

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES EN YUCA
INDUCIDOS POR LA PROTEÍNA DE PATOGENICIDAD HPAF DE
XANTHOMONAS AXONOPODIS PV MANIHOTIS**

**PAULA ALEJANDRA DÍAZ TATIS
CÓDIGO 186306**

**Trabajo de grado presentado para optar al título de
Magíster en Ciencias Microbiología**

Dirigido por:

**CAMILO ERNESTO LÓPEZ CARRASCAL
LILIANA LÓPEZ KLEINE**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
Bogotá, 2011**

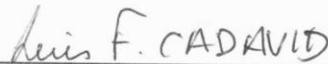
NOTA DE ACEPTACIÓN

La presente tesis fue sustentada y aprobada para el grado de Maestría en Microbiología, el
(colocar la fecha en que sustento-aprobó) 3-Feb-2011.

En constancia firman:



Jurado: Nombre del Jurado
Departamento Biología
Universidad Nacional.



Jurado: Nombre del Jurado
Departamento BIOLOGIA
Universidad Nacional.



Director de Tesis
Universidad

*A mis padres,
a mis hermanos
y a mi esposo*

Agradecimientos

Primero quiero dar gracias a Dios por regalarme la vida.

Al profesor Camilo López por aceptarme sin conocerme a su admirable grupo de investigación, por su amistad, por su gran calidad humana y por confiar en mí para el desarrollo de éste y otros proyectos.

A la profesora Liliana López por orientarme en los análisis estadísticos.

A la profesora Adriana Bernal del Departamento de Ciencias Biológicas la Universidad de los Andes y a su grupo de investigación, por su colaboración, asesoría y gran apoyo desde la generación hasta la finalización del proyecto.

Al profesor Xavier Marquínez del Departamento de Biología de la Universidad Nacional, por su gran apoyo en los ensayos de histotecnica.

Al Dr. Joe Tohme, director del área de investigación en agrobiodiversidad en CIAT, por su amabilidad, disposición y colaboración para el desarrollo de este proyecto en el laboratorio de genética molecular.

A los profesores Alejandro Chaparro y Luis Fernando García del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, por permitirnos desarrollar este trabajo en el laboratorio de biología molecular.

A todos mis amigos del grupo Manihot Biotec: Alejandra, Juan Camilo, Elizabeth, Andrea's, Claudia, Simón, Vivian, Álvaro, Ángela, Verónica, Mariana, Nini, Juan Felipe, Andrés, Oscar y a los que ya se fueron Juliana, Laura, Ana María y Catalina.

A los asistentes de investigación de laboratorio de genética molecular y transformación genética de yuca del CIAT, especialmente a Diana Bernal, Adriana Bohórquez y Maryam Chaib por su apoyo en la parte de microarreglos.

Finalmente, al Ministerio de Agricultura por la financiación de este proyecto. A la Fundación Juan Pablo Gutiérrez Cáceres y a la Universidad Nacional de Colombia por la beca otorgada de la Maestría en Ciencias Microbiología.

RESUMEN

Bacterias fitopatógenas de los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Pantoea* y *Xanthomonas* causan una gran cantidad de enfermedades en diversos cultivos. La base molecular que explica parcialmente la patogenicidad de estas bacterias yace en el envío de proteínas efectoras hacia el interior de las células hospederas a través del sistema de secreción tipo tres (SSTT). *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* (*Xam*) es un bacilo gram negativo y es el agente causal de la bacteriosis vascular de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). En *Xam* sólo una proteína efectora, PthB, ha sido caracterizada como miembro de la familia de los efectores tipo TAL (del inglés *Transcription Activator-Like*). Estudios derivados de la secuenciación parcial del genoma de la cepa de *Xam* CIO151 ha permitido la identificación de HpaF como un factor de virulencia y posible efector de *Xam*. En este trabajo se evaluó la importancia de HpaF en la proliferación y movilidad de *Xam* hacia distintos tejidos de la hoja de plantas de yuca susceptibles de la variedad MCOL1522, mediante el empleo de curvas de crecimiento e histología. Adicionalmente mediante una estrategia de transcriptómica comparativa empleando microarreglos de ADNc de yuca y ARN obtenidos de plantas de yuca inoculadas con una cepa de *Xam* conteniendo HpaF y otra carente del gen que codifica para esta proteína, se estudió el cambio en la regulación de la expresión de genes de yuca por HpaF. Los datos obtenidos sugieren que ninguno de los 5700 genes presentes en el microarreglo fueron modificados. Los resultados obtenidos se discuten a la luz de posibles funciones de este efector de *Xam* en las células de plantas de yuca.

ABSTRACT

Plant pathogenic bacteria of the genera *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Pantoea* and *Xanthomonas* cause diverse diseases in various crops by means of injecting effector proteins directly into host cells through the type three secretion system (TTSS). *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* (*Xam*) is a gram negative bacillus and is the causal agent of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) bacterial blight. In *Xam* only one effector protein, pthB, has been characterized as a member of the transcription activator-like (TAL) effector family. Studies from the partial genome sequence of the *Xam* strain CIO151 has allowed the identification of HpaF as a virulence factor and potential effector of *Xam*. In this study we evaluated the importance of HpaF in the proliferation and mobility of *Xam* into different tissue of cassava MCOL1522 leaves, using growth curves and histology. Additionally, through a strategy of comparative transcriptomics using a cDNA microarray and RNA obtained from cassava plants inoculated with a strain of *Xam* containing HpaF and one lacking the gene encoding this protein, we studied the changes in the regulation of gene expression in cassava by HpaF. These data suggest that none of the 5700 genes present in the microarray were modified. Obtained results are discussed in light of possible functions of this *Xam* effector in cassava plant cells.

INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es considerada como una de las principales fuentes de alimento y energía para muchos países en el mundo. Según la FAO es la tercera fuente de calorías en el trópico después del arroz y el maíz. Actualmente ha cobrado importancia en el área de biocombustibles por la obtención de etanol a partir del almidón de la raíz. La

bacteriosis vascular de la yuca o CBB (del inglés *Cassava Bacterial Blight*) es una enfermedad causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* (*Xam*) que puede producir pérdidas en los cultivos de yuca que van desde el 12% al 100% después de tres ciclos de producción (Verdier, 2002).

Es importante destacar que la bacteriosis vascular no se ha podido controlar por métodos químicos y las medidas fitosanitarias de control no son muy eficientes. De ahí nace la necesidad de encontrar otros mecanismos que permitan el control de esta enfermedad. Uno de estos mecanismos ha sido la utilización de variedades resistentes de yuca. Aún así, estas variedades no se han adaptado a todas las condiciones climáticas donde la yuca es cultivada y además, no presentan las cualidades agronómicas deseadas para este cultivo, tales como buenas cualidades culinarias y rendimientos altos. En la mayoría de las ocasiones estas variedades resistentes han sido empleadas principalmente dentro de los programas de mejoramiento genético convencional de yuca, el cual debido a las características de la yuca (ciclo largo, poliploidía y alta heterocigocidad) es dispendioso y largo.

Otro criterio que puede conducir al desarrollo de estrategias alternativas para el control de esta enfermedad es el entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la patogenicidad de la bacteria. Recientemente se han realizado varios estudios encaminados al entendimiento de los mecanismos de acción de genes efectores del sistema de secreción tipo tres (SSTT) los cuales juegan un papel importante en la patogenicidad de bacterias gram-negativas. La generación de cepas mutantes para efectores tipo tres (Kim *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2008) y el desarrollo de plantas transgénicas que expresan efectores (Hauck *et al.*, 2003), acompañados de experimentos de expresión génica en la planta como RT-PCR (Kim *et al.*, 2009) y microarreglos (Hauck *et al.*, 2003), han permitido vislumbrar algunos de los mecanismos que usan las proteínas efectoras para suprimir la inmunidad en plantas.

Varios estudios han demostrado la importancia de los genes *hpa* (asociados a los genes *hrp* o *hypersensitive response and pathogenicity*) en la patogenicidad de varias especies del género *Xanthomonas* (Buttner *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2008a; Lorenz *et al.*, 2008b). Los recientes trabajos encaminados a la identificación de efectores en *Xam* a través de secuenciación parcial del genoma y búsqueda de efectores candidatos liderados por el grupo de Adriana Bernal en la Universidad de los Andes ha permitido la identificación de HpaF, el cual es un efector conservado en el género *Xanthomonas*. En algunas especies HpaF juega un rol fundamental en la virulencia (Kim *et al.*, 2003). Aunque en *Xam* se ha encontrado que es importante para la virulencia de la bacteria (Pinzón *et al.*, 2009; Trujillo, 2008), no se conoce aún su mecanismo de acción.

Lo anterior indica que posiblemente HpaF, uno de los pocos efectores caracterizados de *Xam*, es importante para la patogenicidad de la misma. El conocimiento más detallado de los mecanismos moleculares que utilizan las proteínas efectoras de *Xam* como HpaF, para causar enfermedad, permitirían en un futuro desarrollar nuevas estrategias de mejoramiento genético en yuca. Asimismo fomentarían el desarrollo de la agricultura en países tropicales donde la bacteriosis es una de las enfermedades que más pérdidas causa en los cultivos de yuca.

ESTADO DEL ARTE Y MARCO TEÓRICO

Inmunidad en plantas

La primera rama de la inmunidad vegetal se basa en la capacidad de reconocimiento de estructuras o moléculas altamente conservadas en todas las clases de microorganismos incluyendo los patogénicos y no patogénicos. A estas estructuras se les conoce con el nombre de PAMPs (del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) o MAMPs (del inglés *Microbe-Associated Molecular Patterns*). Actualmente se conoce una gran variedad de PAMPs de los cuales los más estudiados son la flagelina (flg22) (Felix *et al.*, 1999), el factor de elongación (EF-tu) (Kunze *et al.*, 2004), el lipopolisacárido (LPS) (Dow *et al.*, 2000) y la quitina (Kaku *et al.*, 2006). Este reconocimiento de los PAMPs ocurre gracias a la existencia de proteínas de reconocimiento denominadas PRRs (del inglés *Pathogen Recognition Receptors*) que generalmente se encuentran en la membrana plasmática de la célula vegetal. Un ejemplo de éstos es el receptor de flagelina FLS2 (del inglés *Flagellin Sensing 2*), el cual corresponde a una quinasa del tipo RLK (del inglés *Receptor Like Kinase*) y consiste de una región de repeticiones ricas en leucina (LRR) en el dominio extracelular unida a una serina/treonina quinasa en el dominio intracelular (Gomez-Gomez & Boller, 2000). La flagelina no es sólo reconocida como PAMP por receptores de plantas sino también por receptores de tipo TLR (del inglés *Toll-Like Receptors*) de mamíferos (Underhill & Ozinsky, 2002).

Después de la percepción del ligando por parte de los PRRs, se desencadena una cascada de señalización mediada principalmente por quinasas (de tipo MAPK o *Mitogen Associated Protein Kinase*) la cual es propia de una respuesta de defensa (Gohre & Robatzek, 2008). A esta respuesta de defensa desencadenada como consecuencia de la interacción PAMP/PRR se le conoce como PTI (del inglés *PAMP Triggered Immunity*) o inmunidad mediada por PAMPs la cual generalmente detiene la infección antes de que el microorganismo comience su multiplicación (Chisholm *et al.*, 2006; Dodds & Rathjen, 2010).

Sin embargo, diferentes fuerzas evolutivas han actuado para favorecer la multiplicación del patógeno. La defensa del patógeno ocurre mediante la supresión de la PTI gracias al envío de proteínas efectoras al interior de las células de la planta, a través de un sistema de secreción tipo III (SSTT) en el caso de bacterias fitopatógenas (ver más adelante). Estas proteínas efectoras cumplen dos funciones principales: la primera es ser reconocidas por proteínas de la planta (en el caso de una interacción incompatible o de resistencia) y la segunda, es causar la supresión del reconocimiento por PAMPs o de la señalización de la resistencia (en el caso de una interacción compatible o de susceptibilidad). Una vez los patógenos adquirieron la capacidad de suprimir las defensas primarias (PTI), las plantas desarrollaron un mecanismo más sofisticado para detectar a los patógenos, el cual está basado en el reconocimiento de las proteínas efectoras que inyecta el patógeno, esta inmunidad se conoce como ETI (del inglés *Effector Triggered Immunity*) (Chisholm *et al.*, 2006). Esta segunda rama de la inmunidad o ETI se basa en el reconocimiento directo (Dodds *et al.*, 2006) o indirecto (Van der Biezen & Jones, 1998) que hacen las proteínas de resistencia (R) de su correspondiente efector y de manera específica. Cuando esto sucede, se produce una reacción incompatible (resistencia) y para este caso la proteína efectora se denomina proteína de avirulencia o Avr. Por el contrario, para el

caso de una reacción compatible (en la cual la planta no presenta la proteína de resistencia que reconoce al efector), entonces la proteína efectora es denominada proteína de virulencia, ya que es capaz de inducir virulencia en el patógeno (Dodds & Rathjen, 2010).

La yuca y su importancia económica

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) se considera como la base de la alimentación para cerca de 1.000 millones de personas en 105 países (FAO, 2008). Es el cuarto cultivo mundial más importante en países subdesarrollados, con una producción estimada en 2006 de 226 millones de toneladas (FAO, 2008). Además, en estas zonas donde es cultivada constituye una de las fuentes primordiales de energía para actividad humana, junto con el arroz, el maíz y la caña de azúcar. En 1998, la FAO reporta que un aumento en la producción de yuca a nivel mundial podría ayudar a resolver el problema de desnutrición y hambre en las regiones más pobres del mundo donde podría ser cultivada. Adicionalmente, la FAO considera que la yuca podría ayudar a proteger la seguridad alimentaria y energética de los países pobres, los cuales se encuentran amenazados por los crecientes precios de los alimentos y el petróleo, ya que a partir del almidón se puede producir bioetanol (FAO, 2008).

La yuca es un cultivo perenne que se propaga a partir de estacas (tallos maduros) de 20 cm, a partir de las cuales se desarrolla un cultivo con un ciclo de vida de 8 a 24 meses para su posterior cosecha (Lozano *et al.*, 1981). Debido a su ciclo de vida largo, el cultivo se expone a distintas condiciones climáticas que favorecen el establecimiento de una variedad de patógenos de tipo bacteriano, viral, fúngico y entomológico (Lozano *et al.*, 1981).

Bacteriosis vascular

Una de las principales enfermedades que afectan los cultivos de yuca es la bacteriosis vascular, añublo bacteriano o CBB (del inglés *Cassava Bacterial Blight*). Ésta es una enfermedad vascular y foliar causada por la bacteria gram negativa *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* (*Xam*). *Xam* es un bacilo que posee un único flagelo polar, crece en medio con sucrosa produciendo bacterias sin pigmentación, a excepción de esta última, la mayoría de sus características fisiológicas y bioquímicas son típicas de las *xanthomonadas* (Verdier, 2002).

Las pérdidas causadas por la bacteriosis pueden alcanzar el 100% después de tres ciclos de producción, todo esto si las condiciones son favorables para el desarrollo de la enfermedad y si no se desarrollan prácticas de control (Verdier, 2002). La aparición y expansión de la enfermedad en un cultivo se debe principalmente al uso de estacas como medio de propagación y de herramientas infectadas con *Xam*, las cuales se usan ya contaminadas para los siguientes ciclos de producción. Como consecuencia, el patógeno puede difundirse fácilmente a estacas sanas tomadas de tallos asintomáticos (Verdier, 2002).

Xam es un patógeno sistémico y epífita, que se caracteriza por generar en la planta de yuca síntomas que van desde manchas angulares en las hojas hasta la muerte de la planta. Otros síntomas son el añublo o quemazón, marchitamiento, exudados y lesiones en el tallo. El proceso de infección inicia con la multiplicación epífita de *Xam* en la hoja, luego se produce su entrada a través de las aperturas estomáticas y heridas en la hoja. La fase preliminar ocurre en espacios intercelulares en el mesófilo de la hoja y posteriormente el patógeno se interna en los

vasos. Si los tallos lignificados se infectan la bacteria se mantiene en los tejidos vasculares, donde puede sobrevivir hasta por 30 meses (Verdier, 2002).

Respuestas de yuca a la bacteriosis

Las respuestas de defensa de la yuca a la infección por *Xam*, tanto en variedades resistentes como susceptibles se estudió mediante técnicas de histoquímica en tallos de plantas *in vitro* hace más de 10 años (Kpemoua *et al.*, 1996). En este estudio encontraron que se presentaban respuestas de defensa similares en tejidos vasculares de plantas resistentes y susceptibles, sin embargo la intensidad de estas repuestas fue mayor en las variedades resistentes. Además se observó que estas respuestas están correlacionadas con una reducción en la extensión de la enfermedad. Por otro lado se encontró que, mientras el número de células productoras de fenol no presentaba diferencia en plantas sanas (susceptibles y resistentes), hubo un incremento significativo en el número de estas células presentes en el floema y xilema de plantas resistentes infectadas. Esto se relaciona con estudios previos en los cuales se ha mostrado una posible actividad bactericida de compuestos fenólicos en plantas infectadas con *Xanthomonas* (Reimers & Leach, 1991). También se encontraron flavonoides que se detectaron histoquímicamente sólo dentro de vasos infectados (Kpemoua *et al.*, 1996). La lignina también se presentó diferencialmente acumulada en las paredes de células del floema y corticales, en plantas infectadas. Se cree que esto último contribuye a la prevención de fuentes secundarias de inóculo bacteriano. También se evidenció la acumulación de compuestos osmofílicos en las vacuolas y la formación rápida de tilosis que obstruyen los haces vasculares (Kpemoua *et al.*, 1996).

Por otro lado, un estudio de interacción compatible (enfermedad) en yuca utilizando microscopía electrónica de transmisión ha mostrado que *Xanthomonas axonopodis* pv manihotis parece provocar la degradación de celulosa y pectina de la pared celular de la yuca (Boher *et al.*, 1995). Esto se relaciona con otro estudio en tomate, en el cual se muestra por localización citoquímica que la acumulación y deposición de celulosa es mayor en plantas inoculadas con cepas patogénicas, a diferencia de las plantas inoculadas con cepas no patogénicas mutantes *hrp* (del inglés *hypersensitive response and pathogenicity* –ver más adelante) las cuales presentan menor cantidad de celulosa en su pared celular (Keshavarzi *et al.*, 2004).

Durante los últimos años, y gracias a grandes avances en el campo de la biología molecular y genómica, se han logrado realizar estudios que han permitido un acercamiento a los mecanismos moleculares que gobiernan la interacción yuca – *Xam*. Dentro de éstos, se encuentran la identificación de QTLs (del inglés *Quantitative Trait Locus*) que permitió la identificación de regiones en el genoma de yuca asociadas con resistencia a *Xam* (Jorge *et al.*, 2000). Otros estudios han permitido identificar patrones de expresión de genes de yuca en respuesta a la infección con *Xam* (Lopez *et al.*, 2005). Esto se logró gracias a la generación de una colección de ESTs (del inglés *Expressed Sequences Tags*) y un catálogo unigen de 5700 genes expresados en yuca, los cuales fueron utilizados para estudiar el perfil de expresión de genes en yuca infectada con *Xam* por medio de un microarreglo de ADNc (ADN complementario) (Lopez *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2005). En estos estudios se encontró que *Xam* induce, en una variedad resistente de yuca, la expresión de genes relacionados con el refuerzo de la pared celular, formación de depósitos de lignina, explosión oxidativa,

degradación de proteínas y genes relacionados con patogenicidad. Adicionalmente, y con el objeto de validar los resultados encontrados, se evaluó la expresión de algunos genes inducidos por QRT-PCR (del inglés *Quantitative Real Time- Polymerase Chain Reaction*) empleando una variedad resistente (interacción incompatible) y una susceptible (interacción compatible). Los resultados muestran que los genes también son inducidos pero tardíamente y a menor nivel en la variedad susceptible (Lopez *et al.*, 2005), como se ha reportado en otros patosistemas (Tao *et al.*, 2003).

El agente patógeno

Paralelamente a los estudios desarrollados en yuca, se han realizado diversas investigaciones que tienen como objeto caracterizar la bacteria con el fin de estudiar los mecanismos de patogenicidad y a su vez analizar la diversidad genética de la especie. Varios estudios de diversidad genética y geográfica de *Xam* e identificación de patotipos (cepas que al ser evaluadas en distintas variedades de yuca presentan una patogenicidad común) se han desarrollado encaminados a obtener mejores estrategias de control de la bacteriosis (Gonzalez *et al.*, 2002; Restrepo *et al.*, 2000a; Restrepo *et al.*, 2000b; Restrepo & Verdier, 1997; Verdier *et al.*, 1994; Wydra *et al.*, 2004). Estos estudios han permitido establecer una correlación entre los distintos haplotipos de *Xam*, las distintas zonas edafoclimáticas en las cuales se presentan y las variedades de yuca asociadas a estas zonas. En general, se ha encontrado que existe mayor variabilidad genética de haplotipos de *Xam* en América que en África, y dentro de América las cepas de Brasil son más diversas que en Colombia y Venezuela, lo que se relaciona con el origen amazónico de la yuca (Olsen & Schaal, 1999). Por otro lado, la identificación de patotipos de *Xam* ha permitido establecer la resistencia /susceptibilidad a bacteriosis en un gran número de cultivares de yuca ante distintas cepas de *Xam* (Restrepo *et al.*, 2000a; Wydra *et al.*, 2004). Estos estudios son de gran importancia ya que no sólo favorecen la identificación de genes de yuca asociados con la resistencia a la bacteriosis, sino que también permitirán reconocer en un futuro factores de virulencia en los patotipos de *Xam*.

Mediante estudios de diversidad y comparaciones entre una cepa de *Xam* patogénica (CFBP1851) con una no patogénica (ORST4) se identificó la pérdida de un fragmento de 8Kb localizado en el ADN plasmídico en la cepa no patogénica (Verdier *et al.*, 1994; Verdier *et al.*, 1996). Al inocular estas dos cepas sobre plantas de yuca susceptibles se evidenció que esta región se encontraba asociada con la patogenicidad. La secuenciación de este fragmento de ADN permitió la caracterización de un nuevo miembro de la familia de genes *AvrBs3/pthA* (ver más adelante), el cual fue nombrado *pthB*, y confiere patogenicidad sobre la planta hospedera (Verdier *et al.*, 1996). Por medio de la secuenciación del gen *pthB*, se logró identificar que la proteína codificada por este gen consta de una región de 34 aminoácidos que se repiten 13.5 veces, dos NLS (señales de localización nuclear) y un AAD (dominio ácido de activación) (Castiblanco, 2009; López *et al.*, 2007).

Aunque la distribución de poblaciones y diversidad genética de cepas de *Xam* han sido estudiadas, es realmente poco lo que se conoce acerca de los mecanismos moleculares que explican la patogenicidad en *Xam*. Es así como surge la necesidad de generar conocimiento en el área que permita desarrollar mejores estrategias para el manejo de esta enfermedad, lo cual se logra mediante una mejor comprensión de mecanismos y genes implicados en la patogenicidad de *Xam*.

Patogenómica de *Xam*

Gracias al desarrollo de tecnologías de alto rendimiento en biología molecular, durante los últimos años ha sido más asequible (en términos de tiempo y costos) la secuenciación de genomas completos para grupos de investigación en todo el mundo. Es por esto que actualmente se registran un total de 6621 especies cuyos genomas han sido secuenciados (NCBI, 2010). Dentro de estas especies, 1533 corresponden a especies pertenecientes al dominio Bacteria, de las cuales más del 60% corresponden patógenos de animales y plantas (NCBI, 2010). El primer genoma secuenciado de un fitopatógeno fue *Xylella fastidiosa*, bacteria que causa la clorosis variegada en árboles de naranja (Simpson A. J. G. *et al.*, 2000). A partir de este momento son cientos los fitopatógenos cuyos genomas han sido secuenciados y *Xam* no es la excepción.

La secuenciación del genoma de *Xam*, en particular la cepa CIO151, se está realizando como parte de un proyecto colaborativo liderado por Adriana Bernal en la Universidad de los Andes y con la participación de los grupos de investigación liderados por Camilo López en la Universidad Nacional y Ralf Koebnik en el IRD (Institut de recherche pour le développement). La secuencia del genoma de la cepa CIO151 se ha obtenido empleando las tecnologías de secuenciación de nueva generación como Illumina (Solexa), 454 (Pirosecuenciación) y secuenciación de extremos de clones fósmidos empleando la secuenciación de Sanger. Actualmente se cuenta con datos derivados de la secuenciación del genoma de *Xam* cepa CIO151, los cuales han permitido identificar posibles candidatos a efectores tipo III gracias a aproximaciones bioinformáticas derivadas de la secuenciación completa del genoma de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (Thieme *et al.*, 2005), ahora llamada *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria*. Aunque se cree que *Xam* presenta aproximadamente 30 efectores tipo III, sólo algunos pocos se han podido amplificar por PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) y caracterizar como posibles proteínas de patogenicidad, entre los cuales se encuentra HpaF (Pinzón *et al.*, 2009; Trujillo, 2008). Una aproximación para identificar proteínas asociadas con la virulencia de *Xam*, es a través del estudio de la pérdida de virulencia mediante la generación de mutantes por recombinación homóloga de una serie de posibles proteínas efectoras de *Xam* (Trujillo, 2008). La posterior complementación de estas proteínas en un vector, permitió identificar a HpaF como factor de virulencia de *Xam* (Pinzón *et al.*, 2009).

Islas de patogenicidad y genes *hrp*

Las bacterias fitopatógenas de los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Pantoea* y *Xanthomonas* causan una gran variedad de enfermedades, en algunos casos devastadoras, en una gran diversidad de plantas, algunas de las cuales son cultivos de gran importancia. Sin embargo, todas estas comparten tres características: colonizan los espacios intercelulares de las plantas, son capaces de matar las células vegetales y poseen genes *hrp* (del inglés *hypersensitive response and pathogenicity*). El origen del nombre *hrp* se debe a observaciones iniciales las cuales mostraban que mutaciones en algunos de estos genes provocaban que estas bacterias al ser inoculadas sobre plantas hospederas, normalmente susceptibles, no se desarrollara enfermedad y sobre plantas normalmente resistentes que se defendían mediante una HR (del inglés *hypersensitive response*), ésta se perdiese (Alfano & Collmer, 1997). Hoy se sabe que estos genes codifican para el sistema de secreción tipo III, el cual es un complejo

proteico que actúa a manera de jeringa y que permite la inyección de las proteínas efectoras (Alfano & Collmer, 1997). A excepción de las bacterias de género *Agrobacterium*, los genes *hrp* están presentes y son muy similares en todas las bacterias fitopatógenas biótropas gram-negativas, y generalmente están organizados como grandes clusters en regiones cromosómicas que se expanden de 20 a 30 Kb y comprenden más de 20 genes (Buttner & Bonas, 2002). Dentro de estos *clusters* de genes *hrp* se encuentran algunos genes denominados *hrc* (del inglés *hrp conserved*) los cuales son altamente conservados en bacterias patógenas de animales y plantas. Adicionalmente existen los genes denominados *hpa* (del inglés *hrp associated*) los cuales contribuyen con la patogenicidad y la inducción de HR en plantas no hospedero. Las regiones *hrp-hrc* se denominan islas de patogenicidad (PAIs o *Pathogenicity Island*) en varias bacterias fitopatógenas, y la mayoría de proteínas que hacen parte de esta isla funcionan como parte del sistema de secreción tipo III (SSTT). Se sabe que estas islas contienen genes que están flanqueados por elementos genéticos móviles, secuencias relacionadas con ARNt, y además presentan una composición GC diferente a la del resto del genoma (Alfano *et al.*, 2000). Estas características han llevado a sugerir que este tipo de secuencias se han producido por fenómenos de transferencia horizontal de genes (Pallen & Wren, 2007; Van Sluys *et al.*, 2002).

Las bacterias del género *Xanthomonas* infectan y son responsables de varias enfermedades en una gran variedad de cultivos de importancia económica mundial, tales como arroz, cítricos, soya y yuca. En los últimos años se han realizado varios estudios que han permitido la caracterización de las islas de patogenicidad en varias especies de este género, gracias a la secuenciación completa de sus genomas (Buttner *et al.*, 2006; Buttner *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2003; Sugio *et al.*, 2005; Thieme *et al.*, 2005). Estudios en *Xanthomonas axonopodis* pv *glycines* mostraron que la isla de patogenicidad estaba compuesta por nueve genes *hrp*, nueve *hrc* y ocho genes *hpa* (Kim *et al.*, 2003). En general, estas PAIs son altamente conservadas a nivel de secuencia en las especies *X. axonopodis* pv *glycines* (*Xag*), *X. axonopodis* pv *citri* (*Xac*), *X. campestris* pv *campestris* (*Xcc*), *X. campestris* pv *vesicatoria* (*Xcv*) ahora llamada *X. axonopodis* pv *vesicatoria* (*Xav*) y *X. oryzae* pv *oryzae* (*Xoo*). De estos estudios se ha encontrado que existe una región central más conservada y comprende 20 genes que se extiende desde el ORF *hrcC* hasta el ORF *hpaB*. Esta región contiene secuencias altamente conservadas en las especies *Xag*, *Xac*, *Xcc*, *Xav* y *Xoo* con una identidad mayor al 80% a nivel de aminoácidos a excepción de *hpaA* el cual presenta una identidad relativamente baja (Kim *et al.*, 2003). Adicionalmente se encontraron, corriente abajo del núcleo Hrp, homólogos de los genes *hrpF* y *hpaF* de *Xag* en las otras especies de *Xanthomonas* ya mencionadas; sin embargo no se encontraron homólogos de *hpaF* en *Xcc*. En este mismo estudio, se crearon mutantes con el fin de evidenciar la función de estos genes, y encontraron que los genes *hrp* y *hrc* son esenciales para la patogenicidad total y para la inducción de HR en plantas resistentes de pimienta (Buttner *et al.*, 2007). Por su parte, los mutantes *hpaG*, *hpaC* y *hpaF* presentaron una disminución significativa de la virulencia pero fueron capaces de inducir una HR (Buttner *et al.*, 2007). Ensayos de crecimiento bacteriano de la cepa de *Xag* mutada en *hpaF* muestran que hay una disminución del título bacteriano en la planta en comparación con la cepa silvestre (Kim *et al.*, 2003), indicando un papel importante de esta proteína en su *fitness*.

HpaF es una proteína bacteriana con un motivo LRR (del inglés *leucine-rich repeat*) con homólogos en *Xag*, *Xac*, *Xav*, *Xoo* y *Ralstonia solanacearum* (Gueneron *et al.*, 2000; Kim *et al.*,

2003). El LRR es un motivo proteico típico comúnmente observado en proteínas eucariotas y parece estar involucrado en la formación de interacciones proteína-proteína, lo cual resulta de especial interés biológico (Kobe & Kajava, 2001). Aunque el LRR es un dominio típico eucariótico, estas proteínas parecen tener roles esenciales en la virulencia de patógenos bacterianos. Estudios de análisis de secuencias y modelamiento molecular del dominio GALA-LRR de *Ralstonia solanacearum* sugieren la transferencia horizontal de estas proteínas desde la planta hospedera (Kajava *et al.*, 2008). Como ya se ha mencionado, HpaF se ha encontrado en especies de *Xanthomonas* (Kim *et al.*, 2003) y también existen proteínas similares como PopC (homólogo de HpaF), LrpE y GALA en *R. solanacearum* (Angot *et al.*, 2006; Gueneron *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2006). Sin embargo, entre estas proteínas sólo se ha demostrado que GALA y PopC funcionan como efectores tipo III (Angot *et al.*, 2006; Gueneron *et al.*, 2000). Por su parte, en *Xcc* se ha encontrado un efector de tipo III con dominios LRR denominado XC1553 (Xu *et al.*, 2008). En humanos, de manera similar se ha encontrado que un patógeno como *Yersinia pestis* presenta la proteína YopM la cual contiene repeticiones LRR en tándem y es una proteína efectora que juega un papel importante en estados iniciales de la infección (Viboud & Bliska, 2005). Por su parte InlB, una proteína de *Listeria monocytogenes*, la cual también presenta este motivo, se ha encontrado que juega un papel importante en la entrada a las células de mamíferos (Braun *et al.*, 1999).

Efectores como supresores de defensa basal

Con el fin de lograr colonizar a los hospederos, las bacterias gram negativas han desarrollado un sistema que les permite introducir a la planta una serie de proteínas efectoras, las cuales por acción colectiva son capaces de promover el crecimiento del patógeno (Gohre & Robatzek, 2008). A este sistema se le conoce con el nombre de sistema de secreción tipo III (SSTT), y es un sistema universalmente utilizado por las bacterias no sólo para introducir proteínas a plantas, sino también a una variedad de células eucariotas (Chisholm *et al.*, 2006). En bacterias fitopatógenas, las proteínas que conforman la jeringa que se localiza en la membrana de la bacteria y que constituye el SSTT, son codificadas por el clúster de genes *hrp* (ver arriba) (Alfano & Collmer, 2004).

Una cepa de una bacteria fitopatógena es capaz de enviar entre 15-30 efectores al interior del hospedero utilizando el SSTT (Jones & Dangl, 2006). Una de las funciones que cumplen las proteínas efectoras es suprimir la inmunidad mediada por la interacción PAMP/PRR (Dodds & Rathjen, 2010). Esto lo logran por diversos mecanismos, siendo uno de estos la actividad proteasa que presentan estas moléculas, lo cual lleva a degradar o inactivar componentes de esta rama de la inmunidad (Block *et al.*, 2008). Por ejemplo, AvrPphB y AvrRpt2 de *Pseudomonas syringae* y dos familias de efectores (XopD y YopJ) son cisteína proteasas (Hotson *et al.*, 2003; Mukherjee, 2006). Otros efectores tipo III utilizan la maquinaria de ubiquitinación del hospedero y el proteosoma 26S con el fin de alterar la estabilidad de las proteínas (Block *et al.*, 2008). Ejemplos de este mecanismo lo constituyen los efectores GALA de *R. solanacearum* (Angot *et al.*, 2006) y AvrPtoB de *P. syringae* (Abramovitch *et al.*, 2006). Del mismo modo, HopM1 de *P. syringae* tiene como blanco el proteosoma 26S con el fin de aumentar la degradación de moléculas importantes en el tráfico vesicular (Nomura *et al.*, 2006). La fosforilación y defosforilación de proteínas del hospedero es otro mecanismo que usan los efectores tipo III para suprimir las cascadas de señalización desencadenadas en la PTI

(Block *et al.*, 2008). En esta vía las proteínas MAPKs juegan un papel muy importante ya que actúan secuencialmente fosforilando componentes que se encuentran corriente abajo de la vía de señalización, es por esto que también suelen ser blancos de efectores como por ejemplo de HopA11 y HopAO1 de *P. syringae* (Block *et al.*, 2008).

Como ya se ha mencionado, para que el patógeno logre colonizar un hospedero tiene que atravesar una serie de barreras estructurales que presentan las plantas, con el fin de defenderse constitutivamente ante el ataque de los patógenos (Gohre & Robatzek, 2008). Una de las principales barreras la constituye la pared celular, y se sabe que durante la infección las plantas generan modificaciones en la pared con el fin de reforzar esta barrera estructural (Chisholm *et al.*, 2006; Gohre & Robatzek, 2008). Una de estas modificaciones consiste en la deposición de calosa en aposiciones de la pared celular denominadas papilas (Gohre & Robatzek, 2008). Estudios de expresión diferencial mediante microarreglos en el patosistema *Arabidopsis - Pseudomonas*, han mostrado que ciertos efectores tienen como función prevenir en la planta la secreción de proteínas que se relacionan con el refuerzo de estas barreras estructurales, tales como la deposición de calosa para la formación de papilas (Hauck *et al.*, 2003). Igualmente, estudios de microscopía de epifluorescencia con azul de anilina han demostrado que el efector XopN de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* suprime la deposición de calosa tanto en tomate como en *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2009). En pimienta también se han realizado estudios de epifluorescencia con azul de anilina, histoquímicos e inmunocitoquímicos con partículas de oro en los cuales se demuestra que existe mayor presencia de calosa en las papilas de plantas inoculadas con la cepa mutante *hrp* de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* que en plantas inoculadas con la cepa silvestre (Keshavarzi *et al.*, 2004).

Se sabe que cepas del género *Xanthomonas* son capaces de secretar un conjunto de 15 ó más proteínas efectoras (Kay & Bonas, 2009), aún así no todos éstos contribuyen en igual magnitud a la virulencia de la bacteria. A diferencia de lo encontrado en *P. syringae*, en *Xanthomonas sp.* no se habían encontrado efectores que tengan como función suprimir la defensa basal de la planta (Kay & Bonas, 2009). Sin embargo, recientemente se descubrió que XopN, un efector de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*, es capaz de interactuar con receptores tipo quinasa de la planta y suprimir la defensa basal en tomate (Kim *et al.*, 2003).

Uno de los efectores más estudiados que regula la transcripción del hospedero es AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*, el cual anteriormente le otorgaba el nombre a una gran familia de efectores con características estructurales bien definidas que se encuentran predominantemente en el género *Xanthomonas* (AvrBs3/pthA) y que actualmente es denominado efectores TAL (del inglés *transcription activator-like*). Estudios de AvrBs3 mostraron que este efector se une directamente a la región promotora de un gen que codifica para un factor de transcripción (*upa20*) y que este a su vez permite la expresión de un gen regulador del tamaño celular (*upa20*) (Kay *et al.*, 2007). Esto implica que este efector se dirige específicamente hacia el núcleo de la planta y se une directamente al ADN, con el fin de modificar la expresión de genes de la planta. La expresión del gen *upa20* favorece el crecimiento del patógeno y puede ser considerado como un “gen de susceptibilidad”. Adicionalmente, análisis de cambios en la movilidad electroforética demostraron que AvrBs3, en el caso de una interacción incompatible, se une al promotor del gen de resistencia Bs3

(Romer *et al.*, 2007). Bs3 codifica una proteína homóloga a monooxigenasas dependientes de flavina y posiblemente actúa como un inductor de la muerte celular (Romer *et al.*, 2007).

Un mecanismo particular empleado por los efectores tipo III es la alteración de los niveles de proteínas por medio de la modificación de la transcripción del hospedero (Hauck *et al.*, 2003; Kay *et al.*, 2007; Saijo & Schulze-Lefert, 2008; Sugio *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006). Se piensa que estas regiones del ADN del hospedero a las cuales se unen los efectores tipo TAL podrían ser considerados como factores de susceptibilidad que al ser activados promueven la patogenicidad, facilitando la entrada, multiplicación, dispersión y finalmente la salida de las bacterias de los tejidos ya muertos de la planta para colonizar los tejidos vecinos (Saijo & Schulze-Lefert, 2008).

Con el fin de estudiar las interacciones moleculares planta – patógeno y particularmente la acción de efectores tipo III en la modificación transcripcional de la planta, una de las estrategias más notables ha sido la implementación de microarreglos y chips de ADN. Estudios de la interacción *Arabidopsis* – *Pseudomonas* empleando microarreglos han demostrado que la expresión de AvrPto en *Arabidopsis* reprime la expresión de cierto grupo de genes involucrados en la deposición de calosa para la formación de papilas (Hauck *et al.*, 2003). Por otro lado, estudios en el patosistema arroz – *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* han mostrado que cuando plantas de arroz de una variedad susceptible son inoculadas con una cepa virulenta, se observa un aumento de la expresión de un gen de susceptibilidad, en comparación con las plantas inoculadas con mutantes para un efector tipo III (*pthXo1*) (Yang *et al.*, 2006). En este mismo patosistema, el uso de microarreglos también ha permitido identificar que otros efectores del sistema de secreción tipo III, como *pthXo6* y *pthXo7*, regulan la inducción de genes de susceptibilidad durante la bacteriosis vascular de arroz (Sugio *et al.*, 2007).

En yuca, se han empleado etiquetas de secuencias expresadas o ESTs derivadas de librerías de ADNc para la construcción de microarreglos (Lopez *et al.*, 2005; Restrepo *et al.*, 2005). Estas etiquetas son de gran utilidad ya que permiten la identificación de genes que se expresan diferencialmente en determinados momentos de un organismo. El microarreglo de yuca se construyó con el objeto de estudiar el perfil de expresión de genes involucrados en la respuesta a la infección con *Xam* (Lopez *et al.*, 2005), sin embargo también se ha utilizado estudiar el deterioro post cosecha (Reilly *et al.*, 2007) y análisis del proceso de infección con mosca blanca (Adriana Bohórquez, comunicación personal, (BRU CIAT)).

En el contexto de una interacción compatible, este microarreglo nos permite estudiar la contribución de un efector específico de *Xam* a la susceptibilidad en yuca mediante cambios en el perfil de expresión de genes. Particularmente para HpaF que es uno de los pocos efectores para el cual se ha logrado determinar un papel importante en la patogenicidad de *Xam*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de la proteína HpaF de *Xam* en la susceptibilidad de hojas de yuca, mediante la identificación de síntomas de enfermedad y cambios en la expresión de genes.

Objetivos específicos

1. Identificar síntomas de enfermedad en hojas de yuca de la variedad susceptible MCOL1522 inoculadas con las cepas de *Xam* WT, *Xam* Δ hpaF y *Xam* Δ hpaF (*hpaF*).
2. Determinar el perfil de expresión de genes en hojas de yuca de la variedad susceptible MCOL1522 inoculadas con las cepas *Xam* Δ hpaF y *Xam* Δ hpaF (*hpaF*).
3. Analizar los resultados del perfil de expresión de genes por bioinformática.

METODOLOGÍA

1. Inoculación

Material Vegetal

Las estacas de MCOL1522 (variedad susceptible) provenientes del campo (Finca Los Bugambiles, La Vega Cudinamarca) se trajeron a Bogotá y se sembraron en bolsas de plástico en el invernadero (28°C, fotoperíodo de 12 horas) en una mezcla de arena a tierra 3:1. Para los experimentos se emplearon plantas de yuca de aproximadamente 45 días de sembradas.

Bacterias

Las cepas de *Xam* que se utilizaron para realizar las inoculaciones fueron: *i*) CFBP1851 (cepa silvestre), *ii*) *Xam* Δ hpaF (mutante para HpaF) y *iii*) *Xam* Δ hpaF (*hpaF*) (mutante complementado con HpaF). La cepa *Xam* Δ hpaF se generó mediante recombinación homóloga por medio de un vector suicida (Trujillo, 2008), y sobre esta cepa se hizo un ensayo de complementación de HpaF por medio de transformación genética con un pBAV226:hpaF (Pinzón *et al.*, 2009). Estas cepas fueron desarrolladas por el LAMFU (Laboratorio de Micología y patología de plantas) de la Universidad de los Andes. La variedad de yuca que se empleó para las inoculaciones fue MCOL1522, la cual es susceptible a la cepa de *Xam* CFBP1851.

Las bacterias se crecieron en medio LPGA (0,5% extracto de levadura, 0,5% peptona, 0,5% glucosa y 1,5% agar) durante 48 horas a 28°C a partir del stock a -80. Para el crecimiento en líquido se utilizó LPG (0,5% extracto de levadura, 0,5% peptona y 0,5% glucosa).

Inoculación

Para la evaluación del crecimiento bacteriano, los ensayos de histología y el registro fotográfico se realizó una punción con una aguja estéril en la nervadura principal del haz del foliolo central a una distancia de 1cm abajo del ápice, y se agregaron 10µl de una suspensión bacteriana a una densidad óptica de 0,2 a 600nm (Fig. 1A y 2). Este procedimiento se realizó de igual manera para las tres cepas de *Xam*.

La inoculación para los experimentos de expresión de genes se realizó en cuatro puntos, dos en el mesófilo y dos en el nervio principal, de todos los folíolos de la hoja de la variedad MCOL1522 con las tres cepas ya mencionadas empleando el mismo procedimiento de punción (Fig. 1B).



Figura 1. Inoculaciones en hojas de yuca. **A** A la izquierda se muestra una fotografía con la inoculación utilizada en la evaluación del crecimiento bacteriano, ensayos de histología y registro fotográfico de la enfermedad. **B** A la derecha se muestra la fotografía de la inoculación de las hojas que serán utilizadas en la extracción de ARN. En ambos casos, se colocaron gotas del 10ul a una DO de 0,2 a 600nm.

2. Crecimiento bacteriano

Con el objeto de determinar cambios en el desplazamiento y en la cantidad de bacteria a través del nervio central de la hoja, se tomaron cuatro sitios a estudiar: el primero a 1cm hacia abajo del punto de inoculación, el segundo desde 1cm hasta 2cm del punto de inoculación hacia el pecíolo, el tercero desde 2cm hasta 3cm del punto de inoculación hacia el pecíolo y finalmente el cuarto desde 3cm hasta 4cm punto del inoculación hacia el pecíolo (Fig. 2). Para cada uno de estos sitios, se maceró el tejido en 100µl de MgCl₂ (10mM) luego se completó a un volumen de 1000µl con MgCl₂ y se hicieron diluciones seriadas en MgCl₂ (100µl en 900µl) a partir del macerado. Se platearon tres gotas de cada dilución en medio LPGA con el fin de contabilizar unidades formadoras de colonia (UFC) en cada gota. Para la medición del crecimiento bacteriano se tomaron tres tiempos: 0 DPI(días post inoculación), 4 DPI y 8 DPI.

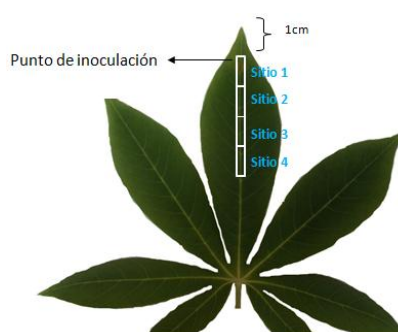


Figura 2. Esquema del experimento de curvas de crecimiento bacteriano en la hoja de yuca. La inoculación se realizó a 1cm del ápice del foliolo central y se tomaron cuatro sitios de 1cm de largo del nervio principal del foliolo.

3. Histología

Para la recolección del material se hizo un corte en forma de cuadrado con 0,5 cm de diámetro aproximadamente, tangencial al punto de inoculación (Fig. 3A). Una vez recolectada la muestra

se procedió a hacer la fijación y aclaramiento de la misma, se hizo el montaje en bloques de parafina, y se seccionaron en micrótomos de rotación (Anexos, protocolo A).

Dentro del tejido se evaluaron dos regiones, una cercana al sitio de inoculación (entre 1 y 2mm hacia arriba del punto de inoculación) y la otra alejada (entre 3 y 4mm hacia arriba del punto de inoculación) (Fig. 3B). Para cada región se hicieron 150 cortes de 5µm, se utilizaron 30 cortes por cada tinción, éstos se fijaron en tres láminas de 10 cortes cada una con el objeto de tener tres réplicas técnicas. Después de tener los cortes fijados a las láminas se procedió a hacer las tinciones diferenciales de azul de astra -fucsina, azul de toluidina, azul de resorcina, floroglucinol y sudán negro (Anexos, protocolos B – F).

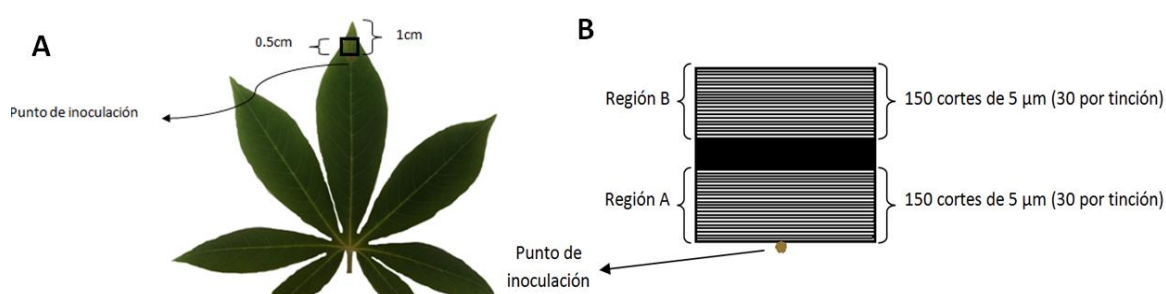


Figura 3. Esquema del experimento de la evaluación fenotípica microscópica de la enfermedad.

A. Para seleccionar el tejido empleado en los cortes de parafina se hizo un corte en forma de cuadrado tangencial al punto de inoculación. Se hizo una muesca en el cuadrado para mantener la orientación al momento de realizar los cortes con el micrótomos. **B.** Esquema del bloque de tejido con las dos regiones a evaluar, la región A que se encuentra inmediatamente después de la inoculación, y la región B que se encuentra en la segunda mitad del bloque, en la región intermedia coloreada de negro no se hicieron cortes.

4. Expresión diferencial por microarreglos

Extracción de ARN

Para la recolección de las hojas en el invernadero se tomó la hoja y se almacenó en nitrógeno líquido. Las extracciones de ARN se realizaron utilizando fenol:cloroformo (Anexos, protocolo G). Luego se procedió a hacer un tratamiento con DNasa y una limpieza (Anexos, protocolo H). Una vez se obtuvo el ARN total libre de ADN genómico, se visualizó con electroforesis en gel de agarosa y NanoDrop (Thermo Scientific).

Síntesis de ADNc y marcaje

La síntesis de ADNc se realizó empleando el método SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, CA). La ventaja de este método es que está diseñado especialmente para casos en los cuales se parte de una cantidad limitada de ARN total. Adicionalmente este método utiliza una amplificación del ADNc por LD PCR (del Inglés *Long Distance Polymerase Chain Reaction*) para aumentar la concentración del ADNc con el mínimo número de ciclos en la amplificación de tal forma que no se altere la relación en la cantidad de transcritos de cada gen. La síntesis de primera cadena se realizó empleando un primer oligodT modificado que sirve como cebador de la enzima MMLV Reverse Transcriptase (Clontech) (Anexos, protocolo I).

El ADNc amplificado se limpió empleando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) (Anexos, protocolo J). Posteriormente, se visualizó por electroforesis en gel de agarosa y se evaluó la calidad con NanoDrop (Thermo Scientific).

Para el marcaje de las sondas de ADNc se empleó un protocolo de marcaje directo en el cual se incorporaron Cy3 ó Cy5 (Cy3-dUTP ó Cy5-dUTP, GE Healthcare) mediante una reacción de síntesis utilizando primers aleatorios y la enzima Exonuclease-free Klenow (USB) (Anexos, protocolo K). Para todas las comparaciones se hicieron tres réplicas técnicas (tres síntesis de ADNc a partir del mismo ARN) con un dye-swap (inversión de Cys) para evaluar la varianza dada por las diferencias en la reacción de incorporación de los Cys. Una vez terminada la reacción de marcaje se hizo nuevamente una limpieza por columna del ADN empleando Qiagen (Anexos, protocolo J) y se evaluó la pureza y eficiencia del marcaje por NanoDrop (Thermo Scientific).

Construcción del microarreglo

Los microarreglos se construyeron a partir de colonias que contienen los insertos de ADNc de cada uno de los 5700 genes únicos. Estas bacterias se encuentran organizadas en 14 placas de 384 pozos y se encuentra disponible en CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Los insertos fueron amplificados por PCR a partir de los clones de bacteria. Los productos de PCR se secaron y se resuspendieron en buffer de impresión (NaCl 0.45 M, citrato de sodio 0.045 M y betaína 1.5 M) y finalmente se transfirieron a placas de 384 pozos para ser impresos sobre láminas de vidrio cubiertas con poly-L-lisina (Thermo Scientific) usando un pin de 6X4 del SPBIO Microarray Spotting Station que se encuentra en CIAT. El ADN de los microarreglos se denaturó al ubicar la lámina de vidrio sobre una plancha caliente a 95°C por 10 segundos, se fijó con ultravioleta a 410mj y se incubó 2 horas a 70°C, luego se guardó en un lugar seco hasta la prehibridización.

Hibridación

La prehibridización de los microarreglos se realizó siguiendo el protocolo establecido en CIAT (Anexos, protocolo L), durante dos horas. Posteriormente se realizó la hibridación del microarreglo mezclando los dos ADNc (uno marcado con Cy3 y otro con Cy5) y se colocó con cuidado sobre el microarreglo cubriéndolo con una laminilla. Se incubó por toda la noche a 42°C y al día siguiente se realizaron los lavados y secados siguiendo los protocolos descritos en Anexos (protocolo M).

Análisis de la imagen

Las láminas se escanearon utilizando el escaner VersArray ChipReader 10µm system (BIO-RAD). Para extraer la información de cada punto se utilizó el programa VersArray Analyzer, se hizo una plantilla con la información de la impresión de la lámina y se extrajo la información de intensidad cruda para los puntos de ambos canales y el background para cada punto a un archivo de Excel.

Inicialmente para la descripción de los datos de microarreglos se utilizaron comandos básicos del programa para análisis estadísticos R (RDevelopmentCoreTeam, 2010) y para la normalización y análisis de expresión diferencial se usaron distintas librerías del proyecto Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004).

Como las intensidades no son comparables directamente, los datos fueron calibrados por el método propuesto por Huber *et al.* (2003) utilizando la librería vsn (Huber *et al.*, 2002) de Bioconductor mediante el programa R (Gentleman *et al.*, 2004; RDevelopmentCoreTeam, 2010), disponibles en <http://www.bioconductor.org> y <http://CRAN.R-project.org/>. La aproximación que usa VSN para la normalización se basa en la estabilización de la varianza para un modelo en el cual los datos de intensidad de microarreglos tienen una dependencia de la varianza vs media, además supera la limitación de otros modelos que afectan los datos de genes expresados en bajas cantidades (Huber *et al.*, 2002). VSN funciona en dos componentes, primero hace un escalamiento de los datos y luego una transformación con Log_2 generalizado (gLog_2). Es decir, primero busca un factor de desplazamiento y escalamiento con el fin de calibrar factores experimentales como por ejemplo la eficiencia de marcaje o la sensibilidad del detector, todo esto con el propósito de que los datos entre los distintos arreglos sean lo más similares posible. Luego hace la transformación con gLog_2 para estabilizar la varianza y que los datos puedan ser empleados para análisis de expresión diferencial (Hahne *et al.*, 2008). La transformación es muy similar al logaritmo en el rango de intensidades altas, pero no afecta diferencias entre condiciones para valores de intensidad bajos, como sí sucede con el logaritmo (Huber *et al.*, 2002). La transformación y calibración usada se realiza de la siguiente manera: $h(x) = \text{arsinh}(x/s)$, donde x es la intensidad medida y s la desviación estándar en las réplicas de cada experimento.

Para la detección de expresión diferencial, se usó una prueba-t modificada (Tusher, 2001). Tusher *et al.* (2001) proponen SAM (Significance Analysis of Microarrays) para detectar genes expresados diferencialmente asignando un puntaje (análogo al estadístico t) a cada gen basado en el cambio de expresión de la media en relación con la desviación estándar de mediciones repetidas para cada condición. Con el fin de decidir si este puntaje es mayor que un umbral dado, la probabilidad (valor-p) es calculada basada en permutaciones de las medidas repetidas para generar una distribución de probabilidad. Además, el porcentaje de genes que pudieron haber superado este umbral por casualidad, también es calculado y reportado como descubrimiento de falsos positivos o FDR (del inglés *False Discovery Rate*) (Tusher, 2001).

El valor (d_i) es calculado de la siguiente manera: $d_i = \frac{\bar{x}_{2i} - \bar{x}_{1i}}{s_i - s_0}$, donde s_0 es una constante

positiva pequeña y $s_i = \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \frac{\sum_1 (x_{ij} - \bar{x}_{i1})^2 + \sum_2 (x_{ij} - \bar{x}_{i2})^2}{n_1 + n_2 - 2}}$ y es llamado el valor observado.

Para determinar la significancia de este valor, SAM calcula el valor esperado d si no existieran diferencias entre las condiciones permutando los nombres de las condiciones al azar y recalculando el valor para cada gen. El umbral definido por el usuario o “delta” (valor esperado - observado) puede ser ajustado para seleccionar genes que exceden el umbral (Tusher, 2001).

5. Diseño experimental

Se inocularon 15 plantas por cada cepa, se evaluaron tres tiempos postinoculación (DPI) 0, 4 y 8, y se utilizaron 5 plantas como réplicas técnicas en cada DPI, para un total de 45 plantas inoculadas. Se inocularon tres hojas jóvenes por planta, una para el experimento de curvas de crecimiento bacteriano, la segunda para evaluación de síntomas de enfermedad por fotografía

y la tercera para los ensayos de microarreglos. El experimento completo se repitió una vez, es decir se tomaron dos réplicas biológicas (Fig. 4). Lo ideal para los experimentos de microarreglos ha sido la utilización de tres réplicas biológicas, pero debido a la disponibilidad de plantas no se realizó la tercera réplica.

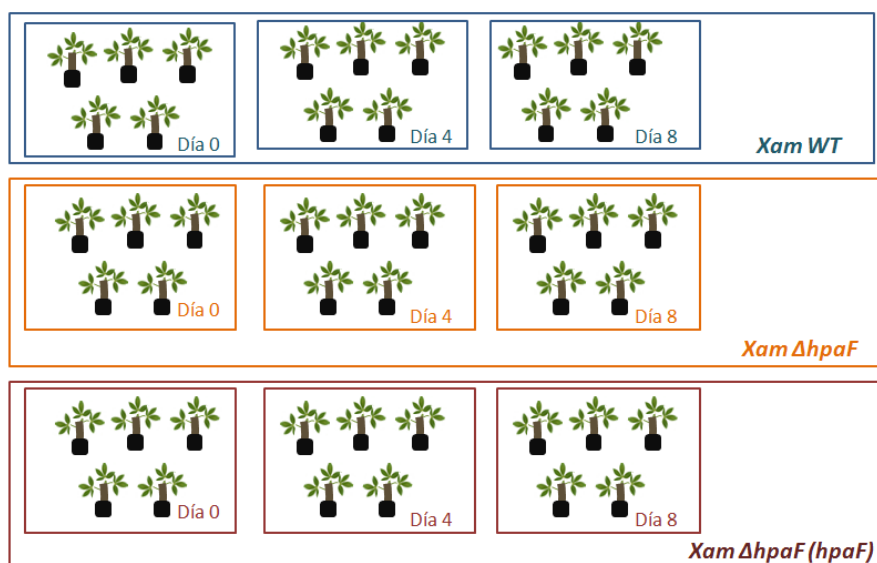


Figura 4. Esquema del diseño del experimento para los ensayos de curva de crecimiento bacteriano, evaluación macroscópica de la enfermedad y análisis de expresión con microarreglos. Se inocularon 15 plantas por cada cepa, se evaluaron tres tiempos postinoculación (DPI) 0, 4 y 8, y se utilizaron 5 plantas como réplicas en cada DPI, para un total de 45 plantas inoculadas. Se inocularon tres hojas jóvenes por planta, una para el experimento de curvas de crecimiento bacteriano, la segunda para evaluación de síntomas de enfermedad por fotografía y la tercera para los ensayos de microarreglos.

RESULTADOS

Identificación de síntomas de enfermedad en hojas de yuca de la variedad susceptible MCOL1522 inoculadas con las cepas *Xam WT*, *Xam ΔhpaF* y *Xam ΔhpaF (hpaF)*.

Crecimiento bacteriano en hojas de yuca

Estudios previos de caracterización y validación de genes asociados a virulencia y patogenicidad en *Xam* han permitido identificar a HpaF como un factor de virulencia, ya que al ser mutado en la bacteria ésta pierde su virulencia y al ser complementado la bacteria la recupera (Pinzón *et al.*, 2009; Trujillo, 2008).

La evaluación del crecimiento bacteriano en plantas es uno de los experimentos claves para determinar la virulencia de distintas cepas en interacciones compatibles (enfermedad). En varios patosistemas, la realización de curvas de crecimiento ha sido de gran importancia para determinar el efecto dado por la mutación de un gen patogenicidad de la bacteria (Keshavarzi *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2003; Noel *et al.*, 2002; Sugio *et al.*, 2007). Sin embargo, en yuca los experimentos de crecimiento de *Xam* no han arrojado resultados consistentes ya que existe mucha variabilidad entre las réplicas (Pinzón *et al.*, 2009; Trujillo,

2008) (Elizabeth Contreras, Andrea Vásquez, Andrea Barrera, comunicación personal). Es por esto que se decidió hacer un ensayo piloto con distintos métodos de inoculación en hojas y tallo de la variedad MCOL1522 para encontrar un procedimiento que permitiera visualizar fácilmente síntomas de enfermedad y a su vez datos de crecimiento bacteriano consistentes. Se evaluó el método de inoculación por corte de hojas con tijeras previamente sumergidas en una solución bacteriana, punción en tallo y piercing. El método que arrojó mejores resultados fue la inoculación por “piercing” o punción en el nervio central del foliolo de las hojas de yuca (datos no mostrados) y la evaluación del crecimiento bacteriano en los primeros diez días post inoculación, es por esto que se decidió hacer la evaluación del crecimiento bacteriano y la identificación de fenotipo macroscópico y microscópico con este método de inoculación. También se decidió utilizar como mínimo cinco réplicas por tratamiento con el objeto de disminuir la variabilidad de los datos, la cual era muy alta con tres réplicas.

Los resultados del crecimiento bacteriano muestran que aún al considerar cinco réplicas técnicas sigue presentándose mucha variabilidad en el título para las distintas réplicas (Figura 5 y 6). Debido a los valores altos de la desviación estándar, no se pueden hacer análisis estadísticos entre las medias para determinar diferencias significativas. Si se deja a un lado esta variabilidad, se pueden observar ciertas tendencias. En la figura 5 se muestra el crecimiento bacteriano para la primera réplica biológica, y se observa que la cepa *WT* (barras de color negro) es la única que muestra movilidad hacia el sitio cuatro, mientras que las otras dos cepas $\Delta hpaF$ (barras de color gris claro) y $\Delta hpaF$ (*hpaF*) (barras de color gris oscuro) sólo alcanzan el sitio 2. Si se examinan por separado los sitios 1 y 2 se nota que en el día 0 la cantidad de bacteria presente es muy similar para cada cepa, lo cual es consistente con lo esperado. Por otro lado, después de 4 días post inoculación se observa una tendencia al aumento de la cepa *WT* sobre las otras dos, tanto para el sitio 1 como para el 2. Después de 8 DPI, el comportamiento en el sitio 1 es muy parecido al ya descrito para 4 DPI, mientras que para el sitio 2 la cepa *WT* se encuentra 3 órdenes de magnitud por encima que la cepa $\Delta hpaF$ (*hpaF*), y la cepa $\Delta hpaF$ no se presenta en este sitio.

Al repetir este experimento (segunda réplica biológica) se observan ciertas diferencias con respecto al primero. En la figura 6 se muestran los resultados de la repetición y a diferencia del experimento anterior sólo las cepas *WT* y $\Delta hpaF$ (*hpaF*) alcanzan los sitios 2, 3 y 4 después de 8 DPI. Si se examina con detalle el sitio 1 se observa que en el día 0 la cantidad de bacteria presente en la planta es distinta para cada cepa, lo cual no es esperado ya que esto indica que aunque todas las plantas fueron inoculadas de la misma manera la cantidad de bacteria que entró a la planta no fue la misma para las tres cepas. Así mismo, al día 4 post inoculación se observa menor cantidad de bacteria de la cepa $\Delta hpaF$ con respecto a las otras dos, y después de 8 DPI no existe mayor diferencia entre las tres cepas. Los sitios 2, 3 y 4 manifiestan exclusivamente la presencia de las cepas *WT* y $\Delta hpaF$ (*hpaF*) luego de 8 DPI y en cantidades decrecientes de acuerdo a la lejanía con el sitio de inoculación.

Estos resultados de la evaluación del crecimiento bacteriano en hojas de yuca muestran mucha variabilidad tanto entre las plantas usadas como en las réplicas técnicas (Figs. 5 y 6, barras de error). Adicionalmente, los resultados entre ambas réplicas biológicas no son del todo congruentes, principalmente en cuanto a la movilidad a lo largo del tiempo.

A pesar de la variabilidad asociada al experimento, se puede decir que la mutación de *HpaF* en *Xam* tiene tendencia a causar una diferencia en el crecimiento bacteriano en la planta con

respecto a las bacterias que sí poseen HpaF. Esta diferencia se observa principalmente en el nivel de desplazamiento a lo largo del nervio central del foliolo de yuca a los 8DPI. También se puede observar que HpaF alcanza a complementar parcialmente el fenotipo de la cepa $\Delta hpaF$.

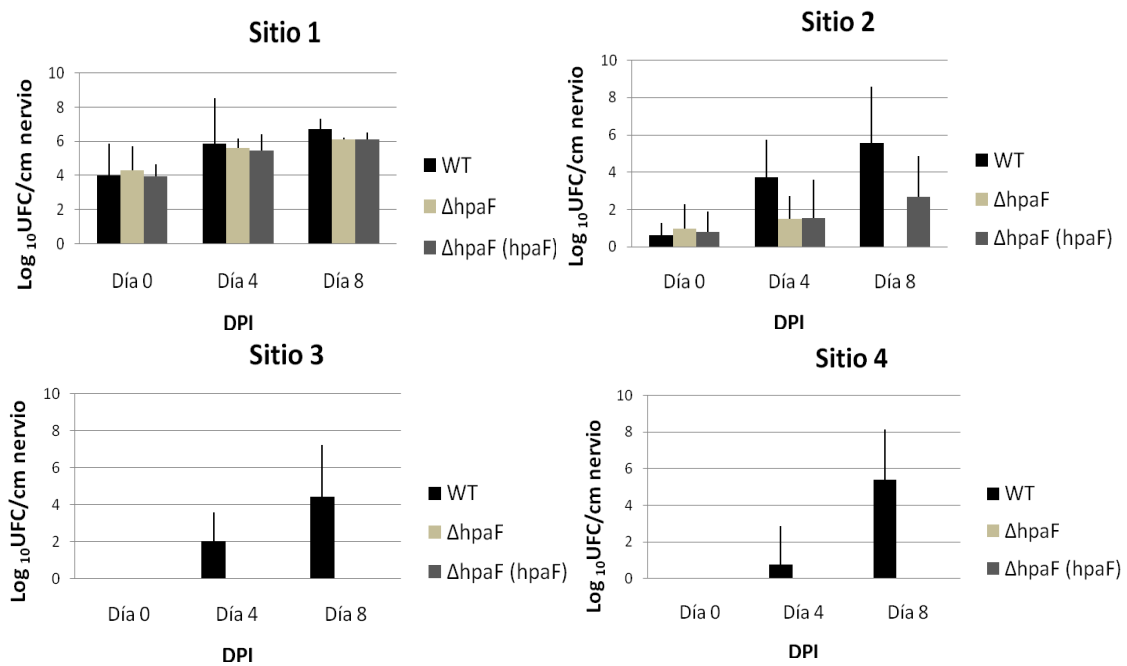


Figura 5. Crecimiento bacteriano en hojas de yuca (MCOL1522) para una réplica biológica. Las barras de color negro muestran la inoculación con la cepa *Xam* WT, las de color gris claro la inoculación con la cepa *Xam* $\Delta hpaF$, y las barras de color gris oscuro la cepa *Xam* $\Delta hpaF$ (*hpaF*). Las gráficas muestran la cantidad de bacterias (Log₁₀ de unidades formadoras de colonias (UFC) por cm de nervio central del foliolo) en función del tiempo (días post inoculación). En la gráfica superior izquierda se muestra el crecimiento bacteriano para el sitio 1, la superior derecha para el sitio 2, la inferior izquierda para el sitio 3 y la inferior derecha para el sitio 4. Las líneas verticales muestran la desviación estándar para cada promedio.

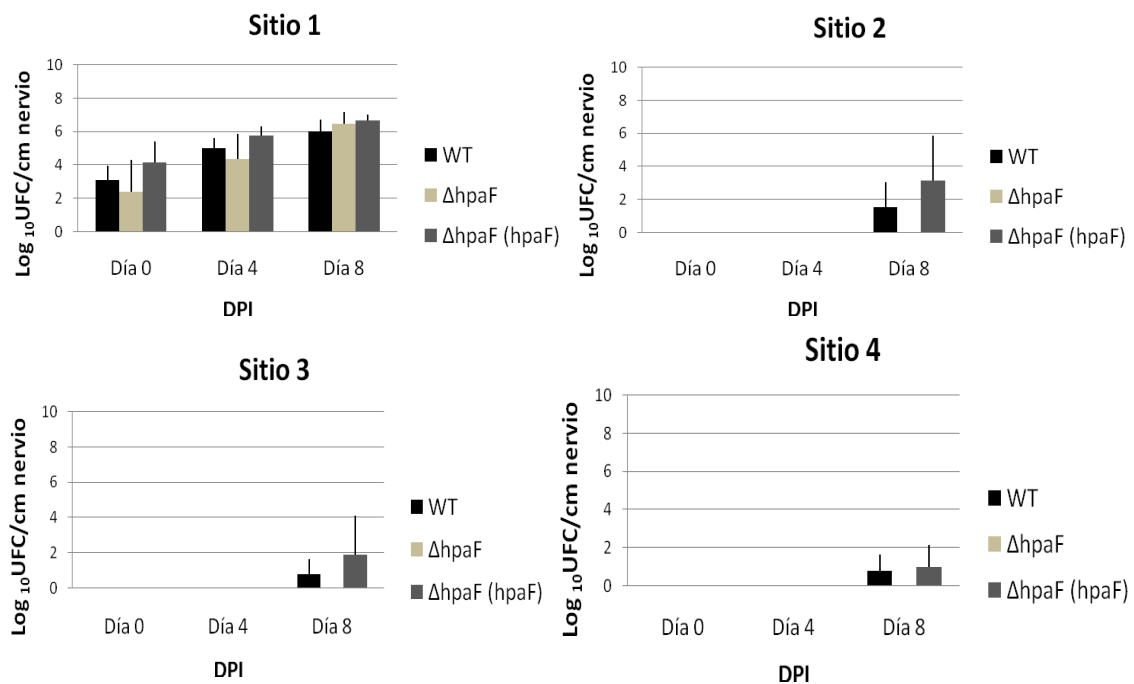


Figura 6. Crecimiento bacteriano en hojas de yuca (MCOL1522) para la segunda réplica biológica. Las barras de color negro muestran la inoculación con la cepa *Xam WT*, las de color gris claro la inoculación con la cepa *Xam ΔhpaF*, y las barras de color gris oscuro la cepa *Xam ΔhpaF (hpaF)*. Las gráficas muestran la cantidad de bacterias (Log_{10} de unidades formadoras de colonias (UFC) por cm de nervio central del foliolo) en función del tiempo (días post inoculación). En la gráfica superior izquierda se muestra el crecimiento bacteriano para el sitio 1, la superior derecha para el sitio 2, la inferior izquierda para el sitio 3 y la inferior derecha para el sitio 4. Las líneas verticales muestran la desviación estándar para cada promedio.

Lesión en el ápice del foliolo

La inoculación en la hoja por punción en el nervio central generó una lesión de necrosis en forma de V en el ápice del foliolo inoculado tanto para la primera réplica biológica como para la segunda (Figuras 7 y 8). En la figura 7 se muestran las fotografías de los foliolos principales de hojas de yuca inoculados con *Xam* después de 14 DPI. Este experimento se realizó simultáneamente al de crecimiento bacteriano y se utilizaron 15 réplicas técnicas por tratamiento. La figura 7A muestra que la inoculación control (mock) con MgCl_2 no presenta ningún efecto sobre la planta ya que de las 5 plantas inoculadas ninguna presentó necrosis ni clorosis. Las figuras 7B y 7C muestran el fenotipo presentado en las plantas inoculadas con la cepa *WT*, de las 15 plantas inoculadas 10 presentan necrosis (7B) mientras las 5 restantes no presentan lesión (7C). Las figuras 7D y 7E muestran el fenotipo presentado en las plantas inoculadas con la cepa *ΔhpaF*, de las 15 plantas inoculadas dos presentan necrosis (7D) mientras que las 13 restantes no presentan lesión (7E). Las figuras 7F y 7G muestran el fenotipo presentado en las plantas inoculadas con la cepa *ΔhpaF (hpaF)*, de las 15 plantas inoculadas 6 presentan necrosis (7F) mientras que las 9 restantes no presentan lesión (7G).

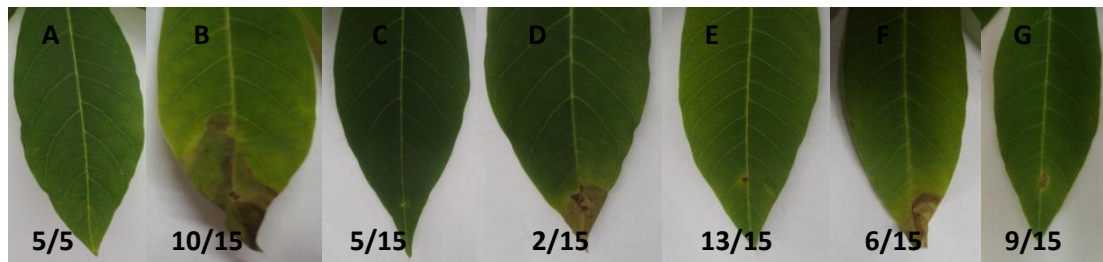


Figura 7. Fenotipo a 14 DPI del foliolo principal de hojas de yuca (MCOL1522) inoculadas con *Xam* para la primera réplica biológica. **A** Inoculación con MgCl_2 (mock), ninguna de las cinco plantas inoculadas presentó lesión. **B y C** Inoculación con la cepa *Xam WT*, 10 de 15 plantas presentaron necrosis (**B**) mientras que las 5 restantes no presentaron esta lesión (**C**). **D y E** Inoculación con la cepa *Xam ΔhpaF*, 2 de 15 plantas presentaron una leve necrosis (**D**) mientras que las 13 restantes no presentaron lesión (**E**). **F y G** Inoculación con la cepa *Xam ΔhpaF (hpaF)*, 6 de 15 plantas presentaron necrosis (**F**), mientras que las 9 restantes no presentaron lesión (**G**).

Para la segunda réplica biológica se presentan resultados similares. La figura 8A muestra que la inoculación control (mock) con MgCl_2 no presenta ningún efecto sobre la planta ya que de las 5 plantas inoculadas ninguna presentó necrosis ni clorosis. Las figuras 8B y 8C muestran el fenotipo presentado en las plantas inoculadas con la cepa *WT*, de las 15 plantas inoculadas 10 presentan necrosis (8B) mientras las 5 restantes no presentan lesión (8C). Las figuras 8D y 8E muestran el fenotipo presentado en las plantas inoculadas con la cepa *ΔhpaF*, de las 15 plantas inoculadas 1 presenta necrosis (8D) mientras que las 14 restantes no presentan lesión (8E). Las figuras 8F y 8G muestran el fenotipo presentado en las plantas inoculadas con la cepa *ΔhpaF (hpaF)*, de las 15 plantas inoculadas 7 presentan necrosis (8F) mientras las 8 restantes no presentan lesión (8G).

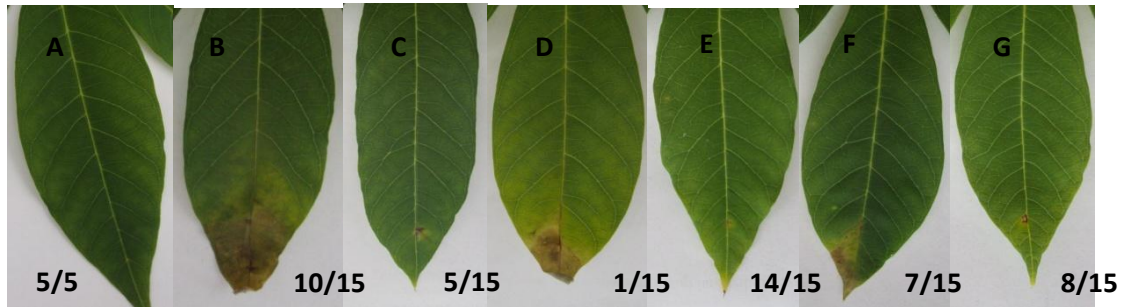


Figura 8. Fenotipo a 14 DPI del foliolo principal de hojas de yuca (MCOL1522) inoculadas con *Xam* para la segunda réplica biológica. **A** Inoculación con $MgCl_2$ (mock), ninguna de las cinco plantas inoculadas presentó lesión. **B** y **C** Inoculación con la cepa *Xam* WT, 10 de 15 plantas presentaron necrosis (**B**) mientras que las 5 restantes no presentaron esta lesión (**C**). **D** y **E** Inoculación con la cepa *Xam* $\Delta hpaF$, 1 de 15 plantas presentó una leve necrosis (**D**) mientras que las 14 restantes no presentaron lesión (**E**). **F** y **G** Inoculación con la cepa *Xam* $\Delta hpaF$ (*hpaF*), 7 de 15 plantas presentaron necrosis (**F**), mientras que las 8 restantes no presentaron lesión (**G**).

En síntesis, se observa claramente la presencia de necrosis hacia el ápice del foliolo como resultado de la inoculación con bacterias que presentan todo su arsenal de efectores. Cuando *Xam* está mutada para *HpaF* este síntoma desaparece, aún así la complementación de *HpaF* no recupera en su totalidad el fenotipo causado por la cepa tipo silvestre. Es importante destacar que a diferencia del experimento de crecimiento bacteriano, la identificación de fenotipo muestra resultados consistentes y con baja variabilidad entre ambas réplicas biológicas.

Histología

Debido a que experimentos previos de inoculaciones en hoja han mostrado que a partir de los 10 días post inoculación se empieza a formar una necrosis en el ápice de la hoja, se decidió seleccionar el tejido justo en este sitio para evaluar cambios fenotípicos a nivel microscópico a los 8 y 16 días postinoculación (DPI) (ver materiales y métodos).

Para evaluar el proceso de infección a nivel microscópico se realizaron cortes en parafina utilizando un micrótopo de rotación. Se inocularon hojas de plantas de la variedad MCOL1522 con las cepas *Xam* WT, *Xam* $\Delta hpaF$ y *Xam* $\Delta hpaF$ (*hpaF*) para evaluar diferencias en el fenotipo inducidas por *HpaF*. Como control de la inoculación se realizaron cortes de plantas inoculadas con mock ($MgCl_2$).

Se fotografiaron cortes de hojas recogidas a 8DPI para la región B del fragmento de hoja seleccionado (ver Materiales y Métodos). No se muestran las imágenes para la región A ya que no hubo una diferencia notable con la región B. Lamentablemente, las tinciones de hoja a 16DPI aparecieron sobreteñidas ya que en la mayoría de los casos el nivel de necrosis en las hojas no permitió la realización de buenos cortes en parafina (datos no mostrados). Adicionalmente, las tinciones con los reactivos sudán IV y azul de resorcina empleados para la detección de suberina y calosa respectivamente, se fotografiaron pero no arrojaron los resultados esperados para estas tinciones (datos no mostrados).

La tinción con fluoroglucinol-HCl o test de Weissner ha sido ampliamente utilizada para la detección de lignina tanto en hojas como en tallos (Bart *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2001; Kpemoua *et al.*, 1996). El fluoroglucinol reacciona con aldehídos aromáticos produciendo una coloración rosada/roja para el caso de aldehídos de tipo hidroxicinamil o una coloración roja/café para el caso de hidroxibenzaldehídos (Pomar *et al.*, 2002).

En la figura 9 se muestra una variación en la intensidad de la coloración roja en los vasos del xilema asociada a la inoculación con las distintas cepas de *Xam*. Al parecer, la ausencia de *HpaF*

se evidencia en la falta de coloración de las paredes del xilema (Fig. 9 E, F flechas blancas). Adicionalmente, en plantas inoculadas con cepas que contienen HpaF (*XamWT* y *Xam ΔhpaF* (*hpaF*)) se observó una coloración café la cual es predominante en las células que hacen parte del mesófilo de empalizada (Fig. 9, flechas negras). Esta coloración no se observa en las hojas de plantas inoculadas con la cepa *Xam ΔhpaF*, indicando que en estas últimas células no se presentó daño y/o acumulación de hidroxibenzaldehídos (Fig. 9 D, H).

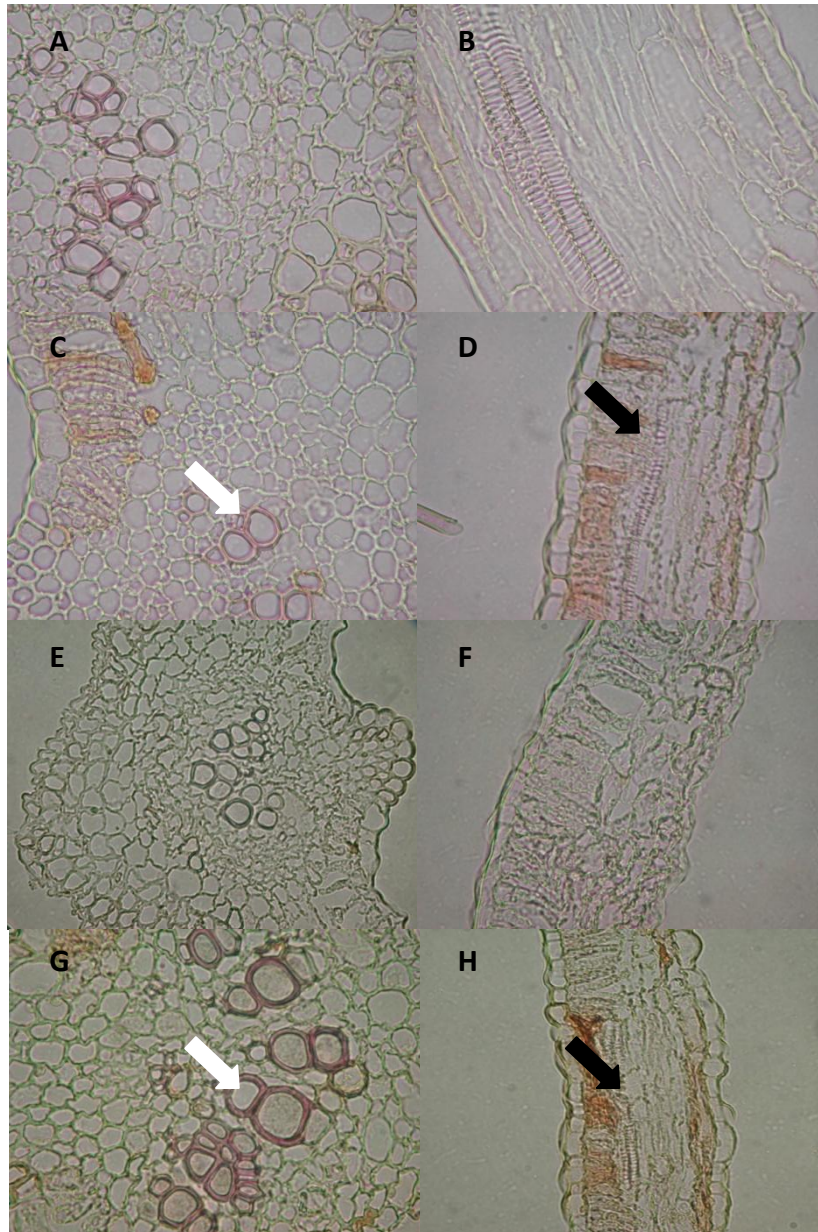


Figura 9. Cortes transversales de hojas de yuca inoculadas con *Xam* a 8DPI y teñidas con fluoroglucinol-HCl. Las fotografías de la izquierda muestran el nervio central del foliolo, mientras que las figuras de la derecha muestran el mesófilo de foliolo. Las tinciones se realizaron sobre plantas inoculadas con $MgCl_2$ (A-B), plantas inoculadas con la cepa *Xam* WT (C-D), *Xam ΔhpaF* (E-F) y *Xam ΔhpaF* (*hpaF*) (G-H). Aumento: 400X.

Por otro lado, la tinción policromática con azul de toluidina ha sido una de las tinciones más empleadas en estudios de histotecnia en plantas gracias a la versatilidad en la coloración de los distintos tipos celulares (Curtis, 1986; O'Brien *et al.*, 1965).

La tinción con azul de toluidina en hojas de yuca en plantas control (inoculadas con $MgCl_2$) revela las paredes de los vasos de xilema y el parénquima de empalizada y esponjoso como una coloración azul-verdosa (Fig. 10 A, B). Las células del colénquima y los tubos cribosos se aprecian como una coloración morada (Fig. 10 A, B). Asociada a la inoculación con *Xam* se presenta un aumento en la coloración morada y degradación del tejido, lo cual es predominante en las inoculaciones con las cepas que presentan HpaF y se pierde en gran medida con la ausencia del efector (Fig. 10 flechas gruesas). Este aumento en la coloración se observa principalmente asociado a los vasos del xilema, aunque también es abundante en las células del mesófilo (Fig. 10 flechas negras gruesas negras). Notablemente y también asociado a la presencia de la proteína efectora, se presenta una fuerte coloración al interior de los vasos del xilema en el nervio central del foliolo (Fig. 10 C, G flechas blancas), la cual se aprecia atenuada en la ausencia de HpaF (Fig. 10 E, flecha blanca). Esta coloración fuerte al interior de los vasos del xilema no sólo se presenta en la nervadura principal del foliolo sino que también está presente en nervios secundarios del mesófilo (Fig. 10 H flecha blanca). El xilema es un tejido que al madurar pierde el protoplasto, por lo tanto no es común apreciar coloración en sus vasos. Es posible que esta fuerte coloración esté indicando presencia de bacterias al interior del xilema.

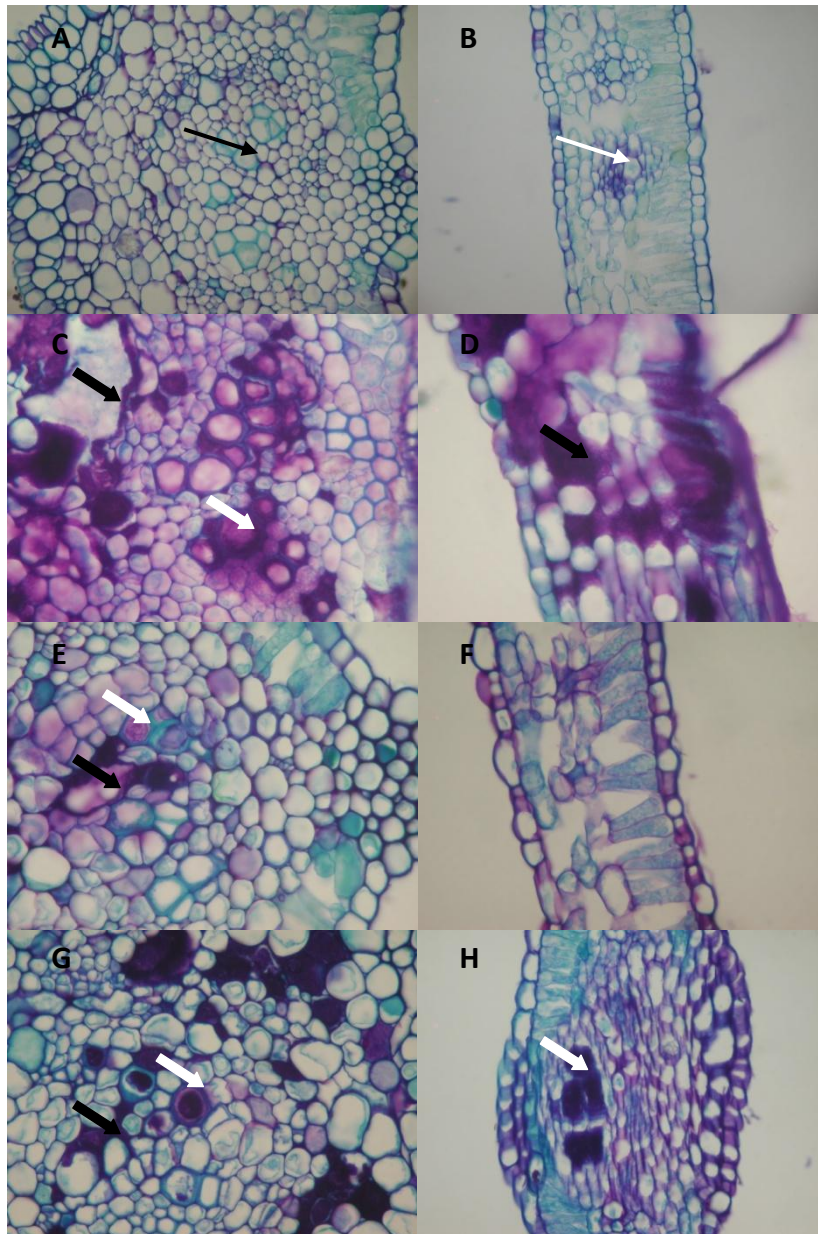


Figura 10. Cortes transversales de hojas de yuca inoculadas con *Xam* a 8DPI y teñidas con azul de toluidina. Las fotografías de la izquierda muestran el nervio central del foliolo, mientras que las figuras de la derecha muestran el mesófilo de foliolo. Las tinciones se realizaron sobre plantas inoculadas con $MgCl_2$ (A-B), plantas inoculadas con la cepa *Xam* WT (C-D), *Xam* $\Delta hpaF$ (E-F) y *Xam* $\Delta hpaF$ (*hpaF*) (G-H). La flecha delgada negra señala los vasos del xilema en el nervio central del foliolo, la flecha delgada blanca señala nervios terciarios en el mesófilo. Las flechas gruesas negras señalan una densa coloración morada tanto en la nervadura central como en el mesófilo asociada a la degradación de tejido. Las flechas gruesas blancas muestran una fuerte coloración morada dentro de los vasos del xilema.

Aumento: 400x.

Adicionalmente, se empleó la doble tinción azul de astra – fucsina básica la cual permite un excelente contraste en cortes semifinos. El azul de astra tiñe polisacáridos, mientras que la fucsina básica tiene afinidad por paredes lignificadas y suberificadas (Kraus *et al.*, 1998). En hojas de yuca control (inoculadas con $MgCl_2$), esta tinción revela notoriamente una coloración rojiza para las paredes que conforman los vasos del xilema y para la cutícula de la epidermis superior (Fig. 11 A, B flechas delgadas negras). La inoculación con *Xam* parece disminuir la coloración roja de la cutícula, la cual es fuerte en el control (Fig. 11 A, B) y ausente en las fotografías de hojas inoculadas (Fig. 11, C-H). Como ya se había observado con la tinción de

azul de toluidina, se observan coloraciones fuertes asociadas al xilema y a tejidos degradados, las cuales son más evidentes en las hojas inoculadas con *Xam* WT y *Xam* $\Delta hpaF$ (*hpaF*) (Fig. 11 C, D, G, H flechas gruesas). Al igual que la tinción con toluidina también se observa coloración al interior de los vasos del xilema, siendo más fuerte en plantas inoculadas con las cepas que contienen todo el arsenal de efectores (Fig. 11 flechas blancas).

Dado que el azul de astra tiñe polisacáridos se puede inferir que en estos sitios hay proliferación de *Xam* y que el reactivo está reaccionando con una matriz de exopolisacáridos producida por *Xam*.

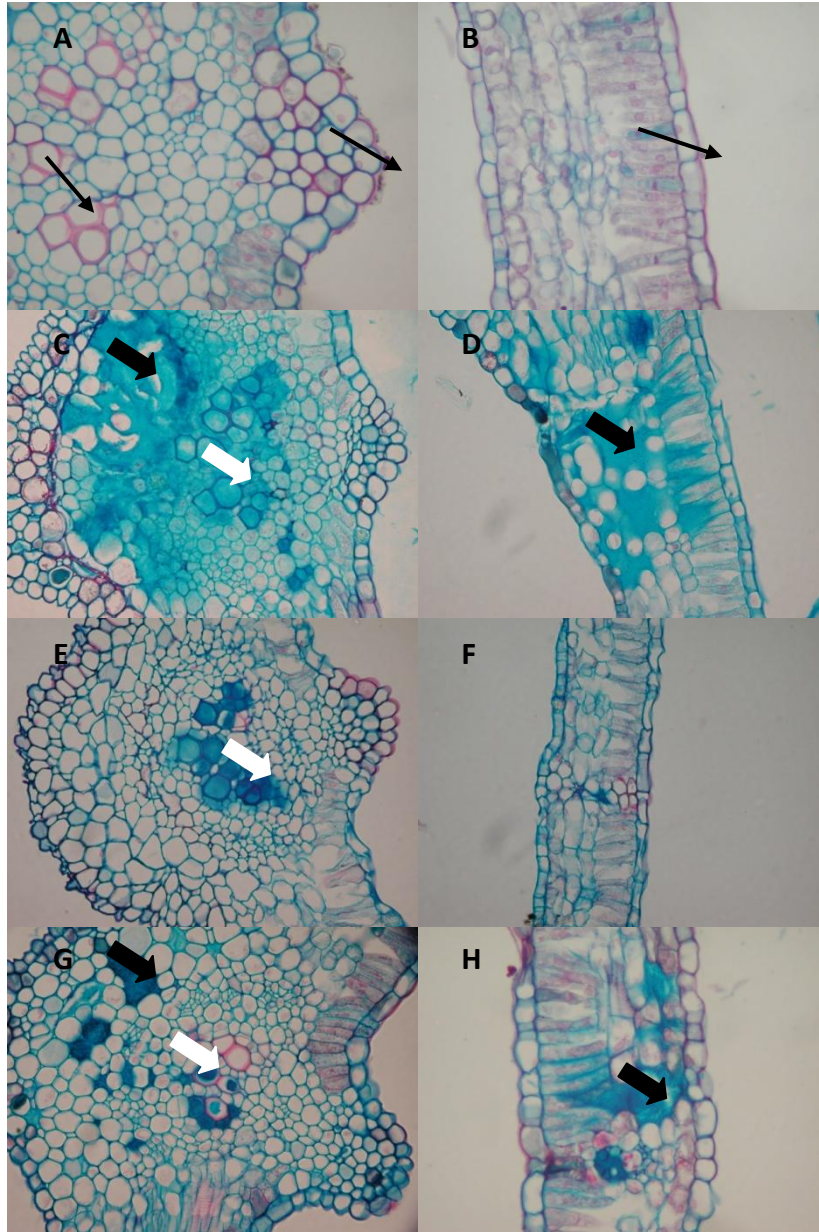


Figura 11. Cortes transversales de hojas de yuca inoculadas con *Xam* a 8DPI y teñidas con la doble coloración azul de astra - fucsina. Las fotografías de la izquierda muestran el nervio central del foliolo, mientras que las figuras de la derecha muestran el mesófilo de foliolo. Las tinciones se realizaron sobre plantas inoculadas con $MgCl_2$ (A-B), plantas inoculadas con la cepa *Xam* WT (C-D), *Xam* $\Delta hpaF$ (E-F) y *Xam* $\Delta hpaF$ (*hpaF*) (G-H). La flecha delgada negra señala la coloración roja en los vasos del xilema en el nervio central del foliolo, y en la cutícula en la epidermis superior. Las flechas gruesas negras señalan una densa coloración azul tanto en la nervadura central como en el mesófilo asociada a la degradación de tejido. Las flechas gruesas blancas muestran una coloración azul dentro de los vasos del xilema.

Aumento 400X.

Comparación del perfil de expresión de genes en hojas de yuca de la variedad susceptible MCOL1522 inoculadas con las cepas *Xam ΔhpaF* y *Xam ΔhpaF (hpaF)*.

Con el fin de determinar cambios en el perfil de expresión de genes asociados a la presencia de la HpaF en *Xam*, se inocularon hojas de yuca de la variedad MCOL1522 con las cepas *Xam* WT, *Xam ΔhpaF* y *Xam ΔhpaF (hpaF)*. Se colectó material vegetal a los 0, 4 y 8 DPI, se extrajo ARN, se sintetizó ADNc, se marcó con Cy3 y Cy5 y se realizó la hibridación al microrreglo de 5700 ESTs de yuca (ver materiales y métodos). Una vez obtenidas las imágenes se procedió a hacer la extracción de la información de intensidades utilizando el programa VersArray Analyzer (ver materiales y métodos).

Análisis descriptivo general

Una vez se obtuvieron los datos de intensidades organizados en columnas, se procedió a evaluar el comportamiento de los datos para las réplicas biológicas por separado mediante un boxplot (Fig. 12 y 13). Dado que al hacer una resta entre dos variables aleatorias (en este caso intensidades crudas menos intensidades del background para cada spot) se aumenta la varianza, se decidió hacer comparaciones entre los datos de intensidad cruda, intensidad neta, la resta de intensidad cruda menos el valor mínimo del background, y la resta de la intensidad cruda menos la media del background para cada imagen. La figura 12 muestra los datos de intensidad cruda (arriba izquierda), intensidad neta (arriba derecha), la intensidad cruda menos el valor mínimo del background (abajo izquierda) y la intensidad cruda menos la media del background (abajo derecha) para la primera réplica biológica. Asimismo, la figura 13 muestra el boxplot para los datos de la segunda réplica biológica.

En general se observa que los datos no varían notablemente al hacer la sustracción de distintos valores de background, en comparación con los datos crudos. Los datos de intensidad cruda al igual que los datos de intensidad neta presentan sólo valores positivos, mientras que al restar el valor mínimo o la media del background aparecen datos negativos, especialmente en el segundo caso. En la figura 12 se observa que particularmente una columna presenta datos de intensidad muy distintos al resto de columnas, esta diferencia ya se había observado en la extracción de los datos a partir de las imágenes. Por otro lado, la figura 13 muestra que para la segunda réplica biológica todos los datos se presentan más uniformes.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se decidió excluir la información, para ambos canales, de la hibridación que muestra datos atípicos. La figura 14 muestra el boxplot para todas las hibridaciones teniendo en cuenta ambas réplicas biológicas.

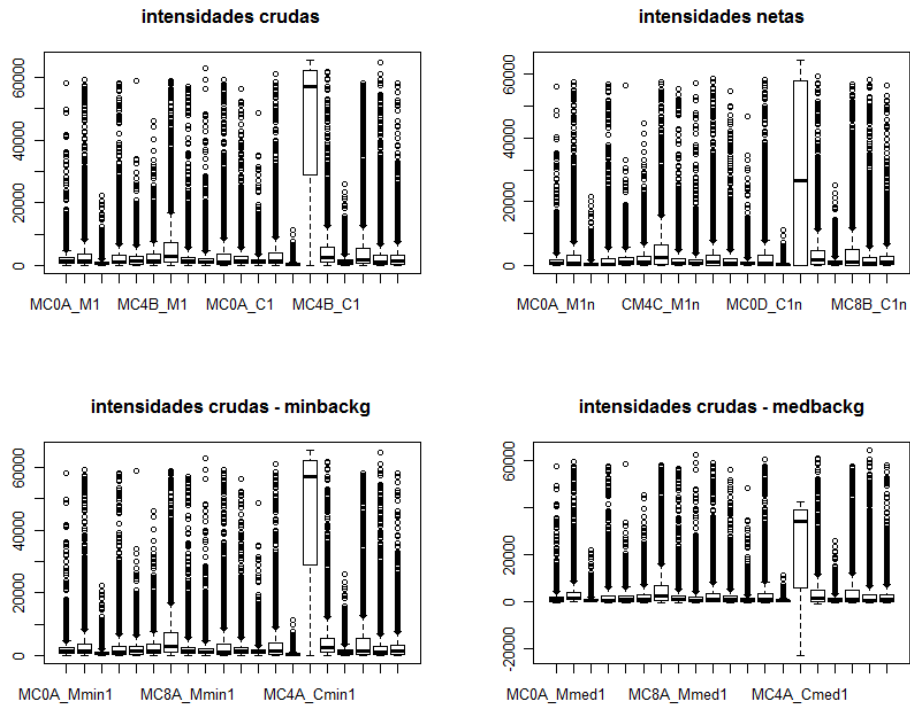


Figura 12. Boxplot de los datos de la primera réplica biológica. Los datos crudos se muestran arriba a la izquierda, los datos netos se muestran arriba a la derecha, los datos crudos menos el valor mínimo del background abajo a la izquierda y abajo a la derecha se muestran los datos crudos menos la media del background para la primera réplica biológica.

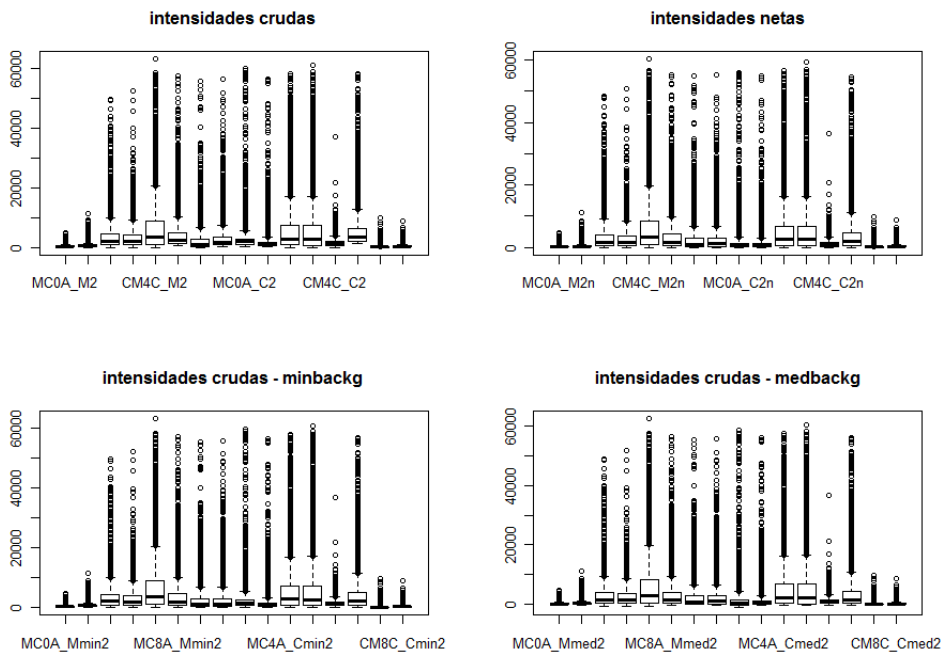


Figura 13. Boxplot de los datos de la segunda réplica biológica. Los datos crudos se muestran arriba a la izquierda, los datos netos arriba a la derecha, los datos crudos menos el valor mínimo del background abajo a la izquierda, y abajo a la derecha se muestran los datos crudos menos la media del background para la segunda réplica biológica.

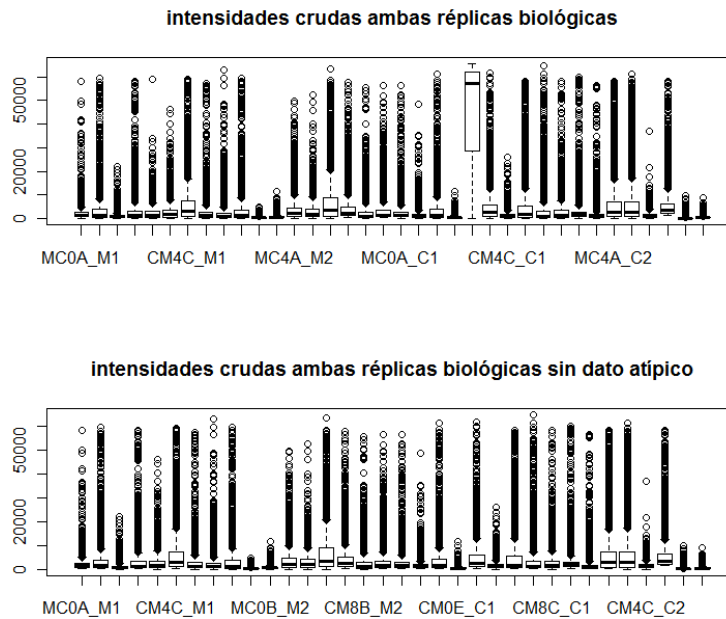


Figura 14. Boxplot de todos los datos de ambas réplicas biológicas. Arriba se muestran todos los datos por columnas y abajo se muestran sin el dato de la hibridación atípica para ambos canales.

Este análisis permitió identificar los datos para continuar el análisis y con éstos se realizaron diagramas de dispersión para evaluar diferencias dentro de las réplicas técnicas asociadas al marcaje del ADNc. Se tomó la información de un tratamiento para el cual se tienen cuatro réplicas técnicas: dos en las cuales el ADNc correspondiente a las plantas inoculadas con la cepa mutante se marcó con Cy5 y en las otras dos el ADNc de este mismo tratamiento se marcó con Cy3. En la Figura 15 se muestran los diagramas de dispersión de un marcaje con respecto al otro para el mismo ADNc. Se observa que efectivamente existen diferencias asociadas al marcaje del ADNc con los fluoróforos Cy3 y Cy5, siendo el marcaje con Cy5 el que tiende a arrojar mayores valores de intensidad y datos más consistentes entre las réplicas. Al transformar los datos con Log_2 se observa cómo cambia su distribución y se asemeja más a la tendencia esperada que es una línea recta en la diagonal con dispersión similar a distintos valores de intensidad (figura 16).

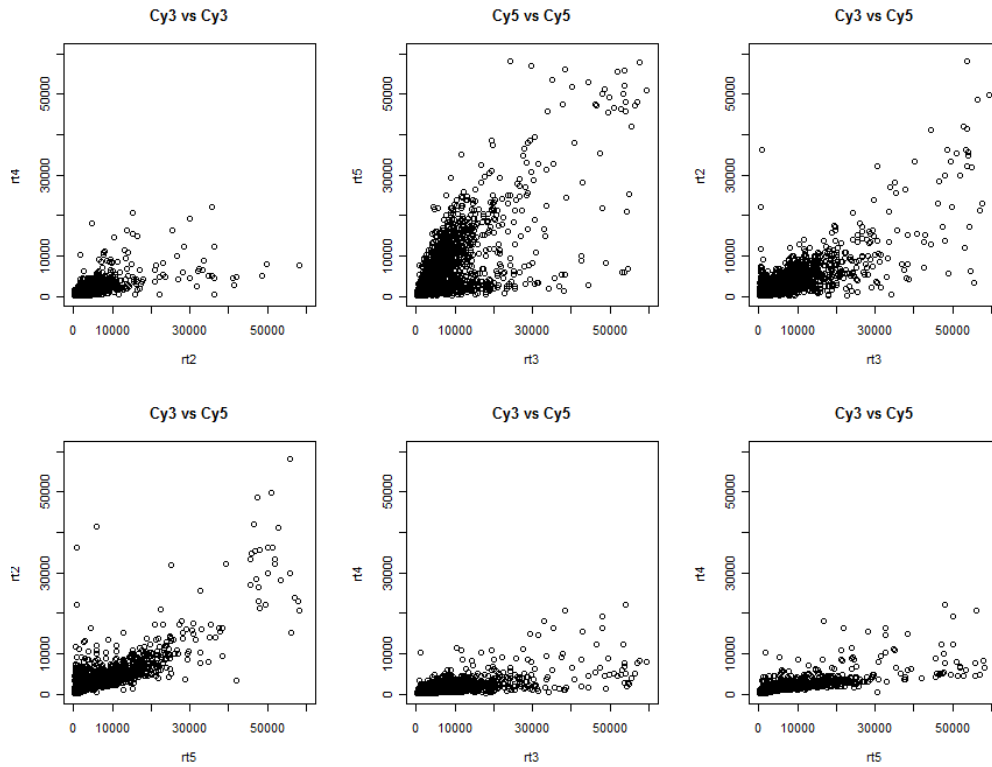


Figura 15. Diagrama de dispersión de los valores de intensidades crudas entre réplicas técnicas de la misma muestra de ADNc. En la figura se muestran seis diagramas de dispersión de los datos de intensidad crudos. Los dos primeros diagramas muestran la dispersión de los datos cuando una misma muestra es marcada con el mismo Cy, los siguientes muestran la relación cuando un mismo ADNc es marcado con Cy3 y con Cy5.

Lo anterior muestra que los datos de intensidad de los puntos se comportan con las tendencias esperadas de datos derivados de microarreglos. Es decir, la varianza aumenta proporcionalmente con la intensidad en cada punto, los valores de intensidad para Cy3 son menores que los valores para Cy5, y después de ser transformados con Log_2 los datos se estabilizan.

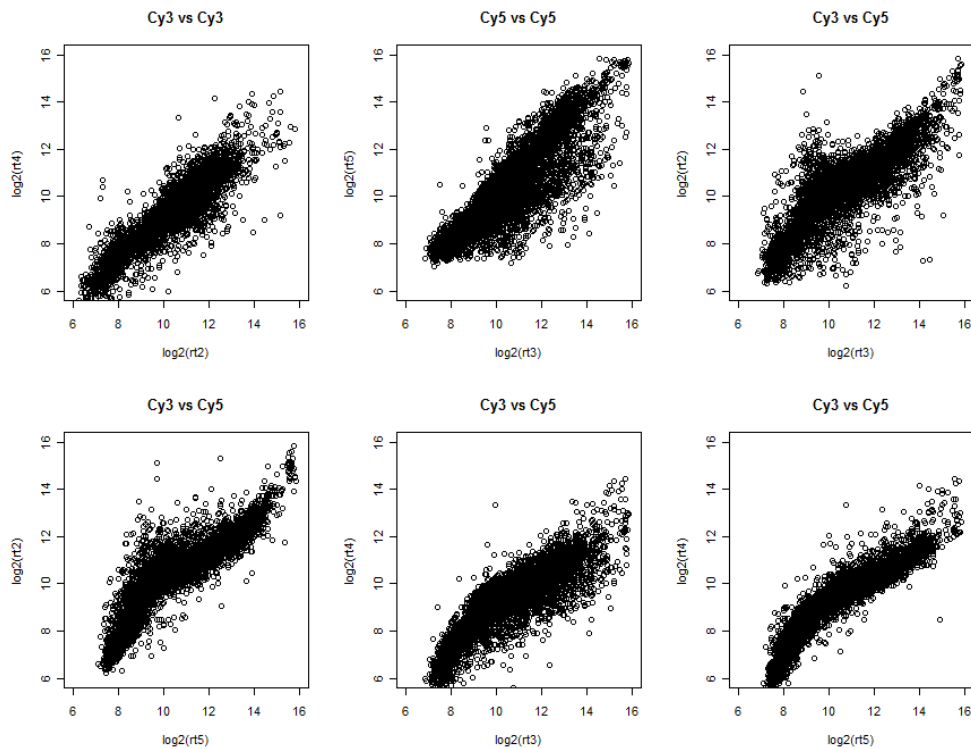


Figura 16. Diagrama de dispersión de los valores de intensidades crudas transformados con Log_2 para los mismo datos de la figura 16. En la figura se muestran seis diagramas de dispersión de los datos de intensidad transformados con Log_2 . Los dos primeros diagramas muestran la dispersión de los datos cuando una misma muestra es marcada con el mismo Cy, los siguientes muestran la relación cuando un mismo ADNc es marcado con Cy3 y con Cy5.

Normalización

La normalización se realiza con el objeto de eliminar la variación en los datos de intensidad dada intrínsecamente en los experimentos de microarreglos. La calibración o normalización de los datos se hizo con la librería VSN (Huber *et al.*, 2002) de Bioconductor mediante el programa R (Gentleman *et al.*, 2004; RDevelopmentCoreTeam, 2010).

Una vez se realiza esta normalización, lo más recomendado para visualizar rápidamente si funcionó la estabilización de la varianza es hacer una gráfica de la desviación estándar vs la media de los datos normalizados como se muestra en la figura 18. Al hacer esta gráfica se espera que la distribución de la desviación estándar esté concentrada en valores pequeños y que no se observe una tendencia significativa de estos valores en función de la media (Anexos, figura 1). Después de la estabilización de la varianza se espera que los puntos rojos formen aproximadamente una línea horizontal, se pueden presentar algunas fluctuaciones al azar pero que no predominen sobre la tendencia general (Hahne *et al.*, 2008; Huber *et al.*, 2002).

A diferencia de lo que se observa en la figura 18 cuando se grafican los datos crudos, la figura 17 muestra cómo efectivamente sí hubo una estabilización de la varianza al normalizar con VSN, ya que no se perciben grandes tendencias.

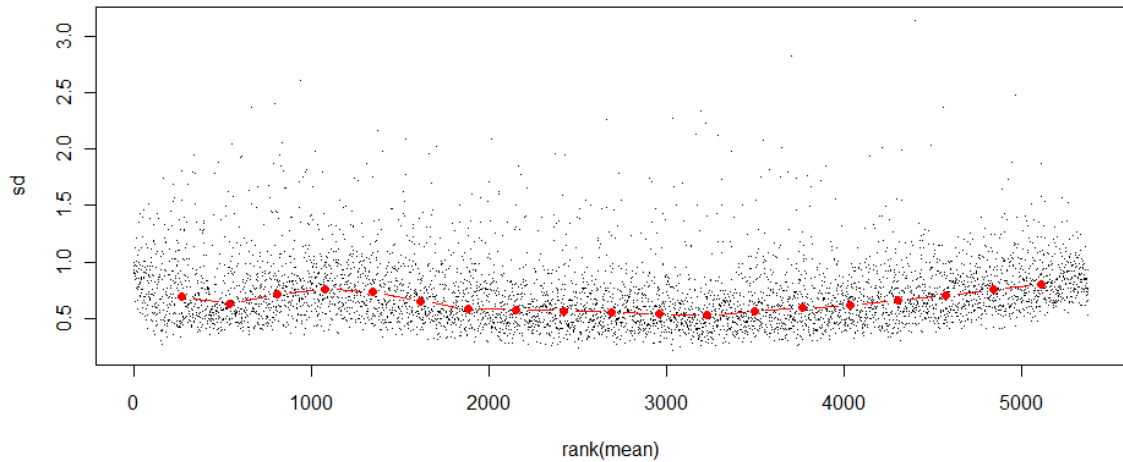


Figura 17. Gráfica de la desviación estándar en función de la media para los datos normalizados. Para cada punto se muestra en el eje y la desviación estándar empírica de los datos normalizados y transformados con gLog_2 vs el rango de la media en el eje x. Los puntos rojos conectados con líneas muestran la mediana de la desviación estándar.

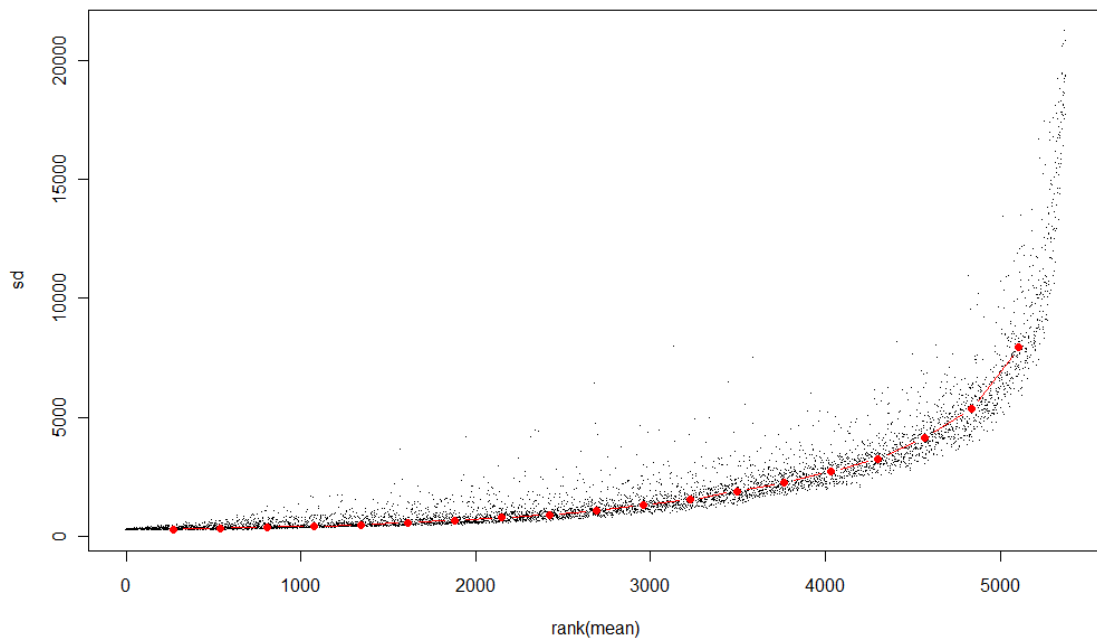


Figura 18. Gráfica de la desviación estándar en función de la media para los datos crudos. Para cada punto se muestra en el eje y la desviación estándar empírica de los datos crudos vs el rango de la media en el eje x. Los puntos rojos conectados con líneas muestran la mediana de la desviación estándar.

Para evaluar la normalización entre arreglos (columnas) se hizo un boxplot después de normalizar con VSN. Si se compara la figura 19 con la figura 14 se advierte cómo se escalan los datos después de la normalización. Sin embargo, se observa que aunque las medias son muy similares, siguen existiendo varios datos atípicos para casi todos los arreglos (Fig. 19). La varianza se puede apreciar a partir del ancho de las cajas, por lo tanto se puede observar cómo aún después de normalizar siguen existiendo diferencias en la varianza de los datos entre microarreglos (Fig. 19).

intensidades normalizadas entre microarreglos

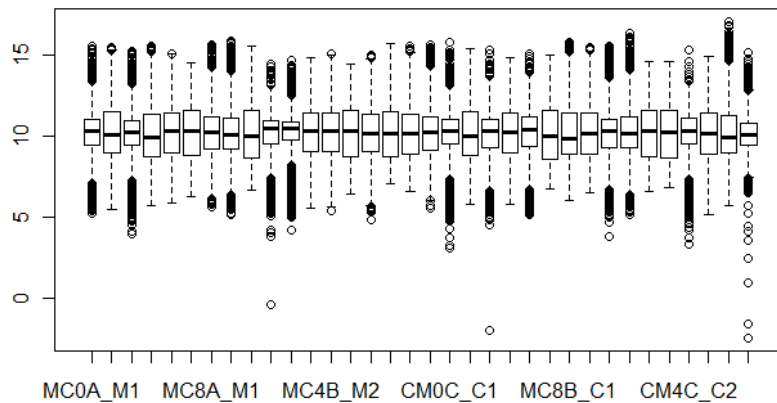


Figura 19. Boxplot de los datos de todas las columnas o arreglos después de normalizar con VSN. Cada caja representa la distribución de los datos de intensidad normalizados para un arreglo.

Para evaluar la dispersión de los datos dentro de un mismo arreglo se hicieron diagramas de dispersión para seis arreglos seleccionados al azar antes y después de la normalización con VSN (Figuras 20 y 21 respectivamente). En la figura 20 se observa que existe una tendencia general de mayores intensidades para el canal rojo comparado con el verde. Sin embargo, el arreglo tres muestra una dispersión sobre la diagonal, lo cual indica que para algunos casos las diferencias para ambos canales no son muy grandes. En la figura 21 se observa cómo después de la normalización, la mayoría de los datos se distribuyen uniformemente sobre la diagonal.

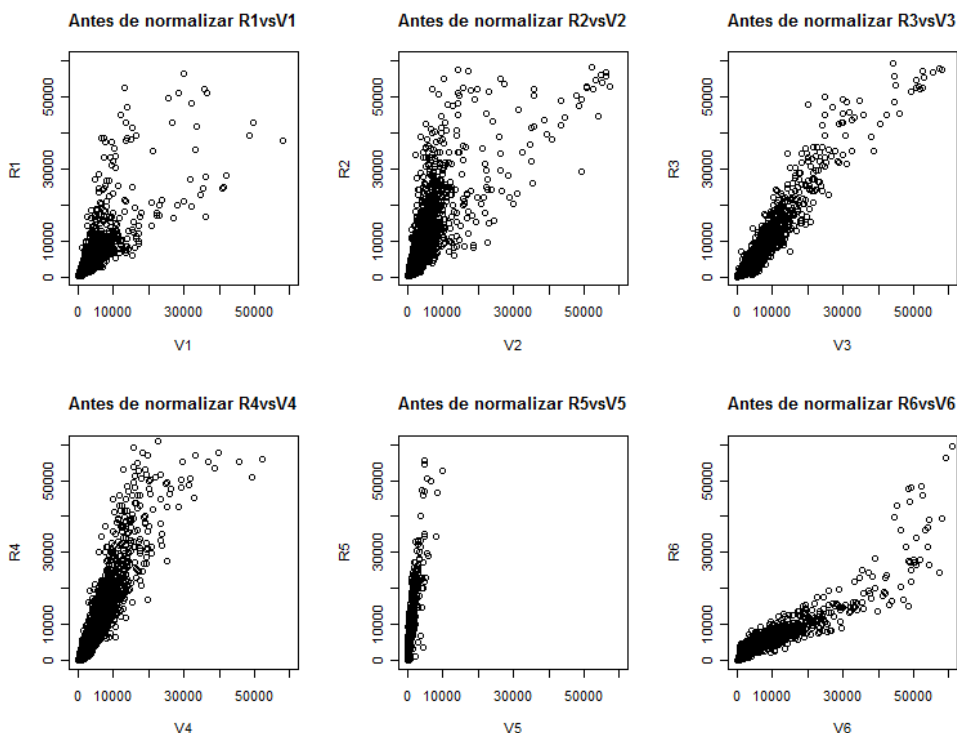


Figura 20. Diagramas de dispersión de seis arreglos con los datos crudos (antes de transformar). En el eje x se muestran los datos de intensidad para la muestra marcada con Cy5 (rojo) y en el eje y se muestran los datos que corresponden a la muestra marcada con Cy3 (verde).

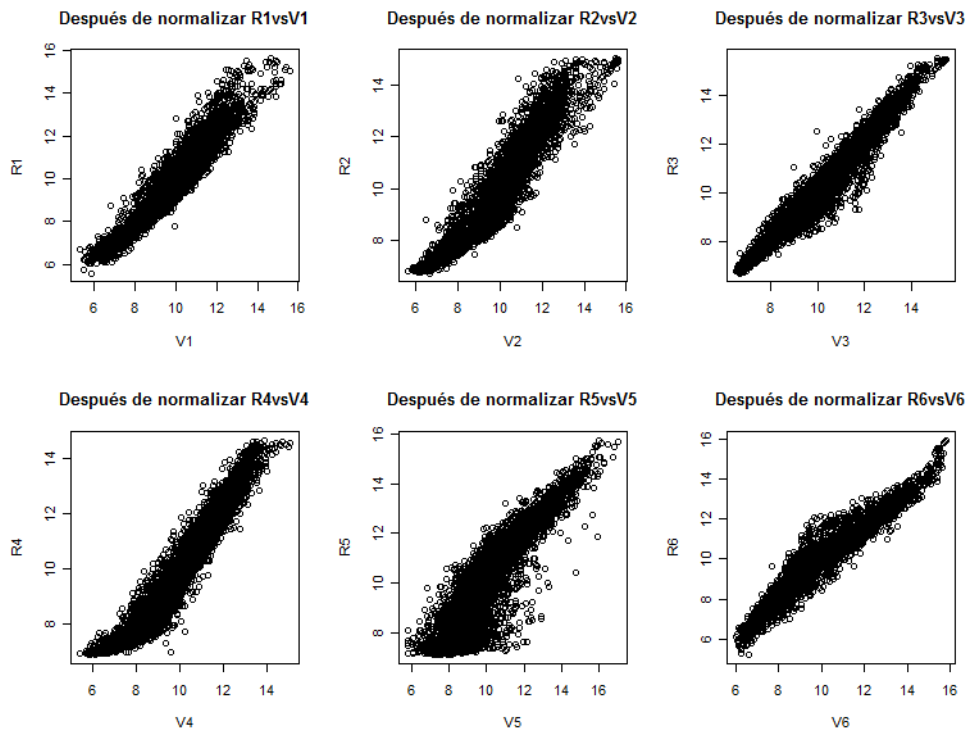


Figura 21. Diagramas de dispersión de los mismos seis arreglos de la figura anterior con los datos transformados. En el eje x se muestran los datos de intensidad para la muestra marcada con Cy5 (rojo) y en el eje y se muestran los datos que corresponden a la muestra marcada con Cy3 (verde).

Todos los resultados anteriores muestran que aunque los datos crudos no son homogéneos, después de realizar la normalización se logra el objetivo de escalar los datos (Fig. 19) y disminuir la varianza asociada a la intensidad (Figs. 18, 20 y 21).

Una gráfica muy usada para visualizar los datos de microarreglos es la llamada MA-Plot (Hahne *et al.*, 2008) o también RI-Plot (Quackenbush, 2002). El valor de M ó R hace referencia al *ratio* o razón, el cual para los datos crudos corresponde a la división del Log_2 de la intensidad del canal rojo por el verde, y en los datos transformados a la diferencia de la intensidad del canal rojo menos el canal verde. Por otro lado, el valor de A ó I corresponde a la intensidad, siendo para los datos crudos la multiplicación de los Log_2 de las intensidades para ambos canales, y para los datos transformados la suma de ambas intensidades.

Para visualizar el MA-Plot de los datos antes y después de normalizar (figuras 22 y 23 respectivamente) se usó el paquete “Geneploster” de Bioconductor. En la figura 22 se observa que los valores de M no son uniformes a lo largo de los distintos valores de intensidad. Esto indica que hay mucha variabilidad dentro de cada arreglo. Aún después de la normalización se observa que aunque los valores de M tienden más hacia cero (línea roja), siguen siendo muy variables (Fig. 23). La tendencia esperada es una distribución de los datos sobre la línea roja, es decir valores de M cercanos a cero para todo el rango de intensidad (Anexos, figura 1). Sin embargo, aunque esto no ocurre para la mayoría de los datos, el arreglo 3 muestra una tendencia similar a la esperada y la asunción de que la mayoría de genes en el microarreglo no se encuentran diferencialmente expresados.

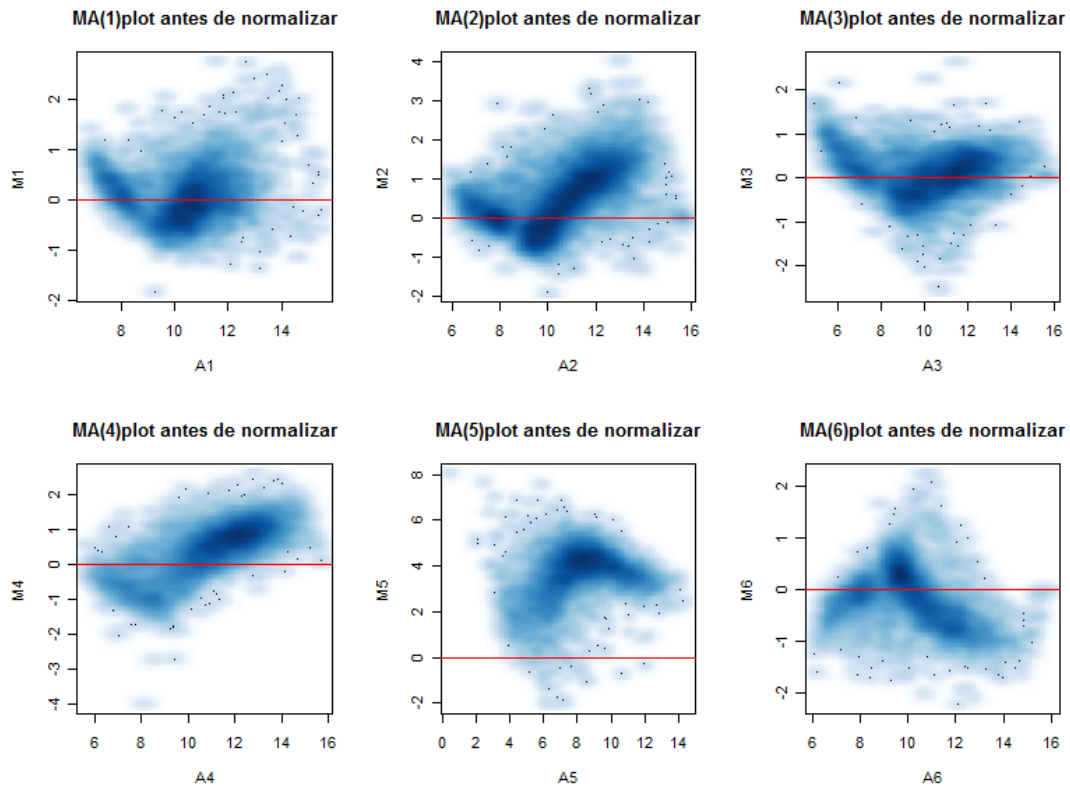


Figura 22. MA-Plot de seis arreglos con los datos crudos. Se utilizaron los mismos datos de la figura 20 y se graficaron los valores de M vs A para cada fila o spot. Esta gráfica muestra la densidad de puntos como intensidad del color azul, es decir entre mayor cantidad de puntos se presenten en un sitio, mayor será la coloración azul, los puntos atípicos aislados se muestran como puntos individuales. La línea roja demarca valores de M iguales a 0.

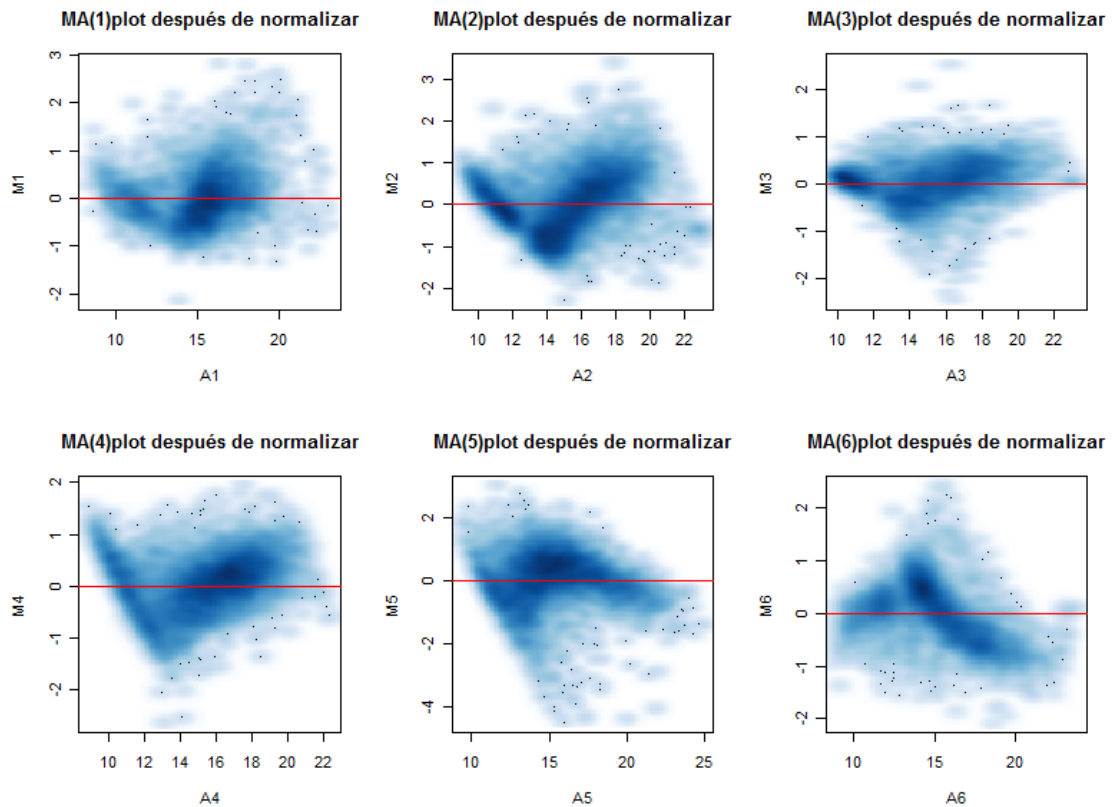


Figura 23. MA-Plot de seis arreglos con los datos normalizados. Se utilizaron los mismos datos de la figura 21 y se graficaron los valores de M vs A para cada fila o spot. Esta gráfica muestra la densidad de puntos como intensidad del color azul, es decir entre mayor cantidad de puntos se presenten en un sitio, mayor será la coloración azul, los puntos atípicos aislados se muestran como puntos individuales. La línea roja demarca valores de M iguales a 0.

Posteriormente se construyeron histogramas de los valores de M para los seis arreglos con los que se ha venido trabajando antes y después de normalizar (figuras 24 y 25 respectivamente). Estas figuras complementan los MA-Plot ya que muestran que la distribución de los valores de M siguen una distribución normal con la mayoría de los datos alrededor de 0 después de realizar la normalización (figura 25).

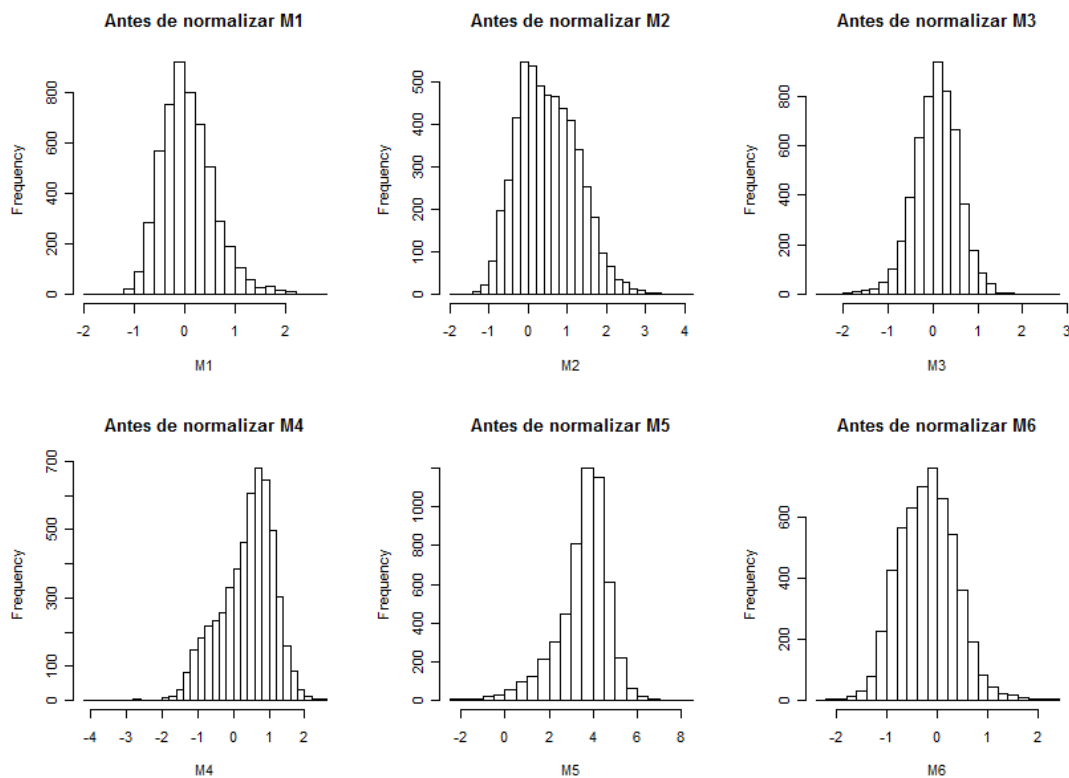


Figura 24. Histogramas del ratio (M) de seis arreglos antes de normalizar.

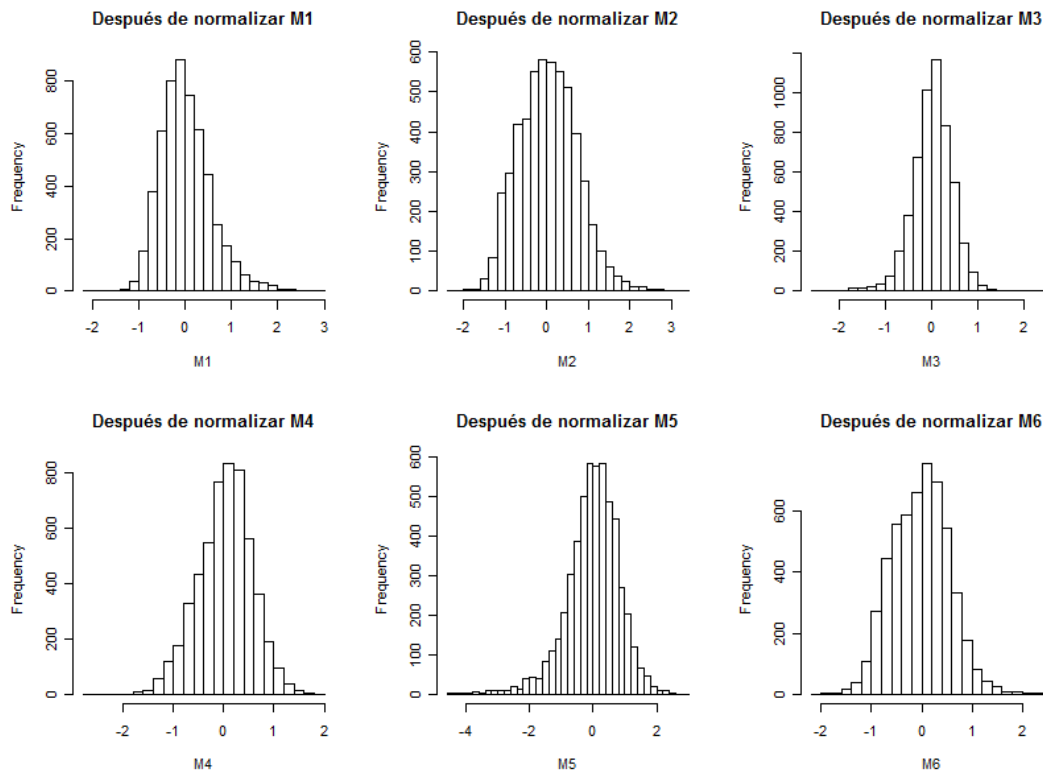


Figura 25. Histogramas del ratio (M) de seis arreglos después de normalizar.

Los resultados anteriores muestran que aunque después de normalizar se logra obtener una semejanza a la distribución normal con media cero para los valores de M, sigue existiendo mucha variabilidad dentro de cada arreglo.

Análisis de expresión diferencial con SAM

Una vez evaluada la normalización se procedió a hacer el análisis de genes expresados diferencialmente utilizando el programa SAM (Tusher, 2001) con el paquete siggenes de Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004). Inicialmente se seleccionaron todas las columnas haciendo un pool para los tiempos de una condición (plantas inoculadas con la cepa $\Delta hpaF$) y se compararon contra la otra condición (plantas inoculadas con la cepa $\Delta hpaF$ (*hpaF*)). Al hacer la gráfica de la salida de SAM para un valor de delta igual a 0,1 se observa que no hay genes diferencialmente expresados (Figura 26).

Para corroborar este resultado, se calculó la media para las réplicas y se hizo una prueba t con ajuste de Bonferroni para pruebas múltiples y se obtuvo datos para el valor $P \geq 0.5$, lo cual indica que efectivamente no existe evidencia estadística suficiente para rechazar la hipótesis nula de que las medias para ambas condiciones son iguales.

Para descartar efectos por los diferentes tiempos de recolección, se repitió por separado para el día 0, 4 y 8 y tampoco se obtuvieron genes diferenciales (datos no mostrados).

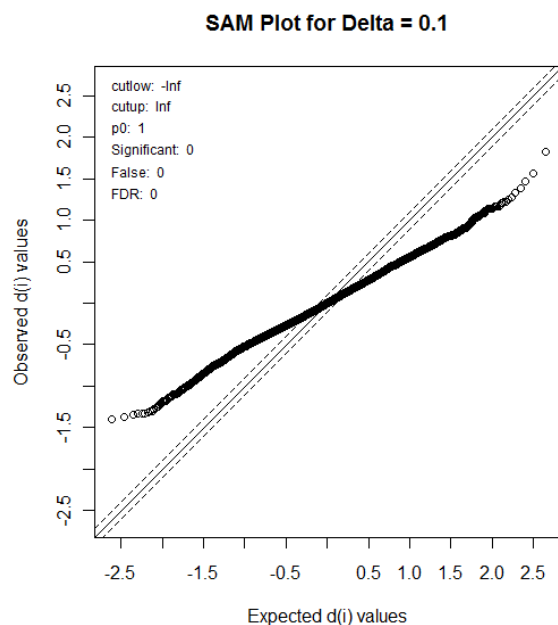


Figura 26. Salida de SAM para un pool de datos utilizando ambas réplicas biológicas.

Otros análisis

Con el fin de superar el problema de variabilidad en los datos se decidió hacer un filtro no específico de los elementos en el arreglo utilizando el paquete “genefilter” de bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004). Se hizo un histograma de la desviación estándar para todos los puntos del arreglo después de normalizar y se seleccionaron sólo aquellos datos con desviación estándar menor a 1 (datos no mostrados). Esto se hizo con el objeto de eliminar aquellas filas o genes con desviaciones muy grandes. Con estos datos filtrados se repitió el SAM e igualmente no resultaron genes diferencialmente expresados.

Otra aproximación para filtrar elementos en el arreglo es considerar la desviación estándar del background para cada elemento. Esta aproximación permite filtrar elementos del arreglo basado en la calidad de la intensidad de cada punto. Esto se hace considerando únicamente aquellos puntos en los cuales el valor de intensidad sea mayor a dos veces la desviación estándar del background para ese punto (Quackenbush, 2002). Se tomaron los datos crudos, se aplicó este filtro y se repitió el SAM e igualmente no resultaron genes expresados diferencialmente (datos no mostrados).

Por último, se decidió estimar el “fold change” para todos los elementos del arreglo. Para esto se promediaron los datos normalizados de las réplicas por condición y se calculó el ratio de una condición (plantas inoculadas con *Xam ΔhpaF (hpaF)*) con respecto a la otra (plantas inoculadas con *Xam ΔhpaF*). Para nuestra sorpresa, ningún elemento excedió un valor de ratio $\geq |2|$. Es decir, aún considerando un estimador descriptivo como el “fold change” no se aprecian diferencias entre plantas inoculadas con *Xam ΔhpaF (hpaF)* con respecto a plantas inoculadas con *Xam ΔhpaF*.

DISCUSIÓN

La evolución de la inmunidad en plantas se inicia con el reconocimiento de PAMPs. Esta percepción inicia una respuesta de defensa en la planta llamada PTI, la cual normalmente detiene la colonización del patógeno. Sin embargo, los patógenos pueden suprimir esta PTI por medio del envío de proteínas efectoras al interior de la planta, resultando en la llamada susceptibilidad mediada por efectores o ETS (del inglés *Effector Triggered Susceptibility*) (Jones & Dangl, 2006). En yuca, la susceptibilidad a la bacteriosis vascular (interacción compatible) ha sido poco estudiada y muy poco se sabe de las proteínas efectoras de *Xam* y su función al interior de la planta. Es por esto que la finalidad de este estudio fue obtener un acercamiento a la interacción compatible mediada por la proteína efectora HpaF de *Xam*, la cual por estudios previos ha mostrado jugar un papel importante en la virulencia.

Importancia de HpaF en el crecimiento bacteriano en hojas de yuca

En otros patosistemas la valoración del crecimiento bacteriano en la planta ha sido de gran importancia para la determinación y caracterización de factores de virulencia y posibles efectores (Keshavarzi *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2003; Noel *et al.*, 2002; Sugio *et al.*, 2007). Nuestros resultados muestran mucha variabilidad tanto a nivel de réplicas técnicas como biológicas (Figs. 5 y 6). Esto corrobora lo apreciado anteriormente (Pinzón *et al.*, 2009; Trujillo, 2008) (Elizabeth Contreras, Andrea Vásquez, comunicación personal) y lleva a la conclusión de que en el patosistema *Xam*-yuca la evaluación del crecimiento bacteriano no es un buen estimador de la inducción de enfermedad. Es de esperarse que la mutación en un sólo efector no cause un mayor efecto en la patogenidad de *Xam*, sobre todo teniendo en cuenta que las bacterias fitopatógenas presentan un arsenal de efectores que en muchos casos son funcionalmente redundantes (Grant *et al.*, 2006).

Adicionalmente, hay que considerar que *Xam* es una bacteria vascular y foliar que se mueve a través de los haces vasculares de la planta. Esto hace especialmente difícil cuantificar su crecimiento y evaluar su movilidad a través de la hoja. Se ha observado que la bacteria tiende a acumularse no uniformemente en los haces vasculares con una gran cantidad de bacterias en ciertas secciones y ausencia completa en otras. Esto puede estar determinado también por el flujo de nutrientes a través de los haces vasculares y la fuerza de este flujo en diferentes momentos de la fisiología de la planta.

En otros patosistemas, ensayos de curvas de crecimiento revelan que, a pesar de que *avrBs3* actúa como un factor de transcripción e induce hipertrofia en células del mesófilo, la multiplicación en pimienta de distintas cepas *Xav* que difieren únicamente en la presencia de *avrBs3* es idéntica (Bonas *et al.*, 1989; Kay *et al.*, 2007; Marois *et al.*, 2002).

A pesar de la variabilidad asociada a este experimento, la mutación de *HpaF* parece afectar el crecimiento y la movilidad de *Xam* a lo largo del nervio central a los 8 DPI (Fig. 6). Esto es similar a otros estudios en tomate en los cuales la mutación de un efector de *Xav* (*XopN*) no altera significativamente el crecimiento bacteriano antes del día 4 y las diferencias se observan a partir del día 6 (Kim *et al.*, 2009).

La mutación de HpaF en *Xam* no manifiesta necrosis en hojas de yuca

La inoculación de bacterias silvestres en hoja muestra que después de los 10 DPI se comienza a observar una especie de necrosis hacia el ápice del foliolo a partir del punto de inoculación, la cual es más destacada a los 14 DPI en plantas inoculadas con las cepas *WT* y $\Delta hpaF$ (*hpaF*) mientras que en las plantas inoculadas con cepas mutantes para HpaF las lesiones son menores (Figs. 7 y 8). Estos resultados muestran claramente la importancia de HpaF en la inducción de necrosis y síntomas en las hojas de yuca. Estos resultados sugieren que HpaF puede estar regulando negativamente la defensa al interior de planta, suprimiendo una primera inmunidad basal de la yuca.

Es importante mencionar que para otros patosistemas caracterizados por producir enfermedades vasculares como es el caso de la bacteriosis de arroz causada por *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, la evaluación de virulencia para mutantes de efectores se hace principalmente mediante un estimador cuantitativo del área de lesión en la hoja (Yang & White, 2004). En yuca, se observa que efectivamente la valoración de la lesión muestra resultados mucho más consistentes a nivel de réplicas técnicas y biológicas.

¿HpaF genera cambios a nivel microscópico en hojas de yuca?

Son escasos los estudios que se realizan a nivel microscópico para evaluar el efecto de la mutación de un efector sobre las respuestas de defensa de la planta (Marois *et al.*, 2002). A pesar de que nuestros resultados no muestran hipertrofia de células del mesófilo como se ha reportado en el patosistema pimentón- *Xav* (Marois *et al.*, 2002), sí muestran diferencias en la tinción con fluoroglucinol-HCl asociadas a la presencia de HpaF en *Xam* (Fig. 9). Notablemente se observa una coloración café en las células del mesófilo exclusivamente en plantas inoculadas con las cepas *WT* y $\Delta hpaF$ (*hpaF*). Se sabe que esta coloración es producida por hidroxibenzaldehídos (Pomar *et al.*, 2002), pero se desconoce la función de este compuesto en respuesta de defensa en plantas. En general, benzaldehídos se han encontrado en semillas de *Arabidopsis*, los cuales por acción de aldehído oxidasas son transformados a ácido benzoico, el cual a su vez es precursor de una serie de glucosinolatos (Ibdah *et al.*, 2009). De estos últimos se sabe que están involucrados en respuestas de defensa de *Arabidopsis* contra hongos e insectos (Bednarek *et al.*, 2009; Clay *et al.*, 2009). Específicamente, el 4-hidroxibenzaldehído se ha encontrado como principal compuesto antifúngico en la savia producida por heridas en hojas de *Phaseolus lunatus* (Bell, 1970).

Por otro lado, la tinción con azul de toluidina ha sido empleada en yuca para la detección de compuestos fenólicos (Kpemoua *et al.*, 1996). En este estudio se muestra que la coloración está asociada a la presencia de HpaF en *Xam* (Fig. 10). Al parecer el azul de toluidina está revelando sitios colonizados con bacterias, tanto en los haces vasculares como en el mesófilo (Fig. 10). Lo anterior concuerda con los bolsillos de lisis bacteriana encontrados en áreas del floema y xilema de plantas susceptibles infectadas con *Xam* (Kpemoua *et al.*, 1996). En otros patosistemas como arroz- *Xoo* también se observa una colonización en los haces vasculares del xilema con la inoculación por “piercing” en hoja (Xu *et al.*, 2008).

Los resultados de la doble tinción con azul de astra y fucsina se asemejan a lo encontrado con la tinción de azul de toluidina (Figs. 10 y 11). Es decir, hay fuertes coloraciones de azul de astra tanto en los haces vasculares como en el mesófilo asociados con la presencia de HpaF (Fig. 11).

Dado que el azul de astra reacciona con polisacáridos, es muy probable que esté tiñendo exopolisacáridos liberados por *Xam* en el apoplasto y dentro de los haces vasculares del xilema principalmente. La presencia de exopolisacáridos en áreas intercelulares, en tubos cribosos y vasos del xilema ya han sido observados anteriormente por medio de autofluorescencia (Kpemoua *et al.*, 1996). Estudios en yuca han mostrado la importancia de los polisacáridos extracelulares de *Xam* en la patogenicidad de la misma (Boher *et al.*, 1997). Por otro lado, la coloración con fucsina muestra una disminución con respecto a las plantas control y no parece estar muy asociada con HpaF (Fig. 11). Es posible que la infección con *Xam* esté causando una reducción en el refuerzo de la cutícula por parte de la planta. Todo lo anterior parece indicar que HpaF promueve la proliferación de *Xam* en la hoja, principalmente en los haces vasculares (Fig. 11 C, E y G). Adicionalmente permite la colonización de *Xam* hacia el mesófilo, ya que la cepa mutada para HpaF no se presenta acumulada en este tejido (Fig. 11 D, F y H).

Todo esto sugiere que la presencia de HpaF en la bacteria ayuda a la movilidad de ésta en distintos tejidos de la hoja, y además se relaciona con un aumento en la producción de fenol e hidroxibenzaldehídos por parte de la planta.

¿HpaF suprime la defensa de la planta mediante la regulación transcripcional de la yuca?

Los análisis de microarreglos comparando el ARN obtenido de plantas inoculadas con las bacterias *ΔhpaF* y *Xam ΔhpaF* (*hpaF*) indican que ninguno de los 5700 genes que incluye este microarreglo es expresado diferencialmente por la acción de HpaF (Fig. 26).

Nuestros resultados de microarreglos muestran que HpaF no induce cambios en la regulación transcripcional de la yuca, sin embargo esta no es la única estrategia que usan los efectores para suprimir la defensa basal. Como ya se mencionó anteriormente, los efectores actúan a distintos niveles para interferir con la inmunidad basal vegetal: pueden superar las barreras físicas impuestas por la planta, inhiben la degradación enzimática en el apoplasto, también pueden inhibir la activación de receptores, interfieren en la señalización de MAPK, actúan en la degradación de componentes de defensa de la planta y también pueden aprovechar la maquinaria de degradación del proteosoma del hospedero para su beneficio (Gohre & Robatzek, 2008).

La presencia de dominios de tipo LRR en HpaF los cuales están asociados con interacciones proteicas en eucariotas, sugiere un posible rol de HpaF en la interacción directa con proteínas de la yuca. Se sabe que efectores GALA de *R. solanacearum*, que contienen repeticiones ricas en leucina (LRR) y dominios de tipo “F-box” interactúan con proteínas ASK de *Arabidopsis* (Angot *et al.*, 2006). Estas proteínas hacen parte de complejos ubiquitin E3 ligasas los cuales son encargados de adicionar ubiquitina a proteínas específicas con el fin de ser degradadas por el proteosoma 26S con el objeto de promover la enfermedad (Angot *et al.*, 2006; Block *et al.*, 2008). Otros efectores como XopD de *Xav* codifican para SUMO (del inglés *small ubiquitin like modifiers*), proteasas que reprimen la estabilidad de proteínas del hospedero en estados tardíos de infección en tomate (Kim *et al.*, 2008).

Recientemente, en ensayos de doble híbrido para evaluar interacciones proteicas utilizando HpaF como “carnada” y una librería de cDNA de yuca como “presa”, se encontró a la proteína

HSP70 como interactor de HpaF (César Trujillo y Adriana Bernal, comunicación personal). Adicionalmente, análisis bioinformáticos de la secuencia de aminoácidos de HpaF utilizando las herramientas phobius del EBI (European Bioinformatics Institute) y TargetP del CBS (Center of Biological Sequence Analysis) sugieren localización no citoplasmática y mitocondrial respectivamente (datos no mostrados). Se sabe que efectores tipo III de *P. syringae* como HopI1 suprime la defensa del hospedero al ser translocado al cloroplasto por medio de la interacción con proteínas de la familia HSP70 (Jelenska *et al.*, 2007). Adicionalmente, se conoce otro efector de *P. syringae*, HopG1, el cual se localiza en la mitocondria alterando su funcionamiento para suprimir la inmunidad innata en la planta (Block *et al.*, 2010).

Todo lo anterior parece sugerir indicios de una posible localización de HpaF al interior de organelos tales como cloroplasto y mitocondria. Esto podría explicar de cierta forma la no expresión diferencial de genes al interior de la yuca, aún así hay otras consideraciones para tomar en cuenta.

Uno de los principales problemas que se presentaron en nuestros experimentos de microarreglos fue la variabilidad intrínseca en los datos generados. Es importante destacar que se trabajó en el caso de una interacción compatible, lo cual puede afectar la variabilidad de los datos. En el patosistema *Arabidopsis* – *Pseudomonas* se han estudiado las respuestas de la planta durante interacciones compatibles e incompatibles mediante cambios en la expresión de genes con la tecnología Affymetrix (Tao *et al.*, 2003). Estos resultados muestran un comportamiento robusto de la interacción incompatible como un sistema biológico. Se sugiere además que a diferencia de lo que ocurre en una interacción incompatible, en la interacción compatible las respuestas se ven muy afectadas por condiciones difíciles de controlar tales como la calidad del suelo, el ambiente microbiano, niveles de humedad, calidad y cantidad de luz (Tao *et al.*, 2003). Adicionalmente encuentran que durante los períodos tempranos de infección, las respuestas en el caso de una interacción compatible e incompatible son cualitativamente similares y las diferencias se observan a nivel cuantitativo y cinético. Esto está basado en la similaridad de los perfiles de expresión entre ambas interacciones en los mismos tiempos, pero la amplitud de los cambios de expresión durante la interacción compatible son pequeños. Estos resultados sugieren que los mecanismos de transducción de señales que usa la planta son en gran parte compartidos en ambas interacciones, y que durante la interacción incompatible la señalización ocurre fuerte y rápidamente después del proceso de infección llevando a la planta a superar la infección (Tao *et al.*, 2003).

En yuca, se ha estudiado la interacción incompatible mediante microarreglos y comparaciones mediante QRT-PCR con una variedad susceptible ha permitido encontrar que algunos de los genes encontrados por microarreglos se inducen rápidamente en la variedad resistente en comparación con la susceptible (Lopez *et al.*, 2005). Estos resultados en yuca corroboran lo encontrado en *Arabidopsis* por Tao *et al.* (2003).

Los resultados anteriores podrían dar una explicación a la variabilidad encontrada en nuestros datos (Figs. 22 y 23). Adicionalmente también sugieren la valoración de tiempos tardíos para evaluar las respuestas en interacciones compatibles. Es posible que a pesar de que los cambios fenotípicos se observen en los primeros 10 DPI, los cambios a nivel transcripcional se observen tardíamente en yuca. Esto podría ser metodológicamente difícil de evaluar ya que después de

12 DPI las hojas inoculadas para la extracción de ARN se encuentran en un estado avanzado de marchitamiento. En tomate se ha mostrado que la infección con *Xav* en plantas susceptibles mutadas para XopN, las diferencias a nivel de crecimiento bacteriano se empiezan a observar a partir de 6 DPI, tiempo en el cual se perciben diferencias en la expresión de genes relacionados con patogenicidad en tomate (Kim *et al.*, 2009). A su vez, y en relación con lo que ocurre en yuca, en tomate encuentran que la bacteria logra crecer hasta 12 DPI, momento en el cual el tejido se satura con bacteria y se observa un marchitamiento general de la hoja (Kim *et al.*, 2009).

Aún así y a pesar de la variabilidad asociada al experimento es de destacar que dentro de 5700 genes ninguno presente cambios en la expresión producidos por este efector. Para esto también hay que considerar que según la información que se tiene disponible del genoma de yuca en <http://www.phytozome.net/> se ha estimado que el genoma contiene aproximadamente 32.000 genes codificantes para proteínas. Es decir, mediante el uso del microarreglo de ADNc de yuca se evalúa menos del 20% del genoma de yuca.

Por otro lado, es de resaltar que los estudios de expresión diferencial utilizando el mismo microarreglo de ADNc desarrollados en una interacción incompatible muestran aproximadamente 200 genes expresados diferencialmente como respuesta a la inoculación con *Xam* en una variedad resistente (López *et al.*, 2005). Es decir, tan sólo el 4% de genes dentro del microarreglo se regulan diferencialmente como respuesta a la infección por *Xam*, lo cual es interesante comprado con nuestros resultados ya que en nuestro estudio evaluamos el efecto de un solo efector en la regulación de expresión de genes de yuca. Todo esto sugiere que es muy posible que hpaF sí regule la transcripción de algunos genes al interior de la yuca, pero que éstos no se encuentren representados dentro del microarreglo de cDNA y es por esto que no se encontraron en este trabajo.

En síntesis se puede concluir que HpaF favorece la proliferación y la movilidad de *Xam* en hojas de yuca susceptibles. Aunque no se encontraron genes expresados diferencialmente por la acción de HpaF, la presencia de estructuras típicas eucariotas en su secuencia sugiere una función en la interacción con posibles proteínas al interior de la planta y una posible regulación transcripcional.

Es importante continuar realizando estudios que permitan comprender la función del repertorio de efectores de *Xam* y los mecanismos que éstos utilizan para causar enfermedad en plantas de yuca. Estos resultados serían de gran utilidad para futuros programas de mejoramiento genético en yuca y para el desarrollo de la agricultura no sólo en Colombia sino en otros países de África donde la yuca es ampliamente cultivada.

PERSPECTIVAS

La disponibilidad que se tiene de un *draft* del genoma permitirá próximamente construir chips para evaluar el repertorio completo de genes de yuca. Alternativamente estrategias como RNAseq podrían tener una mejor representación de posibles cambios en la expresión de genes de manera más confiable y sensible.

ANEXOS

A. Preparación de cortes en parafina utilizando Histochoice Clearing Agent

1. Fijación en F.A.A. por 48 horas.
70% EtOH.....900ml
Acido acético glacial50 ml
Formol..... 50ml
 2. 70 % EtOH 24 horas.
 3. 90 % EtOH 4 horas.
 4. (95%) 96% EtOH 4 horas.
 5. 100% EtOH 4 horas.
 6. 100% EtOH 4 horas.
 7. 90 EtOH: 10 histochoice, 4 horas.
 8. 70 EtOH: 30 histochoice, 4 horas.
 9. 50 EtOH: 50 histochoice, 4 horas.
 10. 30 EtOH: 70 histochoice, 4 horas.
 11. 10 EtOH: 90 histochoice, 4 horas.
 12. histochoice 100%, 2 cambios por 12 horas.
 - 12a. eliminar ½ del Histochoice y reemplazar por parafina a 60º, mezclar rápidamente, colocar en horno a 60º.
 13. Cambios de parafina (x3, 12 horas).
 14. Montar bloques.
 15. Cortar en micrótopo y montar cortes en laminas con adhesivo, secar en horno.
- Adhesivo de Mayer: (Ver Ruzzin, 1999: 84-85)**
1. mezclar 50 cc de clara de huevo y 50 cc de glicerol.
 2. añadir 1 g de salicilato de sodio.
 3. agitar y filtrar (con algodón).

B. Doble tinción azul de astra - fucsina básica

- A partir del protocolo A.
1. Xilol 3 mins.
 2. Xilol 3 mins.
 3. Xilol 50:50 EtOH abs. 3 min.
 4. Xilol 50:50 EtOH abs. 3 min.
 5. EtOH 100% 2 min.
 6. EtOH 95% 2 min.
 7. EtOH 70% 2 min.
 8. EtOH 50% 2 min.
 9. H2O destilada 2 min.
 10. 1% azul de astra acidificado
Variable (Hoja y tallo de yuca a 5 micras=10min; Hoja a 12 micras= 6 minutos)
 11. Lavado en H2O destilada (2 mins.).
 12. 0.1% fucsina básica etanólica
Variable (Hoja y tallo yuca a 5 micras=20 min; Hoja a 12 micras= 4 minutos)
 - 12a. Lavado en H2O destilada (15 segundos).
 - F15. EtOH 50% 1 min.
 - F16. EtOH 70% 1 min.

- F17. EtOH 95% 1 min.
 - F18. EtOH 100% 1 min.
 - F19. EtOH 100% 1 min.
 - F20. EtOH 70: 30 Xilol 2 mins.
 - F21. EtOH 50:50 Xilol 2 mins.
 - 22. Xilol 100% 3 mins.
 - 23. Xilol 100% 3 mins o hasta montaje (no más de 4 horas)
 - 24. Colocación de citoresina y láminillas y secado.
- Azul de astra acidificado:** 1g / 100 ml de 2% ácido tartárico.
- Fucsina básica etanólica:** 0.1g/ 100 ml de etanol 50%.

C. Tinción policromática con Toluidina (Curtis, 1986)

A partir del protocolo A, paso 14.

1. Cortar en micrótopo y montar cortes en láminas con adhesivo Mayer.
2. Secar las láminas sobre placa calefactora a < de 40 grados, no importa el tiempo, hasta secado total. SI SE SOBRECALIENTA LA TINCIÓN ES DESIGUAL.
3. Toluidina 0.05% (en agua destilada) ----- tiempo variable
(hoja de yuca: 30 min. a 5 micras, 15 min. a 12 micras; tallo 15 min. a 5 micras).
4. Secado a < de 40 grados sobre placa calefactora.
1. Xilol 100% 3 mins.
2. Xilol 100% 3 mins o hasta montaje (no más de 4 horas)
7. Colocación de citoresina y laminillas y secado.

Resultados:

1. Paredes lignificadas de coloración azul-verde a verde.
2. Colénquima y parenquima de color púrpura-rojizo
3. Tubos cribosos y células acompañantes de color rojo.

D. Tinción para floema - callosa (Cheadle *et al.* 1953)

A partir del protocolo A.

1. Xilol 3 mins.
2. Xilol 3 mins.
3. Xilol 50:50 EtOH abs. 3 min.
4. Xilol 50:50 EtOH abs. 3 min.
5. EtOH 100% 2 min.
6. EtOH 95% 2 min.
7. EtOH 70% 2 min.
8. EtOH 50% 2 min.
9. Agua destilada 1 min.
- R10. ácido tánico 1% 5 min (1g de salicilato de sodio por 100 ml para prevenir contaminación)
- R11. 3 lavados en H₂O destilada, 1 minuto.
- R12. 2% cloruro férrico por 5 mins.
- R12. 3 lavados en H₂O destilada por 1 minuto (paredes celulares de color gris)
- R13. NaHCO₃ 1% en 25% EtOH en H₂O destilada. Por 30 mins. (cambio de gris a café)
- R14. 0.25 g de azul de resorcina por 100 ml de 30% EtOH + 3 ml de 1% NaHCO₃. 24 horas.
- R15. 50% EtOH en 1% NaHCO₃ por 30 segs. (depende de la tasa de decoloración del azul de resorcina).
- R16. EtOH 70% 30 seg.
- R17. EtOH 95% 30 seg.

- R18. EtOH 100% 30 seg.
- R19. EtOH 100% 30 seg.
- R20. EtOH 70:30 Xilol 1 min.
- R21. EtOH 50:50 Xilol 1 min.
- 22. Xilol 100% 3 mins.
- 23. Xilol 100% 3 mins o hasta montaje (no más de 4 horas)
- 24. Colocación de citoresina, laminillas y secado.

Resultados:

- 1. Calosa: azul-verdoso.
- 2. Tejidos lignificados: similar
- 3. Paredes celulares: gris a café.

E. Detección de lignina con floroglucinol (coloración no permanente): (12 micras)

A partir del protocolo A.

- 1. Xilol 3 mins.
- 2. Xilol 3 mins.
- 3. Xilol 50:50 EtOH abs. 3 min.
- 4. Xilol 50:50 EtOH abs. 3 min.
- 5. EtOH 100% 2 min.
- 6. EtOH 95% 2 min.
- 7. EtOH 70% 2 min.
- 8. EtOH 50% 2 min.
- 9. H2O destilada 2 min.
- 10. Secado.
- 11. Agregar floroglucinol al 1% en EtOH 96% (0.1 gramo en 10 cc. de EtOH 96%)
- 12. Agregar HCl 25% (68 ml HCl 37% y 32 ml H2O destilada).
- 13. Glicerol y laminilla; (sellado con esmalte).
- 14. Toma de fotografías inmediata.

F. Suberina y cutina utilizando Sudan Black B (Ruzin, 1999).

A partir del protocolo A.

- 1. Xilol 3 mins.
- 2. Xilol 3 mins.
- 3. Xilol 50:50 EtOH abs. 3 min.
- 4. Xilol 50:50 EtOH abs. 3 min.
- 5. EtOH 100% 2 min.
- 6. EtOH 95% 2 min.
- 7. EtOH 70% 2 min.
- 8. EtOH 50% 2 min.
- 9. H2O destilada 2 min.
- SU10. Sudan black B por 2 horas
- SU11. EtOH 50% 15 segundos
- SU12. EtOH 40% 1 minuto
- 13. H2O destilada 1 minuto
- 14. Secado a 40 grados.

15. Citoresina.

Solución de Sudan Black B: 70% EtOH 100 ml + Sudan Black B 0.07 g.

Resultados: La cutina y suberina se tiñen de negro

G. Protocolo de Extracción de ARN.

Buffer de Extracción:

Reactivo	Concentración final	Stock	Para 8 Rx
Tris – HCl (pH 7,5)	100mM	1M	400µl
NaCl	100mM	1M	400µl
EDTA	25mM	0,5M	200µl
SDS	1%	20%	200µl
PVP K30 (360.000)	2%	100%	80mg
β mercaptoetanol (14.3M)	2%	100%	80µl
			1300 µl (Σreactivos) + 2700 agua DEPC

Día 1:

1. Precaentar el buffer de extracción a 60°C.
2. Mantener el tubo de 2ml con 0,1 g de tejido congelado en nitrógeno líquido.
3. Adicionar 500µl de buffer de extracción precalentado y mezclar por vórtex.
4. Adicionar 500µl de cloroformo puro y mezclar nuevamente por vórtex.
5. Centrifugar a 12.000rpm por 20 minutos a 4°C.
6. Transferir la fase superior a un nuevo tubo y repetir la extracción con cloroformo dos veces.
7. Finalmente transferir la fase superior a un tubo de 1,5ml, adicionar 0,33 volúmenes de LiCl 8M e incubar overnight a 4°C.

Día 2:

8. Centrifugar a 12.000rpm a 4°C por 15 minutos.
9. Descartar el sobrenadante y disolver el pellet en 500µl de agua DEPC (DiEtilPiroCarbonato).
10. Extraer una vez con 1 volumen de Fenol::Cloroformo::Isoamílico (25::24::1) y dos veces con 1 volumen de Cloroformo::Isoamílico (24::1). Nota: se usa fenol ácido.
11. Transferir la fase superior a un tubo nuevo y precipitar con 0.25 vol de NaCl 5M y 2 vol de etanol por lo menos 30 minutos a -80°C.
12. Centrifugar a 13.000rpm por 20 minutos a 4°C.
13. Decantar el sobrenadante, lavar el pellet con etanol al 70%, y dejar secando 10 minutos.
14. Resuspender el pellet en 30µl de agua libre de nucleasas y almacenar a -80°C.
15. Evaluar la estabilidad y calidad del ARN por electroforesis en gel de agarosa y NanoDrop (Thermo Scientific).

H. Tratamiento con DNasaI (libre de RNasa).

1. Hacer la siguiente mezcla:

Reactivo	Volumen
ARN total	10-40µl
10X DnaseI Buffer (Ambion)	5µl

DNaseI (2U) (Ambion)	1 μ l
Volumen final	50 μ l

- Mezclar bien, centrifugar e incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Adicionar 1 volumen of Fenol::Cloroformo::isoamílico (25::24::1), mezclar bien con vórtex y centrifugar a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Nota: se usa fenol ácido.
- Rescatar el sobrenadante en un nuevo tubo y agregar 1 volumen de Cloroformo::Isoamílico (24::1), mezclar por vórtex y centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Rescatar el sobrenadante en un nuevo tubo y adicionar 1/10 de volumen de Acetato de Sodio 3M pH 5.2, 3 μ l de glicógeno (5 mg/ml), y 2 1/2 de volumen de etanol al 96% frío, mezclar bien e incubar a -80°C por lo menos 10 minutos.
- Centrifugar las muestras durante 20 minutos a 13.000 rpm a 4°C.
- Descartar el sobrenadante, tener cuidado de no perder el pellet.
- Lavar el pellet con etanol al 70%, centrifugar por 10 minutos a 4°C a 13.000rpm.
- Descartar el sobrenadante, tener cuidado de no perder el pellet.
- Resuspender el ARN en 12 μ l de agua libre de nucleasas. Verificar la estabilidad del ARN con electroforesis en gel de agarosa y la calidad con NanoDrop (Thermo Scientific).
- Almacenar las muestras a -80°C.

I. Síntesis de ADNc con el método SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech).

Síntesis de primera cadena de ADNc:

- Hacer la siguiente mezcla:

Reactivo/reacciones	1Rx
ARN (~1 μ g)	6 μ l
3' SMART CDS Primer IIA (12 μ M)	2 μ l
SMART II oligonucleotide (12 μ M)	2 μ l
Volumen final	10 μ l

- Mezclar el contenido y hacer spin con microcentrífuga.
- Incubar el tubo a 70°C en termociclador por 2 minutos.
- Hacer spin y se mantiene a temperatura ambiente.
- Adicionar a cada tubo la siguiente mezcla:

Reactivo/reacciones	1Rx
5X First Strand Buffer (Clontech)	4 μ l
DTT (20mM)	2 μ l
dNTPs (10mM c/u)	2 μ l
MMLV Reverse Transcriptase (Clontech)	2 μ l
AntiRNasa (Ambion)	2 μ l

Volumen Final	12µl
----------------------	------

6. Hacer spin e incubar a 42°C durante una hora.
7. Diluir la reacción de primera cadena en buffer TE (10mM Tris pH 7.6, 1mM EDTA). A 10µl de la reacción de sscDNA agregar 40ul de buffer TE.
8. Calentar los tubos a 72°C durante 7 minutos.

Amplificación del cDNA por LD PCR:

Las condiciones del PCR son las siguientes:

Reactivo	Para 1 reacción
Agua	74µl
10X Advantage PCR Buffer (Clontech)	10µl
dNTPs (10mM c/u)	2µl
5' PCR Primer IIA (12uM)	2µl
50x Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech)	2µl
Volumen Final	90µl (mix) + 10µl (muestra)= 100µl

El protocolo del termociclador es el siguiente:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	1 minuto	1
95°C	15 segundos	Repetir X veces.
65°C	30 segundos	Óptimo 17-19.
68°C	6 minutos	Mínimo 15.

Las secuencias de los primers utilizados se muestran a continuación, la zona subrayada es idéntica en los tres primers:

Nombre del primer u oligonucleótido	Secuencia
SMART II A Oligonucleotide	5'- <u>AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT</u> ACGCGGG-3'
3' SMART CDS Primer II A	5'- <u>AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT</u> ACT ₍₃₀₎ N-1N-3' (N = A, C, G, or T; N-1 = A, G, or C)
5' PCR Primer II A	5'- <u>AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT</u> -3'

J. Limpieza con el Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

1. Adicionar 1 volumen de "Membrane Binding Solution" y mezclar bien.
2. Insertar la columna al tubo de colección.
3. Transferir la mezcla al tubo de colección, e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
4. Centrifugar a 13.000rpm por 1,5 minutos a temperatura ambiente. Descartar el líquido y reinsertar la columna en el mismo tubo de colección.
5. Adicionar 700µl de "Membrane Washing Solution" y centrifugar a 13.000rpm por 1 minuto. Descartar el líquido y reinsertar la columna en el tubo de colección.
6. Repetir el paso anterior con 500µl y centrifugar a 13.000rpm por 5 minutos.
7. Dejar secar el etanol residual de la columna por 1 minuto después del último lavado.
8. Eluir el producto en un nuevo tubo limpio utilizando agua libre de nucleasas. Se colocan 30µl en el centro de la columna, se centrifuga a 13.000rpm por 1 minuto, y luego se pipetea los mismos 30µl eluidos y se vuelven a adicionar al centro de la columna y se centrifugan de nuevo, para obtener un mayor rendimiento.

K. Marcaje de la sonda de ADNc.

1. Concentrar 2µg de ADNc a un volumen de 5,4µl, y adicionar 2µl de nonúmeros aleatorios (Invitrogen) (110ng/µl). Denaturar 3 minutos a 95°C en un termociclador. Mantener en hielo por 2 minutos.
2. Adicionar la siguiente mezcla a cada tubo: 1.2µl de Exonuclease-Free Klenow Reaction Buffer 10X, 1.2µl de dNTPs*, 1.2 µl de Exonuclease-Free Klenow Fragment Enzyme (10U) y 1.0µl de Cy3-dUTP ó Cy5-dUTP (GE Healthcare, anteriormente Amersham Bioscience).
*Preparación de los dNTPs: dATP, dGTP y dCTP 2mM cada uno, DTTP 1.6mM.
3. Mezclar bien y centrifugar el tubo de reacción.
4. Incubar el tubo a 37°C durante 1 hora y media en un termociclador.
5. Limpiar el producto de marcaje utilizando el protocolo J.
6. Adicionar 20µg de ADN de esperma de salmón (GE Healthcare, anteriormente Amersham Bioscience) y 10µg de Polyadenylic acid-Polyuridylic acid sodium salt (Sigma-Aldrich).
7. Reducir el volumen de ADNc marcado a 25 µl mediante un SpeedVac.

L. Prehibridización del microarreglo

1. Lavar las láminas en SDS al 0,2% para retirar las moléculas que no se fijaron a la lámina.
2. Incubar las láminas a 55°C durante 45 minutos en la solución de prehibridización (BSA 1%, SSC5X, y SDS 0,1%).
3. Lavar las láminas en agua destilada y repetir cuatro veces, lavar una vez en isopropanol.
4. Secar las láminas centrifugando 5 minutos a 850rpm. Hibridizar inmediatamente.

M. Hibridización

1. Ajustar el ADNc marcado a 25 µl.
2. Adicionar 25 µl de buffer de hibridización2x (formamida 50%, SSC 10x y SDS 0,2%).
3. Incubar 3 minutos a 95°C y luego mantener en hielo en oscuridad.
4. Hacer un spin a los tubos y homogeneizar la solución por pipeteo.
5. Colocar el microarreglo en la cámara de hibridización y colocar la laminilla.

6. Adicionar la solución pipetando suavemente al borde de la laminilla.
7. Humedecer la cámara con buffer de hibridización 1x.
8. Incubar durante 16 horas a 42°C.
9. Transcurrido este tiempo hacer un lavado a 55°C durante 5 minutos con la solución de lavado 1 (SSC 2%, SDS 1%).
10. Hacer dos lavados con la solución de lavado 2 (SSC1%) durante 5 minutos.
11. Hacer un lavado final con la solución de lavado 3 (SSC0,1%)
12. Secar las láminas centrifugando 5 minutos a 850rpm.

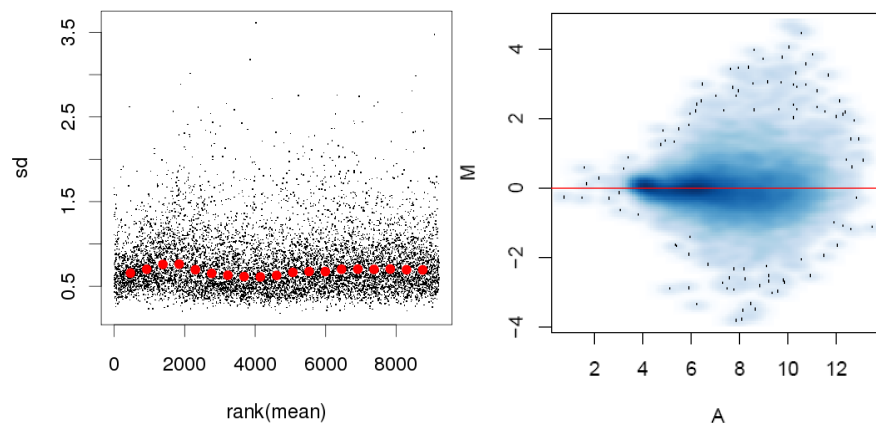


Figura 1. Tendencia esperada para los datos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramovitch, R.B., Janjusevic, R., Stebbins, C.E., & Martin, G.B. (2006). Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 2851-2856.
- Alfano, J.R., & Collmer, A. (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *Journal of bacteriology* *179*, 5655-5662.
- Alfano, J.R., & Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual review of phytopathology* *42*, 385-414.
- Alfano, J.R., Charkowski, A.O., Deng, W.L., Badel, J.L., Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K., & Collmer, A. (2000). The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 4856-4861.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vaillau, F., Baud, C., Gentzmittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C., & Genin, S. (2006). *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 14620-14625.
- Bart, R.S., Chern, M., Vega-Sanchez, M.E., Canlas, P., & Ronald, P.C. (2010). Rice Snl6, a cinnamoyl-CoA reductase-like gene family member, is required for NH1-mediated immunity to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *PLoS Genet* *6*.
- Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Svatos, A., Schneider, B., Doubsky, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., *et al.* (2009). A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science (New York, NY)* *323*, 101-106.
- Bell, A.A. (1970). 4-hydroxybenzaldehyde and vanillin as toxins formed in leaf wound sap of *Phaseolus lunatus*. *PHYTOPATHOLOGY* *60*, 161-165.
- Block, A., Li, G., Fu, Z.Q., and Alfano, J.R. (2008). Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current opinion in plant biology* *11*, 396-403.
- Block, A. Guo, M. Li, G. Elowsky, C. Clemente, T. E. Alfano, J. R. (2010). The *Pseudomonas syringae* type III effector HopG1 targets mitochondria, alters plant development and suppresses plant innate immunity. *Cell Microbiol* *12*,318-330.
- Boher, B., Kpemoua, K., Nicole, M., Luisetti, J., & Geiger, J. (1995). Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*: Cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. *Phytopathology* *85*, 777-788.
- Boher, B., Nicole, M., Potin, M., & Geiger, J.P. (1997). Extracellular polysaccharides from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* interact with cassava cell walls during pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* *10*, 803-811.
- Bonas, U., Stall, R.E., & Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet* *218*, 127-136.
- Braun, L., Nato, F., Payrastra, B., Mazie, J.C., & Cossart, P. (1999). The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Mol Microbiol* *34*, 10-23.

Buttner, D., & Bonas, U. (2002). Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *Embo J* *21*, 5313-5322.

Buttner, D., Gurlebeck, D., Noel, L.D., & Bonas, U. (2004). HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Molecular microbiology* *54*, 755-768.

Buttner, D., Lorenz, C., Weber, E., & Bonas, U. (2006). Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular microbiology* *59*, 513-527.

Buttner, D., Noel, L., Stuttmann, J., & Bonas, U. (2007). Characterization of the nonconserved hpaB-hrpF region in the hrp pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Plant Microbe Interact* *20*, 1063-1074.

Castiblanco, L. (2009). Characterization of PthB, a novel AvrBs3-like effector protein from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. (Bogotá, D.C., Universidad de los Andes).

Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G., & Ausubel, F.M. (2009). Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science (New York, NY)* *323*, 95-101.

Curtis, J. (1986). *Microtecnia vegetal (Mexico)*.

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

Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.M., Teh, T., Wang, C.I., Ayliffe, M.A., Kobe, B., & Ellis, J.G. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 8888-8893.

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

Dow, M., Newman, M.A., & von Roepenack, E. (2000). The Induction and Modulation of Plant Defense Responses by Bacterial Lipopolysaccharides. *Annual review of phytopathology* *38*, 241-261.

FAO (2008). Yuca para la seguridad alimentaria y energética. <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2008/1000899/index.html>

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

Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* *5*, R80.

Gohre, V., & Robatzek, S. (2008). Breaking the Barriers: Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity. *Annual review of phytopathology* *46*.

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

Gonzalez, C., Restrepo, S., Tohme, J., & Verdier, V. (2002). Characterization of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by PCR-based DNA fingerprinting techniques. *FEMS microbiology letters* *215*, 23-31.

Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M., & Dangl, J.L. (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annual review of microbiology* *60*, 425-449.

Gueneron, M., Timmers, A.C., Boucher, C., & Arlat, M. (2000). Two novel proteins, PopB, which has functional nuclear localization signals, and PopC, which has a large leucine-rich repeat domain, are secreted through the hrp-secretion apparatus of *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* **36**, 261-277.

Hahne, F., Huber, W., Gentleman, R., & Falcon, S. (2008). *Bioconductor Case Studies* (New York, Springer).

Hauck, P., Thilmony, R., & He, S.Y. (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8577-8582.

Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K., & Mudgett, M.B. (2003). Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Molecular microbiology* **50**, 377-389.

Huber, W., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Poustka, A., & Vingron, M. (2002). Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics (Oxford, England)* **18 Suppl 1**, S96-104.

Ibdah, M., Chen, Y.T., Wilkerson, C.G., & Pichersky, E. (2009). An aldehyde oxidase in developing seeds of *Arabidopsis* converts benzaldehyde to benzoic Acid. *Plant physiology* **150**, 416-423.

Jelenska, J. Yao, N. Vinatzer, B. A. Wright, C. M. Brodsky, J. L. Greenberg, J. T. (2007). A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. *Current Biology* **17**, 499-508.

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

Jones, L., Ennos, A.R., & Turner, S.R. (2001). Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant J* **26**, 205-216.

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

Kajava, A.V., Anisimova, M., & Peeters, N. (2008). Origin and Evolution of GALA-LRR, a New Member of the CC-LRR Subfamily: From Plants to Bacteria? *PLoS ONE* **3**, e1694.

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

Kay, S., & Bonas, U. (2009). How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Current opinion in microbiology*.

Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., & Bonas, U. (2007). A Bacterial Effector Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Cell Size Regulator. *Science (New York, NY)* **318**, 648-651.

Keshavarzi, M., Soyulu, S., Brown, I., Bonas, U., Nicole, M., Rossiter, J., & Mansfield, J. (2004). Basal defenses induced in pepper by lipopolysaccharides are suppressed by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 805-815.

Kim, J.G., Li, X., Roden, J.A., Taylor, K.W., Aakre, C.D., Su, B., Lalonde, S., Kirik, A., Chen, Y., Baranage, G., *et al.* (2009). *Xanthomonas* T3S Effector XopN Suppresses PAMP-Triggered Immunity and Interacts with a Tomato Atypical Receptor-Like Kinase and TFT1. *Plant Cell* **21**, 1305-1323.

Kim, J.G., Park, B.K., Yoo, C.H., Jeon, E., Oh, J., & Hwang, I. (2003). Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp Pathogenicity Island. *Journal of bacteriology* *185*, 3155-3166.

Kim, J.G., Taylor, K.W., Hotson, A., Keegan, M., Schmelz, E.A., & Mudgett, M.B. (2008). XopD SUMO Protease Affects Host Transcription, Promotes Pathogen Growth, and Delays Symptom Development in *Xanthomonas*-Infected Tomato Leaves. *Plant Cell* *20*, 1915-1929.

Kobe, B., & Kajava, A.V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current opinion in structural biology* *11*, 725-732.

Kpemoua, K., Boher, B., Nicole, M., Calatayud, P., & Geiger, J.P. (1996). Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Can J Microbiol* *42*, 1131-1143.

Kraus, J.E., de Sousa, H.C., Rezende, M.H., Castro, N.M., Vecchi, C., & Luque, R. (1998). Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials. *Biotech Histochem* *73*, 235-243.

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

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

López, C., Restrepo, S., & Verdier, V. (2007). LIMITACIONES DE LA BACTERIOSIS VASCULAR DE YUCA: NUEVOS AVANCES Limitations of Cassava Bacterial Blight: New Advances. *Acta Biol Col* *11*, 21-45.

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

Lorenz, C., Kirchner, O., Egler, M., Stuttmann, J., Bonas, U., & Buttner, D. (2008a). HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Molecular microbiology* *69*, 344-360.

Lorenz, C., Schulz, S., Wolsch, T., Rossier, O., Bonas, U., & Buttner, D. (2008b). HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *PLoS Pathog* *4*, e1000094.

Lozano, J.C., Bellotti, A., Reyes, J.A., Howeler, R., Leihner, D., & Doll, J. (1981). Fileds problems in Cassava (Cali).

Marois, E., Van den Ackerveken, G., & Bonas, U. (2002). The xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol Plant Microbe Interact* *15*, 637-646.

Mukherjee, S. (2006). Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science (New York, NY)* *312*, 1211-1214.

Murata, Y., Tamura, N., Nakaho, K., & Mukaihara, T. (2006). Mutations in the *lrpE* gene of *Ralstonia solanacearum* affects Hrp pili production and virulence. *Mol Plant Microbe Interact*. NCBI (2010, Nov). Genome. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>

Noel, L., Thieme, F., Nennstiel, D., & Bonas, U. (2002). Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the hrp pathogenicity island. *Journal of bacteriology* *184*, 1340-1348.

Nomura, K., Debroy, S., Lee, Y.H., Pumphlin, N., Jones, J., & He, S.Y. (2006). A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science (New York, NY)* *313*, 220-223.

- O'Brien, T.P., Feder, N., & McCully, M.E. (1965). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368–373.
- Olsen, K.M., & Schaal, B.A. (1999). Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5586-5591.
- Pallen, M.J., & Wren, B.W. (2007). Bacterial pathogenomics. *Nature* 449, 835-842.
- Pinzón, D., Trujillo, C., Koebnik, R., Restrepo, S., & Bernal, A. (2009). Characterization of a subset of effector proteins from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* using transient expression and targeted mutagenesis (Bogotá, D.C., Universidad de los Andes).
- Pomar, F., Merino, F., & Barcelo, A.R. (2002). O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma* 220, 17-28.
- Quackenbush, J. (2002). Microarray data normalization and transformation. *Nature genetics* 32 Suppl, 496-501.
- R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing (Vienna, R Foundation for Statistical Computing).
- Reilly, K., Bernal, D., Cortes, D.F., Gomez-Vasquez, R., Tohme, J., & Beeching, J.R. (2007). Towards identifying the full set of genes expressed during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant molecular biology* 64, 187-203.
- Reimers, P.J., & Leach, J.E. (1991). Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene Xa-10 in rice (*Oryza sativa*) involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. *Physiol Mol Plant Pathol* 38, 39-55.
- Restrepo, S., Duque, M.C., & Verdier, V. (2000a). Characterization of pathotypes among isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Plant Pathology* 49, 680-687.
- Restrepo, S., Myers, K.L., del Pozo, O., Martin, G.B., Hart, A.L., Buell, C.R., Fry, W.E., & Smart, C.D. (2005). Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* & *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Mol Plant Microbe Interact* 18, 913-922.
- Restrepo, S., Velez, C.M., & Verdier, V. (2000b). Measuring the Genetic Diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Within Different Fields in Colombia. *PHYTOPATHOLOGY* 90, 683-690.
- Restrepo, S., & Verdier, V. (1997). Geographical Differentiation of the Population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Appl Environ Microbiol* 63, 4427-4434.
- Romer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U., & Lahaye, T. (2007). Plant Pathogen Recognition Mediated by Promoter Activation of the Pepper Bs3 Resistance Gene. *Science* (New York, NY) 318, 645-648.
- Saijo, Y., & Schulze-Lefert, P. (2008). Manipulation of the eukaryotic transcriptional machinery by bacterial pathogens. *Cell host microbe* 4, 96-99.
- Simpson A. J. G., Reinach F.C., Arruda P., Abreu F. A. , Acencio M., Alvarenga R. , L. M. C. Alves, J. E. Araya, G. S. Baia, C. S. Baptista, et al. (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406, 151-159.
- Sugio, A., Yang, B., & White, F.F. (2005). Characterization of the hrpF pathogenicity peninsula of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* 18, 546-554.

Sugio, A., Yang, B., Zhu, T., & White, F.F. (2007). Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes OsTFIIA $\{\gamma\}$ 1 and OsTFX1 during bacterial blight of rice. *PNAS* *104*, 10720-10725.

Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., and Katagiri, F. (2003). Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* *15*, 317-330.

Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Buttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., *et al.* (2005). Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *Journal of bacteriology* *187*, 7254-7266.

Trujillo, C. (2008). Generación y validación de mutantes para el estudio de genes asociados a virulencia y patogenicidad en *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* (Bogotá, D.C., Universidad de los Andes).

Tusher, V.G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *98*, 5116-5121.

Underhill, D.M., & Ozinsky, A. (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current opinion in immunology* *14*, 103-110.

Van der Biezen, E.A., & Jones, J.D. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in biochemical sciences* *23*, 454-456.

Van Sluys, M.A., Monteiro-Vitorello, C.B., Camargo, L.E., Menck, C.F., Da Silva, A.C., Ferro, J.A., Oliveira, M.C., Setubal, J.C., Kitajima, J.P., & Simpson, A.J. (2002). Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annual review of phytopathology* *40*, 169-189.

Verdier, V. (2002). Bacteriosis vascular (o añublo bacteriano) de la yuca causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. In *La yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*, P. Ospina, H. Ceballos, E. Alvarez, A. Bellotti, L. Calvert, B. Arias, L. Cadavid, L. Pineda, R. Llano, & M. Cuervo, eds. (Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)), pp. 148 - 159.

Verdier, V., Boher, B., Maraite, H., & Geiger, J.P. (1994). Pathological and Molecular Characterization of *Xanthomonas campestris* Strains Causing Diseases of Cassava (*Manihot esculenta*). *Appl Environ Microbiol* *60*, 4478-4486.

Verdier, V., Cuny, G., Assigbétsé, K., Geiger, J.P., & Boucher, C. (1996). Characterization of pathogenicity gene pthB in *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Paper presented at: 8th International Congress on Plant-Microbe Interactions, July (Knoxville, TN).

Viboud, G.I., & Bliska, J.B. (2005). *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* *59*, 69-89.

Wydra, K., Zinsou, V., Jorge, V., & Verdier, V. (2004). Identification of pathotypes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Africa and detection of quantitative trait loci and markers for resistance to bacterial blight of cassava. *Phytopathology* *94*, 1084-1093.

Xu, R.-Q., Blanvillain, S., Feng, J.-X., Jiang, B.-L., Li, X.-Z., Wei, H.-Y., Kroj, T., Lauber, E., Roby, D., Chen, B., *et al.* (2008). AvrACXcc8004, 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. *J Bacteriol* *190*, 343-355.

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*, 10503-10508.

Yang, B., & White, F.F. (2004). Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. *Mol Plant Microbe Interact* 17, 1192-1200.