plantas *in vitro* se utilizó una DO_{600nm} de 0.02.

2.3.2.1 Curvas de crecimiento bacteriano en estacas y plantas crecidas *in vitro*

Inoculación plantas crecidas *in vitro*

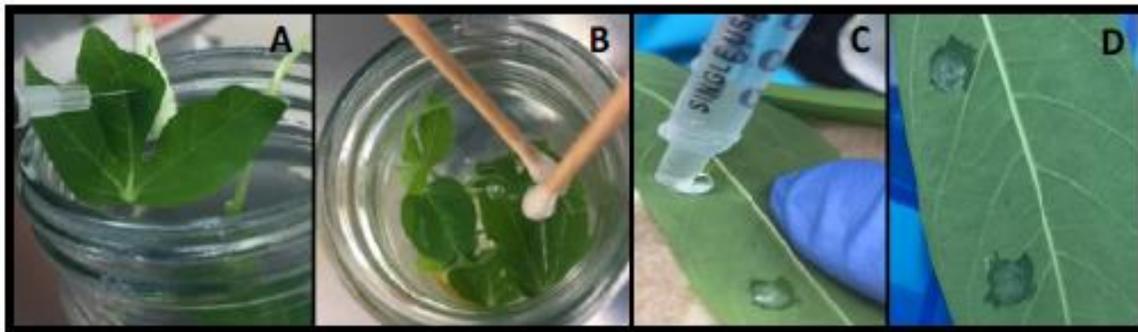
En la cara principal de cada hoja se realizaron cuatro punciones suficientemente espaciadas empleando una aguja de jeringa (Figura 2-3-1A). Este procedimiento se realizó en las cuatro primeras hojas de cada planta, luego con ayuda de un hisopo de algodón estéril se aplicó el inóculo de la bacteria sobre las dos caras de la hoja y se dejó secar el medio durante 5 minutos (Figura 2-3-1B). Para cada tratamiento se inocularon tres plantas.

Inoculación en estacas

Un día antes de la inoculación las plantas fueron mantenidas en condiciones de alta humedad relativa utilizando un humidificador. Para la infiltración fueron seleccionadas la primera, segunda y tercera hoja del botón hacia abajo, las hojas fueron inoculadas por el envés utilizando una jeringa sin aguja, se realizó una infiltración por foliolo asegurando el ingreso de la solución (Figura 2-3-1C y D). Por cada planta se inocularon tres hojas para evaluar los tiempos seleccionados. Los tratamientos se determinaron por triplicado.

Figura 2-3-1: Inoculación plantas crecidas *in vitro* y estacas.

A. Proceso de punción en la hoja de las plantas crecidas *in vitro*. **B** Aplicación del inóculo de *Xpm* en hojas de plantas crecidas *in vitro*. **C.** Infiltración en hojas de plantas adultas. **D.** Inóculo de *Xpm* que ingresó en la hoja.



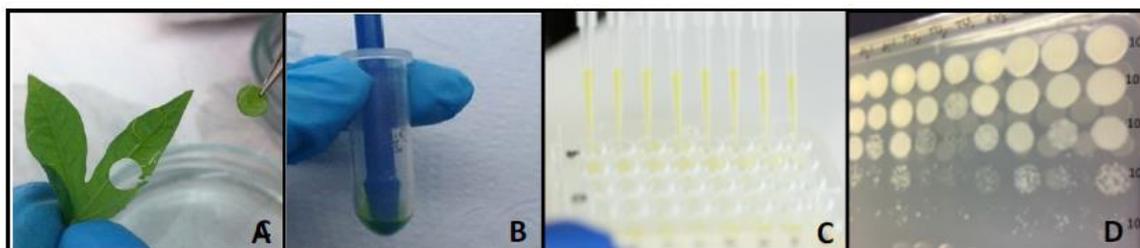
Cuantificación de la población bacteriana

Mediante un sacabocado se tomaron cuatro discos por hoja alrededor del punto de perforación para las plantas crecidas *in vitro*, mientras que para las plantas adultas se tomó un solo disco alrededor del punto de la inoculación (Figura 2-3-2A). Cada disco fue lavado con solución de hipoclorito (1 %), agua estéril y $MgCl_2$ (10 mM), posteriormente fueron colocados en tubos eppendorf y homogenizados con pistilos de maceración en 100 μ L de $MgCl_2$ 10mM (Figura 2-3-2 B) y llevados a un volumen final de 1 mL con $MgCl_2$ 10mM. 100 μ L de la suspensión anterior fueron depositados en uno de los pozos de una placa ELISA de 96 pozos y a partir de la solución anterior se realizaron diluciones decimales sucesivas tomando 10 μ L de la solución anterior y completando a un volumen de 100 μ L en el siguiente pozo con $MgCl_2$ 10mM, las diluciones realizadas fueron 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} (Figura 2-3-2C). 10 μ L de cada una de las diluciones fueron sembrados por triplicado en caja de Petri con medio LPGA, las cajas fueron incubadas

durante dos días a 28°C. Después de dos días se contaron las UFC para cada dilución (Figura 2-3-2D).

Figura 2-3-2: Cuantificación de población bacteriana.

A. Obtención del material vegetal a partir de plántulas *in vitro* empleando sacabocados. **B.** Homogenización del tejido vegetal. **C.** Diluciones seriadas. **D.** Determinación de UFC en cada dilución.



2.3.2.2 AUDPC plantas crecidas *in vitro*

Plantas crecidas *in vitro* de seis semanas conteniendo mínimo cuatro hojas y un tallo elongado con una longitud no superior a 7 cm, fueron inoculadas usando una jeringa de insulina con la que se llevó a cabo una punción en el tallo a la altura del segundo entrenudo dirección ápice-raíz (Figura 2-3-3A). La herida fue impregnada con el inóculo, usando un hisopo de algodón previamente sumergido en una suspensión celular de Xpm318, con $DO_{600nm} = 0.02$ (Figura 2-3-3B). El hisopo se mantuvo durante 10 segundos sobre la herida. Como control negativo se utilizaron plantas inoculadas con $MgCl_2$ 10mM.

Figura 2-3-3: Inoculación para determinar el AUDPC en plantas crecidas *in vitro*.

A. Punción en el tallo usando una jeringa de insulina de 1 mL. **B.** Aplicación del inóculo en la herida mediante un hisopo.



La evaluación de los síntomas en plantas de yuca de la variedad TMS60444 se realizó de acuerdo a la metodología previamente establecida (Restrepo et al. 2000). Luego, los síntomas fueron evaluados a 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 días posteriores a la inoculación (dpi), de acuerdo a la escala descrita en la Tabla 2-3-1. Para cada tratamiento se inocularon 5 plantas.

Tabla 2-3-1: Escala descriptiva para la evaluación de la bacteriosis vascular en plantas de yuca crecidas *in vitro* inoculadas con *Xpm*.

Valor	Descripción del síntoma
0	Lesión asintomática
1	Necrosis alrededor del punto de inoculación
2	Exudados a lo largo del tallo
3	Marchitez (necrosis) 1 ó 2 hojas, cercanas al punto de inoculación
4	Marchitez (necrosis) de 3 o más hojas. Estrangulación del tallo
5	Muerte total del ápice de la planta inoculada. Necrosis

Con los datos generados se calculó el AUDPC (Area Under Disease Progression Curve) para cada tratamiento haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$AUDPC = \sum_i \frac{(D_i + D_{i-1})}{2} * (t_i - t_{i-1})$$

Donde D es el valor asignado de acuerdo a la escala tras la observación de síntomas y t son los días después de la inoculación, con $i=7, 14$ o 30 días. Las réplicas que no presentaron síntomas fueron descartadas del análisis. El valor promedio de AUDPC de las 5 réplicas realizadas y su Logaritmo en base 10 fue calculado para las plantas inoculadas con *Xpm*.

Análisis estadístico

Los resultados fueron presentados en gráficas de dispersión ó de barras, el error estandar +/- representa el error promedio de los datos. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 7. Para la comparación de las medias de dos grupos se utilizó una prueba de dos colas. Si se compararon dos variables, por ejemplo, la concentración y el tiempo, en más de dos grupos se utilizó un ANOVA de dos vías seguido de un test de Tukey ó Sidak para realizar múltiples comparaciones. Los resultados fueron asignados como significativos cuando el P -value (P) < 0.05: * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$, **** = $P < 0.0001$, ns = no significativo.

2.3.3 Resultados

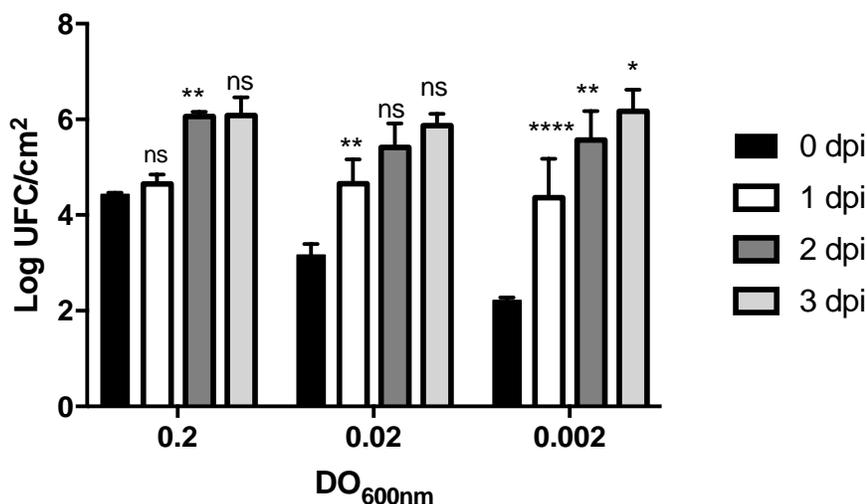
2.3.3.1. Curvas de crecimiento bacteriano en plantas crecidas *in vitro*

Con el objetivo de determinar la concentración óptima de bacteria para inocular plantas crecidas *in vitro* y en particular observar diferencias en el crecimiento bacteriano en plantas de una misma variedad inoculadas con diferentes cepas de *Xpm* y viceversa. El crecimiento bacteriano de *Xpm* fue evaluado a tres concentraciones (0.2, 0.02 y 0.002) sobre plantas de la variedad TMS30572 durante los tres primeros días posteriores a la inoculación. Al emplear un alto inóculo de bacteria ($DO_{600nm}=0.2$) no se observaron cambios significativos en el crecimiento bacteriano entre el tiempo inicial y el día 1 y entre el día 2 y el día 3, alcanzando el punto de saturación a los dos días (Figura 2-3-4). La evaluación de una concentración de bacteria 10 veces menor ($DO_{600nm}=0.02$), generó incrementos graduales y

relativamente constantes en la cantidad de bacteria en los diferentes días post-inoculación (Figura 2-3-4). Por último, el inóculo de menor concentración generó un comportamiento muy similar al descrito con un inóculo de 0.02, aunque los cambios generados fueron más significativos, lográndose identificar una diferencia significativa en el crecimiento bacteriano entre los 2 y 3 días, lo cual no se pudo observar al utilizar una OD de 0.02. Los tres tratamientos evaluados alcanzaron los mismos niveles de bacteria al tercer día post infiltración (Figura 2-3-4).

Figura 2-3-4: Efecto de la concentración de inóculo en el crecimiento bacteriano en plantas crecidas *in vitro*.

Plantas crecidas *in vitro* de dos meses de la variedad TMS30572 fueron inoculadas mediante perforación y aplicación del inóculo en el haz y el envés de la hoja con la cepa Xpm531 a tres DO_{600nm} 0.2, 0.02 y 0.002. La cantidad de bacteria fue determinada a 0, 1, 2 y 3 dpi, los datos representan un promedio de tres réplicas biológicas.

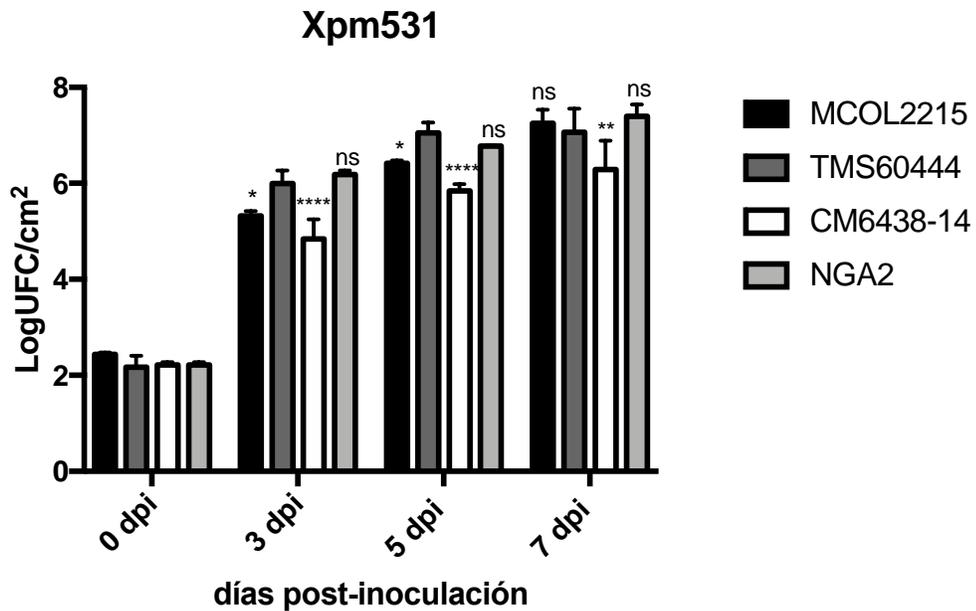


A partir de los resultados obtenidos anteriormente se seleccionó la DO_{600nm} 0.002 para los siguientes experimentos. El crecimiento bacteriano se evaluó a 0, 3, 5 y 7 dpi ya que algunos de estos tiempos han sido empleados en reportes previos (Díaz Tatis et al. 2018). Con el objetivo de evaluar si el crecimiento bacteriano es un parámetro que permite evaluar diferencias entre variedades de yuca hacia una misma cepa de *Xpm*, se realizó un experimento en donde se evaluó el efecto de la cepa Xpm531 en plantas crecidas *in vitro* de las variedades MCOL2215, TMS60444, CM6438-14 y NGA2. En las

plantas de la variedad CM6438-14, las bacterias de la cepa Xpm531 presentaron menor crecimiento en los tres tiempos evaluados, mientras que la cantidad de bacteria fue similar en las variedades TMS60444 y NGA2 y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En el caso de la variedad MCOL2215 el crecimiento bacteriano presentó valores intermedios en los días 3 y 5, pero a los 7 dpi alcanzó valores similares a los que se obtuvieron en las variedades TMS60444 y NGA2 (Figura 2-3-5A). Los resultados demuestran que las condiciones utilizadas para evaluar el crecimiento de la bacteria en plantas crecidas *in vitro* permiten determinar diferencias entre variedades de yuca y entre cepas de *Xpm*.

Figura 2-3-5: Crecimiento bacteriano en plantas crecidas *in vitro* inoculadas con la cepa Xpm531.

Plantas *in vitro* de dos meses de las variedades NGA2, TMS60444, CM6438-14 y MCOL2215 fueron inoculadas mediante perforación y aplicación del inóculo en el haz y el envés de la hoja con la cepa Xpm531 a una $DO_{600nm}=0.002$. La cantidad de bacteria fue determinada 0, 3, 5 y 7 dpi, los datos representan un promedio de tres réplicas biológicas.

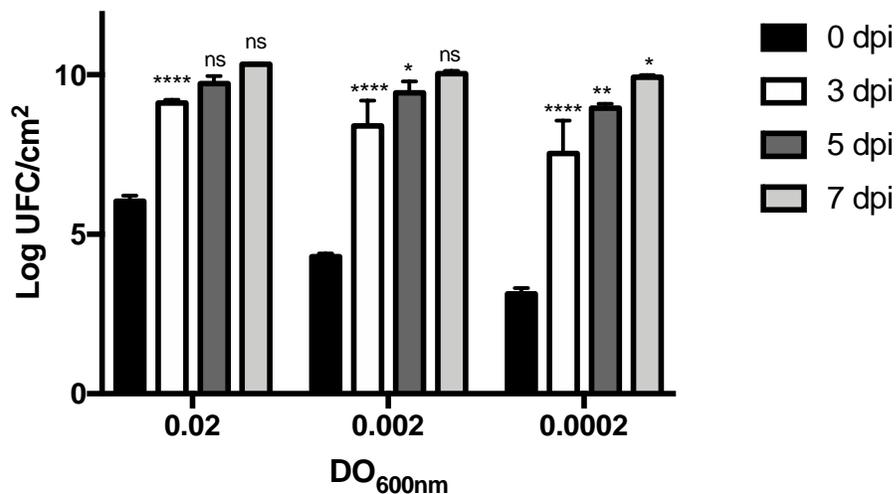


2.3.3.2. Curvas de crecimiento bacteriano en plantas obtenidas a partir de estacas

Una vez validado las condiciones para cuantificar *Xpm* en plantas crecidas *in vitro*, se diseñó un nuevo experimento para evaluar estos mismos parámetros en plantas obtenidas a partir de estacas e inoculadas mediante infiltración. Las estacas de yuca de la variedad TMS60444 fueron inoculadas con la cepa *Xpm318* y a tres concentraciones de inóculo: 0.02, 0.002 y 0.0002. Las bacterias fueron cuantificadas a 0, 3, 5 y 7 dpi (Figura 2-3-6). Empleando una $DO_{600nm}=0.02$ la cantidad de bacteria incrementó significativamente de 0 a 3 dpi, sin embargo, no se observó un crecimiento diferencial a los 5 y 7 dpi, sugiriendo que la bacteria alcanzó rápidamente un nivel de saturación en el tejido vegetal. En el caso de las hojas de yuca inoculadas con una $DO_{600nm}=0.002$ se observó aumento en la cantidad de bacteria desde el tiempo inicial hasta los 5 dpi, pero el crecimiento bacteriano a los 7 dpi no fue estadísticamente diferente del observado a los 5 dpi. Finalmente, al inocular con una $DO_{600nm}=0.0002$ se pudo observar un crecimiento continuo de la bacteria a los diferentes tiempos, siendo este mayor durante los 3 primeros dpi. La cantidad de bacteria a los 7 dpi empleando esta DO no alcanzó los mismos niveles que en los otros tratamientos indicando que sería necesario evaluar tiempos adicionales para alcanzar el nivel de saturación bacteriana en el tejido. De acuerdo con los resultados obtenidos se decidió seleccionar una concentración de $DO_{600nm}=0.002$ para inocular estacas a través de infiltración y evaluar el crecimiento bacteriano a los 0, 3 y 7 dpi.

Figura 2-3-6: Efecto de la concentración de inóculo en el crecimiento bacteriano en plantas obtenidas a partir de estacas.

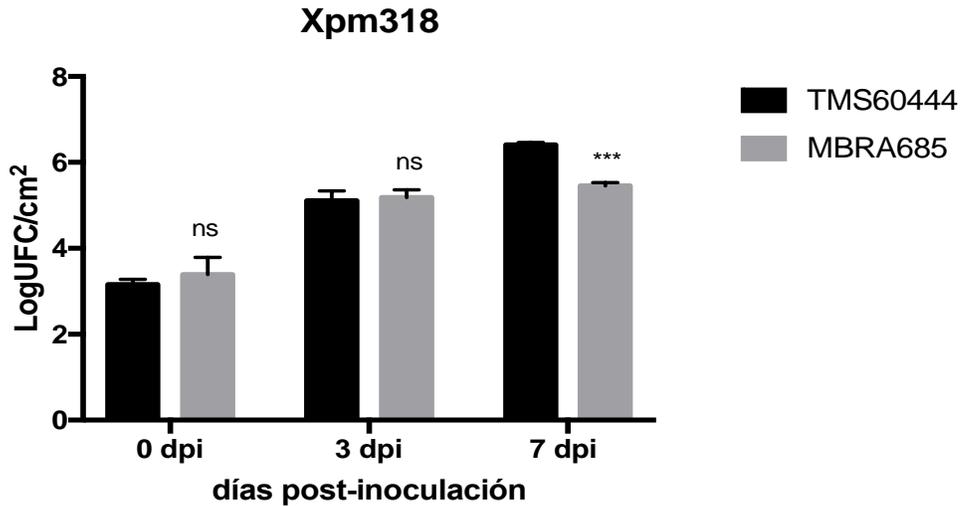
Plantas de dos meses de la variedad TMS60444 fueron inoculadas mediante infiltración, con la cepa Xpm318 a tres DO_{600nm} 0.02, 0.002 y 0.0002. La cantidad de bacteria fue determinada 0, 3, 5 y 7 dpi, los datos representan un promedio de tres replicas biológicas.



Las condiciones seleccionadas para la cuantificación de *Xpm* en estacas que se utilizaron para evaluar el efecto de la cepa Xpm318 en las variedades TMS60444 y MBRA685. La cepa Xpm318 creció en mayor proporción en la variedad TMS60444 al día 7 (Figura 2-3-7), tiempo en el cual se encontraron diferencias significativas entre las dos variedades. Estos resultados permiten afirmar que la DO_{600nm} y los tiempos determinados para la cuantificación bacteriana en estacas, son las adecuadas para observar diferencias en el crecimiento bacteriano de *Xpm* entre variedades.

Figura 2-3-7: Crecimiento bacteriano en estacas inoculadas con las cepas Xpm318.

Estacas de dos meses de la variedad TMS60444 y MBRA685 fueron inoculadas mediante infiltración, con la cepa Xpm318 a una $DO_{600nm}:0.0002$. La cantidad de bacteria fue determinada 0, 3 y 7 dpi, los datos representan un promedio de tres replicas biológicas.



2.3.3.3. AUDPC en plantas crecidas *in vitro*.

Las plantas crecidas *in vitro* de la variedad MBRA685 fueron inoculadas con las cepas Xpm318 y se evaluaron los síntomas siguiendo la escala reportada previamente (Restrepo et al. 2000). Es interesante notar que los síntomas reportados en dichos estudios también se presentaron de forma similar en las plantas crecidas y mantenidas *in vitro* (Figura 2-3-8). El espectro de síntomas inició con necrosis en el punto de inoculación, seguido por la secreción de exudados en este mismo punto, el marchitamiento de las hojas cercanas al punto de inoculación, el estrangulamiento del tallo y finalmente la muerte total del ápice de la planta. A cada síntoma se le asignó su valor correspondiente de acuerdo a la Tabla 2-3-1 y con los datos generados se calculó el AUDPC (Area Under Disease Progression Curve) a las plantas crecidas *in vitro* de la variedad MBRA685 inoculadas con Xpm318 y Xpm681. Las plantas inoculadas fueron clasificadas como resistentes ó susceptibles de acuerdo a dos criterios, el criterio 1 define una planta como susceptible si el logaritmo del valor de AUDPC es mayor a 1,69 ó como resistente si este valor es menor a 1,59 (Trujillo et al. 2014), en el criterio 2 se tienen en cuenta la misma escala en términos de la sumatoria de la AUDPC , además contempla una variedad como moderadamente resistente si la Σ AUDPC está entre 39 y 44 ó moderadamente susceptible si la Σ AUDPC está entre 44 y 49 (Díaz Tatis 2016). Las

plantas de la variedad MBRA685 inoculadas con la cepa Xpm681 son resistentes de acuerdo al criterio 1 y moderadamente resistente de acuerdo al criterio 2, mientras que plantas de esta misma variedad son susceptibles a la cepa Xpm318. Los resultados demuestran que la cuantificación del grado de avance de la enfermedad en plantas *in vitro* es posible realizarlo mediante inoculación por punción en el tallo, utilizando la misma escala de síntomas previamente establecido en estacas de yuca.

Figura 2-3-8: Síntomas en plantas crecidas *in vitro*

1. Necrosis. 2. Exudados. 3. Marchitez de 1 ó 2 hojas. 4. Estrangulación del tallo y 5. Muerte total del ápice de la planta inoculada.



Tabla 2-3-2: AUDPC en plantas crecidas *in vitro*.

Plantas *in vitro* de dos meses de la variedad MBRA685 inoculadas mediante punción en el tallo, los tratamientos inoculados fueron Xpm318 y Xpm681 a una DO_{600nm} 0.02. La evaluación de los síntomas se realizó de acuerdo con lo propuesto por Restrepo et al. (2000).

Tratamientos	AUDPC Media Log	Criterio 1	Σ AUDPC	Criterio 2
Xpm681	1,59	R	44.4	MR
Xpm318	1,71	S	57	S

2.3.4 Discusión

Xpm es un patógeno capaz de colonizar el mesófilo y el tejido vascular en yuca durante su ciclo de infección (Boher & Verdier 1994). Este ciclo de infección y las metodologías de inoculación previamente reportadas son un punto de partida importante para el diseño de nuevos métodos de inoculación mejorados y dirigidos hacia el estudio del patosistema yuca-*Xpm*. Es por esta razón que en este trabajo se destacó esta información, con el

objetivo de optimizar y validar condiciones de inoculación de *Xpm* en plantas de yuca tanto crecidas *in vitro* como obtenidas a partir de estacas. Las plantas crecidas *in vitro* fueron inoculadas mediante punción seguida de la aplicación del inóculo, mientras que las estacas se inocularon mediante infiltración. Para ambos sistemas fue posible identificar y validar las mejores condiciones a través de la cuantificación del crecimiento bacteriano de *Xpm*. Al mismo tiempo que fue posible extrapolar el sistema de evaluación de síntomas previamente reportado para plantas obtenidas de estacas a plantas crecidas *in vitro*.

El método tradicional de multiplicación de la yuca es por estacas. La evaluación de síntomas y determinación de resistencia/ susceptibilidad en estacas, se ha llevado a cabo clásicamente inoculando el tallo y evaluando los síntomas a través de una escala lo que permite calcular el AUDPC (Jorge et al. 2000; Trujillo et al. 2014; Soto Sedano et al. 2017). En este trabajo se evaluó una metodología alternativa de inoculación para evaluar no el desarrollo de síntomas, sino el crecimiento bacteriano en plantas obtenidas a partir de estacas. Inicialmente se evaluaron diferentes concentraciones (DOs) y días post-inoculación, encontrando que una concentración alta de inóculo bacteriano conduce a un grado de saturación en un tiempo muy corto (3 dpi). Así mismo se pudo observar que empleando los dos inóculos de mayor concentración (DO_{600nm} 0.02 y 0.002), a los 7 dpi se llega a un nivel de saturación bacteriana en el tejido vegetal que no se logra al emplear un inóculo bajo ($OD = 0.0002$). A partir de estos resultados se sugiere que para próximos experimentos encaminados a evaluar diferencias en resistencia/susceptibilidad de plantas y virulencia/avirulencia de cepas de *Xpm* se utilicen inóculos de 0.002 y se evalúe el crecimiento bacteriano a 3 y 7 dpi. De esta manera, el presente trabajo logró desarrollar una estrategia alternativa y complementaria que permita además de emplear el tradicional método de AUDPC el crecimiento bacteriano como metodología para detectar diferencias en las respuestas de la planta o niveles de virulencia que no pueden ser detectados a través del desarrollo o presencia de síntomas.

La infiltración es un método de inoculación que permitió monitorear el crecimiento bacteriano en las plantas de yuca. Este método ha sido previamente evaluado por otros investigadores con resultados poco satisfactorios (López, comunicación personal) pero sin embargo recientemente se ha utilizado para realizar seguimiento de la bacteriosis en plantas obtenidas a partir de estacas de yuca (Mutka et al. 2016). Durante los primeros

ensayos conducidos en este trabajo no fue posible lograr infiltrar las hojas de diferentes variedades de yuca, dado su carácter altamente coriáceo y la solución no lograba penetrar el tejido por más fuerza que se le aplicara al émbolo de la jeringa. Sin embargo, al llevar a cabo un pretratamiento de las plantas a condiciones de alta humedad en invernadero en plástico con bandejas de agua se garantizó alcanzar HR superiores al 80%, y sobre estas condiciones se llevaron a cabo nuevos experimentos de infiltración con resultados altamente satisfactorios que permitieron la entrada de la suspensión bacteriana a las hojas y su posterior colonización en el mesófilo. Estos resultados demuestran la gran importancia que tiene la humedad para generar condiciones que favorezcan la entrada de las bacterias a los tejidos vegetales. Estudios recientes han demostrado que las bacterias patógenas utilizan proteínas de virulencia especializadas para crear un ambiente acuoso dentro del apoplasto de la hoja en condiciones de alta humedad. La disponibilidad de agua en el ambiente apoplástico puede determinar el éxito de microbios potencialmente patógenos (Aung et al. 2018).

La infiltración en hojas de plantas de yuca ofrece varias ventajas respecto a la inoculación en tallo. La inoculación en tallo requiere el uso de una planta por muestra y por réplica biológica mientras que, la infiltración en hoja permite la inoculación de diferentes tratamientos y replicas biológicas por foliolo, de esta forma es posible trabajar con menor cantidad de material vegetal. Además, la infiltración permite visualizar los síntomas rápidamente (4 dpi) en comparación con el AUDPC, en donde los síntomas se evidencian partir de 14 dpi. Adicionalmente, las condiciones de inoculación y de muestreo seleccionadas en este capítulo, permitieron la cuantificación del crecimiento bacteriano logrando evidenciar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Figura 2-3-7). En yuca existen trabajos en donde se ha cuantificado el crecimiento bacteriano en estacas utilizando otras metodologías de inoculación y DO_{600nm} (Cohn, Shybut, et al. 2015; Muñoz Bodnar et al. 2015; Mutka et al. 2016). En un trabajo en donde evaluaron el crecimiento bacteriano utilizando como metodología de inoculación la infiltración, también fue posible medir el crecimiento bacteriano y encontrar diferencias entre los tratamientos (Mutka et al. 2016).

La propagación de yuca es vegetativa, su multiplicación se realiza por estacas lo cual genera una tasa de propagación lenta y baja, si alguna de las estacas utilizadas para la propagación se encuentra contaminada con algún patógeno, su constante multiplicación

puede generar reducción en la producción (Santos et al. 2009). Por esta razón es muy importante el desarrollo de técnicas alternativas que permitan una rápida multiplicación del material libre de patógenos. Dentro de estas alternativas se encuentra la micropropagación (Santos et al. 2009), la cual permite la producción clonal de plantas de alta calidad, en cortos periodos de tiempo, en espacios físicos reducidos que aseguren la calidad fitosanitaria y con menores costos de operación (Vidal et al. 2015). En yuca el establecimiento de cultivo *in vitro* para micropropagación inicia con el crecimiento de los meristemas, las plantas generadas son clones sanos que sirven como plantas stock para nuevas plantaciones o para propagar mayor cantidad de material de alta calidad. Además, el sistema *in vitro* provee condiciones adecuadas de humedad para el monitoreo del desarrollo de síntomas en los experimentos encaminados a evaluar el desarrollo de la bacteriosis. En este trabajo el sistema de micropropagación con plantas crecidas *in vitro* fue utilizado para estudiar el patosistema yuca- *Xpm*. Para este tipo de plantas se empleó la punción como técnica de inoculación en hoja y en tallo, seguido de la aplicación del inóculo. Las heridas realizadas simulaban las entradas naturales de la planta. La colonización del patógeno se confirmó tanto en hojas como en tallo mediante curvas de crecimiento bacteriano y AUDPC en planta respectivamente (figura 2-3-4, 2-3-5, 2-3-6, 2-3-7 y tabla 2). En la gran mayoría de las técnicas utilizadas para el estudio de la bacteriosis se ha utilizado algún tipo de herida en hojas ó en tallo para asegurar el ingreso de *Xpm* (Lozano & Laberry 1982; Restrepo et al. 2000; Jorge & Verdier 2002; Cohn, Shybut, et al. 2015; Muñoz Bodnar et al. 2015; Mutka et al. 2016).

La respuesta a la inoculación artificial con *Xpm* mostró variaciones entre los cultivares de yuca evaluados (Figura 2-3-5) y los síntomas generados fueron muy similares a los detectados en estacas o en campo (Figura 2-3-8). Diferentes concentraciones del inóculo fueron evaluadas tanto en estacas como en plantas crecidas *in vitro*. Este es un parámetro importante ya que define la rapidez con que se da la colonización del patógeno en el tejido. Si la concentración de inóculo es demasiado alta el patógeno invade rápidamente el tejido, se satura y no permite evaluar diferencias entre tratamientos. En plantas crecidas *in vitro* se evaluaron tres concentraciones: 0.2, 0.02 y 0.002 y en estacas 0.02, 0.002 y 0.0002. Algunas de estas concentraciones fueron tomadas de trabajos previos en donde se evaluaron curvas de crecimiento en plantas *in vitro* (Díaz Tatis et al. 2018) y en estacas (Muñoz Bodnar et al. 2015; Cohn, Shybut, et al. 2015). De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo la concentración

seleccionada para plantas crecidas *in vitro* fue de 0.002 y para estacas de 0.0002. En ambos casos la concentración corresponde a la más baja evaluada, ya que permitió observar cambios significativos en el crecimiento bacteriano en función del tiempo. Concentraciones de inóculo aún más bajas han sido utilizadas para evaluar el crecimiento de *Xpm* en estacas (Cohn et al. 2014), no obstante los parámetros seleccionados permitieron observar diferencias entre las variedades evaluadas. En la variedad CM6438-14 se observó menor crecimiento bacteriano mientras que en las variedades TMS60444 y MCOL1505 el crecimiento bacteriano fue el más alto (Figura 2-3-5). Estos resultados concuerdan con datos previos de AUDPC obtenidos a partir de plantas provenientes de estacas, en donde se encontró que la variedad CM6438-14 es resistente a la cepa *Xpm*531, mientras que las variedades TMS60444 y MCOL1505 fueron susceptibles (Trujillo et al. 2014).

En conclusión, este trabajo permitió evaluar el crecimiento bacteriano en estacas inoculadas mediante infiltración y en plantas *in vitro* inoculadas mediante punción en hoja. Las condiciones seleccionadas permitieron encontrar diferencias entre cepas y entre variedades de yuca. La evaluación de AUDPC en plantas *in vitro* inoculadas por punción en el tallo, permitieron validar este sistema de micropropagación como un sistema alternativo para el estudio de este patosistema. En conjunto los resultados obtenidos evaluando métodos de inoculación alternativos, tanto en plantas *in vitro* como en estacas aportan alternativas para el estudio del patosistema yuca- *Xpm*.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los tres secciones anteriores permitieron optimizar varios aspectos indispensables en la interacción yuca- *Xpm* como *i*) la inducción de distintas respuestas tanto en plantas de yuca como de tabaco por efecto de *Xpm*, *Xe* ó *Agrobacterium*, *ii*) un sistema de liberación de TALEs, *iii*) un método de inoculación en hoja, *iv*) las condiciones para la expresión transitoria en yuca, *v*) los parámetros para evaluar el crecimiento bacteriano en plantas adultas y crecidas *in vitro* y *vi*) la validación del sistema de plantas crecidas *in vitro* para la evaluación del patosistema.

La variación en el fenotipo en planta utilizando la infiltración en hoja, presentó variaciones entre los distintos sistemas de liberación evaluados, las cepas bacterianas y entre TALEs de diferente tamaño. En tabaco se observó la activación ó no de HR por parte de algunas cepas de *Xpm*, mientras que en yuca se evidenció el desarrollo de algunos fenotipos con diferentes características. Las inoculaciones con *Xe* y *A. tumefaciens* en yuca desencadenaron únicamente la formación de manchas marrón por efecto de los TALEs transformados en *Xe* ó de las cepas de *Agrobacterium*. Caso contrario al efecto generado por *Xpm* en yuca en donde se observaron fenotipos de susceptibilidad y de resistencia. El fenotipo de susceptibilidad se caracterizó por la formación de manchas acuosas alrededor del punto de inoculación, por el contrario, el fenotipo de resistencia se caracterizó por la formación de manchas necróticas de color marrón tipo HR. La utilidad de la infiltración se demostró en varios experimentos independientes. Su uso también fue determinado en experimentos de expresión transitoria del gen *GUS* en yuca. Reafirmando la versatilidad de la infiltración como técnica alternativa para la inoculación en yuca.

La inoculación tradicional en tallo también se utilizó, pero en plantas crecidas *in vitro*. Los resultados mostraron un patrón de síntomas distinto al observado en hoja. En tallo no se desarrollaron manchas acuosas como un síntoma temprano, en su lugar se observaron lesiones necróticas acompañadas de exudados en el punto de inoculación. Esto ocurre debido a la movilización del microorganismo hacia otras partes de la planta por el xilema (Aung et al. 2018).

Otros parámetros evaluados en estos capítulos fueron los tiempos de respuesta, la concentración de inóculo, distintas cepas y variedades de yuca. El tiempo de respuesta mostró variaciones entre plantas crecidas *in vitro* y plantas adultas, las respuestas son más tempranas en plantas crecidas *in vitro*. De los tres tipos de bacterias evaluadas, *Xpm* fue la única que permitió observar diferencias entre cepas y TALEs de distinto tamaño. Razón por la cual fue seleccionada para los experimentos abordados en el tercer y cuarto capítulo. Las concentraciones del inóculo bacteriano, variaron dependiendo del método de inoculación (infiltración, inoculación en tallo ó perforación más aplicación del inóculo), tipo de evaluación (síntomas ó crecimiento bacteriano) y del tipo de sistema en planta (adultas ó crecidas *in vitro*). Su selección dependerá del experimento de interés. El último parámetro evaluado fue el fondo genético de la planta. Su efecto se evaluó en algunas variedades de yuca mediante expresión transitoria utilizando cuatro cepas de *Agrobacterium*. La expresión transitoria del gen *GUS* se logró solo en algunos casos. Este efecto diferencial no permitió continuar con la evaluación de los TALEs mediante expresión transitoria. Como método alternativo se utilizó la interacción compatible entre *Xpm* y yuca, determinando fenotipos tanto de resistencia y como de susceptibilidad hacia un TALE específico.

El estudio actual presenta el primer reporte de la activación de una respuesta de resistencia en yuca por parte de un efector, lo que representa un avance importante en la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia. En el siguiente capítulo se abordarán las bases de la resistencia, enfocándose principalmente en las diferencias a nivel transcripcional de una respuesta de resistencia y una de susceptibilidad en plantas con el mismo fondo genético. Mientras que, el cuarto capítulo se enfocará en la búsqueda de los genes ejecutores candidatos.

Capítulo 3

“no es matando guerrilleros, o policías, o soldados, como parecen creer algunos, como vamos a salvar a Colombia. Es matando el hambre, la pobreza, la ignorancia, el fanatismo político o ideológico, como puede mejorarse un país”

Héctor Abad Gómez.

Capítulo 3. Resistance and susceptibility to *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* in cassava: a transcriptomic comparison (or two sides of the same coin)

3.1 Introduction

The genus *Manihot* covers around 98 species, however only *Manihot esculenta* (cassava) is cultivated as food source (Rogers & Appan 1973). Cassava was originally cultivated by the native Amazonians around 5000-7000 years ago and was introduced to Africa during XV century and more recently to Asia (Henry & Hershey 2002). Although able to reproduce sexually, cassava is mainly propagated by stem cuttings for production purposes (Ceballos et al. 2015). Cassava has caught much of the attention recently because of its high tolerance to drought, which might be highly relevant in a context of global warming (Okogbenin et al. 2013). Cassava roots store large quantities of starch representing the fourth most important calories source for the human population. In most American and African countries cassava is mainly cultivated by small farmers and used for local consumption (FAO 2018). However extensive farming of the crop is increasing, notably for industrial purposes (FAO 2018).

Different pests and diseases affect cassava production, including cassava mosaic disease (CMD) and cassava brown streak disease (CBSD) which are two highly threatening viral diseases although restricted to Africa. Cassava Bacterial Blight (CBB) is the most important bacterial disease and is present in all regions around the world where cassava is cultivated (Harris et al. 2015; Graziosi et al. 2016). CBB was first reported in Brazil in 1912 and later in Colombia and Venezuela (Lozano 1986). Recent studies have reported the expansion of the disease to different countries both in Africa and Asia, sometimes with high incidence (Harris et al. 2015; Graziosi et al. 2016). The estimated yield reduction caused by CBB ranged between 13 and 100% (Harris et al. 2015). The

causal agent of CBB is *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), previously known as *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) (Constantin et al. 2016). Epidemio-surveys of *Xpm* populations have provided information about *Xpm* geographic distribution and diversity, which is essential information for the deployment of pathogen-adapted host resistance in breeding programs (Bart et al. 2012). The best strategy to control CBB is through the use of resistant varieties (Boher & Verdier 1994). Resistance to CBB has been reported in some cassava varieties, however most of them are not productive (López & Bernal 2012). Improving our knowledge about anti-CBB immunity in cassava will be key to develop optimized strategies towards sustainable CBB control. Several genomic regions associated to QTL allowing for CBB resistance have been identified (Jorge et al. 2000; Jorge et al. 2001; Wydra et al. 2004; Soto Sedano et al. 2017; Tappiban et al. 2018). One resistance gene has been recently isolated conferring partial resistance to some *Xpm* strains (Díaz Tatis et al. 2018).

In the past decade, several transcriptomic studies including cDNA-AFLP, microarray and RNAseq, have been conducted to elucidate the molecular mechanisms activated in cassava in response to *Xpm*. cDNA-AFLP enabled to identify transcript-derived fragments coding for NBS and LRR-like domains, heat shock proteins or related to oxidative burst (Santaella et al. 2004). Based on a cDNA microarray-based gene expression analysis of resistant cassava varieties challenged with *Xpm*, defense genes involved in oxidative burst, protein degradation, and pathogen recognition were found upregulated, while genes involved in photosynthesis and metabolism were downregulated (Lopez et al. 2005). RNAseq experiments were also conducted more recently to assess the transcriptomic response of cassava leaves infected with *Xpm* during a compatible interaction (Muñoz-Bodnar et al. 2014)(Cohn et al. 2014).

Plant resistance depends on the recognition of PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) and effectors proteins triggering PTI (PAMP Triggered Immunity) and ETI (Effector Triggered Immunity) respectively (Jones & Dangl 2006). While PTI is effective against non-adapted potential pathogens, ETI confers strains specific resistance to host-adapted pathogens (Cui et al. 2015). The activation of PTI and ETI depends on the presence of plant receptors known as PRRs (Patter Recognition Receptors) and resistance (R) proteins respectively (Zipfel 2014). Although PTI and ETI receptors show distinctive cellular locations and biochemical properties, they share some downstream

signaling components, such as signaling pathways mediated by the defense hormones salicylic acid (SA), jasmonate (JA), and ethylene (ET) (Tsuda & Katagiri 2010). The modular network models for PTI and ETI identified 1.159 genes and 1.289 interactions shared in these two plant immune responses (Dong et al. 2015). Susceptibility occurs as a consequence of the absence of the R protein in the plant and/or the absence of the corresponding effector protein in the adapted pathogen. On the other hand, quantitative resistance (QR) depends on the concerted action of several genes and is considered durable and large spectrum although the molecular bases are less known (Corwin & Kliebenstein 2017). Transcriptomic studies have shown that during the different kind of plant–pathogen interactions (non host resistance, PTI, ETI, resistance, susceptibility and QR) plants activate relatively large overlapping responses (Grennan 2006; Chen et al. 2013; Dong et al. 2015; Nobori et al. 2018). The main difference resides on the time and intensity at which these responses are activated. The response is stronger and faster during ETI compared with susceptibility and/or non-host resistance (Cui et al. 2015). Another difference is that the defense modules in ETI are organized into relatively independent structures, explaining the robustness of ETI to genetic mutations and effector attacks (Dong et al. 2015).

A few transcriptomics studies have been conducted in cassava, but none of them are comparing the resistance and susceptibility responses in a same genetic background. For example, differentially expressed genes were identified by microarrays in the resistant variety MBRA685, and a subset of these genes were studied by QRT-PCR in the susceptible variety MCOL1522 (Lopez et al. 2005). As a consequence it is difficult to differentiate if the overlapping responses or the common activated genes are resulting from the activation of similar responses or if they are affected by the genetic background. Here, we explore the potential of using RNAseq to study the transcriptomic response of cassava leaves challenged by *Xpm* in a compatible and incompatible interaction by using the same cassava variety.

3.1 Material and methods

Plant Material

The cassava variety MBRA685 was grown *in vitro* on MS medium supplemented with sucrose (2% w.v⁻¹) under growth chamber conditions (day/night temperature = 28°C, 16h

photoperiod, and 80 % relative humidity). These plants were obtained from the CIAT germplasm collection and vegetatively propagated on MS medium for the inoculation assays. 8-week-old plants were used in all the assays.

Plant inoculations assays

Xpm318 and Xpm681 strains were grown at 28°C on liquid LPG medium (5 % yeast extract, 5 % peptone, 5 % glucose and 15 % agar) and resuspended in 10mM MgCl₂. For RNAseq and bacterial growth experiments, leaves of cassava plants grown *in vitro* were infected by “tip-inoculation”. Leaves were punctured with a sterile needle and wiped on both adaxial and abaxial sides using cotton swab previously immersed in a bacterial suspension (OD_{600nm}=0.5 for RNAseq experiments, and OD_{600nm}=0.002 for bacterial titers).

Bacterial titers in planta were assessed at 0, 3, 5 and 7 dpi. For each time point, four 0.7cm diameter leaf disks were excised from inoculated regions using a cork borer, and ground in 100 µL of 10 mM MgCl₂. Serial dilutions of the resulting leaf suspension were then plated on LPGA media, and *Xpm* colonies were counted to estimate the number of bacteria in the original leaf sample.

For AUDPC (area under disease progress curve) analysis, plants were infected by stem-inoculation. Stems of plants grown *in vitro* were punctured in the stem using a sterile syringe and the inoculum was spread into the wound using a cotton swab (“Q-tip”). A reference scale of disease symptoms ranging from 0 to 5 was used and symptoms development was monitored at 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24 days after inoculation as reported previously (Trujillo et al. 2014).

RNA extraction and QRT-PCR

Leaf samples were collected at 48 hours post inoculation (dpi) submerged in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Total RNA was extracted from leaves using Invitrap® Spin plant RNA minikit (STRATEC, Berlín, GER). 1ug of total RNA was treated with DNaseI RNase-free (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). First strand synthesis was performed with oligo(dT)₁₈ primers using the First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). The quality and yield of the RNA were assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (LAMFU lab, Andes University). 10 µL RT-PCR reactions typically contained 1 µL of diluted cDNA 1/10, 10 mM forward and reverse primers, and 1x OneTaq Master Mix with Standard Buffer (New England Biolabs). PCR was performed on

a LightCycler 96 de Roche® with the kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX de Bio-Rad. The program used was: 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C and 30 s at 58 °C. Analysis was performed using the delta–delta Ct method (Pfaffl 2004). The gene expression levels obtained were normalized using the Ct obtained for the housekeeping gene as reported previously (Hu et al. 2016). All experiments were performed in triplicate. Primers for qRT-PCR are listed in Table 3-1.

Table 3-1: qRT-PCR primer sets used in this study and their target genes.

Gene ID	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Function
Manes.06G114 200	TGGTCAGCACATTTGTTCT T	AGCAGACCCCGTCATTGTA G	ZINC FINGER CCCH DOMAIN CONTAINING PROTEIN 43 (HouseKeeping)
Manes.12G051 200	TTCTCGAAGACGATTCCGA TTT	CCCAGTAGCTGATCTCACA ATG	PDDEXK-LIKE FAMILY OF UNKNOWN FUNCTION
Manes.06G010 600	TGGTCTGGAGAGTCTCAG TAAT	GCACTTGCCTCAGAACTAG AA	PROTEIN NRT1
Manes.14G131 900	GGTCTCTCACAGTCTTCTT TGT	CCGATGCCTATTCTCTGGA TATT	DENTIN SIALOPHOSPHOPROT EIN-LIKE PROTEIN

cDNA library construction and sequencing

RNA-Seq libraries were prepared using the TruSeq RNA sample preparation kit (v2; Illumina), starting with 3 µg of total RNA. Nine libraries (three biological replicates for each condition) were indexed, pooled, and sequenced in a single lane on a NextSeq 500 (Illumina) using a paired-end run (2 × 150 pb). A minimum of 14 M reads were generated for each library.

Bioinformatics and statistical analyses

In total, three biological replicates for each condition (ie, nine libraries) were compared. For sample-wise allocation of the sequencing data, the raw reads from each lane of flow cell were demultiplexed using the respective index sequence. Initial processing of sequencing data was performed using the Galaxy Project Platform bioinformatics tools (Giardine et al. 2005), hosted by the IRD (Institut de Recherche pour le Développement) bioinformatics computing cluster (<http://bioinfo-inter.ird.fr:8080/root>). The Galaxy Workflow Management system was used to implement the whole data processing pipeline, the figure 3-1 show the steps used. The quality was assessed using FastQC (Galaxy version 0.63). The adapter sequences were removed from sequencing reads using ‘cutadapt’

(Galaxy versión 1,6) tool. Illumina reads were mapped against the cassava genome using BWA-MEM (galaxy versión 0.7.12), the aligned reads were then aggregated with htseq-count (Galaxy versión 0.6.1galaxy1). Galaxy's DESeq2 (Galaxy version 2.11.38) was employed to analyzed differentially expressed genes. In this study, genes were considered to be differentially expressed only when their absolute value of \log_2 fold change was $\log_2FC > 1$ and $\log_2FC < -1$ and P -value was <0.05 .

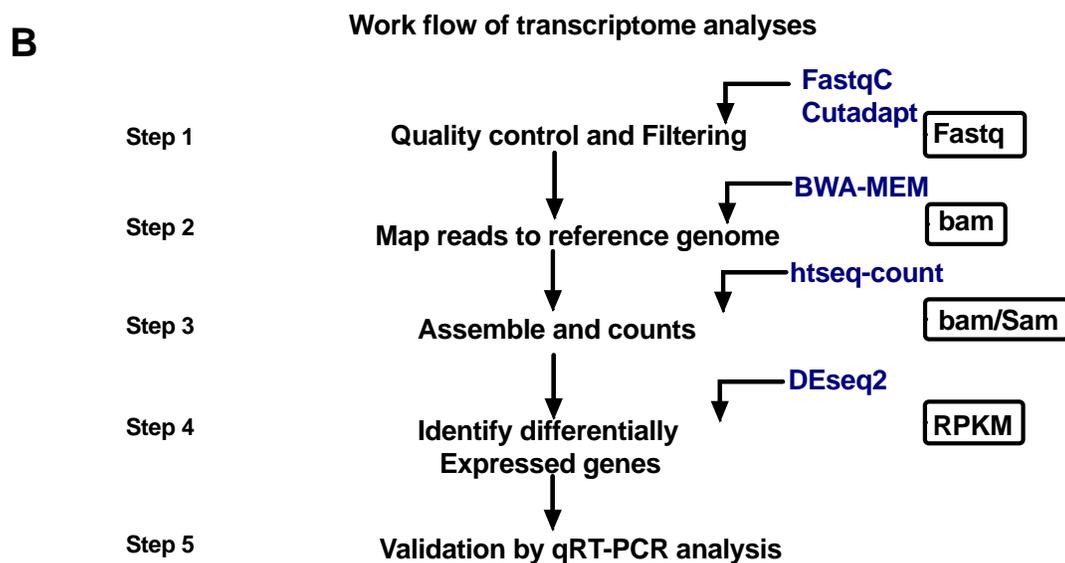
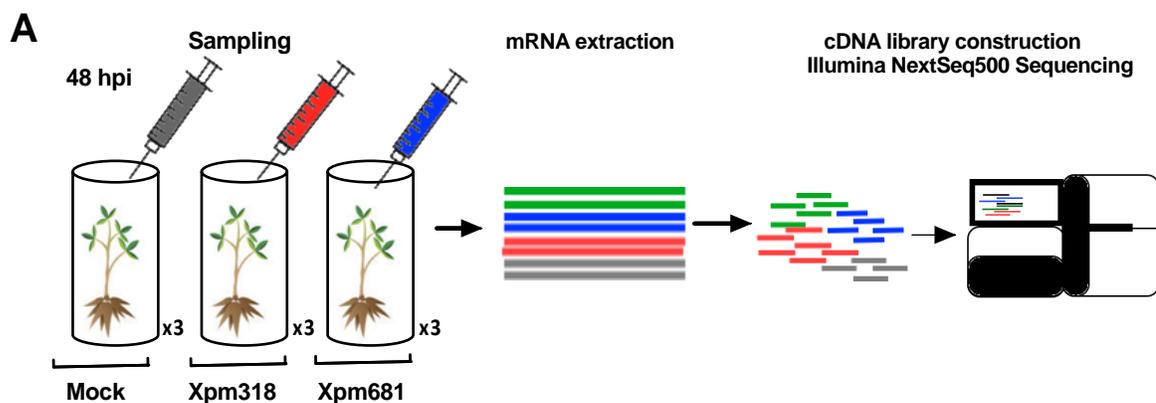
A heat map of the resulting list was generated to compare expression patterns across all samples using heatmapper (Babicki et al. 2016). Functionally enriched GO (Gene Ontology) terms in the differentially expressed gene dataset were identified through an automated computational pipeline using the PhytoMine database (<https://phytozome.jgi.doe.gov/phytomine/begin.do>). In order to find the pathways in which putative proteins of cassava plants inoculated with *Xpm* are involved, analysis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) was performed using the PhytoMine application from Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/phytomine/begin.do>).

Statistical analyses

Results are presented as scatter, dot or bar plots, in which the mean +/- standard error of the mean (SEM) are depicted. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 7 software. When the means of 2 groups were compared, a two-tailed unpaired ttest was used. When the means of 2 variables (e.g. induction and concentration) of more than 2 groups were compared, a two-way ANOVA with Tukey's or Sidak's multiple comparisons post-test was used. Results were designated significant when the P -value (P) < 0.05 : = $P < 0.05$, = $P < 0.01$, = $P < 0.001$, = $P < 0.0001$, ns = non-significant.

Figure 3-1: Experimental design and workflow of transcriptome analyses.

(A) Sample preparation for RNAseq. Cassava plant leaves were infiltrated with Mock, Xpm318 and Xpm681. RNA was isolated at 48 dpi and subjected to 150 base paired-end Illumina NextSeq500 sequencing. **(B)** RNA-seq analysis. FastqC and Cutadapt were used for quality control and filtering. The High-quality reads were retained and mapped to the *Manihot esculenta* reference genome (v6.1) using the BWA-MEM program, followed by transcript assembly, differential expression, and global analysis using htseq-count and DESeq2. The RNAseq analysis was performed on the Galaxy platform hosted by the IRD bioinformatics computing cluster.



3.3 Results

3.3.1. Plants of the MBRA685 variety grown in vitro show a differential response to Xpm681 and Xpm318

The pathotype of ten representative *Xpm* isolates from the Caribbean Region was previously determined, showing that the cassava variety MBRA685 was resistant and susceptible to strains Xpm681 and Xpm318 respectively, based on AUDPC data (Trujillo et al. 2014). To further validate the differential response of MBRA685 to Xpm681 and Xpm318 with plants grown *in vitro*, we performed stem-inoculation and evaluated disease symptoms progression. Plants inoculated with Xpm318 displayed faster symptom development as compared to plants inoculated with Xpm681 (Figure S3-1). The AUDPC values obtained for these two *Xpm* strains were of 1.715 and 1.576, respectively (Table 3-2). Although the differences observed were not statistically significant (P-value of 0.4015), according to the threshold of 1.59 which was previously established (Trujillo et al. 2014), MBRA685 is considered as susceptible to Xpm318 and resistant to Xpm681. The bacterial growth of these two strains was subsequently evaluated on MBRA685 at 3, 5 and 7 days post-inoculation (dpi). The growth of Xpm681 was significantly reduced compared to that of Xpm318 at each evaluated time point (Figure 3-2). Taken together these data demonstrate that MBRA685 is resistant to Xpm681 and susceptible to Xpm318.

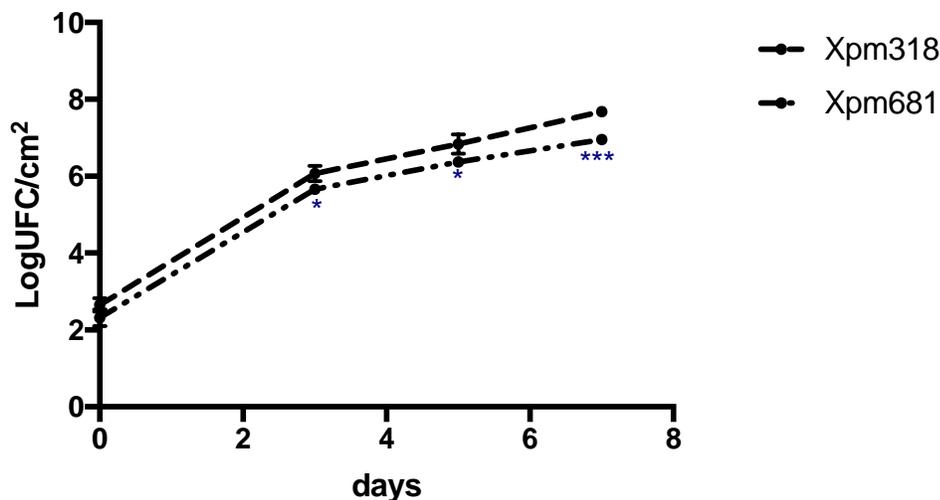
Table 3-2: Area Under Disease Progression Curve (AUDPC) of MBRA685 plants inoculated with two *Xpm* strains.

Data shown is the mean of the Log Σ AUDPC at 24 dpi from five replicates. The plant was considered to be resistant if the Log Σ AUDPC value <1.59 and susceptible when the Log Σ AUDPC value >1.69 according to (Trujillo et al. 2014).

Strain	Mean Log Σ AUDPC	Criteria
Xpm318	1,715	S
Xpm681	1,576	R

Figure 3-2: Growth levels for two *Xpm* strain on the MBRA685 cassava variety.

Bacterial growth of Xpm318 and Xpm681 following piercing and dipping on leaf ($OD_{600nm}=0.002$). The number of bacteria was quantified at 0, 3, 5 and 7 dpi, data represent a mean of three biological samples \pm SE.



3.3.2. A large number of differentially expressed genes is induced during Cassava resistance response to Xpm

A transcriptomic approach was carried out with the aim of establishing the molecular differences at the gene expression level in Cassava between a compatible and an incompatible interaction. MBRA685 leaf tissues inoculated with Xpm681 and Xpm318 were collected at 50 hpi and used to perform high-throughput RNA sequencing (RNAseq). Nine libraries (3 biological replicates x 3 treatments: plants inoculated with mock, Xpm681 and Xpm318) were indexed, pooled and sequenced in a single lane using Illumina NextSeq500. In total, more than 33 millions reads passed the quality filters (four millions per library) and reads count information was recorded for 33033 transcripts (Table 3-2). Pair-wise comparisons were conducted using the information of the libraries derived from the mock-treated plants and those from the plants inoculated with Xpm681 (resistant response) and Xpm318 (susceptible response). In Figure 3-3A, red dots in the MA plot represents the differentially expressed genes upon treatment with Xpm318 and Xpm681, compared to the Mock, highlighting a much larger quantity of differentially expressed genes (DEGs) by Xpm681 in MBRA685. A total of 2093 and 435 DEGs were obtained for

Xpm681 and Xpm318 treatments respectively, they were named Resistance- Differential Expressed Genes (R-DEGs) and Susceptibility-Differential Expressed Genes (S-DEGs). From the 2093 R-DEGs, 974 were induced and 1119 were repressed while S-DEGs included 158 induced and 277 repressed genes (Figure 3-3B). The resistant and susceptibility responses share in common 313 genes. The top 20 most induced or repressed R-DEGs and S-DEGs include genes encoding for transcription factors, MAP kinases and peroxidases. S-DEGs include repressed genes known to be important in plant immunity such as WRKY transcription factor, ethylene-responsive transcription factors and pathogenesis-related proteins (Table 4). Highly up-regulated genes (Log2FC > 2) exhibited higher fold change values when plants are challenged with Xpm681 compared to Xpm318 (Table 3-4).

Table 3-3: Summary of clean reads alignment to the reference genome

Library	Reads
Mock_1	6009990
Mock_2	2193766
Mock_3	6893798
Xpm318_1	3487663
Xpm318_2	3510026
Xpm318_3	3985209
Xpm681_1	3483308
Xpm681_2	2711377
Xpm681_3	2897772

Figure 3-3: Longitudinal differential gene expression of bacterial blight in cassava.

(A) MA analysis showing differentially expressed genes between Mock and the strains Xpm318 and Xpm681 ($p < 10^{-6}$), which are highlighted in red. (B) Bar chart of the numbers of genes found to be upregulated or downregulated in cassava plants at two *Xpm* strain Xpm318 and Xpm681.

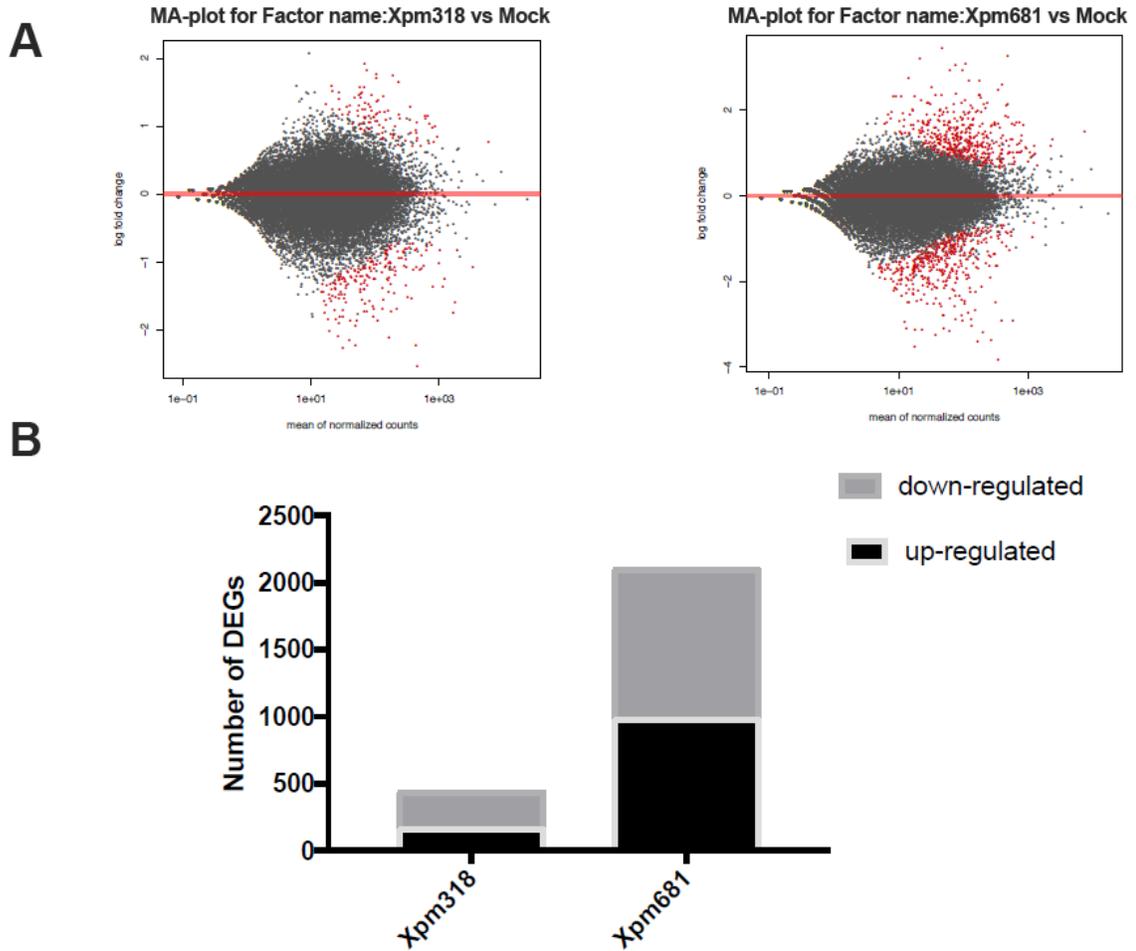


Table 3-4: Top 20 significantly upregulated/downregulated genes in MBRA685 activated with Xpm681 and Xpm318

Xpm681				Xpm318			
Gen	Log 2FC	Adjusted P-value	Seq. description	Gen	Log 2FC	Adjusted P-value	Seq. description
Manes.06G 010600	3,46	2,00E-15	dentin sialophosphoprotein-like protein	Manes.06G 059800	2,08	na	plant protein of unknown function
Manes.09G 092600	3,28	1,00E-07	haloacid dehalogenase-like hydrolase	Manes.03G 149600	1,92	2,00E-04	protein male sterile 5
Manes.14G 166300	3,22	8,00E-09	dentin sialophosphoprotein-like protein	Manes.02G 078400	1,82	2,00E-04	aspartyl protease family protein
Manes.03G 149600	3,08	5,00E-13	pthr36326:sf1 - protein male sterile 5	Manes.16G 136800	1,77	1,00E-06	cryptochrome dash
Manes.09G 025200	3,06	2,00E-12	transcription factor nf-y alpha-related // subfamily not named	Manes.16G 006000	1,75	2,00E-04	adenylyl-sulfate reductase (thioredoxin) /
Manes.04G 165400	2,93	2,00E-14	plant protein of unknown function	Manes.09G 009700	1,71	5,00E-04	plant protein of unknown function
Manes.15G 120900	2,93	6,00E-16	voltage and ligand gated potassium channel	Manes.14G 095900	1,65	8,00E-07	phosphoenolpyruvate carboxylase 4
Manes.07G 119800	2,76	6,00E-06	regulator of chromosome condensation repeat	Manes.04G 135800	1,6	na	polyadenylate-binding protein 7
Manes.05G 026700	2,69	6,00E-13	g-box-binding factor 2-related	Manes.09G 168400	1,6	1,00E-02	cullin 1 (cul1, cdc53)
Manes.06G 164500	2,68	8,00E-16	mate efflux family protein 1	Manes.15G 033100	1,57	6,00E-03	early light-induced protein 1, chloroplastic-related
Manes.02G 146000	2,59	4,00E-15	solute carrier family 25 (mitochondrial oxoglutarate transporter),	Manes.05G 110000	1,57	6,00E-03	putative nuclear localisation signal (ninja_b)
Manes.06G 157400	2,53	8,00E-08	RNA polymerase sigma factor sige	Manes.06G 157400	1,52	1,00E-02	RNA polymerase sigma factor sige
Manes.16G 006000	2,47	7,00E-05	adenylyl-sulfate reductase (thioredoxin)	Manes.01G 177600	1,5	na	plant protein of unknown function
Manes.05G 016200	2,39	2,00E-08	response regulator of two-component system	Manes.06G 171400	1,5	6,00E-04	GTP-binding protein-related
Manes.14G 131900	2,37	2,00E-06	protein nrt1/ ptr family 6.2	Manes.11G 125000	1,49	1,00E-02	mitogen-activated protein kinase kinase
Manes.s07 6700	2,36	2,00E-06	nitrate reductase (NADH) /	Manes.03G 043500	1,49	na	plant protein of unknown function
Manes.09G 041900	2,36	1,00E-15	ATP-binding cassette transporter	Manes.15G 039700	1,48	2,00E-03	ethylene-responsive transcription factor 1 (ERF1)
Manes.14G 018500	2,35	1,00E-10	RNA polymerase sigma factor (sigma70)	Manes.07G 119800	1,48	na	regulator of chromosome condensation repeat
Manes.06G 123400	2,33	2,00E-03	bidirectional sugar transporter sweet10	Manes.05G 016200	1,46	9,00E-03	response regulator of two-component system
Manes.10G 025500	2,33	1,00E-03	regulator of chromosome condensation repeat	Manes.15G 116100	1,46	2,00E-03	senescence regulator
Manes.04G 144900	-2,78	5,00E-13	germin-like protein subfamily 3 member 3	Manes.02G 085100	-1,78	na	WRKY transcription factor 71-related
Manes.15G 154300	-2,79	1,00E-09	CCT motif	Manes.03G 183500	-1,8	2,00E-03	eukaryotic aspartyl protease family protein

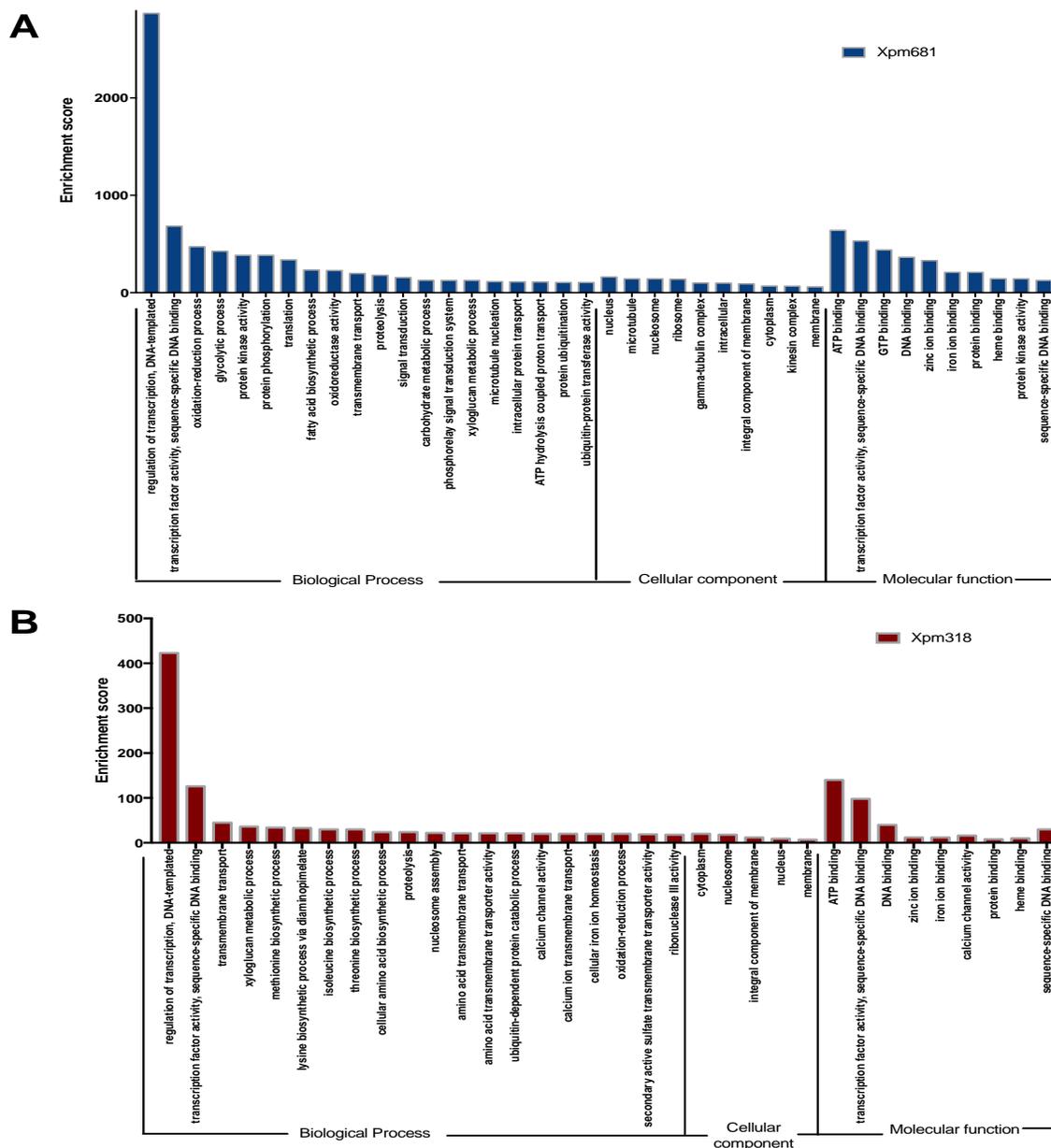
Manes.s09 9200	-2,79	5,00E -11	protein kinase domain (pkina) /	Manes.14G 059900	-1,8	na	plant protein of unknown function (duf868) (duf868)
Manes.05G 140900	-2,88	2,00E -14	multi-copper oxidase type i family protein-related	Manes.14G 102400	-1,81	2,00E -04	b-box zinc finger (zf-b_box) // cct motif (cct)
Manes.14G 102400	-2,89	1,00E -09	b-box zinc finger (zf-b_box) // cct motif (cct)	Manes.17G 095800	-1,82	4,00E -04	plant protein of unknown function
Manes.11G 115200	-2,91	2,00E -11	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 14-related	Manes.06G 131300	-1,84	2,00E -03	ethylene-responsive transcription factor erf106
Manes.11G 096600	-2,92	9,00E -28	aquaporin pip2-7	Manes.02G 007500	-1,86	2,00E -03	cellulose synthase-like protein g1-related
Manes.15G 024700	-2,92	2,00E -24	plant protein of unknown function	Manes.17G 045600	-1,86	5,00E -04	ubiquitin-conjugating enzyme e2 24-related
Manes.16G 107200	-2,95	1,00E -05	protein of unknown function	Manes.02G 075500	-1,88	2,00E -04	pathogenesis-related protein bet v 1
Manes.04G 066900	-3,04	2,00E -17	phosphate-induced protein 1 conserved region (phi_1)	Manes.05G 085800	-1,88	2,00E -04	dimethylaniline monooxygenase
Manes.15G 090700	-3,09	5,00E -06	basic helix-loop-helix domain	Manes.02G 162000	-1,9	5,00E -04	EamA-like transporter family (EamA)
Manes.02G 053000	-3,1	2,00E -12	pollen allergen (pollen_allerg_1)	Manes.03G 099400	-1,95	6,00E -04	protein of unknown function
Manes.03G 183500	-3,11	3,00E -07	eukaryotic aspartyl protease family protein	Manes.13G 096100	-2,01	3,00E -04	peroxidase 17
Manes.17G 010400	-3,13	3,00E -07	plant protein of unknown function	Manes.10G 128500	-2,1	5,00E -04	cupin (cupin_1)
Manes.05G 091200	-3,15	3,00E -13	extensin, proline-rich protein // subfamily not named	Manes.04G 066900	-2,12	2,00E -09	phosphate-induced protein 1 conserved region (phi_1)
Manes.05G 103900	-3,2	7,00E -23	pollen allergen (pollen_allerg_1)	Manes.06G 092400	-2,15	3,00E -05	gibberellin-regulated protein 4
Manes.18G 022000	-3,26	2,00E -10	beta-galactosidase 5	Manes.06G 128700	-2,23	1,00E -06	respiratory burst oxidase homolog protein a-related
Manes.05G 200200	-3,37	7,00E -29	tubulin beta-6 chain	Manes.12G 076800	-2,23	3,00E -13	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 9
Manes.11G 015200	-3,41	8,00E -16	dnaj homolog subfamily b member 6 (dnajb6)	Manes.07G 051500	-2,27	3,00E -05	protein-related
Manes.01G 034500	-3,51	1,00E -08	pollen allergen (pollen_allerg_1)	Manes.15G 024700	-2,54	9,00E -19	plant protein of unknown function

The two most prevalent GO categories for R-DEGs, S-DEGs and common genes to both responses were the same: “regulation of transcription” and “transcription factor activity” (Figure 3-4C). In addition, these two GO categories are also the most predominant in the DEGs shared for the resistant and susceptible response. This underscores the importance of the gene expression reprogramming during plant-pathogen interactions. On the other hand, some GO categories, as for example “protein kinase activity” and “phosphorylation” are present exclusively during the resistance response (Figure 3-4A). The most prevalent GO for S-DEGs is “amino acid biosynthetic process”, which are not found in R-DEGs GO (Figure 3-4B). BioCyc metabolic pathways enrichment analysis

revealed that R-DEGs were mostly enriched in “Calvin-Benson-Bassham cycle”, “gluconeogenesis”, “sucrose biosynthesis” and “glycolysis” while S-DEGs were mainly involved in “aerobic respiration” and “anthocyanin biosynthesis” (Table 3-5).

Figure 3-4: Gene ontology functional analyses of DEGs.

(A) Xpm681 (B) Xpm318 (C) common genes. Blue denotes DEGs for Xpm681, red depicts DEGs for Xpm318 and green for common genes.



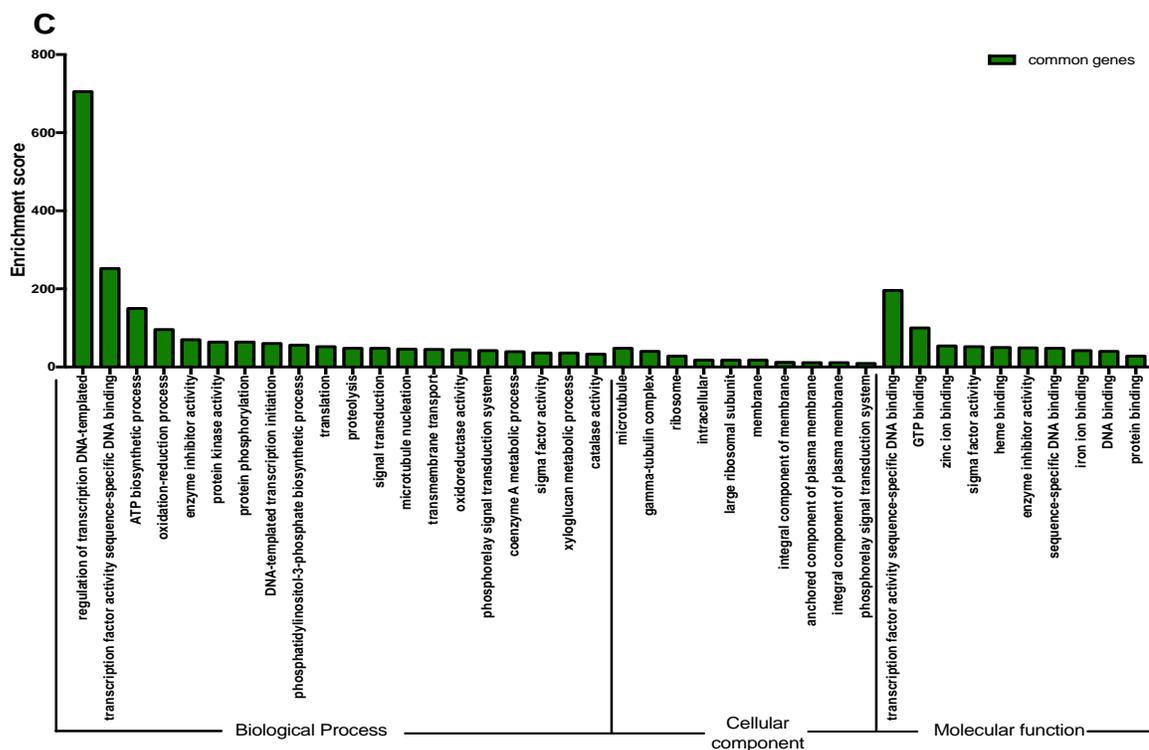


Table 3-5. BioCyc metabolic pathways enriched by the effect of Xpm318 and Xpm681 in cassava plants (top five in each).

TREATMENT	PATHWAY INFO IDENTIFIER	PATHWAY NAME	COUNT
Xpm681	CALVIN-PWY	Calvin-Benson-Bassham cycle	16
	GLUCONEO-PWY	gluconeogenesis I	15
	PWY66-399	gluconeogenesis III	14
	SUSCSYN-PWY	Sucrose biosynthesis I (from photosynthesis)	14
	PWY-5464	Superpathway of cytosolic glycolysis (plants), pyruvate dehydrogenase and TCA cycle	14
Xpm318	PWY-3781	Aerobic respiration I (cytochrome c)	2
	PWY-7279	Aerobic respiration II (cytochrome c)	2
	PWY-5125	anthocyanin biosynthesis	2
	PWY-5153	anthocyanin biosynthesis(delphinidin 3-O-glucoside)	2

PWY-7267

anthocyanin biosynthesis (pelargonidin 3-O-glucoside)

2

3.3.3 Differences in R and S responses are quantitative

A heat map was constructed using the R-DEGs and excluding those shared with the S-DEGs. However, for comparative purposes the log₂fold change for the corresponding genes during the compatible response was included (Figure 3-5B). It is interesting to note that most of these R-DEGs, induced or repressed, are also subtly induced or repressed during the compatible response. The general pattern of gene expression is similar and differences resides mostly on the intensity or level of the induction or repression. Only 176 (9.89 %) and 1604 (90.11 %) genes showed an opposite pattern or no expressed comparing the two responses. A similar pattern is observed when the same analysis was conducted for the specific S-DEGs (Figure 3-5A). The general expression profile for the S-DEGs in the resistant response was similar although the level expression was lower. In this case, only 63 (52.07 %) and 58 (47.93 %) genes showed an identical expression pattern or no expression at all. Finally, the heat map from the 313 shared genes between the two responses shows a similar pattern (Figure 3-5C). Even for genes differentially expressed upon infection of both *Xpm* strains, the expression level is, in the majority of the cases, higher in the resistant response, i.e. with *Xpm681* (Figure 3-6).

Figure 3-5: Gene expression profile.

Venn diagram representing the number of DEGs between Xpm318 and Xpm681 in the same cassava varieties MBRA685 at 50 hpi. Heatmap of gene expression values depicting clustering of genes between Xpm681 (A), Xpm318 (B) and common genes (C) based on the expression of mRNAs for a set of significant genes ($P_{adj} < 0.001$). Sample names are represented in columns and significant genes are represented in rows. Low to high expression is represented by a change of color from red to green, respectively.

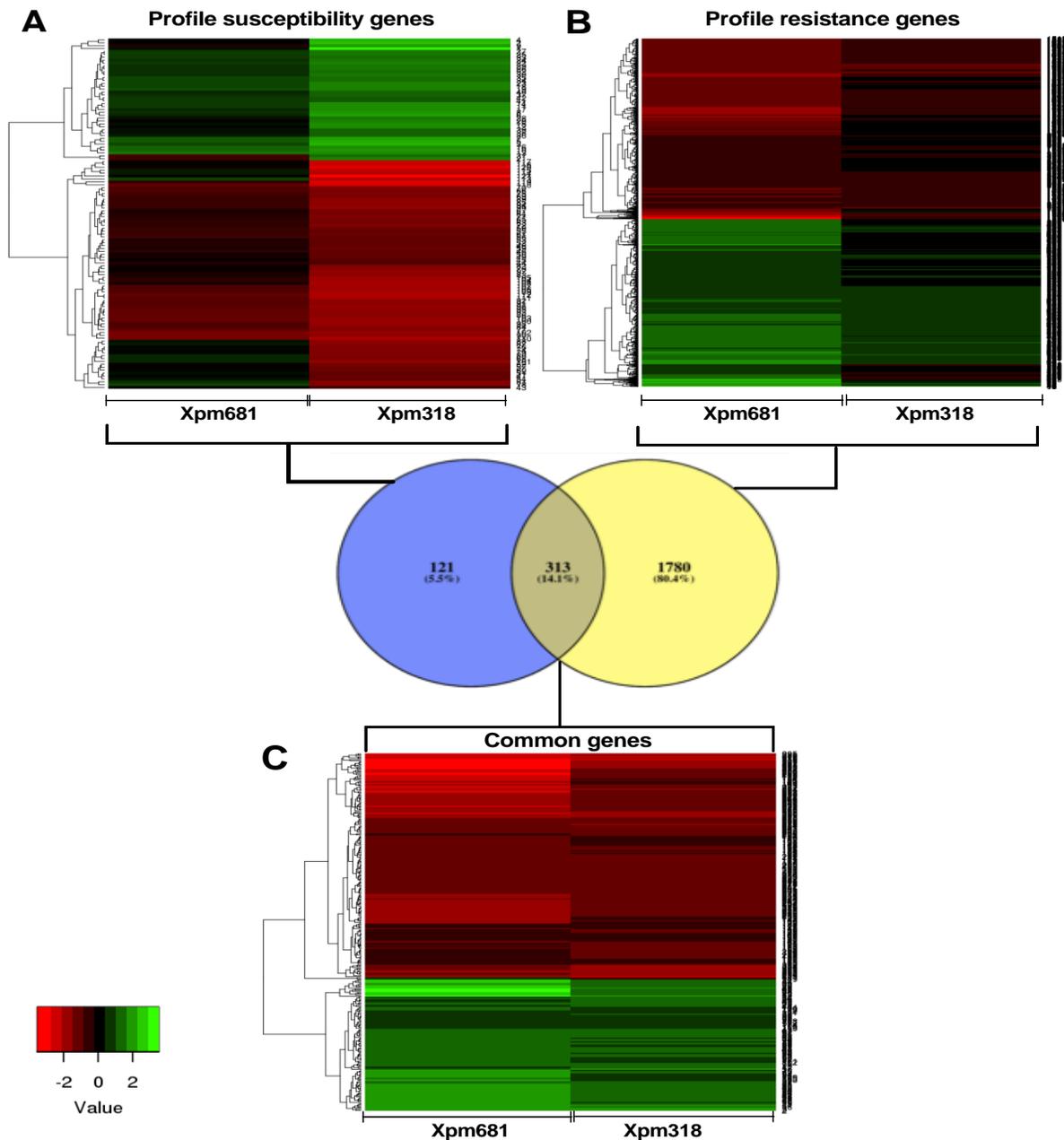
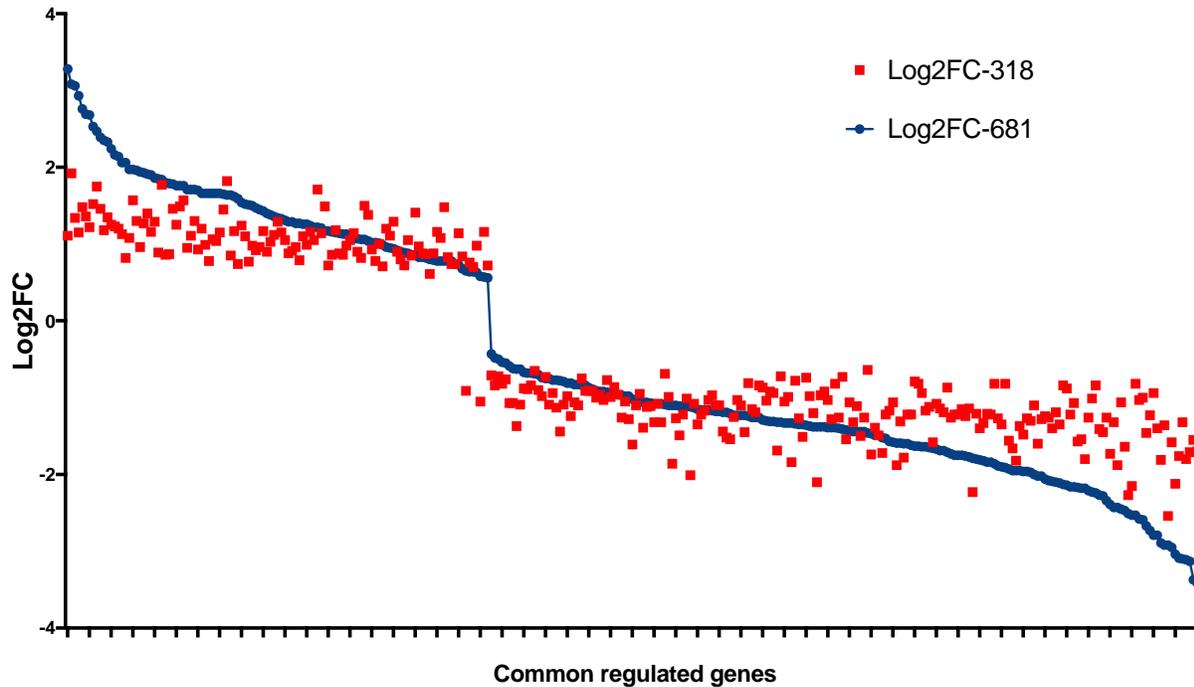


Figure 3-6. Log2FC of expression levels of genes regulated in both resistant and susceptible response after *Xpm* inoculation

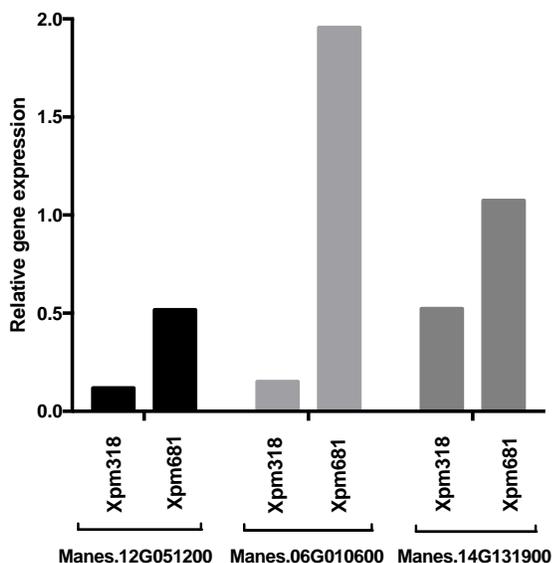


3.3.4 Validation of the selected genes confirm the suitability of RNAseq data

To further validate the induction of genes related to defense, we measured by qRT-PCR experiments the expression of three genes activated by Xpm681, including Manes.12G051200, Manes.06G010600 and Manes.14G131900. As shown in Figure 8, these three genes showed increased expression in the leaf samples infiltrated with Xpm681 at 50 hpi (Figure 3-8). The observed expression trends are similar to those obtained with the RNAseq data, whereby Manes.06G010600 showed the highest increase, followed by Manes.14G131900 and Manes.12G051200.

Figure 3-7: qRT-PCR validation of differentially expressed 3 genes related to defense response at 50 h post-inoculation.

Expression levels of each sample were normalized on the basis of transcript amounts of zinc finger cch domain- containing. Relative expression values for qRT-PCR analysis were determined against the average value of mock sample. Each experiment determined in three technical replicates and standard deviation (n = 3).



3.4 Discussion

Several studies based on transcriptomic (Santanella et al. 2004; Lopez et al. 2005; Muñoz-Bodnar et al. 2014; Cohn et al. 2014) and gene network analysis (Gómez-Cano et al. 2018) have generated data to get insights into the global responses of cassava to *Xpm* infection. Here we developed a transcriptomic approach to compare the cassava host response in a compatible and incompatible interaction, based on the use of the MBRA685 variety inoculated with Xpm618 and Xpm318 strains. This study revealed quantitative differences at the gene expression level between both conditions. Though a larger group of genes was differentially expressed in the incompatible interaction, a large proportion of genes showed similar expression patterns in the two conditions.

Some transcriptomic studies of the cassava-*Xpm* interaction are available but none has ever tackled the comparison of a compatible vs. incompatible interaction on the same genetic background. Here we focused on the cassava variety MBRA685 which was

previously categorized as resistant and susceptible to strains Xpm681 and Xpm318, respectively (Trujillo et al. 2014). We established a method to infect plants grown *in vitro* and to evaluate symptoms (Mora et al. in press). AUDPC experiments led to values of 1.576 and 1.715 on MBRA685 plants inoculated with Xpm681 and Xpm318 respectively, classifying these interactions as incompatible and compatible. In addition, growth curve analysis highlighted a small but significant difference between Xpm681 and Xpm318 in MBRA685, with a higher titer for Xpm318.

A transcriptomic approach was next carried out at 50 hpi to obtain a general picture of the early transcriptomic changes during these two responses. The identification of DEGs was done comparing each type of response (R or S) against mock-treated plants and categorized as R-DEGs and S-DEGs. The number of R-DEGs was considerably higher (1780 genes) than S-DEGs (121 genes). These numbers contrast with previous reports. For instance, Lopez et al (2005) reported on the identification of 150 DEGs upon the analysis of a cassava microarray with 5000 ESTs during an incompatible interaction. Using an RNAseq approach, a profile of gene expression conducted at 1, 5 and 7 dpi on the resistant cultivar TMS30572 led to the identification of a relatively similar number of genes 142, 20 and 145 at 1, 3 and 5 dpi, respectively (Gómez-Cano et al. 2018). Analysis of the susceptible variety MCOL1522 comparing the response to a pathogenic and non-pathogenic *Xpm* strain identified around 3,000 genes. Gómez-Cano et al. (2018) conducted a preliminary effort comparing the susceptible and resistant response obtained upon the analysis of different cassava varieties and at different inoculation time points. The differences reported can be attributed to differences during the differential responses but also to genetic differences present in the two cassava cultivars (TMS30572 and MCOL2215). In addition, all these studies employed different cassava varieties, several *Xpm* strains, alternative inoculation methods, diverse tissues (stems and leaves) and the time points studied were also, in most of the cases, different from those used in this study. These variables make it difficult to conduct comparative analysis. To tackle this problem and elucidate the real differences, the same cassava variety and identical experimental conditions were conducted to detect the differential responses between resistance and susceptibility. Under these circumstances the differences between R-DEGs and S-DEGs may constitute a better representation of the reality. It is possible to interpret the larger number of DEGs during the resistance response as a need to generate a strong and effective response, which is achieved through changes in expression of more genes (Du

et al. 2015; Gervasi et al. 2018). The GO analysis suggested that the two more predominant categories in both transcriptomes were related to regulation of transcriptional reprogramming of gene expression, supporting this hypothesis. Even though in the S-DEGs these GO categories were also the most relevant in terms of levels of differential expression, the difference in number of genes is drastically lesser. A general conclusion derived from these results, is both responses shared mainly similar biological processes and cellular components; however, the amplitude (robust and weak) of these responses differed between them.

More attributed function of DEGs was contained in biological process and molecular function categories than in cellular component categories for R-DEGs and S-DEGs (Figure 3-5). Functional characterization of DEGs found in resistant plants showed that four major biological processes predominated: “regulation of transcription”, “oxidation-reduction”, “protein phosphorylation” and “protein kinase activity”. These four processes appear critical to plant defense signaling and activity against *Xpm* in cassava, the same responses were observed in in the PssALF3 in alfalfa (Nemchinov et al. 2017). On the other hand, in the S-DEGs the major biological process were metabolic and biosynthetic process. The induction of “amino-acid biosynthetic process” can be correlated with previous metabolomic studies in *Arabidopsis*, where the levels of isoleucine, threonine, alanine, methionine and glutamine were increased after DC3000 inoculation, the significant changes in the metabolites, indicating specific metabolite reprogramming during infection. Similar response for S-DEGs and R-DEGs was found in the PssALF3 in alfalfa (Nemchinov et al. 2017).

Once identified the specific R-DEGs and S-DEGs, the expression level of the same genes for the opposite response was included and visualized through heat maps (Figure 3-5). This analysis allowed to identify that even no differentially expressed, the general pattern of gene expression was quite similar in both cases. As was mentioned previously, the two most prevalent GO categories related to control of gene expression were the same for the two responses. All together, these results highlighting the great level of overlapping of these two responses. So, the question that rises is what makes a plant susceptible? An important point resides on the number of DEGs as was mentioned above. Other important aspect is the intensity in the gene expression. Even if the expression pattern is similar, in most of the cases the level of gene expression was higher during the resistance response

compared to susceptibility. In a pioneer study comparing different responses (non-host, incompatible and compatible interaction), it was established the general gene expression pattern is similar and differences resides on the intensity and time of the response (Tao et al. 2003). Although kinetics was not conducted in the present work, a similar conclusion concerning the intensity of the response was obtained. A detailed inspection of the genes can also provide an explanation for the differences between R and S. Genes encoding WRKY transcriptional factors, ethylene-responsive transcription factor and pathogenesis-related protein Bet v I exhibited a dramatic down-regulation during the S response. These genes are known to have a link to defense responses in plants (Withers & Dong 2017; Herrera et al. 2018). The greater extent of down-regulation of these genes is likely related to the fast infection progression in the susceptibility response. In contrast, most of these genes were identified as up-regulated or at least not differentially expressed, but not down regulated, in the R-DEGs. These pivotal genes can explain the successful establishment of resistance response against Xpm681 and the ability to proliferate of Xpm318. The qRT-PCR data were almost consistent with profiles detected by RNA-seq (Figure 3-7), confirming the trends of up- or down-regulation of three genes analyzed. The expression pattern of Manes.12G051200, Manes.06G010600 and Manes.14G131900 were opposite between R and S responses, being up-regulated by Xpm681 while down-regulated by Xpm318. Certainly, the evaluation of more genes by qRT-PCR should provide more reliable information for verify the genes involved in the process of resistance and susceptibility to the pathogen.

It is possible to speculate that the differential response of MBRA685 to the two *Xpm* strains used in this work is given by the presence of a putative effector in Xpm681, which is recognized by the plant. The genome sequence and a comparative genome analysis will help to establish possible differences at effector repertoires between these two strains. It is important also to consider the possibility that the differential responses of MBRA685 to these two strains may result from the action of TALEs (Transcription Activator Like Effectors). The repertoire of TALEs for these two strains is not known, but it is possible that Xpm681 has a TALE which is not present in Xpm318, and which is able to induce an executor (*E*) gene. Alternatively, it is also possible to consider that Xpm318 has a TALE which is not present in Xpm681, and which is inducing a susceptibility (*S*) gene. In any of the two situations, the knowledge of the genome of these strains and their TALE

content, complemented with the transcriptomic data presented here, will help to the identity the corresponding *E* or *S* genes.

3.5 SUPPORTING INFORMATION

Figure S3-1. Area Under Disease Progression Curve (AUDPC) of MBRA685 plants inoculated with Xpm318 and Xpm681.

Symptoms observed upon stem-inoculation of MBRA685 plants grown *in vitro* with *Xpm* cell suspensions ($OD_{600nm}=0.02$) 24 dpi.



Capítulo 4

“Todo el mundo habla de paz, pero nadie educa para la paz, la gente educa para la competencia y este es el principio de cualquier guerra. Cuando eduquemos para cooperar y ser solidarios unos con otros, ese día estaremos educando para la paz”

Maria Montessori

Capítulo 4. A candidate cassava Executor (E) gene targeted by TAL15 from *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*

4.1 Introduction

The *Xanthomonas* genus forms a group of plant pathogenic bacteria able to infect ~400 host species (Hayward 1993), including a wide variety of economically important crops, such as rice, citrus, banana, cabbage, tomato, cassava, pepper and bean (Jacques et al. 2016). To cause disease *Xanthomonas* species depend on a set of specialized virulence proteins known as effectors (Kay & Bonas 2009). Effector proteins are translocated into host plant cells through a type three-secretion system (T3SS) (Diepold & Armitage 2015). *Xanthomonas* effectors can be divided into two groups of proteins referred to as non-TAL (Transcription Activated Like) and TAL effectors (White et al. 2009). The non-TAL effectors include a large set of unrelated proteins, most of which interfere with the plant immune system (Medina et al. 2018). On the other hand, the main function of TAL effectors is to modify host gene expression, acting as bona fide plant eukaryotic transcription factors (Boch & Bonas 2010; Bogdanove et al. 2010). The number of TAL effectors among *Xanthomonas* species is variable as well as among strains in a given pathovar (Schornack et al. 2013). The first 100 amino acid of the TAL proteins are involved in the translocation through the T3SS (Boch & Bonas 2010). In the C-terminus there is a single or two NLSs (Nuclear Localization Signal) and an AAD (acidic activation domain) (Boch & Bonas 2010; Bogdanove et al. 2010), which are responsible for host nuclear localization and recruitment of the host RNA polymerase machinery. The central region of TAL effectors is characterized by a series of variable number of 34-35 amino acid repeats. These repeats are highly conserved except in residues 12 and 13, which are named RVDs (Repeat Variable Di-residues). These RVDs are responsible of the recognition of a specific DNA sequence in the promoter of particular host genes. Each repeat binds to a single nucleotide and the binding specificity is governed by a code

where most frequent RVDs such as HD, NN, NG, and HG, recognize A, T, C, and G respectively (Boch et al. 2009; Moscou & Bogdanove 2009; Boch et al. 2014; Cernadas et al. 2014). The sequence recognized by a particular TAL effector is known as EBE (Effector Binding Element). In this way, it is possible to predict EBEs within promoters of host target sequence of TAL effectors, based on the number and identity of RVDs. In addition it is possible to engineer artificial (or designer) TAL effectors with customized repeat arrays (Doyle et al. 2013).

TAL effectors are able to induce the expression of disease susceptibility *S* genes, i.e. genes conferring an advantage to the bacteria during infection. At least 11 *S* genes have been identified so far in different *Xanthomonas*-host pathosystems. and most of them encode either transporters (sugar or sulfate) or proteins involved in transcriptional regulation (Boch et al. 2014). The best-known *S* genes encode sucrose transporters of the SWEET family (Chen 2014), the function of which is to allow the over-accumulation of sugar at sites of *Xanthomonas* multiplication, e.g. the apoplast. It is believed that the bacteria use it as a carbon source, thereby promoting virulence (Chen 2014). During plant-*Xanthomonas* co-evolution, different mechanisms of resistance involving TAL effectors have raised. Preventing TAL effector-mediated induction of *S* genes may be achieved through the accumulation of mutations in EBEs (Hutin et al. 2015), or even in its vicinity (Cox et al. 2017). It has been shown in rice that some genotypes with mutations in the EBE of *SWEET11* which is targeted by PthXo1 of *X. oryzae* pv. *oryzae* are avoiding the induction of the *S* gene, leading to resistance by loss of susceptibility (Chu et al. 2006; Yang et al. 2006; Liu et al. 2011). Alternatively, EBEs can be present in the promoter of genes conferring or activating plant resistance. In this case these genes are known as Executor (*E*) genes (Bogdanove et al. 2010). The *E* gene expression is associated in some cases with a hypersensitive response (HR) in the respective host plants and restricts pathogen growth at the site of infection. So far, five *E* genes and their cognate TAL effector genes have been cloned, including *Xa27*, *Bs3*, *Bs4c*, *Xa10* and *Xa23* (Gu et al. 2005; Römer et al. 2007; Strauss et al. 2012; Tian et al. 2014; Wang et al. 2015). Well-characterized *E* genes are *Bs3* and *Xa27* from pepper and rice respectively. *Bs3* codes for a flavon monooxygenase (Römer et al. 2007), while *Xa27* codes for a protein with an unknown function (Gu et al. 2005). Typical *E* genes encode rather small unrelated proteins which role in eliciting resistance remains to be deciphered (Zhang et al. 2015). Yet *Xa10*, *Xa23* and *Bs3* have in common to harbor transmembrane domains.

Cassava Bacterial Blight (CBB) is caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), formerly *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Lozano 1986;Constantin et al. 2016). *Xpm* is one of the top 10 most important phytopathogenic bacteria (Jacques et al. 2016), and CBB the most important bacterial disease affecting cassava (Harris et al. 2015). The symptoms are characterized by the presence of angular leaf spots, exudates in stems and occasionally in leaves, wilting and in severe and advanced infections, total death of the plant (Lozano 1986). CBB can cause losses varying between 12 to 100 % of cassava production (Harris et al. 2015). Cassava represent the third most important source of carbohydrates for humans. In consequence losses caused by *Xpm* can compromise harshly global food security (FAO 2018). This disease is present in all regions where cassava is cultivated and high incidences have been reported recently in several African countries (Wydra & Verdier 2002b). *Xpm* populations have been studied extensively, notably in Colombia. These studies have revealed *Xpm* as a highly diverse pathogen, represented by hundred of unrelated haplotypes with populations changing drastically between ecozones and time periods (Restrepo et al., 2000; Trujillo et al. 2014). The climatic conditions and the presence of different cassava cultivars are two of the main determinants in the changes of *Xpm* populations (Restrepo et al. 2000; Restrepo et al. 2004; Bart et al. 2012). The TAL effector repertoires present in a group of strains representing the global *Xpm* diversity has allowed to classify them into in 8 groups, based on their RVDs (Zarate et al., in prep). Among them, the TAL effector TAL14 is known to play an important role in *Xpm* virulence but its function remains unknown (Castblanco et al 2013). More recently, based on transcriptomic and bioinformatics predictions of EBEs, the TAL effector TAL20 was identified as a new major virulence TAL found to activate the sugar transporter *SWEET10* (Cohn et al. 2014).

In this study, we tested the avirulence potential of several *Xpm* TAL effectors by screening a set of cassava varieties for resistance phenotypes. We identified TAL15 as a novel avirulence candidate able to trigger a resistance response in the TMS60444 cassava variety. Plants inoculated with *Xpm* strains containing versions of TAL15 that were mutated in the NLS or AAD failed to trigger a resistance response. Through a combination of transcriptomic approach and EBE predictions, we identified a set of five putative *E* genes candidates targeted by TAL15 which were further validated by qRT-PCR.

4.2 Material and methods

Plant varieties and growth conditions

Cassava plants from the varieties SG107-35, CM6438-14, MTAI, MBRA685 and TMS60444 were obtained from the CIAT germplasm collection. Plants were propagated, multiplied and maintained under greenhouse conditions (day/night temperature 28/19 °C, photoperiod 12 h, and relative humidity = 80 %). *in vitro* cassava plants were grown and maintained in Murashige and Skoog (MS) basal medium supplemented with 1 ppm thiamine, 100 ppm myo-inositol, 2 µM CuSO₄, 0.002 ppm NAA, 0.05 ppm GA3, 0.04 ppm BAP and 20 g/ L⁻¹ sucrose. Plants were grown in a growth chamber at 28°C under 16h of light. 8-week- old plants were used for all assays.

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The bacterial strains used in this study were: Xpm318, Xpm150, Xpm394 and CFBP1851Δ14Δ21 (*Xpm* ΔTALs) and *Escherichia coli* DH10B. *E. coli* was used for all cloning procedures. Plasmid were introduced into *E. coli* and *Xpm* by electroporation. The plasmid used to clone TAL effectors genes was pSKX1. The *Xpm* strains were grown on Luria Peptone Glucose Agar (LPGA, 5 g yeast extract, 5 g dextrose, 5 g peptone and 15 g agar per L of distilled water) plates. Bacteria were incubated at 28 °C for 48 h in solid medium and for 24 h in liquid medium. *E. coli* bacteria were cultivated at 37°C in LB. Media were supplemented with kanamycin (50 mg/mL) or gentamycin (10 mg/mL).

Generation of deletion mutants NLS1.2 and AAD of TAL15

Deletions in the domains NLS and AAD domains (NLSs 1 and 2, and AAD) from the C-terminal region of TAL15 were constructed as follows. For TAL15ΔNLS1.2, the flanking 3' primer 1841_Rv (GCTAAGCTTTCACTGAGGAAATAGCTCCATC) containing a HindIII restriction site and 4_Fw (TCTAGATTTGATGAAGCCATGACG) primer were used to amplified the C-terminal domain from pENTR/D-TOPO containing TALE1Xam-ΔNLS1.2 (Castiblanco et al. 2013). The C-terminal of TAL15 was excised from pSKX1 with XhoI and HindIII, and then ligated with the C-terminal without NLS1.2, previously digested with the same enzymes, assembling the full-length gene. TAL15ΔAAD mutant was obtained using the same methodology, but using the flanking 3' primer MutantAAD_Rv

(TCCTTAAGCTTGCTGGACGCTGCCA) containing a HindIII restriction site to amplify the C-terminal from pSKX1:TAL15. The TAL15 deletion mutants were then used to transform Xpm318 strain. All PCRs were carried out using high-fidelity Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The final clones were confirmed by sequencing at Macrogen, Inc. (Seoul, South Korea).

Plant inoculations and virulence assays

Symptoms development in leaf apoplast: Prior to inoculation, the plants were treated with high humidity conditions to improve the quantity of bacteria that enter into the leaves, the bacterial solutions were injected into the leaf with a needleless 1-mL syringe. The *Xpm* strains grown as describes previously were re-suspended in 10 mM MgCl₂ and calibrated to a OD_{600nm}=0.2. Approximately 0.1 mL of bacterial solution was injected at each inoculation site. The symptoms in leaf apoplast were taken 48 hours post inoculation.

Bacterial growth in plant tissue: cassava leaves were inoculated as described in the section "symptoms development in the leaf apoplast", with bacterial solutions (OD_{600nm}=0.002). For each time point that bacterial growth was monitored, leaf discs were taken from inoculated regions. A 0.7 cm diameter cork borer was used to excise a leaf disk, which was then ground in 100 µL of 10 mM MgCl₂. Dilutions of the leaf lysate were then plated on LPG media with gentamycin (20 µg/mL), and *Xpm* colonies were counted to estimate the number of bacteria in the original leaf sample.

AUDPC from stem-cuttings and "in vitro" plants: To evaluate the AUDPC the stem inoculation was used. Cassava plants from two-month-old were punctured in the stem using an insulin-syringe. The bacterial inoculum was spread in the wound using a Q-Tip. A scale of symptoms from 0 to 5 was used and symptoms development was monitored at 0,7,14,21 and 30 dpi for adult plants as reported previously (Trujillo et al. 2014). For *in vitro* plants the symptoms were monitored at 0,3,6,9,12,15,18, 21 and 24 dpi. In order to quantify susceptibility, the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated, according to the following equation:

$$AUDPC = \sum_i \frac{(D_i + D_{i-1}) \times (t_i + t_{i-1})}{2}$$

where D corresponds to the severity of symptoms, and t corresponds to the time after inoculation.

RNA-Seq.

Plant inoculations: Overnight liquid cultures of Xpm Δ TALEs was transformed with the empty vector pSKX1 and pSKX1:TAL15. The strains were grown on LPGA plates supplemented with gentamycin (10 mg/mL). The cultures were re-suspended in 10 mM MgCl₂ at OD_{600nm} = 0.5. *in vitro* plants of cassava cultivar TMS60444 were inoculated by leaf inoculation using Q-Tip. A sterile needle was used to make a puncture in the mesophyll (apoplast). Each leaf was then wiped on both adaxial and abaxial side using a Q-Tip previously immersed in Xpm+EV or Xpm+TAL15 cell suspension. Mock infiltrations were done with 10 mM MgCl₂.

Total RNA extraction and Illumina sequencing: Total RNA extraction was performed separately for each of the 9 samples (describer las 9 librerías) using “Plant RNA Reagent” Invitrap® Spin plant RNA minikit (STRATEC, Berlín, GER). All samples were aliquoted and stored at -80°C. The purity and concentration of RNA samples were evaluated using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Subsequently, samples were sent to the Novogene (San Diego, USA) for RNA- Sequencing. Briefly, 3.0 µg of total RNA was processed using a ‘TruSeq Stranded mRNA Sample Prep kit’ (Illumina, San Diego, USA) for library preparation, cDNAs were processed with an Illumina cBot for cluster generation on the flow cell, following the manufacturer’s instructions, and sequenced in single-end mode using a HiSeq4000 sequencing platform (Illumina, San Diego, USA).

Bioinformatic analyses: Quality control of the libraries was carried using FastQC-project (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). We carried out pair-sequence and per-base analyses to filter reads according to the following criteria: sequence-read distribution = 75 bp, 100% coverage in all bases, GC-content ~50%, ~25% of A, T, G and C nucleotide contributions, ambiguous base-content <0.1% and a Phred score higher than 30 (i.e. base-calling accuracy larger than 99.9%). Short sequence reads were assembled, mapped and annotated against the cassava genome using tophat

v2.0.6 (Trapnell et al. 2013). Gene expression data were normalized by calculating the Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Millions base pairs sequenced (FPKM). Using scales of abundance estimates by exon length and millions of mapped reads, original expression values were transformed and normalized. Subsequently, total read counts for each locus were used as an input dataset for the differential gene expression analysis using the DESeq package v.1.12. Statistically significant DEGs were defined as those with both $p_{adj} < 0.001$ and \log_2 fold change (FC) > 2 (up-regulated) or < -2 (down-regulated). Venn diagrams were plotted from the DEG lists generated using DESeq using Venny webtool (Venny's diagrams drawing tool), a heat map of the resulting list was generated to compare expression patterns across all samples using heatmapper (Babicki et al. 2016).

TAL15 effector target prediction

Talvez v3.1 (1 kb upstream of annotated start codons)(Pérez-Quintero et al. 2013), TALE-NT (Doyle et al. 2012) and Talgetter (1 kb upstream of annotated start codons)(Grau et al. 2013) were used to identify potential binding sites for TAL15 in the cassava promoterome (1 kb upstream of annotated start codons). The top 500 predicted targets with best score were kept for analyses. Functional annotations for each gene model were obtained from the Mesculenta_147_annotation_info text file (last modified 27.06.18) available from Phytozome.

QRT-PCR.

Xpm strains were inoculated into cassava leaves as described in RNA-seq - Plants inoculations Total RNA was extracted with the Invitrap® Spin plant RNA minikit (STRATEC, Berlín, GER). Starting with 1 µg of total RNA, cDNA was made using the First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). The 10 µL RT-PCR reactions contained 1 µL of the diluted cDNA sample, 10 mM forward primer, 10 mM reverse primer, and 1x OneTaq Master Mix with Standard Buffer (New England Biolabs). PCR was performed on an LightCycler 96 de Roche® with the kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX de Bio-Rad. Analysis was performed using the delta–delta Ct method (Pfaffl 2004). The gene expression levels obtained by qRT-PCR were normalized,

using the Ct obtained for the housekeeping Manes.06G114200 (ZINC FINGER CCCH DOMAIN- CONTAINING) primers Forward TGGTCAGCACATTTGTTTCGT and reverse AGCAGACCCCGTCATTGTAG (Hu et al. 2016) All experiments were performed in triplicate. Primers for qRT-PCR are listed on supplementary Table S1.

Western analysis

Overnight liquid cultures of *Xpm* were centrifuged, the pellets obtained were re-suspended in 100µL of 1x Laemmli buffer (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue), the samples were vortexed, boiled for six minutes, vortexed, spin down and stored as aliquots at -80°C. Total bacteria protein extracts were separated onto a 8% SDS-PAGE gel. Following electrophoresis, the gels were blotted onto nitrocellulose membranes, blocked with 5% nonfat milk powder and probed for 1 hour at room temperature with TAL effector content was analyzed using standard immunoblotting techniques with a polyclonal antibody capable of recognizing diverse TAL effectors (diluted 1:10.000). After washes, the blots were incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit specific antibody (Product No. A7434 Sigma-Aldrich, Inc., Germany). The immune complex was detected by BCIP/NBT AP substrate buffer (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, containing 0.3 g/l NBT and 0.15 g/l BCIP) and the reaction was stopped by washing with distilled water.

4.3 Results

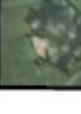
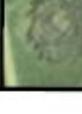
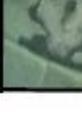
4.3.1 Gain-of-function screening for *Xpm* TAL effectors with avirulence activity upon infection of multiple cassava varieties

The TAL effector repertoires (TALome) of a set of 19 *Xpm* strains representing the pathogen diversity has been investigated and the most common groups include those of TAL13, TAL14, TAL15, TAL20, TAL21 and TAL22 (Zarate et al, in prep). In an attempt to characterize the *avr* activity of these most abundant TAL effectors, they were cloned into the expression vector pSKX1, conjugated into *Xpm* and inoculated into five cassava varieties of interest. TAL13, TAL14, TAL15 and TAL21 were introduced into strain Xpm150 which has TAL21(Zarate et al, in prep), while TAL20 was introduced into Xpm394 which naturally contains TAL13, TAL14 and TAL15 (Zarate et al, in prep). Strains of Xpm150 or Xpm394 carrying each an individual TAL effector or the empty vector

pSKX1 were leaf-infiltrated into the five cassava varieties TMS6044, MBRA685, SG107-35, CM6438-14 and MTAI according to material availability (Figure 4-1). Scoring of the symptoms 4 days post-inoculation highlighted *TAL13B* and *TAL15A* to alter the development of watersoaked lesions in the five varieties, as compared to native control strain Xpm150 or with the empty vector. Both TAL effectors induced symptoms similar to a Hypersensitive Like Response (HLR). Xpm150 strains carrying the two known virulence TAL effectors *TAL14* or *TAL20* seemed to increase disease symptoms, and especially in the varieties TMS60444 and SG107-35. For *TAL21A*, a reduction of disease could also be observed but only on cassava variety CM6438-14. Altogether, our data show that *TAL13B*, *TAL15A* and *TAL21A* lead to a decrease of typical CBB symptoms when expressed individually in a strain naturally deprived of them, suggesting these TAL effectors to act as Avr factors. As proof of concept we decided in the following part of this study to only focus on the functional characterization of *TAL15*.

Figure 4-1: Screening of Xpm TAL effectors with Avr activity.

Evaluation of symptoms in leaf apoplast for two *Xpm* strains (Xpm150 y Xpm394) transforms with TALEs 13, 14, 15, 20 and 21. The cassava varieties used was: MTAI-8, CM6438-14, MBRA685, SG107-35 y TMS60444. The cassava leaves were inoculated with a cell suspension of *Xpm* ($OD_{600nm} = 0.5$) and the developing symptoms were photographed at 4 dpi.

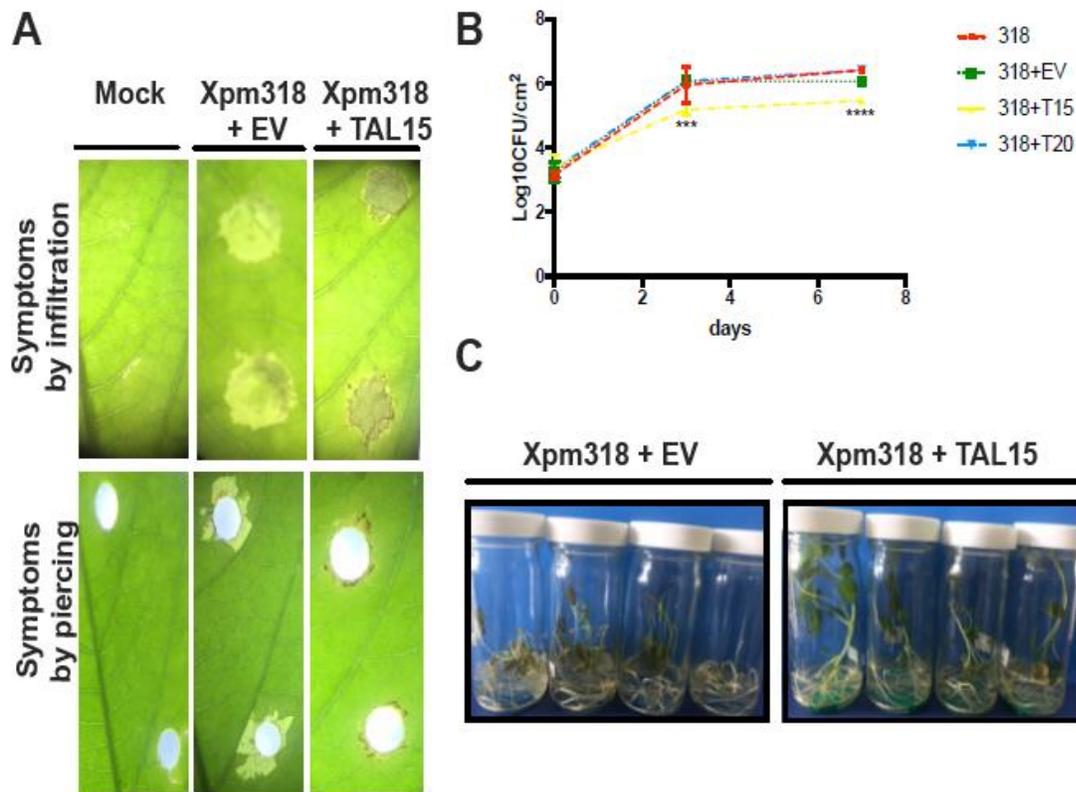
Variedad Tratamiento	MBRA685	CM6438-14	SG107-35	TMS60444	MTAI-8
Mock					
Xpm150					
Xpm150 (pSKX1)					
Xpm150 (TAL13A)					
Xpm150 (TAL14B)					
Xpm150 (TAL15B)					
Xpm150 (TAL20C)					
Xpm394					
Xpm394 (pSKX1)					
Xpm394 (TAL21A)					

4.3.2 TAL15 acts as an avirulence factor in *Xpm*

To further evaluate the negative effect of TAL15 on CBB symptoms development, we transformed *TAL15* into the highly virulent recipient *Xpm* strain 318, which contains *TAL13*, *TAL14*, *TAL20* and *TAL22* endogenously, but not *TAL15* (Zarate et al, in prep). Although the effect of TAL15 was similar in the five previously tested cassava varieties (Figure 4-1), we decided to focus on variety TMS60444, which was adapted for genetic transformation. Leaves of TMS60444 were inoculated with *Xpm*318 strains carrying the empty vector (EV) or TAL15, using both infiltrations and piercing methods (Figure 4-2A). Typical CBB angular lesions were observed around the site of inoculation for *Xpm*318+EV, demonstrating its full potential to cause disease on TMS60444. In contrast, non or very reduced symptoms could be observed upon inoculation of *Xpm*318 with *TAL15* (*Xpm*318+T15). Notably a necrotic response was observed at 48 hpi, suggesting the establishment of a resistance phenotype (Figure 4-2A). Next we monitored bacterial growth in leaves of TMS60444 plants grown *in vitro*. Bacterial titers were significantly reduced for *Xpm*318+T15 at 3 and 7 dpi compared to *Xpm*318 strains without TAL15. The effect of *TAL15* was specific given the growth of *Xpm*318 transformed with TAL20 was similar to that observed for controls *Xpm*318 or *Xpm*318+EV (Figure 4-2B). To further assess the effect of TAL15 on the outcome of the interaction between *Xpm* and cassava, plants grown *in vitro* were inoculated by stem puncture and symptoms were recorded over 24 days after inoculation to calculate the AUDPC. The AUDPC log values were of 1.715 and 1.244 for plants inoculated with *Xpm*318+EV and *Xpm*318+T15, respectively. These differences were statistically significant (p -value 0.01), and indicate that plants inoculated with *Xpm*318+T15 are resistant. While plants inoculated with *Xpm*318+EV showed extensive CBB symptoms characterized by loss of leaves at earlier time points and release of exudates, plants inoculated with *Xpm*318+T15 remained healthy (Figure 4-2C). Taken together, these results suggest a resistance response to occur in TMS60444 plants in response to TAL15.

Figure 4-2: TAL15 strongly affects CBB symptoms and reduces Xpm growth in planta.

(A) The cassava variety TMS60444 was inoculated using both infiltration and piercing methods using a suspension of *Xpm* of $OD_{600nm}=0.2$; symptoms were photographed 48 hpi. (B) In planta bacterial growth of Xpm318 strains carrying the empty vector (EV) or *TAL15*. Bacterial numbers were quantified at 0, 3, 5 and 7 dpi, data represent a mean of three biological samples \pm SE. (C) Symptoms observed upon stem-inoculation of MBRA685 plants grown in vitro with *Xpm* cell suspensions ($OD_{600nm}=0.02$) 24 dpi.



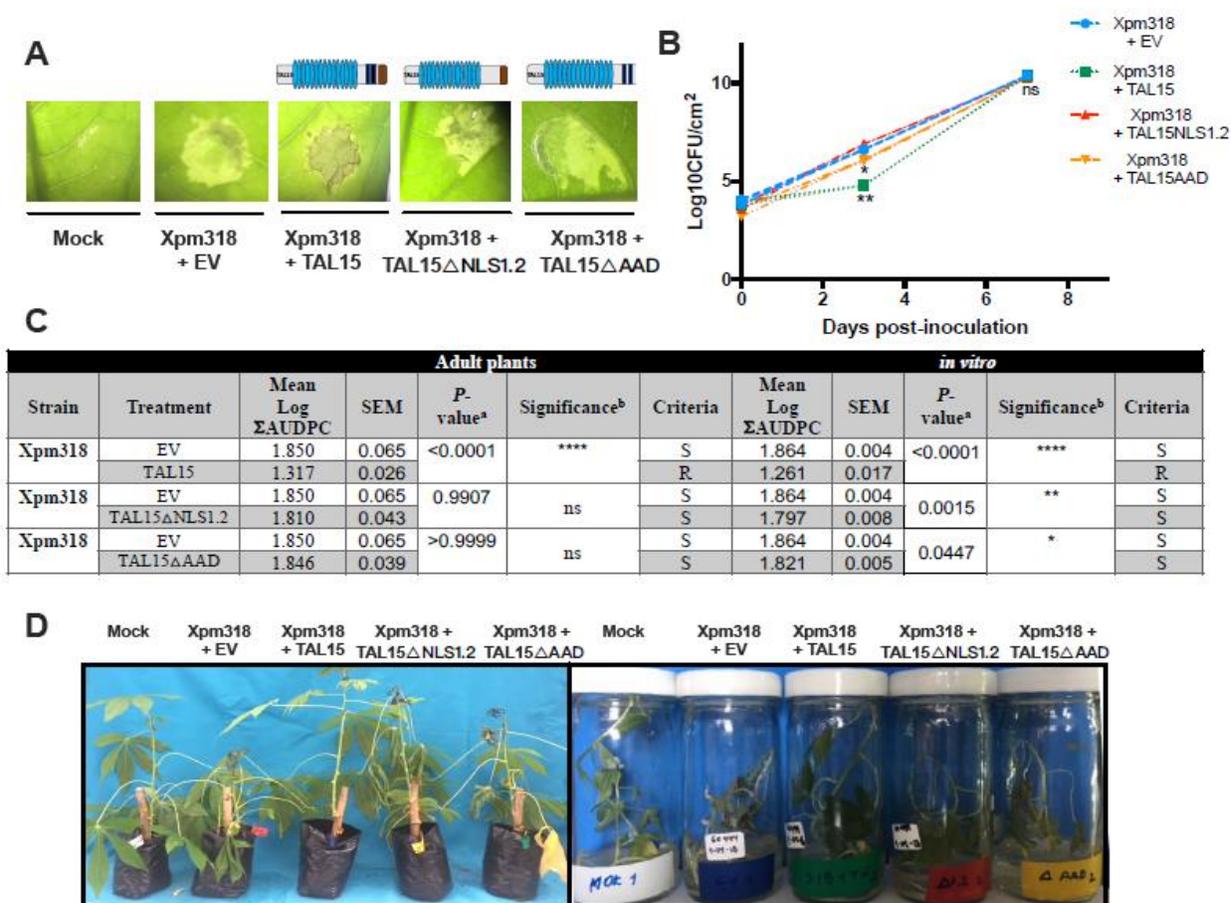
4.3.3 Mutation of the NLS or the AAD in TAL15 abrogate its ability to suppress CBB symptoms in TMS60444

To evaluate whether the resistance phenotype triggered by TAL15 is dependent on its NLSs or AAD, TAL15 deletion mutants were constructed for both of these motifs and transformed into Xpm318 (Fig S4-1). Western-blot analysis showed that the bacteria were producing the mutated proteins at the expected size (Fig S4-2). TMS60444 plants were next inoculated with Xpm318 harboring TAL15 Δ NLS1.2 or TAL15 Δ AAD and exhibited symptoms similar to that observed for leaves inoculated with the Xpm318+EV control

(Figure 4-3A). The reduction in the bacterial growth observed for Xpm318+T15 was abolished when Xpm318 was transformed with the NLS or AAD mutants (Figure 4-3B). AUDPC values were similar for adult plants infected with Xpm318 carrying the empty vector (1.850) or TAL15 mutants (1.810 and 1.846), while it was much reduced in presence of TAL15 (1.317). A similar pattern was observed for plants grown in vitro (Figure 4-3C-D). All together, these results further validate the resistance response of TMS60444 plants to strains of Xpm carrying TAL15, and the requirement of its NLS and AAD motifs. This is suggesting that TAL15 is activating an Executor type of resistance gene in cassava.

Figure 4-3: The NLS1.2 and AAD are required for TAL15 activity.

A. Comparison of disease symptoms caused by TAL15 mutants on leaves at 48 hpi after syringe infiltration ($OD_{600nm}=0.5$). **B** Growth levels of Xpm318+ EV, Xpm318+TAL15, Xpm318+TAL15 Δ NLS1.2 and Xpm318+TAL15 Δ AAD following syringe infiltration in leaves. The number of bacteria was quantified at 0, 3, 5 and 7 dpi, data represent a mean of three biological samples \pm SE. **C.** Area under disease progression curve (AUDPC) analysis of *in vitro* and adult plants inoculated with different TAL15 mutants. The cassava plants were inoculated by stem puncturing with a *Xpm* cell suspension ($OD_{600nm}=0.02$). Data shown is the mean of the Log Σ AUDPC from five replicates and the standard error of the mean (SEM) was calculated from five replicates per strain. The plant was considered to be resistant if the Log Σ AUDPC value <1.59 and susceptible when the Log Σ AUPDC value >1.69 according to (Trujillo et al. 2014). **D** comparison of disease symptoms at 30 and 24 dpi on *in vitro* and adult plants respectively.



4.3.3 RNA-seq-based search for TAL15 executor gene candidates in TMS60444

To identify putative TAL15 targets in cassava, we undertook a transcriptomic approach. pSKX1-TAL15 was transformed into CFBP1851 Δ 14 Δ 20 (also referred to as *Xpm* Δ TAL) which is a derivative of CFBP1851 knocked-out in TAL14 and 15 by targeted homologous recombination. *Xpm* Δ TAL does not elicit any disease symptoms when infiltrated into cassava leaves (Figure S3) and was used to deliver TAL15 into cassava leaves for RNA-seq experiments. RNA was extracted at 50 hpi for leaves inoculated with Mock, *Xpm* + EV, and *Xpm* + TAL15 (Figure 4-4 A). Three technical replicates were performed for each treatment and each library comprised a minimum of 41 million paired-end reads. These reads were mapped to the publicly available cassava genome MCOL1505 (Figure 4-4 B). Genes upregulated in *Xpm* + TAL15 compared with Mock and *Xpm* + EV were considered specific targets (Figure 4-4 C). The FPKM values for the 73 most upregulated genes by TAL15 were used to construct a heat map. The expression patterns showed higher expressions levels in the samples treated with TAL15. The 73 upregulated genes were compared with the top 500 of *in silico* targets predicted with the programs Talvez v3.1 (Pérez-Quintero et al. 2013), TALE-NT (Doyle et al. 2012) and Talgetter (Grau et al. 2013). Best identified candidate targets were Manes.01G058900, Manes14G044700 and Manes11G030700. Two other candidate genes (Manes.07G050200 and Manes08G002700) were selected because of their high induction level (Log₂FC), their expression pattern and their role in defense (Figure 4-5 A). qRT-PCR experiments validated TAL15-dependent gene induction for Manes14G044700, Manes11G030700, Manes.07G050200 and Manes08G002700 (Figure 4-5 B). For Manes11G030700 and Manes.07G050200, we couldn't graphed the normalized measured because we didn't get signal in the plants inoculated with Mock, EV, and both TAL mutants. These results confirm the RNA-seq data, suggesting that Manes11G030700, Manes.07G050200 and Manes08G002700 are possible executor gene candidates triggered by TAL15.

Figure 4-4: Strategy for experimental identification of TAL15 targets.

A. Overview of the workflow for the RNA-seq-based TAL15 targets identification. Nine *in vitro* plants were infiltrated with Mock, *Xpm* + EV and *Xpm* + TAL15 for transcriptome analysis. RNA samples isolated at 48 dpi were sequenced with an Illumina HiSeq 4000 instrument. **B.** Summary statistics of the transcription mapping. **C.** A three-way Venn diagram plot shows the numbers of differentially expressed genes induced. Statistically significant DEGs were defined as those with both $p_{adj} < 0.001$ and \log_2 fold change (FC) > 2 (up-regulated). **D.** Heatmap of 73 gene expression values depicting clustering of genes based on the expression for a set of significant genes ($P_{adj} < 0.001$). Sample names are represented in columns and significant genes are represented in rows. Low to high expression is represented by a change of color from red to green, respectively.

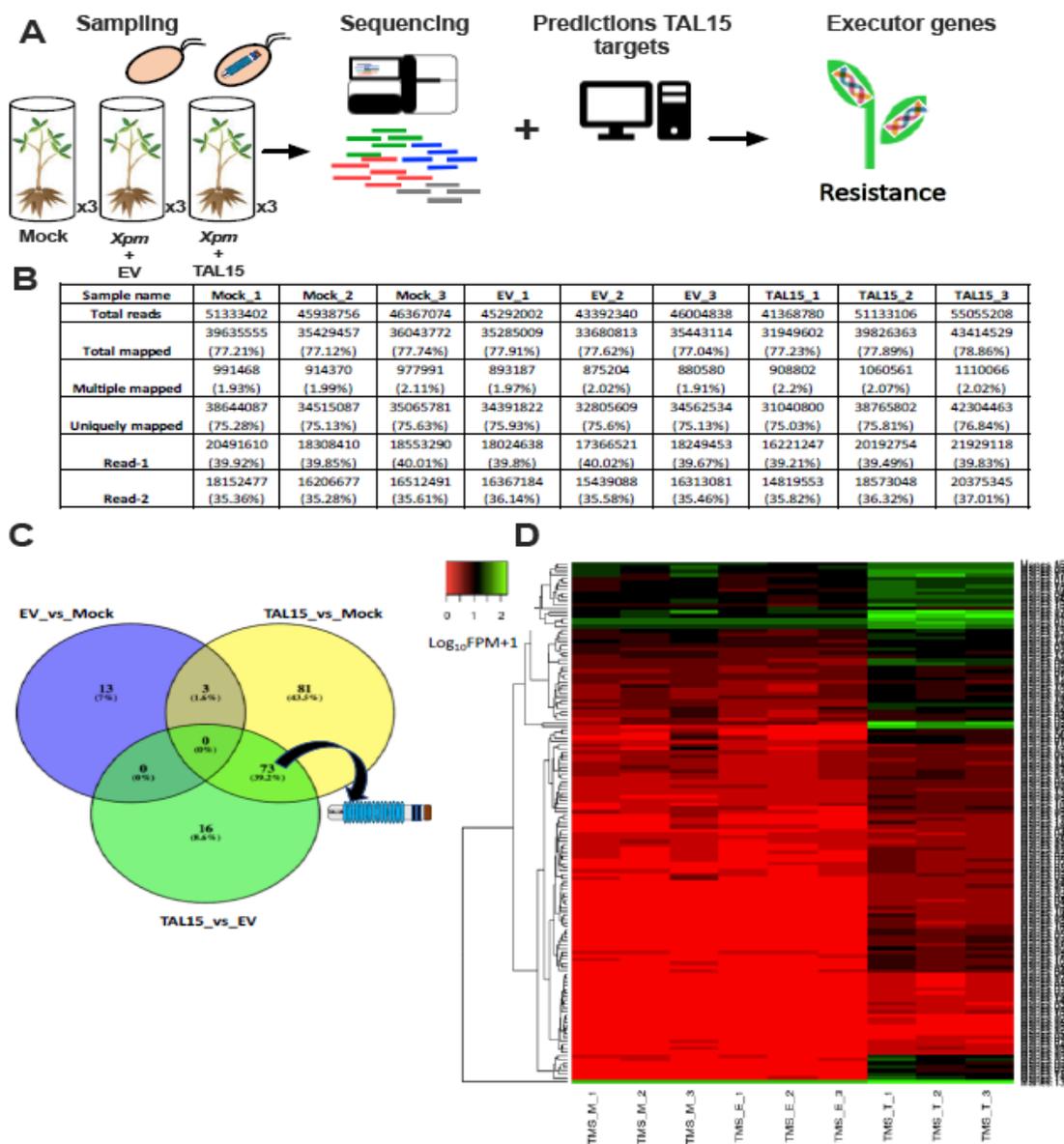


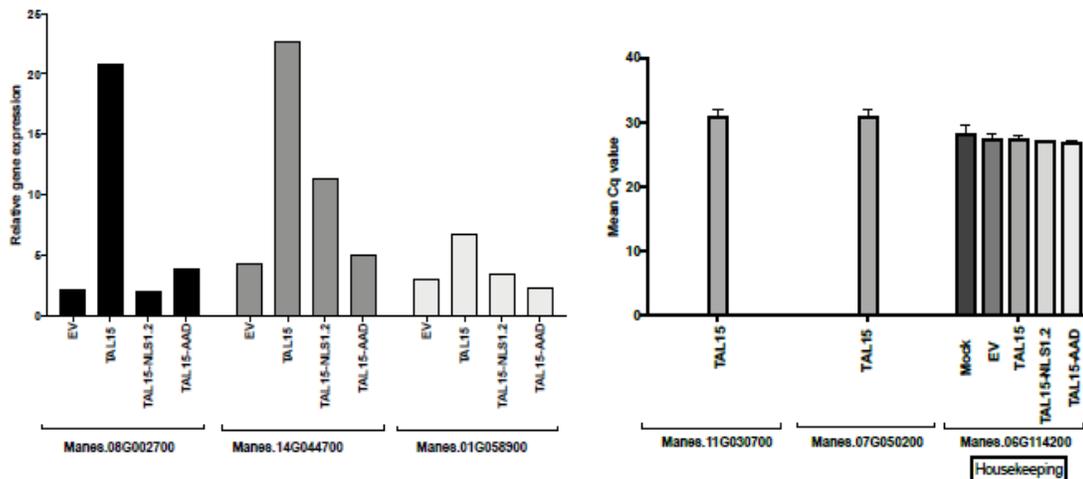
Figure 4-5: Validation by qRT-PCR of candidates genes activated by TAL15.

A. Five executor genes candidates for validate by qRT-PCR. **B** Relative expression of candidates obtained by qRT-PCR using *in vitro* plants. Expression levels of each sample were normalized on the basis of transcript amounts of zinc finger cch domain- containing. Relative expression values for qRT-PCR analysis were determined against the average value of mock sample. Each experiment determined in three technical replicates and standard deviation (n = 3) is represented by error bars.

A

Genes	Readcount TMS_R_T	Readcount TMS_R_E	log2FoldChange	P-value	Function
Manes.07G050200	94,06	0	Inf	9,52E-28	Defense-related protein containing SCP domain
Manes.11G030700	175,0	0	Inf	1,25E-14	Cryptdin protein-like protein
Manes.08G002700	771,09	9,5	6,3471	1,84E-24	L-ascorbate peroxidase 2, cytosolic
Manes.01G058900	257,3	46,9	2,4551	1,66E-19	RING-H2 zinc finger protein RHA1 (RHA1)
Manes.14G044700	1616,9	182,5	3,1473	1,98E-18	AP2 domain (AP2)

B



4.4 Discussion

Xanthomonas uses TAL effectors as a major class of virulence factors during infection. the knowledge of the TAL effectors in cassava allowed identified which TALs increased the bacterial virulence and what are their targets (Bodnar 2012; Cohn et al. 2014; Castiblanco et al. 2013). Nevertheless, the role of TAL effectors in resistance remains unknown. In this work, we demonstrated that TAL15 is one TALs from *Xpm* able to

activate a resistance phenotype in cassava and that required its NLS and AAD in the C-term for this function. An RNA-seq approach was employed to investigate the transcriptome profile induced by the TAL15 in cassava, the transcriptome profile achieved identified some candidates to executor genes, which from evaluated by qRT-PCR and will be validated using arTALs in the following experiments.

The first experiment that allowed identified the TAL15 action was by infiltration in cassava leaves, the differential contribution to virulence was found to TALEs of different sizes (13, 14, 15, 20 and 21) into the *Xpm* strains that exclusively contained one or the other TALEs to introduce individually a TAL of the opposite group and thus try to establish an association between the presence of a specific TALE with a phenotype. The infiltration showed the TAL14 and TAL20 contributes to watersoaking development symptoms, results have been reported in the literature (Castiblanco et al. 2013; Cohn et al. 2014; Cohn, Morbitzer, et al. 2015). Furthermore, the highlights reduction in the symptoms by the TALs 13, 15 and 21 in some cassava varieties are results found for the first time in cassava. The HLR produced for these TALEs is a phenotype like to resistance response (Gu et al. 2005; Römer et al. 2007; Strauss et al. 2012; Tian et al. 2014; C. Wang et al. 2015), so its activation indicates that these TALEs could active any executor gene. The TALs 13, 15 and 21 TALs are not common in *Xpm* strains (Zarate, unpublished results) may be in the bacterial evolution some strains have lost these TALs to avoid the resistance phenotype activation (Erkes et al. 2017). Another observation is the HLR activation in TMS60444 and CM6438-14 by the three TALs, presumably shared the same targets like TAL14 and TAL20 effectors that can active SWEET gene transporter according to bioinformatic predictions (Cohn et al. 2014). In spite of HLR observed with TAL13, TAL15 and TAL21, we selected the TAL15 for the next experiments because its RVDs length is between the range of specificity to get a specific target (Jana. Streubel et al. 2012) and the TAL effector predictions programs produced fewer candidates.

The phenotype of TAL15 showed an influence on bacterial growth can be coupled from symptom development (Figure 4-2). The plants inoculated with TAL15 are healthy and their bacterial content is lowed some days after inoculation in compared with the plants inoculated with the bacteria without TAL15. The maximum scale of symptoms reached in the plants was 1 or rare case 2, the plants showed necrosis around the inoculation point that arrests the progression of the disease and avoids the bacterial progression into the plant. Like TAL15, TAL effector *avrXa27* of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* have been

reported to contribute to both growth and symptom formation (Gu et al. 2005). The TAL15 is typical of this family of effectors that require NLS and activation-domain (Boch & Bonas 2010; Bogdanove et al. 2010), because the TAL15 mutants lacking the AAD (TAL15 Δ AAD) and the NLS1.2 (TAL15 Δ NLS1.2) did not confer the ability to elicit resistance to cassava bacterial blight (Figure 4-3). This is an important experiment to validate that TAL15 need enters into the nucleus for inducing the gene activation and hence promotes the resistance in the plant.

Our RNA-Seq experimental using *Xpm* strains without TALEs allowed us to identify transcriptional changes and genes induced specifically by TAL15 (Figure 4-4 D). 355, 290 and 488 annotated cassava promoters contain potential TAL15 EBE according to TALENT, TALgetter and TALVEZ programs respectively. Only three transcripts, Manes.01G058900, Manes14G044700 and Manes11G030700 have potential EBE. TAL15 targeted Manes.01G058900 and Manes14G044700 two genes reported previously as targets of TAL15Xpm668 (Cohn et al. 2014), we got the same targets because the TAL15 used in this study was isolated from Xpm522 and had the same RVD that TAL15Xpm668 (NI NG NI NN HD HD NS NS NS HD HD NS HD NG NG). The function of Manes.01G058900 is Brassinosteroid-responsive Ring-H2 , the proteins of this family are widely represented in plants and play important roles in the regulation of many developmental processes, in *Arabidopsis* RING proteins have been shown to regulate the response to biotic and abiotic stresses as well as to be involved in plant defense (Kawasaki et al. 2005). The second gene previously reported Manes14G044700 is an integrase-type DNA-binding protein with AP2 domain involved in transcription regulation. Despite to validated their activation by TAL15Xpm668 they didn't find a resistance phenotype to correlated (Cohn et al. 2014). In the current research, we evaluated once again the two genes activation by qRT-PCR but we only verified the Manes14G044700 activation (Figure 4-5 B) may be the plant's conditions using in our experiments are important for the activation. The third target identified in the actual study is Manes11G030700 this gene was activated only for TAL15 inoculation, expected behavior for an executor gene. Manes11G030700 translated a crytdin protein-like protein, in mammalian these proteins act as alpha-defensins (Ouellette 1997) but in plant, their homologs protein are uncharacterized or act as transmembrane protein (Goodstein et al. 2012) To the other two genes validated (Manes.08G002700 and Manes.07G050200) we didn't find EBE predicted but were selected for their defense function, log2FC, their

activation only by TAL15 and because the cassava varieties used in this studied is not sequenced yet. The function of the TAL15 candidates validated in this paper were not described before in the executor genes reported (Gu et al. 2005; Römer et al. 2007; Strauss et al. 2012; Tian et al. 2014; C. Wang et al. 2015). The commonalities are not clear, actually, there are four executor R genes cloned. In the group 1 is BS3, which is predicted to have a catalytic function on the basis of homology to a large conserved protein family and in the Group 2 are Bs4C, XA27, XA10, and XA23, all members have low sequence similarity to proteins of unknown function in closely related species. According to these characteristics, the Manes11G030700 is a good candidate because have potential transmembrane domains and unknown function like group number two.

Most of genes modulated by TAL effectors were identified using positional cloning (Gu et al. 2005; Römer et al. 2007; Tian et al. 2014; C. Wang et al. 2015) and RNA sequencing approaches (Strauss et al. 2012; Bodnar 2012; Cohn et al. 2014; Mora 2017). Our RNA-seq results showed that its transcriptional tool facilitated the identification of candidates that mediates recognition of the matching TAL15 protein. In addition, the RNA-seq is a fast, reliable, and cost-effective method to map and will be used for the cloning of further genes activated by TAL effectors, but this approach will only be applicable if the gene promoter is transcriptionally activated by given TAL effector.

The most reliable method to control the CBB is through the use of varietal resistance. The identification of *X. phaseoli* pv. *manihotis* induced executor R genes will contribute to developing cassava that is resistant to CBB. Based on the results obtained in this study, it is possible to confirm the resistance phenotype activated by infiltration, bacterial growth and AUDPC in TMS60444 used in this work is given by TAL15, which is recognized into the nucleus in the cassava plant. The TAL15 candidates confirms using arTALs should prove useful as resistance tool in cassava. This approach should provide a durable resistance in the host, saving farmers from the hardships associated with crop loss.

4.5 Supporting information

Figure S4-1. Design, construction and validation of NLS1.2 and AAD Mutants.

A- B. A general method for construction of TAL15 mutants. The NLS1.2 and AAD were eliminated A. The NLS1.2 mutant was made interchanging the C-terminal of TALE14 without both NLS in the normal TAL15. B. the AAD mutant was made amplifying by PCR the C-terminal of TALE15 without the AAD domain. C-D Validation of deletions in NLS1.2 and AAD mutants by colony-PCR. The C-terminal was amplified in five *E.coli* colonies using the primers 4_Fw and 1841_Rv .(+), pSKX1-TAL15. (-), negative PCR control. E-F Screening by Western blotting for TALE15 mutants. The strain Xpm318 was transform with pSKX1-TAL15ΔNLS1.2 and pSKX1-TAL15ΔAAD plasmids, The TALE expression was checked by Western blot using antibody anti-TALE. G-H symptoms of Xpm318 wild type and colonies of TAL15 mutants. Leaves of TMS6044 variety inoculated by infiltration with *Xpm* cell suspension (OD_{600nm}=0.2), symptoms to 48 hpi.

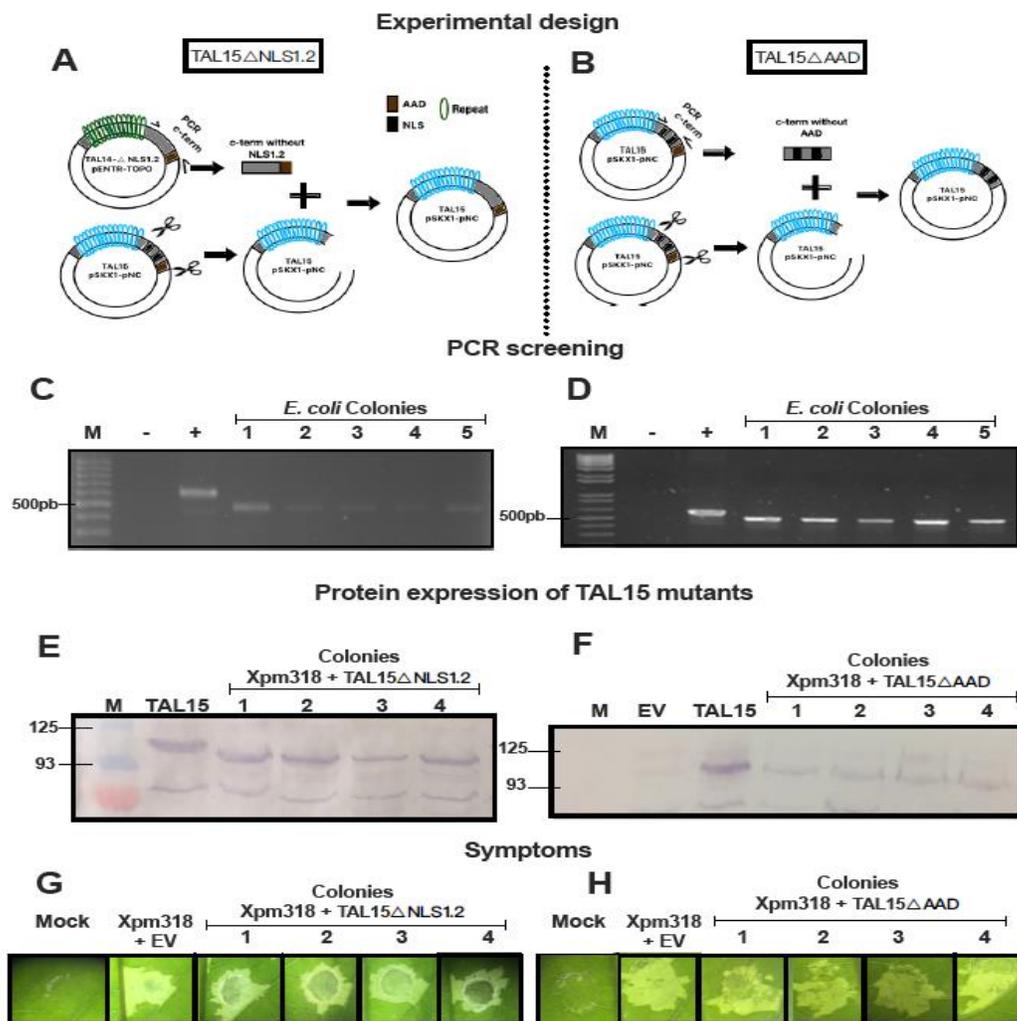


Figure S4-2. Immunoblotting analysis of TAL15 mutants.

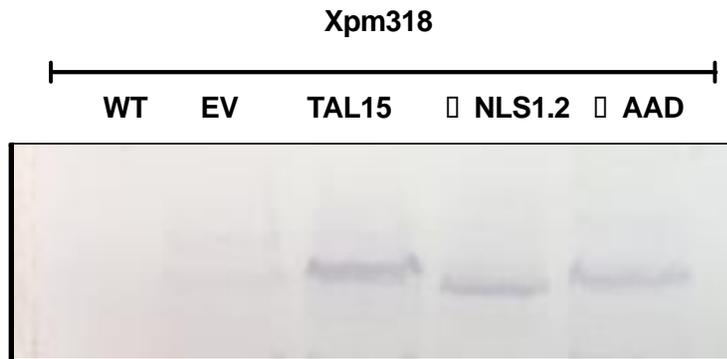
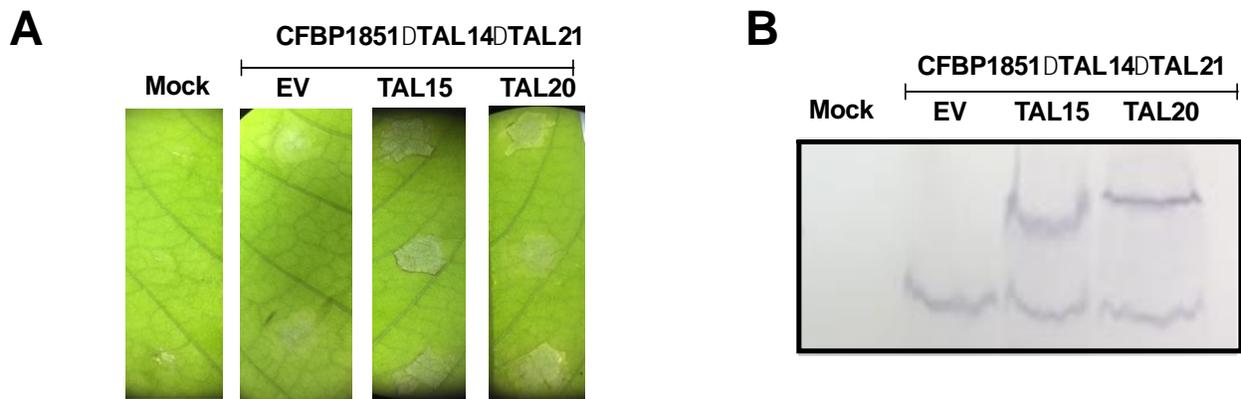


Figure S4-3. Symptoms and protein expression using *Xpm* strain CFBP1851ΔTAL14ΔTAL21(XpmΔTALs).



Supplement A. TAL effector nucleotide sequences described in this study

TAL15

```

ATGGATCCCATTTCGTCCGCGCACGCCAAGTCCTGCCACGAACTTCTGGCCGGACC
CCAGCCGGATAGGGTTCAGCCGCAGCCGACTGCAGATCGTGGGGGGGCTCCGCCT
GCCGGCAGCCCCCTGGATGGCTTGCCCGCTCGACGGACGATGTCCCGAACCCGTC
TCCCGTCTCCCCCTGCACCCTTGCCCTGCGTTCTCAGCGGGCAGTTTCAGCGATCTG
CTCCGTCAGTTCGATCCGTCGCTTCTTGATACATCGCTTTTTAATTCGATGTCTGCCT
TCGGCGCTCCTCATAACAGAGGCTGCCTCAGGAGAGGGGGATGAGGTGCAATCGGG
TCTGCGTGCAGCCGATGACCCGCAAGCCACCGTGCAGGTCGCTGTGACGGCCGCG
CGACCGCCGCGCGCCAAGCCGGCGCCGCGACGGCGTGCTGCGCACACCTCTGAC
    
```

GCTTCGCCGGCCGGGCAGGTCGATCTATGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAGC
AAGAGAAGATCAAACCTGAAGGCGCGTTCGACAGTAGCACAGCACCACGAGGCACTG
ATCGGCCATGGGTTTACACGTGCGCACATCGTTGCGCTCAGCCAACACCCGGCAGC
CTTAGGGACCGTTCGCTGTCAAGTACCAGGCCATGATCGCGGCGTTGCCGGAGGCG
ACACACGAAGACATCGTTGGCGGCGGCCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCCCTGG
AAGCATTGCTCACGGTGTGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACA
GGTCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCGGTGGAGGCAGTGCA
TGCATGGCGCAATGCACTGACGGGCGCTCCCCTGAACCTGACCCCGGACCAGGTG
GTGGCCATCGCCAGCAATATTGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGC
TGTTGCCGGTGTGTGCGAGCAACATGGCCTGACCCTGGACCAGGTGGTGGCCATC
GCCAGCAATGGCGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCG
GTGCTGTGCGAGCAACATGGTCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCA
ATATTGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTG
CGAGCAACATGGTCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAACGGC
GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCGAGCAAC
ATGGCCTGACCCGGGCGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCA
GGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCGCCAGGCCCATGGCCTG
ACCCGGGCGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTG
GAGACGGTGCAGCAGCTGTTGCCGGTGTGTGCGAGCAACATGGCCTGACCCCGG
CGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT
GCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGACCAGGTG
GTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGG
CTGTTGCCGGTGTGTGCGAGCAACATGGTCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCAT
CGCCAGCAATAGCGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCG
GTGCTGTGCGAGCAACATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCC
ACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTG
CGAGCAACATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGC
GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCGCCAGGCC
CATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGCGGCAAGC
CGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCGAGCAACATGGCCT
GACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTG
GAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGG
ACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT
GCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCGAGCAACATGGTCTGACCCCGGCGCAGGTG
GTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAAGCAGGCGGCGCTGGAGAGCATTTTTGCC
AGTTATCTCGCCCTGATCAGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCC
TTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGAGGCAGTGAAAAAGGATTGCCGC
ACGCGCCGACCTTGATCAAAAGAACCAATCGCCGTCTTCCCGAACGCACGTCCCAT
CGCGTTGCCGACCACGCGCAAGTGGCTCGCGTGTGGTTTTTTCCAGTGCCACTC
CCACCCAGCGCAAGCATTTGATGAAGCCATGACGCGAGTTCGGGATGAGCAGGCACG
GTTTGTACAGCTATTTTCGAGAGCCGCGTACCGAACTCGAGGCCACAGTGGA
ACGCTCCCCCAGCCTCGCAGCGTTGGCACCGTATCCTCCAGGCATCAGGGATGAA
AAGGGCCGAACCGTCCGGTGTCTCCGCTCAAACGCCGGACCAGGCGTCTTTGCATG
CATTGCGCGATGCGCTGGAGCGTGAGCTGGATGCGCCCAGCCCAATAGACCGGGC
GGGCCAGGCGCTGGCAAGCAGCAGCCGTAAACGGTCCCGATCGGAGAGTTCTGTC
ACCGGCTCCTTCGCACAGCAAGCTGTGAGGTGCGCGTTCCCGAACAGCGCGATG
CGCTGCATTTCTCCCCTCAGCTGGGGTGTAAAACGCCCGCGTACCAGGATCGGG
GGCGGCTCCCGGATCCTGGTACACCCATGGACGCCGACCTGGCAGCGTCCAGCA
CCGTGATGTGGGAACAAGATGCTGACCCCTTCGAGGGGCAGCGGATGATTTCCG
GCATTCAACGAAGAGGAGATGGCATGGTTGATGGAGCTATTTCTCAGTGA

TAL15ΔNLS1.2

ATGGATCCCATTTCGTCCGCGCACGCCAAGTCCTGCCACGAACTTCTGGCCGGACC
CCAGCCGGATAGGGTTCAGCCGCAGCCGACTGCAGATCGTGGGGGGGCTCCGCCT
GCCGGCAGCCCCCTGGATGGCTTGCCCGCTCGACGGACGATGTCCCGAACCCGTC
TCCCGTCTCCCCCTGCACCCTTGCCCTGCGTTCTCAGCGGGCAGTTTCAGCGATCTG
CTCCGTCAGTTTCGATCCGTCGCTTCTTGATACATCGCTTTTTAATTCGATGTCTGCCT
TCGGCGCTCCTCATAACAGAGGCTGCCTCAGGAGAGGGGGATGAGGTGCAATCGGG
TCTGCGTGCAGCCGATGACCCGCAAGCCACCGTGCAGGTGCTGTGACGGCCGCG
CGACCCGCGCGGCCAAGCCGGCGCCGCGACGGCGTGCTGCGCACACCTCTGAC
GCTTCGCCGGCCGGGCAGGTTCGATCTATGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAGC
AAGAGAAGATCAAACCTGAAGGCGCGTTTCGACAGTAGCACAGCACCCAGAGGCACTG
ATCGGCCATGGGTTTACACGTGCGCACATCGTTGCGCTCAGCCAACACCCGGCAGC
CTTAGGGACCGTTCGCTGTCAAGTACCAGGCCATGATCGCGGCGTTGCCGGAGGCG
ACACACGAAGACATCGTTGGCGGCGGCCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCCCTGG
AAGCATTGCTCACGGTGTGCGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACA
GGTCAAACCTTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCCGCGGTGGAGGCAGTGCA
TGCATGGCGCAATGCACTGACGGGCGCTCCCCTGAACCTGACCCCGGACCAGGTG
GTGGCCATCGCCAGCAATATTGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGC
TGTTGCCGGTGCTGTGCGAGCAACATGGCCTGACCCTGGACCAGGTGGTGGCCATC
GCCAGCAATGGCGGCGGCCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCG
GTGCTGTGCGAGCAACATGGTCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCA
ATATTGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTG
CGAGCAACATGGTCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAACGGC
GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCGAGCAAC
ATGGCCTGACCCGGGCGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCA
GGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGCGCCAGGCCCATGGCCTG
ACCCCGGCGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTG
GAGACGGTGCAGCAGCTGTTGCCGGTGCTGTGCGAGCAACATGGCCTGACCCCGG
CGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGCGGCCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT
GCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGCGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGACCAGGTG
GTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGCGGCCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGG
CTGTTGCCGGTGCTGTGCGAGCAACATGGTCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCAT
CGCCAGCAATAGCGGCGGCCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCG
GTGCTGTGCGAGCAACATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCC
ACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTG
CGAGCAACATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGC
GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGCGCCAGGCC
CATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGCGGCCAAGC
CGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCGAGCAACATGGCCT
GACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTG
GAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGCGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGG
ACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT
GCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCGAGCAACATGGTCTGACCCCGGCGCAGGTG
GTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCCAGGCCGCGCTGGAGAGCATTGTTGCC
AGTTATCTCGCCCTGATCAGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCC
TTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGAGGCAGTGAAAAGGGATTGCCGC
ACGCGCCGACCTTGATCAAAGAACCAATCGCCGCTTCCCGAACGCACGTCCCAT
CGCGTTGCCGACCACGCGCAAGTGGCTCGCGTGTTGGGTTTTTTCCAGTGCCACTC
CCACCCAGCGCAAGCATTGATGAAGCCATGACGCAGTTCGGGATGAGCAGGCACG

GGTTGTTACAGCTATTTTCGCAGAGCCGGCGTACCCGAACCTCGAGGCCCGCAGTGGA
ACGCTCCCCCAGCCCCGCAGCGTTGGCACCGTATCCTCCAGGCATCAGGGATGAA
AAGGGCCGAACCGTCCGGTCTTCGGCTCAAACGCCGGACCAGGCGTCTTTGCATG
CATTGCGCGATGCGCTGGAGCGTGAGCTGGATGCGCCCAGCCCAATAGACCGGGC
GGGCCAGGCGCTGACAAGCAGCAGCACCAGGATCGGGGGCGGCCTCCCGGATCCT
GGTACACCCATGGACGCCGACCTGGCAGCGTCCAGCACCGTGATGTGGGAACAAG
ATGCTGACCCCTTCGCAGGGGCAGCGGATGATTTTCCGGCATTCAACGAAGAGGAG
ATGGCATGGTTGATGGAGCTATTTCTCAGTGA

TAL15 Δ AAD

ATGGATCCCATTCGTCCGCGCACGCCAAGTCCGCCCACGAACCTTCTGGCCGGACC
CCAGCCGGATAGGGTTCAGCCGCAGCCGACTGCAGATCGTGGGGGGGCTCCGCCT
GCCGGCAGCCCCCTGGATGGCTTGGCCGCTCGACGGACGATGTCCCGAACCCGTC
TCCCGTCTCCCCCTGCACCCTTGCCTGCGTTCTCAGCGGGCAGTTTCAGCGATCTG
CTCCGTGATTCGATCCGTGCTTCTTGATACATCGCTTTTTAATTCGATGTCTGCCT
TCGGCGCTCCTCATAACAGAGGCTGCCTCAGGAGAGGGGGATGAGGTGCAATCGGG
TCTGCGTGCAGCCGATGACCCGCAAGCCACCGTGCAGGTCGCTGTGACGGCCGCG
CGACCGCCGCGCGCCAAGCCGGCGCCGCGACGGCGTGCTGCGCACACCTCTGAC
GCTTCGCCGGCCGGCAGGTCGATCTATGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAGC
AAGAGAAGATCAAACCTGAAGGCGCGTTCGACAGTAGCACAGCACCACGAGGCACTG
ATCGGCCATGGGTTTACACGTGCGCACATCGTTGCGCTCAGCCAACACCCGGCAGC
CTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTACCAGGCCATGATCGCGGCGTTGCCGGAGGCG
ACACACGAAGACATCGTTGGCGGCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCCCTGG
AAGCATTGCTCACGGTGTGCGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACA
GGTCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCCGCGGTGGAGGCAGTGCA
TGCATGGCGCAATGCACTGACGGGCGCTCCCTGAACCTGACCCCGGACCAGGTG
GTGGCCATCGCCAGCAATATTGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGC
TGTTGCCGGTGTGTGCGAGCAACATGGCCTGACCCTGGACCAGGTGGTGGCCATC
GCCAGCAATGGCGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCG
GTGCTGTGCGAGCAACATGGTCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCA
ATATTGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTG
CGAGCAACATGGTCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAACGGC
GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCGAGCAAC
ATGGCCTGACCCGGGCGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCA
GGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCGCCAGGCCCATGGCCTG
ACCCGGCGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTG
GAGACGGTGCAGCAGCTGTTGCCGGTGTGTGCGAGCAACATGGCCTGACCCCGG
CGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT
GCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGACCAGGTG
GTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGG
CTGTTGCCGGTGTGTGCGAGCAACATGGTCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCAT
CGCCAGCAATAGCGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCG
GTGCTGTGCGAGCAACATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCC
ACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTG
CGAGCAACATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGC
GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCGCCAGGCC
CATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAGCGGCGGCAAGC
CGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCGAGCAACATGGCCT
GACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTG
GAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGG

ACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT
 GCAGCGGCTGTTGCCGTGCTGTGCGAGCAACATGGTCTGACCCCGGCGCAGGTG
 GTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAAGCAGGCGGCGCTGGAGAGCATTGTTGCC
 AGTTATCTCGCCCTGATCAGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCCGC
 TTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGAGGCAGTAAAAAGGGATTGCCGC
 ACGCGCCGACCTTGATCAAAAGAACCAATCGCCGTCTTCCCGAACGCACGTCCCAT
 CGCGTTGCCGACCACGCGCAAGTGGCTCGCGTGTGGGTTTTTCCAGTGCCACTC
 CCACCCAGCGCAAGCATTGATGAAGCCATGACGCAGTTCGGGATGAGCAGGCACG
 GTTGTTACAGCTATTCGCAGAGCCGGCGTCAACGAACTCGAGGCCACAGTGGA
 ACGTCCCCCAGCCTCGCAGCGTTGGCACCGTATCCTCCAGGCATCAGGGATGAA
 AAGGGCCGAACCGTCCGGTGCTTCCGCTCAAACGCCGGACCAGGCGTCTTTCATG
 CATTGCCGATGCGCTGGAGCGTGAGCTGGATGCGCCAGCCCAATAGACCGGGC
 GGGCCAGGCGCTGGCAAGCAGCAGCCGTAACGGTCCCGATCGGAGAGTTCTGTC
 ACCGGCTCCTTCGCACAGCAAGCTGTCGAGGTGCGCGTTCCCAGACGCGCGATG
 CGCTGCATTTCTCCCCCTCAGCTGGGGTGTAACCGCCCGCGTACCAGGATCGGG
 GGCGGCTCCCGGATCCTGGTACACCCATGGACGCCGACCTGGCAGCGTCCAGCA
 AGCTTAAGGA

Supplement B. TAL effector amino acid sequences described in this study

Table S4-1: RT-PCR primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Gene /Region
Manes.07G050200_TAL15_F1	GTGAGCGAGAAGCCTAACTATG	Manes.07G050200
Manes.07G050200_TAL15_R1	CCTTCCACACCCAAGATGAA	Manes.07G050200
Manes.08G002700_TAL15_F1	GGTGAGCGACGAATATCAGAA	Manes.08G002700
Manes.08G002700_TAL15_R1	ATGTTAGGCGAAGGACGATG	Manes.08G002700
Manes.11G030700_TAL15_F1	GTTGGTCGCTGTCTTCATCT	Manes.11G030700
Manes.11G030700_TAL15_R1	AAATGGGTCGACGAGTTTGA	Manes.11G030700
Manes.01G058900_TAL15_F1	ATGGGCTGCTTCTGGGATTC	Manes.01G058900
Manes.01G058900_TAL15_R1	TATACACATCACGGCCACGC	Manes.01G058900
Manes.14G044700_TAL15_F1	GAGCCATTTCTTTCGCGGAC	Manes.14G044700
Manes.14G044700_TAL15_R1	AGTACGGACTCCCAAACCTGC	Manes.14G044700
427_Fw	CGGTGGAGGCAGTGATG	RepeatsTAL
428_Rv	ATCAGGGCGAGATAACTGGGC	RepeatsTAL
4_Fw	TCTAGATTTGATGAAGCCATGACG	C-termTAL
1841_Rv	GCTAAGCTTTCCTGAGGAAATAGCTC CATC	C-termTAL-HindIII
MutantAAD_Rv	TCCTTAAGCTTGCTGGACGCTGCCA	C-termTAL-HindIII
727_Rv	CACTGAGGAAATAGCTCCAT	C-termTAL

726_Fw	CACCATGGATCCCATTCGTCC	N-termTAL
--------	-----------------------	-----------

Capítulo 5

“No llores porque ya se terminó, sonríe porque sucedió”

Gabriel Garcia Marquez

Capítulo 5. Discusión general

El crecimiento de la población humana presenta un comportamiento exponencial, acompañado de un incremento lineal en la demanda de alimentos. Según proyecciones de las naciones unidas la población mundial para el año 2050 será de 9.15 billones (<http://www.un.org/en/development/desa/news/population/2015-report.html>), lo cual implica la necesidad de un incremento del 70 al 100% en la producción de alimentos (FAO 2009). Esta demanda de alimentos se enfrenta a su vez a cambios constantes de temperatura, CO₂ y de ozono, por efecto del cambio climático. Lo que exige el desarrollo de nuevas estrategias que aseguren la seguridad alimentaria en la población, mediante el cambio de las prácticas agronómicas, la reducción de los desechos, el manejo integrado de plagas, el uso adecuado de los terreno y la selección de cultivos capaces de adaptarse a los cambios medioambientales (Dinesh & Vermeulen 2016). La yuca es uno de los cultivos tropicales más productivos en tierras marginales. La yuca es capaz de adaptarse a condiciones adversas, su desempeño es alto en aquellas áreas propensas a sequía y con suelos pobres. Por tanto, se considera un cultivo candidato para soportar los efectos del cambio climático (Mupakati & Tanyanyiwa 2017). En ambientes estacionales y semiáridos con menos de 700 mm de lluvia anual, los cultivos pueden producir más de 3 toneladas de raíces secas por hectárea (El-Sharkawy 2007). La yuca es considerada un cultivo de seguridad alimentaria para los pequeños agricultores de escasos recursos en tierras marginales.

La yuca al igual que muchos otros cultivos es vulnerable a muchas pestes y enfermedades que pueden generar reducción en su producción. Las enfermedades que generan mayores pérdidas son la bacteriosis vascular, la CMD y la CBSD. La bacteriosis vascular es la enfermedad más devastadora en America, África y Asia (Harris et al. 2015; Graziosi et al. 2016). Una medida adoptada por los agricultores para evitar perdidas por esta enfermedad y proteger el agro-ecosistema es el uso de variedades resistentes (Lozano 1986; Boher & Verdier 1994). Algunas variedades resistente han sido descritas

(Restrepo et al. 2000), sin embargo la enfermedad permanece si la variedad no se adapta al suelo ó si no poseen características agroculinarias agradables que incremento su cultivo (López & Bernal 2012). Esto implica la necesidad de transferir características que le confieran resistencia, en aquellas variedades adaptadas y ampliamente utilizadas por el agricultor (Verdier et al. 2004). Sin embargo, el proceso para la obtención de nuevas variedades resistentes mediante el metodo de mejoramiento convencional, consume mucho tiempo debido al ciclo reproductivo de la yuca. Como alternativa para mejorar la resistencia de la planta, se sugiere la combinación de mecanismos moleculares asociados con la resistencia y el uso estrategias no convencionales para la transferencia de genes.

Algunas de las estrategias utilizadas en yuca, para la búsqueda de fuentes de resistencia han involucrado el mapeo de loci de caracteres cuantitativos (Jorge et al. 2000; Soto Sedano et al. 2017; Tappiban et al. 2018), la clonación posicional (Lopez et al. 2003) ó el uso de TALEs (Shybut 2015; Cohn 2015). Los resultados de estas investigaciones han permitido la identificación de regiones en el genoma asociadas con resistencia hacia algunas cepas de *Xpm* (Jorge et al. 2000; Soto Sedano et al. 2017; Tappiban et al. 2018), genes de resistencia candidatos *RXam1* y *RXam2* (Díaz Tatis et al. 2018; Díaz Tatis 2016) y construcciones de genes que contienen EBEs para TALEs en su región promotora (Cohn 2015), además de genes candidatos activados por TALEs de *Xpm* en tabaco (Shybut 2015). Los avances logrados con estas metodologías han sentado algunas bases importantes en el conocimiento de este patosistema. No obstante, la transferencia de los genes candidatos identificados hacia variedades susceptibles no ha permitido la obtención de plantas adultas estables y en las aproximaciones en donde se utilizan TALEs como inductores transcripcionales, no se han obtenido genes candidatos en yuca. De aquellas estrategias que han involucrado TALEs, la primera utilizó la expresión transitoria como método para la obtención de un fenotipo de resistencia, activado por el TAL14 en plantas de tabaco. Posteriormente, se analizó el perfil transcriptómico de las muestras a través de un análisis de RNAseq para la obtención de los candidatos. Sin embargo, los candidatos validados no recuperaron el fenotipo de resistencia en planta (Shybut 2015). En la segunda estrategia se utilizó el concepto de gen ejecutor para diseñar un gen el cual generara HR en yuca, el diseño del gen contempló un EBEs para el TA14 ó para el TAL20 en la región promotora del efector *avrGf2* de *Xanthomonas fuscans* sbsp. *arantifolii*. El efector *avrGf2* fue seleccionado

debido a la inducción de HR en yuca. Su expresión transitoria disminuyó los síntomas de la bacteriosis vascular (Cohn 2015). A pesar de evidenciar la activación de HR en yuca, mediante el uso de sistemas alternativos, los resultados obtenidos con estas dos aproximaciones no permitieron la obtención de genes candidatos en yuca. Por consiguiente, el eje central de este trabajo se centró en la búsqueda de estos genes ejecutores.

Sin embargo, los resultados obtenidos en varios patosistemas no solo en yuca-*Xpm* han demostrado la necesidad de evaluar múltiples parámetros que pueden afectar la interacción. Parámetros desarrollaron en cada uno de los capítulos, en donde se abordaron distintas necesidades. Los parámetros más críticos para alcanzar el objetivo final fueron *i)* determinar un sistema de liberación *ii)* establecer una HR en yuca activada por TALEs y *iii)* optimizar algunas metodologías para el estudio del patosistema. La selección de un sistema de liberación fue el primer parámetro evaluado y quizás uno de los más importantes. La liberación de TALEs mediada por *Agrobacterium* fue evaluada en tabaco, los resultados permitieron obtener el mismo fenotipo de resistencia obtenido por Shybut (2015), problemas en la evaluación de la expresión de estas proteínas en planta favorecieron la decisión de no continuar con éste proyecto (Ramírez comunicación personal). A pesar de, optimizar varios parámetros que afectan la expresión transitoria en yuca, no fue posible evaluar la inoculación de los TALEs debido al efecto diferencial observado entre variedades de yuca. Las inoculaciones en yuca con otros sistemas, demostraron la selección de la bacteria *Xpm* como el sistema más adecuado por el desarrollo de fenotipos de susceptibilidad y resistencia por efecto de los TALEs. Este hallazgo es uno de los resultados principales de este proyecto, ya que se observó el desarrollo de HR resolviendo el segundo parámetro crítico en este proyecto. La optimización de las metodologías también generaron un gran aporte porque validaron tanto el sistema con plantas adultas y como con plantas crecidas *in vitro*, para la evaluación de síntomas y del crecimiento bacteriano.

Todos los resultados generados en los primeros capítulos fueron explotados en los dos últimos, con el objetivo de entender y profundizar en las bases de la resistencia. Los resultados del análisis transcriptómico realizado en plantas crecidas *in vitro* de la variedad MBRA685 inoculadas con las cepas *Xpm318* y *Xpm681*, demostraron diferencias muy marcadas entre la respuesta de resistencia y de susceptibilidad. En el

fenotipo de resistencia se activó una mayor cantidad de genes, con valores altos de expresión. El análisis realizado es único por ser evaluado en plantas con el mismo fondo genético.

Por último, se desarrolló el proyecto enfocado hacia la búsqueda de genes ejecutores, en este capítulo se logró demostrar la activación de un mecanismo de resistencia activado por el TAL15, utilizando diferentes métodos de inoculación ó sistemas en plantas de yuca. Su función como activador transcripcional fue demostrado mediante el diseño de dos mutantes y su evaluación. Los genes candidatos fueron obtenidos mediante herramientas transcriptómicas, algunos de estos genes fueron validados y son ahora candidatos promisorios, el diseño de arTALEs dirigidos hacia su región promotora validaran su función en planta. Si algunos de los arTALEs diseñados disminuyen los síntomas en planta. Estaremos frente al primer gen ejecutor en yuca. El cual podrá ser utilizado en programas de mejoramiento en yuca.

Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas

El trabajo permitió abordar varias problemáticas, que giran en torno a la búsqueda de genes ejecutores como eje central de esta tesis. Los sistemas de liberación evaluados permitieron identificar la infiltración como metodología para la liberación de efectores, en particular TALEs, bajo condiciones de alta humedad. Las inoculaciones en planta de los TALEs 13A, 14B, 15B, 20C y 21A, permitieron observar respuestas diferenciales para cada uno de los TALEs en plantas de yuca. Algunos TALEs como el 14 y 20 aumentaron los síntomas, mientras que los TALEs 13, 15 y 21 los disminuyeron. Las respuestas a la inoculación con *Xpm* de las plantas crecidas *in vitro* recrearon las respuestas que se observan en las plantas obtenidas a partir de estacas.

Se lograron identificar las mejores condiciones para inducir la expresión transitoria del gen *GUS* en hojas de yuca, utilizando como metodología de inoculación la infiltración y la cepa GV3101, la introducción del gen *VirG* en la cepa de *Agrobacterium* GV3101 mejoró la expresión transitoria del gen *GUS*, aunque se observó una fuerte dependencia entre las variedades de yuca para que el proceso de agroinfiltración sea eficiente.

Se demostró la activación de un mecanismo de resistencia activado por el TAL15, mediante infiltración en hojas, AUDPC y crecimiento bacteriano, en estacas y en plantas crecidas *in vitro*. La función del TAL15 como activador transcripcional se corroboró mediante el diseño y construcción de dos mutantes. La combinación de herramientas transcripcionales de plantas inoculadas con el TAL15 y las predicciones bioinformáticas de los EBEs, permitieron la identificación de cuatro genes E candidatos inducidos por TAL15, los cuales fueron validados y son ahora candidatos promisorios. El diseño de arTALEs dirigidos hacia su región promotora permitieron corroborar su función en planta, si alguno de estos cinco genes candidatos disminuye los síntomas en planta mediante la inoculación de los arTALEs diseñados, se habrá logrado el objetivo de la identificación del primer gen ejecutor en yuca, el cual podrá ser utilizado en programas de mejoramiento.

Bibliografía

Adlung, N. et al., 2016. Non-host Resistance Induced by the Xanthomonas Effector XopQ Is Widespread within the Genus Nicotiana and Functionally Depends on EDS1. , 7(November).

Allem, A.C., 1994. The origin of Manihot esculenta Crantz (Euphorbiaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 41(1987), pp.133–150.

Antony, G. et al., 2010. Rice xa13 recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene Os-11N3. *The Plant cell*, 22(11), pp.3864–76. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3015117&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Aung, K. et al., 2017. Subcellular Localization of Pseudomonas syringae pv. tomato Effector Proteins in Plants. In M. L. Nilles & D. L. J. Condry, eds. *Type 3 Secretion Systems: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York, pp. 141–153. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6649-3_12.

Aung, K., Jiang, Y. & He, S.Y., 2018. The role of water in plant-microbe interactions. *The Plant Journal*, 93(4), pp.771–780. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/tpj.13795>.

Babicki, S. et al., 2016. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic acids research*, 44, pp.W147–W153.

Bacman, S.R. et al., 2018. MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA^{Ala} levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation. *Nature Medicine*, 24(11), pp.1696–1700. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0166-8>.

Bart, R. et al., 2012. High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), pp.E1972–E1979.

Bart, R.S. & Taylor, N.J., 2017. New opportunities and challenges to engineer disease resistance in cassava , a staple food of African small-holder farmers. *PLoS ONE*, 13(5), pp.1–7.

Bernal-galeano, V. et al., 2018. Development of a multiplex nested PCR method for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Cassava. *Tropical Plant Pathology*.

Van der Biezen, E.A. & Jones, J.D.G., 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(12), pp.454–456.

Bigeard, J., Colcombet, J. & Hirt, H., 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8(4), pp.521–539. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>.

Blanvillain-Baufumé, S. et al., 2017. Targeted promoter editing for rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals differential activities for SWEET14-inducing TAL effectors. *Plant Biotechnology Journal*, 15(3), pp.306–317.

Boch, J. et al., 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326(5959), pp.1509–1512. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19933107> <http://classic.sciencemag.org/content/326/5959/1509.full.pdf>.

Boch, J. & Bonas, U., 2010. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual review of phytopathology*, 48, pp.419–36. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>.

Boch, J., Bonas, U. & Lahaye, T., 2014. TAL effectors--pathogen strategies and plant resistance engineering. *The New phytologist*, 204(4), pp.823–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25539004>.

Bodnar, A.M., 2012. Function of TALE1 Xam in cassava bacterial blight : a transcriptomic approach Function of TALE1 Xam in cassava bacterial blight : a transcriptomic approach.

Bogdanove, A.J., Schornack, S. & Lahaye, T., 2010. TAL effectors : finding plant genes for disease and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4), pp.394–401. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.010>.

Boher, B. et al., 1997. Extracellular polysaccharides from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* interact with cassava cell walls during pathogenesis. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 10(7), pp.803–811.

Boher, B. et al., 1995. Ultrastructure of Interactions Between Cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*: Cytochemistry of Cellulose and Pectin Degradation in a Susceptible Cultivar. *Cytology and Histology*, 85(7), pp.1–12. Available at: <papers://ae07b554-3856-4ee3-b9ee-801c36a70ef7/Paper/p2149>.

Boher, B. & Verdier, V., 1994. Cassava bacterial Blight in Africa: The state of knowledge and implications for designing control strategies. *African Crop Science Journal*, 2(4), pp.505–509.

- Boller, T. & Felix, G., 2009. A Renaissance of Elicitors : Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, pp.379–4076.
- Bredeson, J. V et al., 2016. Sequencing wild and cultivated cassava and related species reveals extensive interspecific hybridization and genetic diversity. *Nature Biotechnology*, (April). Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt.3535>.
- Brunings, A.M. & Gabriel, D.W., 2003. Xanthomonas citri: Breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, 4(3), pp.141–157.
- Büttner, D., 2016. Behind the lines – actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(6), pp.894–937.
- Cao, Y. et al., 2014. The kinase LYK5 is a major chitin receptor in Arabidopsis and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *eLife*, 3, pp.1–19.
- Carroll, D., 2011. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188, pp.773–782.
- Castiblanco, L.F. 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. *Molecular Plant Pathology*, 14(1), pp.84–95.
- Ceballos, H. et al., 2015. Conventional breeding, marker-assisted selection, genomic selection and inbreeding in clonally propagated crops: a case study for cassava. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 128(9), pp.1647–1667. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26093610>.
- Cermak, T. et al., 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. , 39(12), pp.1–11.
- Cernadas, R.A. et al., 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 Pathogens*, 10(2).
- Chakraborty, J. et al., 2018. Functional diversification of structurally alike NLR proteins in plants. *Plant Science*, 269, pp.85–93. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.01.008>.
- Chen, H. et al., 2017. Bacterial Type III Effector Targets the Master Subvert Plant Immunity Article A Bacterial Type III Effector Targets the Master Regulator of Salicylic Acid Signaling , NPR1 , to Subvert Plant Immunity. *Cell Host and Microbe*, 13, pp.1–12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.019>.
- Chen, K. & Gao, C., 2015. Chapter 4 Engineered TAL Effector Proteins: Versatile Reagents for Manipulating Plant Genomes. In *Advances in New Technology for Targeted*

Modification of Plant Genomes. pp. 145–159. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2556-8>.

Chen, L. et al., 2012. Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science*, 335(207), pp.207–211.

Chen, L.Q., 2014. SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytologist*, 201(4), pp.1150–1155.

Chen, T. et al., 2013. Comparative Transcriptome Profiling of a Resistant vs . Susceptible Tomato (*Solanum lycopersicum*) Cultivar in Response to Infection by Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *PLoS ONE*, 8(11), pp.4–6.

Chisholm, S.T. et al., 2006. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), pp.803–814.

Chisholm, S.T. et al., 2005. Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(6), pp.2087–2092. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15684089>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC548309>.

Chu, Z. et al., 2006. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes & development*, 20(10), pp.1250–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1472899&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Chung, E. et al., 2011. Article Specific Threonine Phosphorylation of a Host Target by Two Unrelated Type III Effectors Activates a Host Innate Immune Receptor in Plants. *Cell Host and Microbe*, 9(2), pp.125–136. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2011.01.009>.

Cock, J.H., 1982. Cassava : A Basic Energy Source in the Tropics. *Science, New Series*, 218(4574), pp.755–762.

Cohn, M., Shybut, M., et al., 2015. Assays to Assess Virulence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* on Cassava. *Bio-protocol*, 5(13).

Cohn, M., 2015. *Characterization of the Transcription Activator-Like Effectors of Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* and identification of susceptibility targets in the host cassava.

Cohn, M., Morbitzer, R., et al., 2015. Comparison of gene activation by two TAL effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv . *manihotis* reveals candidate host susceptibility genes in cassava. *Molecular Plant Pathology*, (869), pp.1–15.

- Cohn, M. et al., 2014. Xanthomonas axonopodis virulence is promoted by a transcription activator like (TAL) effector mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 27(11), pp.1186–1198. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25083909>.
- Collier, S.M., Hamel, L. & Moffett, P., 2011. Cell Death Mediated by the N-Terminal Domains of a Unique and Highly Conserved Class of NB-LRR Protein. *MPMI*, 24(8), pp.918–931.
- Constantin, E.C. et al., 2016. Genetic characterization of strains named as Xanthomonas axonopodis pv. dieffenbachiae leads to a taxonomic revision of the X. axonopodis species complex. *Plant Pathology*, 65(5), pp.792–806.
- Contois, D., 1959. Kinetics of Bacterial Growth: Relationship between Population Density and Specific Growth Rate of Continuous Cultures. *J. gen. Microbiol.*, (21), pp.40–50.
- Cook, D.E., Mesarich, C.H. & Thomma, B.P.H.J., 2014. Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion. *Annual Review of Phytopathology*, 53(May), p.150605182533006. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-phyto-080614-120114>.
- Corwin, J.A. & Kliebenstein, D.J., 2017. Quantitative Resistance: More Than Just Perception of a Pathogen. *The Plant Cell*, 29(4), pp.655–665. Available at: <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.16.00915>.
- Couto, D. & Zipfel, C., 2016. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, 16, p.537. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri.2016.77>.
- Cox, K.L. et al., 2017. TAL effector driven induction of a SWEET gene confers susceptibility to bacterial blight of cotton. *Nature Communications*, 8(May), pp.1–14. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15588>.
- Cuculis, L. et al., 2015. Direct observation of TALE protein dynamics reveals a two-state search mechanism. *Nature Communications*, 6, p.7277. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms8277>.
- Cui, H., Tsuda, K. & Parker, J.E., 2015. Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66(October 2015), pp.487–511. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-arplant-050213-040012>.
- Curtin, S.J. et al., 2018. CRISPR / Cas9 and TALENs generate heritable mutations for genes involved in small RNA processing of Glycine max and Medicago truncatula. *Plant Biotechnology Journal*, 16, pp.1125–1137.

Deng, D. et al., 2012. Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. *Science*, 335(6069), pp.720–723. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/335/6069/720.short%5Cnhttp://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1215670>.

Deng, W. et al., 2017. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 15, pp.323–337.

Díaz Tatis, A.P., 2016. Transference of RXam2 and Bs2 genes to confer resistance against cassava bacterial blight (CBB). , pp.1–187.

Díaz Tatis, P.A. et al., 2018. The overexpression of RXam1, a cassava gene coding for an RLK, confers disease resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Planta*, 247(4), pp.1031–1042.

Diepold, A. & Armitage, J.P., 2015. Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1679), p.20150020. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26370933%5Cnhttp://rstb.royalsocietypublishing.org/lookup/doi/10.1098/rstb.2015.0020>.

Dinesh, D. & Vermeulen, S., 2016. *Climate change adaptation in agriculture: practices and technologies Opportunities for climate action in agricultural systems*, Available at: <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/71053>.

Dong, X. et al., 2015. Revealing Shared and Distinct Gene Network Organization in Arabidopsis Immune Responses by Integrative Analysis. *Plant Physiology*, 167(3), pp.1186–1203. Available at: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.114.254292>.

Doyle, E.L. et al., 2012. TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: Tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), pp.117–122.

Doyle, E.L. et al., 2013. TAL effectors : highly adaptable phytobacterial virulence factors and readily engineered DNA-targeting proteins. *Trends in Cell Biology*, 23(8), pp.390–398.

Du, H. et al., 2015. Comparative Transcriptome Analysis of Resistant and Susceptible Tomato Lines in Response to Infection by *Xanthomonas perforans* Race T3. *Frontiers in Plant Science*, 6(December), pp.1–14. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.01173/abstract>.

El-Sharkawy, M.A., 2007. Physiological characteristics of cassava tolerance to prolonged drought in the tropics: Implications for breeding cultivars adapted to seasonally dry and semiarid environments. *Brazilian Journal Plant of physiology*, 19(4), pp.257–286. Available at: <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20073012668>.

Engler, C. et al., 2009. Golden gate shuffling: A one-pot DNA shuffling method based on type IIS restriction enzymes. *PLoS ONE*, 4(5).

Erkes, A. et al., 2017. Evolution of Transcription Activator-Like Effectors in *Xanthomonas oryzae*. *Genome biology and evolution*, 9(6), pp.1599–1615.

Erkes, A. et al., 2019. PrediTALe : A novel model learned from quantitative data allows for new perspectives on TALE targeting Author summary. , pp.1–28.

Ezenwaka, L. et al., 2018. Genome-Wide Association Study of Resistance to Cassava Green Mite Pest and Related Traits in Cassava. *Crop Science*, 58, pp.1–12.

FAO, 2017. *Food Outlook: Biannual Report on Global Food Markets.*,

FAO, 2015. Food Outlook. *Global information and early warning system on food and agriculture*, (October), pp.1–119. Available at: <http://www.fao.org/docrep/013/al969e/al969e00.pdf>.

FAO, 2009. *Global agriculture towards 2050*, Available at: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Global_Agriculture.pdf.

FAO, F. and A.O. of the U.N., 2013. EL ESTADO MUNDIAL DE LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.

FAO, F. and A.O. of the U.N., 2018. *Food Outlook: Biannual report on global food markets*,

Fatima, U. & Senthil-Kumar, M., 2015. Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. *Frontiers in Plant Science*, 6(September), pp.1–12. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.00750/abstract>.

Feng, F. et al., 2012. A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature*, 485, p.114. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10962>.

Flores, C. et al., 2018. Development of a duplex-PCR for differential diagnosis of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* and *Xanthomonas cassavae* in cassava (*Manihot esculenta*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2018.07.005>.

Gangadharan, A. et al., 2013. The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Type III Effector HopM1 Suppresses Arabidopsis Defenses Independent of Suppressing Salicylic Acid Signaling and of Targeting. *PLoS ONE*, 8(12).

Geeta & Mishra, R., 2018. Fungal and Bacterial Biotrophy and Necrotrophy. In A. Singh & I. K. Singh, eds. *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. Singapore: Springer Singapore, pp. 21–42. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_2.

Germain, H. et al., 2018. Infection assays in Arabidopsis reveal candidate effectors from the poplar rust fungus that promote susceptibility to bacteria and oomycete pathogens EG U I N. *Molecular Plant Pathology*, 19(1), pp.191–200.

Gervasi, F. et al., 2018. Transcriptome reprogramming of resistant and susceptible peach genotypes during *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* early leaf infection. *PLoS ONE*, 13(4), pp.1–21.

Giardine, B. et al., 2005. Galaxy :A platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Research*, 15, pp.1451–1455.

Glazebrook, J. & Roby, D., 2018. Plant biotic interactions: from conflict to collaboration. *The Plant Journal*, 93(4), pp.589–591.

Gómez-Cano, F. et al., 2018. Gene co-expression network for *Xanthomonas*-challenged cassava reveals key regulatory elements of immunity processes. *European Journal of Plant Pathology*.

Gómez-gómez, L. & Boller, T., 2002. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science*, 7(6), pp.251–256.

Gonzalez, C. et al., 2002. Characterization of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by PCR-based DNA fingerprinting techniques. *FEMS Microbiology Letters*, 215(1), pp.23–31.

Goodstein, D.M. et al., 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic*, 40, pp.1178–1186.

Grau, J. et al., 2013. Computational Predictions Provide Insights into the Biology of TAL Effector Target Sites. *PLoS Computational Biology*, 9(3).

Graziosi, I. et al., 2016. Emerging pests and diseases of South-east Asian cassava : a comprehensive evaluation of geographic priorities , management options and research needs. *Pest Management Science*, 72, pp.1071–1089.

Grennan, A.K., 2006. Plant Response to Bacterial Pathogens . Overlap between Innate and Gene-for-Gene Defense Response. *Plant Physiology*, 142(November), pp.809–811.

Gu, K. et al., 2005. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, 435(7045), pp.1122–1125.

Guy, E. et al., 2013. xopAC -triggered Immunity against *Xanthomonas* Depends on Arabidopsis Receptor-Like Cytoplasmic Kinase Genes PBL2 and RIPK. *PLoS ONE*, 8(8), pp.1–13.

Hahn, S.K., Terry, E.R. & Leuschner, K., 1980. Breeding cassava for resistance to cassava mosaic disease. *Euphytica*, 29(3), pp.673–683.

- Harris, K.P. et al., 2015. Cassava Bacterial Blight and Postharvest Physiological Deterioration Production Losses and Control Strategies. *Evans School Policy Analysis and Research (EPAR)*, pp.1–34.
- Hayward, A.C., 1993. The hosts of *Xanthomonas*. In J. G. Swings & E. L. Civerolo, eds. *Xanthomonas*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 1–119. Available at: https://doi.org/10.1007/978-94-011-1526-1_1.
- Henry, G. & Hershey, C., 2002. Cassava in South America and the Caribbean. In R. J. Hillocks, J. M. Thresh, & A. C. Bellotti, eds. *Cassava: Biology, Production and Utilization*. New York: CABI, pp. 17–40.
- Herrera, M. et al., 2018. Estudio de la expresión de genes que codifican para putativas proteínas PRs en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). , 23(3), pp.242–252.
- Hirai, H. et al., 2011. Glycosylation Regulates Specific Induction of Rice Immune Responses by *Acidovorax avenae* Flagellin. *Journal of Biological Chemistry*, 286(29), pp.25519–25530.
- Hu, M. et al., 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(May), pp.1–12. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.00680>.
- Hu, Y. et al., 2014. Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), pp.E521-9. Available at: <http://www.pnas.org/content/111/4/E521.abstract>.
- Hummel, A.W., Doyle, E.L. & Bogdanove, A.J., 2012. Addition of transcription activator-like effector binding sites to a pathogen strain-specific rice bacterial blight resistance gene makes it effective against additional strains and against bacterial leaf streak. *New Phytologist*, 195(4), pp.883–893.
- Hutin, M. et al., 2015. MorTAL Kombat: the story of defense against TAL effectors through loss-of-susceptibility. *Frontiers in plant science*, 6(July), p.535. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4500901&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hwang, H.-H., Yu, M. & Lai, E.-M., 2017. *Agrobacterium* -Mediated Plant Transformation: Biology and Applications. *The Arabidopsis Book*, 15, p.e0186. Available at: <http://www.bioone.org/doi/10.1199/tab.0186>.
- Jacques, M.-A. et al., 2016. Using Ecology, Physiology, and Genomics to Understand Host Specificity in *Xanthomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, 54(1), pp.163–187. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-phyto-080615-100147>.

- Jankele, R. & Svoboda, P., 2014a. TAL effectors: tools for DNA targeting. *Briefings in functional genomics*, 13(5), pp.409–19. Available at: <http://bfg.oxfordjournals.org/content/early/2014/06/06/bfgp.elu013.short>.
- Jankele, R. & Svoboda, P., 2014b. TAL effectors: tools for DNA targeting. *Briefings in functional genomics*, 13(5), pp.409–19. Available at: <http://bfg.oxfordjournals.org/content/early/2014/06/06/bfgp.elu013/F1.expansion.html>.
- Jehle, A.K. et al., 2013. The receptor-like protein ReMAX of Arabidopsis detects the microbe-associated molecular pattern eMax from Xanthomonas. *The Plant cell*, 25(6), pp.2330–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3723629&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jelenska, J., van Hal, J. a & Greenberg, J.T., 2010. Pseudomonas syringae hijacks plant stress chaperone machinery for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, pp.13177–13182.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature Reviews*, 444(November), pp.323–329.
- Jordan, T. et al., 2006. Physical delimitation of the pepper Bs3 resistance gene specifying recognition of the AvrBs3 protein from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 113(5), pp.895–905. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16874489>.
- Jorge, V. et al., 2000. Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 101(September 2000), pp.865–872.
- Jorge, V. et al., 2001. QTL analysis of field resistance to Xanthomonas axonopodis pv. manihotis in cassava. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(4), pp.564–571.
- Jorge, V. & Verdier, V., 2002. Qualitative and quantitative evaluation of cassava bacterial blight resistance in F 1 progeny of a cross between elite cassava clones. *Euphytica*, 123, pp.41–48.
- Kaku, H. et al., 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(29), pp.11086–11091.
- Kang, Y. et al., 2014. HopW1 from Pseudomonas syringae Disrupts the Actin Cytoskeleton to Promote Virulence in Arabidopsis. *PLOS Pathogens*, 10(6), p.e1004232. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004232>.

- Kawasaki, T. et al., 2005. A duplicated pair of Arabidopsis RING-finger E3 ligases contribute to the RPM1- and RPS2-mediated hypersensitive response. *The Plant Journal*, 44, pp.258–270.
- Kay, S. et al., 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5850), pp.648–651.
- Kay, S. & Bonas, U., 2009. How Xanthomonas type III effectors manipulate the host plant. *Current Opinion in Microbiology*, 12(1), pp.37–43. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008.12.006>.
- Khan, M. et al., 2018. Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. *The Plant Journal*, 93(4), pp.651–663.
- Khan, M., Subramaniam, R. & Desveaux, D., 2016. Of guards, decoys, baits and traps: Pathogen perception in plants by type III effector sensors. *Current Opinion in Microbiology*, 29, pp.49–55. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2015.10.006>.
- Khan, Z. et al., 2018. TALE-Mediated Inhibition of Replication of Begomoviruses. *International Journal of agriculture & biology*, 20, pp.109–118.
- Kim, H. et al., 2005. The Pseudomonas syringae effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from Arabidopsis membranes to block RPM1 activation. *PNAS*, 102(18).
- Kourelis, J. & van der Hoorn, R.A.L., 2018. Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *The Plant Cell*, 30(2), p.285 LP-299. Available at: <http://www.plantcell.org/content/30/2/285.abstract>.
- Kpémoua, K. et al., 1996. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by Xanthomonas campestris pv. manihotis. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(November), pp.1131–1143.
- Krol, E. et al., 2010. Perception of the Arabidopsis danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *Journal of Biological Chemistry*, 285(18), pp.13471–13479.
- Lam, E., Kato, N. & Lawton, M., 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411, p.848. Available at: <https://doi.org/10.1038/35081184>.
- de Lange, O. et al., 2014. Programmable DNA-binding proteins from Burkholderia provide a fresh perspective on the TALE-like repeat domain. *Nucleic Acids Research*, 42(11), pp.7436–7449.
- Lee, M.W., Jelenska, J. & Greenberg, J.T., 2008. Arabidopsis proteins important for modulating defense responses to Pseudomonas syringae that secrete HopW1-1. *The Plant Journal*, 54, pp.452–465.

- Lewis, J.D. et al., 2013. The Arabidopsis ZED1 pseudokinase is required for ZAR1-mediated immunity induced by the *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1a. *PNAS*, 110(46), pp.18722–18727.
- Li-Qing, C. et al., 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468(7323), pp.527–532.
- Li, S. et al., 2017. The industrial applications of cassava: current status, opportunities and prospects. *Journal of the science of food and Agriculture*, 97(8), pp.2282–2290.
- Li, T. et al., 2012. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotech*, 30(5), pp.390–392. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2199>.
- Li, Z. et al., 2014. A potential disease susceptibility gene CsLOB of citrus is targeted by a major virulence effector PthA of *xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Molecular Plant*, 7(5), pp.912–915.
- Liu, Q. et al., 2011. A paralog of the MtN3/saliva family recessively confers race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* in rice. *Plant, Cell and Environment*, 34(11), pp.1958–1969.
- Lopez, C. et al., 2004. A unigene catalogue of 5700 expressed genes in cassava. *Plant Molecular Biology*, 56(4), pp.541–554.
- Lopez, C. et al., 2005. Gene expression profile in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* infection in cassava using a cDNA microarray. *Plant Molecular Biology*, 57(3), pp.393–410.
- Lopez, C.E. et al., 2003. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. *Phytopathology*, 93, pp.88–95.
- López, C.E., 2011. Deciphering the Molecular Bases of Quantitative Resistance. *Acta Biol. Colomb.*, 16(2), pp.3–14.
- López, C.E. & Bernal, A.J., 2012. Cassava Bacterial Blight: Using Genomics for the Elucidation and Management of an Old Problem. *Tropical Plant Biology*, 5(1), pp.117–126.
- Lozano-durán, R. et al., 2014. The bacterial effector HopM1 suppresses PAMP-triggered oxidative burst and stomatal immunity. *New Phytologist*, 202, pp.259–269.
- Lozano, C.-J., 1986. Cassava Bacterial Blight: A Manageable Disease. *Plant Disease*, 70(12), p.1089-.
- Lozano, J. & Laberry, R., 1982. Screening for Resistance to Cassava Bacterial Blight. *Plant Disease*, 66(April), pp.316–318.

- Ma, L. et al., 2018. Leptosphaeria maculans Effector Protein AvrLm1 Modulates Plant Immunity by Enhancing MAP Kinase 9 Phosphorylation. *iScience*, 3, pp.177–191. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2589004218300476>.
- Ma, L. et al., 2012. The Use of Agroinfiltration for Transient Expression of Plant Resistance and Fungal Effector Proteins in *Nicotiana benthamiana* Leaves. In *Plant Fungal Pathogens*. pp. 61–74. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-501-5>.
- Ma, Z. et al., 2017. A paralogous decoy protects *Phytophthora sojae* apoplastic effector PsXEG1 from a host inhibitor. *Science*, 355, pp.710–714.
- Maag, D. et al., 2015. Defensive weapons and defense signals in plants: Some metabolites serve both roles. *BioEssays*, 37(2), pp.167–174. Available at: <https://doi.org/10.1002/bies.201400124>.
- Mafurah, J.J. et al., 2015. A Virulence Essential CRN Effector of *Phytophthora capsici* Suppresses Host Defense and Induces Cell Death in Plant Nucleus. *PLoS ONE*, 5, pp.1–15.
- Mak, A.N. et al., 2012. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science*, 335(6069), pp.716–719.
- Masurkar, P. et al., 2018. Invasion and Nutrient Acquisition Strategies of Phytopathogens: Fungi, Bacteria and Viruses. *International Journal of current Microbiology and Applied Sciences*, 7(08), pp.3132–3146.
- Mbaringong, G.A. et al., 2017. Evaluation of Selected Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Cultivars Grown in Kenya for Resistance to Bacterial Blight Disease. *World Journal of Agricultural Research*, 5(2), pp.94–101. Available at: <http://pubs.sciepub.com/wjar/5/2/5>.
- Mccallum, E.J., Anjanappa, R.B. & Gruissem, W., 2017. ScienceDirect Tackling agriculturally relevant diseases in the staple crop cassava (*Manihot esculenta*). *Current Opinion in Plant Biology*, 38, pp.50–58. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.008>.
- McNabb, W., Van den Berg, C.G. & Rimmer, S., 1993. Comparison of inoculation methods for selection of plants resistant to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 73, pp.1199–1207.
- Meckler, J.F. et al., 2013. Quantitative analysis of TALE-DNA interactions suggests polarity effects. *Nucleic Acids Research*, 41(7), pp.4118–4128.
- Medina, C.A. et al., 2018. The role of type III effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in virulence and suppression of plant immunity. *Molecular Plant Pathology*, 19(3), pp.593–606.

- Mensi, I. et al., 2014. Breaking dogmas: the plant vascular pathogen *Xanthomonas albilineans* is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome. *Open biology*, 4, p.130116. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3938051&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Meyer, D. et al., 2005. Optimization of pathogenicity assays to study the *Arabidopsis thaliana* – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathosystem. *Molecular Plant Pathology*, 6(3), pp.327–333.
- Miller, J.C. et al., 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotech*, 29(2), pp.143–148. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1755>.
- Miya, A. et al., 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), pp.19613–8. Available at: <http://www.pnas.org/content/104/49/19613.long>.
- Mo, J. & Duncan, J.A., 2014. Assessing ATP binding and hydrolysis by NLR proteins Jinyao. *Methods in Molecular Biology*, 1040, pp.153–168.
- Montagnac, J. a, Davis, C.R. & Tanumihardjo, S. a, 2009. Nutritional Value of Cassava for Use as a Staple Food and Recent Advances for Improvement. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8.
- Monteiro, F. & Nishimura, M.T., 2018. Structural , Functional , and Genomic Diversity of Plant NLR proteins : An Evolved Resource for Rational Engineering of Plant Immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 56, pp.1–25.
- Mora, M.R.M., 2017. *Identificación de genes de susceptibilidad en yuca, blancos de TALEs de Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Universidad Nacional de Colombia.
- Moscou, M.J. & Bogdanove, A.J., 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326(5959), p.1501. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19933106>
<http://classic.sciencemag.org/content/326/5959/1501.full.pdf>.
- Mowang, D. et al., 2017. Assessment of Cyanide Content of Some Cassava (*Manihot esculantif*) Products Sold in Calabar , Cross River State , Nigeria. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*, 4(12), pp.1–5.
- Muñoz-Bodnar, 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(11), pp.1901–1912.

Muñoz Bodnar, A. et al., 2015. COMPARING INOCULATION METHODS TO EVALUATE THE GROWTH OF *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* ON CASSAVA PLANTS. *Acta Biol. Colomb.*, 20(2), pp.47–55.

Mupakati, T. & Tanyanyiwa, V.I., 2017. Cassava production as a climate change adaptation strategy in Chilonga Ward, Chiredzi District, Zimbabwe. *Jàmbá: Journal of Disaster Risk Studies*, 9(1), pp.1–10.

Mutka, A.. et al., 2016. Quantitative, image-based phenotyping methods provide insight into spatial and temporal dimensions of plant disease. *Plant Physiology*.

Nanjareddy, K. et al., 2016. Protoplast isolation, transient transformation of leaf mesophyll protoplasts and improved *Agrobacterium*-mediated leaf disc infiltration of *Phaseolus vulgaris*: tools for rapid gene expression analysis. *BMC Biotechnology*, 16(1), p.53. Available at: <http://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-016-0283-8>.

Nemchinov, L.G. et al., 2017. Resistant and susceptible responses in alfalfa (*Medicago sativa*) to bacterial stem blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *PLoS ONE*, 12(12), pp.1–20.

Njeri-Chege, M., 2017. *Phenotypic and genotypic diversity of Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing bacterial blight disease of cassava in Kenya.

Njoroge, M.K. et al., 2017. Whitefly species efficiency in transmitting cassava mosaic and brown streak virus diseases. *Cogent Biology*, 3, pp.1–8. Available at: <http://doi.org/10.1080/23312025.2017.1311499>.

Nobori, T. et al., 2018. Transcriptome landscape of a bacterial pathogen under plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p.201800529. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1800529115>.

Nomura, K. et al., 2006. A Bacterial Virulence Protein Suppresses Host Innate Immunity to Cause Plant Disease. *Science*, 313(5784), pp.220–223. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1129523>.

Núñez-Pérez, C. del C. et al., 2018. *Conocimientos tradicionales vinculados a la yuca Manihot esculenta en el pueblo ticuna*,

OECD, 2014. *Consensus Document on the Biology of Cassava*,

Okogbenin, E. et al., 2013. Phenotypic approaches to drought in cassava: review. *Frontiers in physiology*, 4(93), pp.1–15.

Olsen, K.M., 2004. SNPs , SSRs and inferences on cassava ' s origin. *Plant Molecular Biology*, 56, pp.517–526.

Ospina, B. & Ceballos, H., 2012. *La Yuca en el Tercer Milenio.pdf*,

Ouellette, A.J., 1997. Paneth Cells and Innate Immunity in the Crypt Microenvironment. *Gastroenterology*, 113, pp.1779–1784.

Peng, Y., Wersch, R. Van & Zhang, Y., 2017. Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and Effector-triggered immunity. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 4, pp.1–26.

Pérez-Quintero, A.L. et al., 2013. An Improved Method for TAL Effectors DNA-Binding Sites Prediction Reveals Functional Convergence in TAL Repertoires of *Xanthomonas oryzae* Strains. *PLoS ONE*, 8(7).

Pérez-Quintero, A.L. et al., 2018. daTALbase: a database for genomic and transcriptomic data related to TAL effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(4), pp.471–480. Available at: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-06-17-0153-FI>.

Pfaffl, M., 2004. Quantification strategies in real-time PCR. In *A-Z of quantitative PCR*. pp. 87–112.

Pruitt, R.N. et al., 2015. The rice immune receptor XA21 recognizes a tyrosine-sulfated protein from a Gram-negative bacterium. *Crop Science*, 99(July), pp.1–13.

Qin, J. et al., 2018. The *Xanthomonas* effector XopK harbours E3 ubiquitin-ligase activity that is required for virulence. *New Phytologist*, 220(1), pp.219–231.

Rache, L. et al., 2016. A strategy to study population variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* using a new set of multiple-locus variable number tandem repeats. In *Phytopathology*. p. S4.137.

Ranganathan, S., 2018. Innate Immunity Engaged or Disengaged in Plant-Microbe Interactions. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. pp. 107–144.

Rathore, J.S. & Ghosh, C., 2018. Pathogen-Associated Molecular Patterns and Their Perception in Plants. In A. Singh & I. K. Singh, eds. *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. Singapore: Springer Singapore, pp. 79–113. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_4.

Restrepo, S. et al., 1999. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Microbo*, 145(1 999), pp.107–114.

Restrepo, S., Duque, M.C. & Verdier, V., 2000. Characterization of pathotypes among isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Plant Pathology*, 49(6), pp.680–687.

Restrepo, S., Velez, C.M. & Duque, M.C., 2004. Genetic Structure and Population Dynamics of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia from 1995 to 1999. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), pp.255–261.

- Restrepo, S. & Verdier, V., 1997. Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), pp.4427–4434.
- Richter, A. et al., 2014. A TAL effector repeat architecture for frameshift binding. *Nature Communications*, 5, p.3447. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms4447>.
- Rinaldi, F.C. et al., 2017. The effect of increasing numbers of repeats on TAL effector DNA binding specificity. *Nucleic Acids Research*, 45(11), pp.6960–6970.
- Rodríguez-Puerto, C.M., Díaz-Tatis, P.A. & López, C.E., 2017. Validación del gen candidato de resistencia a la bacteriosis vascular, *RXam2* de yuca, utilizando expresión inducida por efectores artificiales tipo TAL.
- Rogers, D.J. & Appan, S.G., 1973. Manihot Manihotoides (Euphorbiaceae). *Flora Neotropica*, 13, pp.1–272.
- Römer, P. et al., 2007. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5850), pp.645–648.
- Römer, P., Recht, S. & Lahaye, T., 2009. A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), pp.20526–20531.
- Ron, M. & Avni, A., 2013. The Receptor for the Fungal Elicitor Ethylene-Inducing Xylanase Is a Member of a Resistance- Like Gene Family in Tomato Author (s): Mily Ron and Adi Avni Published by: American Society of Plant Biologists (ASPB) Stable URL : <http://www.jstor.org/stab.> , 16(6), pp.1604–1615.
- Rosenthal, D.M. & Ort, D.R., 2011. Examining Cassava's Potential to Enhance Food Security Under Climate Change. *Tropical Plant Biology*.
- Ryan, R.P. et al., 2011. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 9(5), pp.344–355. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2558>.
- Sagrilo, E. et al., 2003. Effect of Harvest Period on the Quality of storage roots and protein content of the leaves in five cassava cultivars (*Manihot esculenta* , Crantz). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(2), pp.295–305.
- Santaella, M. et al., 2004. Identification of genes in cassava that are differentially expressed during infection with *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Molecular Plant Pathology*, 5(6), pp.549–558.
- Santanella, M. et al., 2004. Identification of genes in cassava that are differentially expressed during infection with *Xanthomonas axonopodis* pv . *manihotis*. *Molecular Plant Pathology*, 5(6), pp.549–558.

Santos, M. et al., 2018. Review: Potential biotechnological assets related to plant immunity modulation applicable in engineering disease-resistant crops. *Plant Science*, 270, pp.72–84. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.013>.

Santos, V.S. et al., 2009. *Multiplicação Rápida, Método Simples e de Baixo Custo na Produção de Material Propagativo de Mandioca*,

Schandry, N. et al., 2018. A cautionary TALE: how plant breeding may have favoured expanded TALE repertoires in *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology*, 19(6), pp.1297–1301.

Schandry, N. et al., 2016. TALE-like Effectors are an Ancestral Feature of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex and Converge in DNA Targeting Specificity. *Frontiers in Plant Science*, 7(August), p.1225.

Schechter, L.M. et al., 2004. *Pseudomonas syringae* Type III Secretion System Targeting Signals and Novel Effectors Studied with a Cya Translocation Reporter. *Journal of bacteriology*, 186(2), pp.543–555.

Scheibner, F. et al., 2018. The Type III Secretion Chaperone HpaB Controls the Translocation of Effector and Noneffector Proteins From *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *MPMI*, 31(1), pp.61–74.

Scheibner, F., Marillonnet, S. & Büttner, D., 2017. The TAL effector AvrBs3 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contains multiple export signals and can enter plant cells in the absence of the type III secretion translocon. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), pp.1–18.

Van Schie, C.C.N. & Takken, F.L.W., 2014. Susceptibility Genes 101 : How to Be a Good Host. *Annual Review of Phytopathology*, 52, pp.551–581.

Schorneck, S. et al., 2008. Characterization of AvrHah1, a novel AvrBs3-like effector from *Xanthomonas gardneri* with virulence and avirulence activity. *New Phytologist*, 179(2), pp.546–556.

Schorneck, S. et al., 2013. Engineering Plant Disease Resistance Based on TAL Effectors. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), pp.383–406. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-phyto-082712-102255>
<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-phyto-082712-102255>.

Schreiber, K.J. et al., 2016. Multiple Domain Associations within the Arabidopsis Immune Receptor RPP1 Regulate the Activation of Programmed Cell Death. *PLoS pathogens*, 12(7), pp.1–26.

Schreiber, T. et al., 2015. Refined Requirements for Protein Regions Important for Activity of the TALE AvrBs3. *PLoS ONE*, 10(3), pp.1–21.

Schreiber, T. & Bonas, U., 2014. Repeat 1 of TAL effectors affects target specificity for the base at position zero. *Nucleic Acids Research*, 42(11), pp.7160–7169.

Schreiber, T. & Tissier, A., 2017. Generation of dTALEs and Libraries of Synthetic TALE-Activated Promoters for Engineering of Gene Regulatory Networks in Plants. In *Plant Gene Regulatory Networks: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. pp. 185–201. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7125-1>.

Schultink, A. et al., 2017. Roq1 mediates recognition of the Xanthomonas and Pseudomonas effector proteins XopQ and HopQ1. *Plant Journal*, 92(5), pp.787–795.

Schulze, S. et al., 2012. Analysis of new type III effectors from Xanthomonas uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytologist*, 195(4), pp.894–911.

Schwartz, A.R. et al., 2017. TALE-induced bHLH transcription factors that activate a pectate lyase contribute to water soaking in bacterial spot of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(5), pp.E897–E903. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1620407114>.

Shybut, M.E., 2015. *Transcription Activator-Like (TAL) Effectors of the Cassava Bacterial Blight Pathogen Xanthomonas axonopodis pv. manihotis*.

Singer, A.U. et al., 2013. A Pathogen Type III Effector with a Novel E3 Ubiquitin Ligase Architecture. *PLoS Pathogens*, 9(1).

Soto Sedano, J.C. et al., 2017. Major Novel QTL for Resistance to Cassava Bacterial Blight Identified through a Multi-Environmental Analysis. , 8(July), pp.1–13.

Spoel, S.H. & Dong, X., 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature reviews. Immunology*, 12(2), pp.89–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22273771>.

Strauss, T. et al., 2012. RNA-seq pinpoints a Xanthomonas TAL-effector activated resistance gene in a large-crop genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47), pp.19480–5. Available at: <http://0-www.pnas.org.innopac.up.ac.za/content/109/47/19480.full>.

Streubel, J. et al., 2017. Dissection of TALE-dependent gene activation reveals that they induce transcription cooperatively and in both orientations. *PLoS ONE*, 12(3), pp.1–24.

Streubel, J. et al., 2012. TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nat Biotech*, 30(7), pp.593–595. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2304>.

Streubel, J. et al., 2012. TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nature Biotechnology*, 30(7), pp.593–595. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt.2304>.

- Su, J. et al., 2018. Constant vigilance : plant functions guarded by resistance proteins. *the Plant Cell Online*, 93, pp.637–650.
- Sugio, A. et al., 2007. Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes OsTFIIAgamma1 and OsTFX1 during bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25), pp.10720–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1965579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sun, Y. et al., 2013. Structural Basis for flg22-Induced Activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 Immune Complex. *Science*, 342, pp.624–628.
- Szurek, B. et al., 2001. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3 : protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *The Plant Journal*, 26(5), pp.523–534.
- Szurek, B. et al., 2002. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Molecular Microbiology*, 46(1), pp.13–23.
- Tao, Y. et al., 2003. Quantitative Nature of Arabidopsis Responses during Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae*. *the Plant Cell Online*, 15(2), pp.317–330. Available at: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.007591>.
- Tappiban, P. et al., 2018. Identification and expression of genes in response to cassava bacterial blight infection. *Journal of Applied Genetics*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13353-018-0457-2>.
- Tefera, T. & Vidal, S., 2009. Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl*, 54, pp.663–669.
- Thieme, F. et al., 2007. New Type III Effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Trigger Plant Reactions Dependent on a Conserved N-Myristoylation Motif. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(10), pp.1250–1261. Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-20-10-1250>.
- Thomas, W.J. et al., 2009. Recombineering and stable integration of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 hrp/hrc cluster into the genome of the soil bacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Plant Journal*, 60(5), pp.919–928.
- Tian, D. et al., 2014. The rice TAL effector-dependent resistance protein XA10 triggers cell death and calcium depletion in the endoplasmic reticulum. *The Plant cell*, 26(1), pp.497–515. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24488961>.

- Toruño, T., Stergiopoulos, I. & Coaker, G., 2016. Plant-Pathogen Effectors: Cellular Probes Interfering with Plant Defenses in Spatial and Temporal Manners. *Annu Rev Phytopathol*, 54, pp.419–441.
- Trapnell, C. et al., 2013. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols*, 7(3), pp.562–578.
- Triplett, L.R. et al., 2016. A resistance locus in the American heirloom rice variety Carolina Gold Select is triggered by TAL effectors with diverse predicted targets and is effective against African strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 87(5), pp.472–483.
- Trujillo, C.A. et al., 2014. A Complex Population Structure of the Cassava Pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Recent Years in the Caribbean Region of Colombia. *Microbial Ecology*, 68(1), pp.155–167.
- Tsuda, K. et al., 2012. An efficient *Agrobacterium* -mediated transient transformation of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 69, pp.713–719.
- Tsuda, K. & Katagiri, F., 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4), pp.459–465. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.006>.
- Underwood, W., 2012. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science*, 3(85), pp.1–6.
- Upton, J.L. et al., 2018. ScienceDirect The coming of age of EvoMPMI: evolutionary molecular plant – microbe interactions across multiple timescales. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, pp.108–116.
- Üstün, S. et al., 2016. The Proteasome Acts as a Hub for Plant Immunity and Is Targeted by *Pseudomonas* Type III Effectors. *Plant physiology*, 172, pp.1941–1958.
- Verdier, V., 2002. Bacteriosis Vasculare o Añublo Bacteriano) de la Yuca Causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *La Yuca del tercer milenio*, pp.148–159.
- Verdier, V., 1988. *Evaluation de la Variabilité de Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, Agent Causal de la Bactériose Vasculaire du Manioc (*Manihotesculenta*, Cran&). Université de Paris Sud-Orsay.
- Verdier, V. et al., 1998. Genetic and pathogenic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Venezuela. *Plant Pathology*, 47(5), pp.601–608.
- Verdier, V. et al., 2004. Recent progress in the characterization of molecular determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*-cassava interaction. *Plant Molecular Biology*, 56(4), pp.573–584.

- Verdier, V., Dongo, P. & Boher, B., 1993. Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris*. *Journal of General Microbiology*, 139(1993), pp.2591–2601.
- Vidal, M. et al., 2015. Genetic fidelity and variability of micropropagated cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) evaluated using ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 14(3), pp.7759–7770.
- Wan, J. et al., 2012. LYK4 , a Lysin Motif Receptor-Like Kinase , Is Important for Chitin Signaling and Plant. *Plant Pathology Journal*, 160, pp.396–406.
- Wang, C. et al., 2015. XA23 Is an executor r protein and confers broad-spectrum disease resistance in rice. *Molecular Plant*, 8(2), pp.290–302. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2014.10.010>.
- Wang, G. et al., 2015. The Decoy Substrate of a Pathogen Effector and a Pseudokinase Specify Pathogen-Induced Modified-Self Recognition and Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe*, 18, pp.285–295.
- Wang, L. et al., 2017. TAL Effectors Drive Transcription Bidirectionally in Plants. *Molecular Plant*, 10(2), pp.285–296.
- Wang, M. et al., 2017. Botrytis small RNA Bc -siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA Biology*, 14(4), pp.421–428.
- Wang, S. et al., 2015. Rice OsFLS2-Mediated Perception of Bacterial Flagellins Is Evaded by *Xanthomonas oryzae* pvs . *oryzae* and *oryzicola*. *Molecular Plant*, 8(7), pp.1024–1037. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.012>.
- Wang, Y. et al., 2010. A *Pseudomonas syringae* ADP-Ribosyltransferase Inhibits Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases. *The Plant cell*, 22(June), pp.2033–2044.
- White, F.F. et al., 2009. The type III effectors of *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology*, 10(6), pp.749–766.
- Williams, B., Verchot, J. & Dickman, M.B., 2014. When supply does not meet demand-ER stress and plant programmed cell death. *Frontiers in plant science*, 5(June), p.211. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4045240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Willmann, R. et al., 2011. Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection Roland. *PNAS*, 108(49), pp.1–6.
- De Wit, P.J.G.M., 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(21), pp.2726–2732.

- Withers, J. & Dong, X., 2017. Post-translational regulation of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, pp.124–132. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.004>.
- Wu, C.-H. et al., 2015. The “sensor domains” of plant NLR proteins: more than decoys? . *Frontiers in Plant Science*, 6, p.134. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00134>.
- Wu, J. et al., 2017. Highly efficient mesophyll protoplast isolation and PEG-mediated transient gene expression for rapid and large-scale gene characterization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *BMC Biotechnology*, 17(29), pp.1–8.
- Wu, L. et al., 2008. XA27 depends on an amino-terminal signal-anchor-like sequence to localize to the apoplast for resistance to *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant physiology*, 148(November), pp.1497–1509.
- Wydra, K. et al., 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(50), pp.1084–1093.
- Wydra, K. & Verdier, V., 2002a. Occurrence of cassava diseases in relation to environmental, agronomic and plant characteristics. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 93(1–3), pp.211–226. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880901003498> [Accessed May 25, 2016].
- Wydra, K. & Verdier, V., 2002b. Occurrence of cassava diseases in relation to environmental, agronomic and plant characteristics. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 93(1–3), pp.211–226.
- Xiang, T. et al., 2008. *Pseudomonas syringae* Effector AvrPto Blocks Innate Immunity by Targeting Receptor Kinases. *Current Biology*, 18(1), pp.74–80.
- Xiao, F. et al., 2007. The N-terminal region of *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB elicits Pto-dependent immunity and has two distinct virulence determinants. *Plant Journal*, 52(4), pp.595–614.
- Xin, X.-F. & He, S.Y., 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), pp.473–498. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102321>.
- Xiong, L. & Yang, Y., 2003. Disease Resistance and Abiotic Stress Tolerance in Rice Are Inversely Modulated by an Abscisic Acid – Inducible Mitogen-Activated Protein Kinase. *The Plant Cell*, 15(March), pp.745–759.

- Xu, R. et al., 2008. AvrAC Xcc8004 , a Type III Effector with a Leucine-Rich Repeat Domain from *Xanthomonas campestris* Pathovar *campestris* Confers Avirulence in Vascular Tissues of *Arabidopsis thaliana* Ecotype Col-0 □ †. *Journal of bacteriology*, 190(1), pp.343–355.
- Yadav, S. & Chhibbar, A.K., 2018. Plant--Virus Interactions. In A. Singh & I. K. Singh, eds. *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. Singapore: Springer Singapore, pp. 43–77. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_3.
- Yang, B. & Bogdanove, A., 2013. Inoculation and Virulence Assay for Bacterial Blight and Bacterial Leaf Streak of Rice. In *Rice Protocols*. pp. 249–255.
- Yang, B., Sugio, A. & White, F.F., 2006. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), pp.10503–8. Available at: <http://www.pnas.org/content/103/27/10503.abstract>.
- Yang, J. et al., 2014. Complete decoding of TAL effectors for DNA recognition. *Cell research*, 24(5), pp.628–31. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2014.19>.
- Yin, J. et al., 2017. Conserved RXLR Effector Genes of *Phytophthora infestans* Expressed at the Early Stage of Potato Infection Are Suppressive to Host Defense. *Frontiers in plant science*, 8(December), pp.1–11.
- Yu, X. et al., 2017. From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annual Review of Phytopathology*, 55, pp.109–137.
- Yuan, M. et al., 2016. A host basal transcription factor is a key component for infection of rice by TALE- carrying bacteria. *eLife*, 5, pp.1–17.
- Yuan, M. & Wang, S., 2013. Rice MtN3/saliva/SWEET family genes and their homologs in cellular organisms. *Molecular Plant*, 6(3), pp.665–674. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/mp/sst035>.
- Zarate, C., 2015. *Diversity of TALE content in Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strains is a valuable tool to improve target gene searching methodologies. Universidad de los Andes.
- Zhang, J., Zhongchao, Y. & White, F., 2015. TAL effectors and the executor R genes. *Frontiers in plant science*, 6(641), pp.1–9.
- Zhang, W. et al., 2013. BIR1-1 / EVERSHERD Mediate Innate Immunity to Necrotrophic Fungi © American Society of Plant Biologists *Arabidopsis* RECEPTOR-LIKE PROTEIN30 and Receptor-Like Kinase SUPPRESSOR OF BIR1-1 / EVERSHERD Mediate Innate Immunity to Necrotrophic Fungi. *The Plant cell*, 25(October), pp.4227–4241.

Zhang, Z. et al., 2012. Article Disruption of PAMP-Induced MAP Kinase Cascade by a *Pseudomonas syringae* Effector Activates Plant Immunity Mediated by the NB-LRR Protein SUMM2. *Cell Host and Microbe*, 11(3), pp.253–263. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.01.015>.

Zhou, J. et al., 2014. *Pseudomonas syringae* Effector HopF2 Suppresses Arabidopsis Immunity by Targeting BAK1. *Plant Journal*, 77(2), pp.235–245.

Zipfel, C., 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*, 35(7), pp.345–351. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>.

Zipfel, C. & Oldroyd, G.E.D., 2017. Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*, 543, p.328. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature22009>.

7. Publicaciones y presentaciones

Publicaciones

Ramírez, E; Szurek, B; López-Carrascal, C.E. Factores que afectan la expresión transitoria del gen GUS en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Revista Colombiana de Biotecnología, [S.l.], v. 20, n. 2, p. 57-67, jul. 2018. doi:<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77063>.

Participación en eventos

- III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2.
Noviembre 01-03, 2018
Bogotá, Colombia. Poster
- 6th Xanthomonas Genomics Conference & 2nd Annual EuroXanth Conference
Juli0 18-21, 2018
Halle, Alemania. Poster
- XXXIII Congreso Colombiano de Fitopatología y ciencias afines
Septiembre 20-22, 2017
Cali, Colombia. Presentación oral
- Workshop- Red de Investigación en Bacteriosis de Yuca (RIBY)
Diciembre 7-8, 2015
Bogotá, Colombia. Comité organizador
- 5th Xanthomonas Genomics Conference
Julio 8-11, 2015
Bogotá, Colombia. Asistente

