UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

VALIDACIÓN FUNCIONAL DEL GEN DE RESISTENCIA CANDIDATO DE YUCA A BACTERIOSIS VASCULAR *RXam2* POR ARN DE INTERFERENCIA

Juan Camilo Ochoa Cabezas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2011

VALIDACIÓN FUNCIONAL DEL GEN DE RESISTENCIA CANDIDATO DE YUCA A BACTERIOSIS VASCULAR *RXam2* POR ARN DE INTERFERENCIA

Juan Camilo Ochoa Cabezas

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

Magister en Ciencias - Biología

Director: Camilo Ernesto López Carrascal

Ph.D

Línea de Investigación en Genética

Grupo de Investigación: Manihot Biotec

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología

Bogotá, Colombia

2011

Agradecimientos

Primero que todo quiero agradecer al Profesor Camilo E López por su importante apoyo, colaboración y críticas constructivas durante todas las etapas de la investigación. También quiero agradecerle por su inagotable paciencia, lo cual me ha permitido desarrollar esta investigación de la mejor forma posible de acuerdo con las condiciones que tenemos.

También quiero agradecer al grupo de transformación genética de yuca del CIAT encabezados por Paúl Chavarriaga y Joe Tohme. Todos sus integrantes me enseñaron y colaboraron de forma amable y desinteresada durante todo el proceso en cultivo de tejidos y transformación genética de Yuca. Entre ellos quiero hacer un agradecimiento especial a Janeth Ladino por su apoyo en la fase de regeneración de plantas transgénicas y a Mónica Prías, quién me ayudó enormemente con la técnica Southern Blot.

A los demás integrantes del grupo Manihot-Biotec, a quienes les agradezco también su constante apoyo durante todo el proceso de investigación y al seguimiento, ideas y críticas constructivas que nutrieron enormemente la investigación y el contenido del trabajo.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación del proyecto de investigación.

A la profesora Margarita Perea por su apoyo y colaboración durante la fase de cultivo de tejidos vegetales.

A la compañía australiana CSIRO por proveer amablemente los vectores de silenciamiento utilizados durante la investigación.

Finalmente quiero agradecer a mi familia y amigos, pero especialmente a mis padres, de quienes recibí todo el apoyo y ánimo que me dieron ánimo en los momentos críticos de este proceso.

Resumen

La bacteriosis vascular es una de las enfermedades más importantes que atacan el cultivo de yuca y es causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis (*Xam*). *RXam2* es un gen que codifica una proteína de tipo NBS-LRR que se encuentra asociado a un QTL que explica el 62% de la resistencia a la cepa de *Xam* CIO151. Previamente fragmentos de 618pb de este gen fueron clonados en el vector de silenciamiento pHellsgate12, el cual es compatible con la tecnología Gateway®. Este vector contiene insertos del gen a silenciar en sentido y antisentido separados por un intrón, lo que producirá silenciamiento génico mediado por ARN de doble cadena. Esta construcción fue transformada en *A. tumefaciens* y posteriormente en plantas de yuca de la variedad 60444 con el fin de silenciar *RXam2*. En total se obtuvieron cinco plantas transgénicas de las cuales se presenta la caracterización de dos de ellas, debido a que presentaron anormalidades probablemente causadas por efectos pleiotrópicos del silenciamiento. Las plantas transgénicas se distinguieron por tener crecimiento lento y reducido, dificultad en la micropropagación, tallos más delgados y hojas más pequeñas. Estas además presentaron una disminución en la expresión del gen que codifica para la enzima fenilalanina amonio liasa, el cual es comúnmente expresado en las respuestas de defensa. Aunque las plantas silenciadas no mostraron una susceptibilidad estadísticamente significativa a la infección por el patógeno, si se observaron algunas diferencias visuales en la intensidad y rapidez en la aparición de síntomas en las plantas transgénicas silenciadas. Estos resultados sugieren que *RXam*2 es un gen involucrado en la resistencia a *Xam* CIO151. Además de la cepa CIO151, se realizaron análisis preliminares de evaluación de patotipos para determinar si las cepas actuales corresponden a patotipos diferentes y poder estudiar en posteriores trabajos si *RXam*2 está involucrado en la resistencia a algunas de estas cepas.

Palabras Claves: Silenciamiento, Defensa, Resistencia, Virulencia, Patotipos

Abstract

Cassava bacterial blight (CBB) is one of the most important diseases affecting cassava (*Manihot esculenta* Crantz), and is caused by the gram-negative bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis (*Xam*). *RXam2* is a resistance gene candidate that codes for a protein containing the NBS-LRR domains and it is associated to a QTL explaining 62% of the resistance to *Xam* strain CIO151. We previously cloned fragments of 618bp from *RXam2* into pHellsgate12, an ihpRNA silencing vector that is compatible with gateway® system. pHellsgate12 contains the sequences sense and antisense spliced by an intron that will produce gene silencing mediated by double stranded RNA. This construction was transformed in *Agrobacterium tumefaciens* and subsequently in cassava plants cultivar 60444 to silence *RXam2*. We obtained five transgenic plants but only two were described here, probably caused by the abnormalities due to pleiotropic effects caused by silencing. Transgenic plants showed slower growth, difficulties in in-vitro propagation, thinner shoots and smaller leaves compared with control plants. Inoculated transgenic plants showed a reduction in the expression of Phenylalanine ammonia-lyase gene that is commonly expressed during cassava defense responses. Even though the transgenic plants didn´t showed a statistically significant increased susceptibility, together these results indicate that *RXam*2 is involved in resistance to *Xam* strain CIO151. We also conducted pathotypic analysis of recent Xam strains to select new haplotypes of Xam that can be used in subsequent works with silenced transgenic plants and test the effect of *RXam2* against new *Xam* strains.

Key Words: Silencing, Defense, Resistance, Pathotypes, Virulence.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **VII**

Lista de Figuras ..... **XI**

Lista de Tablas ..... **XIII**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XV**

1. Objetivos **17**
1.1 Objetivo General 17
1.2 Objetivos específicos 17

2. Marco Teórico **19**

3. Materiales y Métodos **33**
3.1 Material Vegetal 33
3.2 Transformación de plantas de yuca 33
3.2.1 Embriogénesis Somática 33
3.2.2 Producción de Callo Embriogénico Friable 34
3.2.3 Transformación de CEF de yuca por medio de *Agrobacterium tumefaciens* 34
3.2.3.1 Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* .. 34
3.2.3.2 Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* 35
3.2.3.3 Elaboración del co-cultivo de CEF de yuca y *Agrobacterium tumefaciens* 35
3.2.3.4 Selección y regeneración de plantas de yuca a partir de CEF transgénico 36
3.3 Confirmación molecular de plantas transgénicas putativas de yuca y ensayos de expresión 37
3.3.1 Extracción de ADN de plantas de Yuca 37
3.3.2 PCR 37
3.3.3 Southern Blot 38
3.3.4 Extracción de ARN 38
3.3.5 Síntesis de ADNc 39
3.4 Evaluación de resistencia/susceptibilidad en las plantas transgénicas y determinación de patotipos. 39

4. Resultados **41**

4.1 Transformación genética del cultivar 60444 con la construcción *RXam2*: pHellsgate12 41
4.2 Determinación de la transformabilidad genética de los cultivares BRA685 y SG107-35 42
4.2.1 Evaluación de la embriogénesis primaria y la embriogénesis cíclica de BRA685 y SG107-35 42
4.2.2 Evaluación de la producción de CEF 44
4.2.3 Transformación de CEF de BRA685 45
4.3 Evaluación molecular de plantas transgénicas de yuca por PCR 46
4.4 Evaluación molecular de plantas transgénicas de yuca por southern blot 50
4.5 Evaluación de la expresión del cassette de silenciamiento y *RXam*2 en plantas transgénicas por RT-PCR 51
4.5.1 RT-PCR de *nptII* y *RXam2* sobre ARN plantas transgénicas in vitro 51
4.5.2 RT-PCR de *nptII* y *RXam2* sobre ARN de plantas transgénicas en invernadero 54
4.6 Evaluación del progreso de la infección en plantas transgénicas de yuca en invernadero 58
4.7 Evaluación de Patotipos en Nuevos Aislamientos. 60

5. Discusión 63

6. Conclusiones y recomendaciones 69

7. Bibliografía 71

Lista de Figuras

Pág.

Figura 4-1: ADN-T del constructo RXam2-Hellsgate..... 41
Figura 4-2: Embriones somáticos primarios obtenidos en medio MS2 con Picloram 12mg/l en los tres cultivares evaluados..... 43
Figura 4-3: Clúster de inducción de CEF en BRA685. 45
Figura 4-4: Plantas transgénicas putativas provenientes de los genotipos BRA685 y TMS60444..... 45
Figura 4-5: Extracciones de ADN de las plantas transgénicas putativas de yuca del genotipo 60444..... 46
Figura 4-6: PCR de tubulina sobre extracciones de ADN de plantas transgénicas..... 46
Figura 4-7: PCR de nptII sobre extracciones de ADN de plantas transgénicas..... 47
Figura 4-8. PCR de *RXam2*: Hellsgate sentido sobre extracciones de ADN de plantas transgénicas. 48
Figura 4-9. Evaluación Molecular de plantas transgénicas putativas restantes de 6044449
Figura 4-10: Evaluación por southern blot de plantas transgénicas seleccionadas..... 50
Figura 4-11: ARN total de hojas de plantas transgénicas in vitro..... 51
Figura 4-12: PCR control de ADNasa y RT-PCR de tubulina de ARN de hojas de plantas transgénicas in vitro 52
Figura 4-13: RT-PCR de *nptII* sobre ARN de hojas de plantas transgénicas in vitro..... 53
Figura 4-14: RT-PCR de un fragmento *RXam2* contenido en el inserto de silenciamiento sobre ARN de hoja de plantas transgénicas in vitro. 53
Figura 4-15: RT-PCR de un fragmento *RXam2* contenido en el inserto de silenciamiento sobre ARN de hoja de plantas transgénicas in vitro 54
Figura 4-16: Morfología en invernadero de las plantas transgénicas..... 55
Figura 4-17: Extracción de ARN de plantas transgénicas en invernadero 55
Figura 4-18: RT-PCR de tubulina para verificar síntesis de ADNc a partir de ARN de plantas transgénicas inoculadas en invernadero..... 56
Figura 4-19: RT-PCR de tubulina para estandarización y realización de PCR semicuantitativo..... 56
Figura 4-20: RT-PCR de *nptII* y *RXam2* sobre muestras seleccionadas de plantas transgénicas de invernadero 57
Figura 4-21: RT-PCR de *PAL* sobre de plantas transgénicas de invernadero inoculadas con Xam CIO151..... 58

Figura 4-22: Promedio AUDPC de plantas transgénicas comparadas con plantas no transgénicas durante la infección con *Xam* CIO151 59
Figura 4-23: Síntomas observados en plantas transgénicas comparados con los observados en la no transgénicas en invernadero. 59
Figura 4-24: Comparación de Medias de AUDPC de todos los aislamientos en los distintos cultivares. 61

Lista de Tablas

Pág.

Tabla 3-1. Cebadores utilizados durante el estudio. 38
Tabla 4-1: Porcentaje de yemas axilares embriogénicas durante la embriogénesis primaria 43
Tabla 4-2: Porcentaje de yemas axilares embriogénicas durante la embriogénesis primaria de BRA685 y SG107-35 con las hormonas dicamba y 2,4-D. 44
Tabla 4-3: Determinación de la resistencia/susceptibilidad a nuevos haplotipos de Xam. 60

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
2,4 D	Ácido 2,4 - Diclorofenoxiacético
ADN	Ácido Deoxiribonucleico
ADNc	Ácido Deoxiribonucleico Complementario
ADN-T	ADN de Transferencia
ANA	Ácido Naftalén-Acético
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNi	Ácido Ribonucleico de Interferencia
AUDPC	Area Under Disease Progress Curve (Área bajo la curva de progreso de la enfermedad)
BAP	Bencil Amino-Purina
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cat	Catalase
CEF	Callo Embriogénico Friable
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
DEPC	Diethyl-Pirocarbonate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GA_3	Gibberellic Acid 3
GD	Gresshoff and Doy
IBA	Indole-3-butyric Acid

LB	Luria-Bertani
MATAB	Mixed Alkyl-Trimethyl Ammonium Bromide
MS	Murashige & Skoog
nptII	Neomycin phosphotransferase II
NT	No Transgénico
OD	Optic Density
PAL	Phenylalanine Ammonia-Lyase
PCR	Polymerase Chain Reaction
pdk	Pyruvate Dehydrogenase Kinase
ppm	Partes Por Millón
RGC	Resistance Gene Candidate
RT-PCR	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium dodecyl sulphate
T	Transgénico
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
UFC	Unidades formadoras de Colonia
Xam	*Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis
YEP	Yeast Extract Peptone
YEPA	Yeast Extract Peptone Agar

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar la función que desempeña el gen candidato de resistencia *RXam2* en plantas transgénicas de yuca por medio de la tecnología del ARN de interferencia (ARNi) en respuesta a la infección por *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis.

1.2 Objetivos específicos

- Establecer una metodología de silenciamiento génico en yuca para validación funcional de genes por medio de transformación genética estable mediada por *Agrobacterium tumefaciens.*
- Determinar la posibilidad de transformación de dos variedades de yuca altamente resistentes a bacteriosis vascular.
- Evaluar la resistencia que confiere el gen candidato de resistencia *RXam2* a la cepa de *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis CIO151. En plantas con expresión reducida del gen de resistencia candidato en la variedad 60444.
- Determinar los patotipos a partir de haplotipos de *Xam* aislados en los últimos dos años con el fin de ver a futuro si *RXam2* está implicado con la resistencia a nuevos aislamientos.

2. Marco Teórico

La seguridad alimentaria es una de las mayores preocupaciones mundiales en la actualidad, en especial en países subdesarrollados. Además de las razones sociopolíticas que enmarcan este problema, la limitación más importante para asegurar la alimentación de la creciente población mundial es el déficit de producción provocado por las enfermedades causadas por patógenos, los cuales se estima pueden causar pérdidas hasta del 10% de la producción global de alimentos (Strange & Scott, 2005). Lo anterior ha conllevado a que se incrementen los estudios encaminados al entendimiento de los mecanismos de resistencia y defensa en las plantas con los que se pretenden combatir las enfermedades, enmarcados en un contexto ambientalista donde se espera reducir el uso de contaminantes agroquímicos.

Recientemente se han implementado tres tipos de estudios complementarios orientados al mejoramiento de los cultivos, uno de ellos consiste en el uso de marcadores moleculares que pueden ser empleados para la construcción de mapas genéticos que permiten la identificación y clonación de genes de interés y selección asistida para el desarrollo de variedades de plantas con altos niveles productivos, resistencia a patógenos y tolerancia a estrés abiótico. El segundo corresponde a los estudios que involucran genómica y bioinformática, con los cuales se pretende no solo el desarrollo de variedades vegetales con características agronómicas de interés, sino el entendimiento de los mecanismos organísmicos, celulares y moleculares por los cuales las plantas pueden responder de forma positiva a condiciones desfavorables tales como enfermedades causadas por patógenos o determinadas condiciones ambientales (Delmer, 2005; Goff & Salmeron, 2004). Finalmente el entendimiento de estos mecanismos ha permitido el desarrollo de cultivos transgénicos con características como resistencia a insectos a través de la introducción de genes como el caso del gen *cry* de

Bacillus thuringensis que confiere resistencia a insectos o del gen *bar* que confiere resistencia al herbicida PPT (Delmer, 2005). Igualmente bajo este tipo de aproximaciones ha sido posible incrementar el valor nutricional de los cultivos como ocurre en el caso del Golden Rice, el cual es un tipo de arroz con alto contenido de beta-caroteno, o incluso generar resistencia a patógenos virales por medio de ARN de interferencia en plantas en las que no hay genotipos naturalmente resistentes, como ocurre en cultivos de papaya que son afectados por el virus de la mancha anular (Delmer, 2005). Cabe mencionar que los diferentes tipos de aproximaciones investigativas mencionadas anteriormente no son excluyentes, por el contrario, es el complemento de las tres lo que permitirá generar una agricultura sostenible.

Los estudios moleculares en el área de la fitopatología que se han venido desarrollando a lo largo de las últimas décadas han profundizado en el conocimiento de los mecanismos naturales por los cuales las plantas responden a los distintos patógenos. Dichos mecanismos han sido diferenciados en dos ramas de inmunidad vegetal (Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006). El primero de ellos depende del reconocimiento de moléculas fundamentales para la viabilidad del patógeno y que en consecuencia son ampliamente distribuidas, altamente conservadas y de evolución lenta (Schwessinger & Zipfel, 2008). Estas moléculas son llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, *del inglés Pathogen-Associated Molecular Patterns*) y desencadenan la inmunidad inducida por PAMPs (PTI, *del inglés PAMP-Triggered Immunity*) que genera una respuesta de defensa temprana y de baja intensidad (Chisholm *et al.*, 2006). Entre las principales respuestas de defensa inducidas durante el reconocimiento de PAMPs se encuentran la inducción de cascadas de fosforilación mediadas por mitogen-activated protein kinases (MAPK), expresión de genes relacionados con patógenos (PR, *del inglés Pathogen-Related*), estallidos oxidativos, aumento de la concentración intracelular de iones de calcio y refuerzo de la pared celular entre otros (Abramovitch *et al.*, 2006; Nurnberger *et al.*, 2004).

Los principales PAMP encontrados hasta el momento son el péptido de 22 aminoácidos (aa) de la flagelina bacteriana flg22, el factor de elongación TU (elf18) y más recientemente el péptido sulfatado AX21 típico de *Xanthomonas spp* (Park et al., 2010). Estos PAMPs son reconocidos por las plantas por medio de receptores transmembranales llamados PRR (*del inglés Pattern Recognition Receptor*) o receptores

tipo kinasa (RLK, *del inglés Receptor Like Kinase*) que constan de un dominio extracelular de repeticiones ricas en leucina (LRR*, del inglés Leucin Rich Repeat*) y un dominio kinasa citoplasmático (Abramovitch *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006; Lee *et al.*, 2009). A pesar de que los PAMPs son moléculas altamente conservadas se ha encontrado variabilidad entre diferentes especies vegetales para los receptores FLS2 y EFR, que reconocen flg22 y elf18 respectivamente (Chisholm *et al.*, 2006). No obstante dichas funciones pueden estar desempeñadas por genes ortólogos en otras especies o simplemente estar restringidas a una especie, lo que evidencia la adaptabilidad de distintos PRRs para acoplarse a la diversidad microbiana (Schwessinger & Zipfel, 2008). En patosistemas que involucran la interacción con hongos se han reportado hasta el momento dos receptores de PAMPs. El primero de ellos fue encontrado en arroz y fue llamado CEBiP (*del inglés Chitin Elicitor Binding Protein*) dado que es capaz de unirse a la quitina y está involucrado en desencadenar respuestas de defensa inducidas por el reconocimiento de la quitina (Kaku *et al.*, 2006). Posteriormente se encontró el receptor de quitina CERK1 en Arabidopsis y se caracterizó por tener una estructura similar a CEBiP, pero con un dominio kinasa adicional (Miya *et al.*, 2007).

A pesar de que se ha observado que variaciones en los PAMP, incluso modificaciones postraduccionales, pueden permitir la evasión de la detección por los PRR, esta no es la principal forma por la cual los patógenos impiden la detección por parte de las plantas (Abramovitch *et al.*, 2006). Por esta razón han desarrollado sistemas por los cuales liberan moléculas que son esenciales para su multiplicación y posterior desarrollo de la enfermedad (Chisholm *et al.*, 2006). Entre los principales mecanismos desarrollados por bacterias se encuentran el sistema de secreción tipo II (T2SS, *del inglés Type 2 Secretion System*) que es usado fundamentalmente por fitopatógenos necrotróficos como *Erwinia carotovora* el cual le permite liberar enzimas degradadoras como celulasas y pectinasas para destruir rápidamente las paredes celulares del hospedero (Abramovitch *et al.*, 2006; Jha *et al.*, 2005). El sistema de secreción tipo cuatro (T4SS, *del inglés Type 4 Secretion System*) es usado por bacterias como *Agrobacterium tumefaciens* y permite la introducción del plásmido Ti (*del inglés Tumor Inducing*) en el genoma de las células infectadas para que se expresen genes involucrados en la síntesis de opinas y hormonas que le den ventaja exclusiva a este patógeno sobre la planta hospedera (Abramovitch *et al.*, 2006; McCullen & Binns, 2006). Finalmente el sistema se secreción tipo tres (T3SS) es el más estudiado e importante mecanismo por el cual las bacterias fitopatógenas

suprimen la PTI por parte de su hospedero. El T3SS actúa como una jeringa que atraviesa la membrana y la pared de la célula vegetal inyectando moléculas llamadas efectores, cuya principal función es bloquear las respuestas de defensa y los mecanismos de resistencia por medio de la alteración de las condiciones fisiológicas de las plantas susceptibles (Alfano & Collmer, 2004; Cornelis, 2006). El T3SS es propio de bacterias gram-negativas y está estructural y filogenéticamente relacionado con el flagelo (Cornelis, 2006). Otros organismos como hongos y oomicetes son capaces de secretar moléculas efectoras a través de un peg de penetración generado por un haustorio y aunque no se conoce muy bien el mecanismo, los efectores en cualquier caso deben ser introducidos al citoplasma de la célula vegetal (Kamoun, 2006).

Algunas de las actividades enzimáticas conocidas de los efectores encontrados son de crucial importancia para impedir la PTI como es el caso del efector AvrPto de *Pseudomonas syringae* que interactúa con el receptor FLS2 de forma directa antes de que se active la cascada de fosforilación de las MAPK (He *et al.*, 2006; Xiang *et al.*, 2008). Otras de las actividades enzimáticas reportadas de particular interés son las de la familia de efectores AvrBs3 encontrados en *Xanthomonas* spp. que están implicados en la activación de la transcripción de los genes del hospedero para el beneficio del patógeno. Esta actividad se logra gracias a la presencia de un dominio de localización nuclear (NLS, *del inglés Nuclear Localization Signal*) y un dominio acídico de la activación transcripcional (AAD, del inglés *Acidic transcripcional Activation Domain*) (Szurek *et al.*, 2002). Particularmente el efector AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria es capaz de activar genes reguladores del crecimiento celular causando hipertrofia para facilitar la colonización del hospedero (Kay *et al.*, 2007).

En respuesta a los efectores las plantas han desarrollado proteínas de resistencia que reconocen de manera altamente específica su presencia y activan fuertes respuestas de defensa, esta rama de la inmunidad es llamada inmunidad inducida por efectores (ETI *del inglés Effector Triggered Immunity*) (Bent & Mackey, 2007; Jones & Dangl, 2006). Los efectores reconocidos por las proteínas de resistencia son llamados proteínas de avirulencia y resultan en una interacción incompatible entre el hospedero y el patógeno (Dangl & Jones, 2001; Nurnberger *et al.*, 2004).

A pesar de las grandes diferencias entre los linajes de patógenos que atacan a las plantas (virus, bacterias, hongos, oomicetes y nemátodos) y los efectores que estos poseen, las proteínas de resistencia tienen estructuras con dominios altamente conservados (Lopez, 2007). Entre los más frecuentes se encuentran el dominio de unión a nucleótido (NB, *del inglés Nucleotide Binding*) y el LRR. El dominio NB está implicado en la unión e hidrólisis de ATP o GTP y en consecuencia es el posible responsable de activar las cascadas de señalización (Takken *et al.*, 2006). El dominio LRR funciona como sitio de interacción proteína-proteína, péptido ligando y proteína carbohidrato, otros estudios han mostrado que también está involucrado en la autorregulación del dominio NB (Jones & Dangl, 2006; Takken *et al.*, 2006). El domino LRR presenta gran variabilidad y es quizás quién da especificidad a la proteína de resistencia, por lo cual estaría involucrado en el reconocimiento de proteínas del patógeno (Lopez, 2007). Las proteínas de resistencia NB-LRR además pueden tener asociados dominios Toll-Interleukin Receptors (TIR) o Coiled Coil (CC) hacia el extremo amino terminal. Otro dominio importante encontrado en las proteínas de resistencia es el WRKY involucrado en unión al ADN, por lo que son posibles activadores de la transcripción de genes implicados en defensa, por medio de la unión a las cajas W de los genes blanco (Bent & Mackey, 2007; Lopez, 2007).

Tal vez la pregunta de mayor interés y relevancia en la fitopatología molecular es ¿cómo reconocen las proteínas de resistencia a los efectores que generan avirulencia? Para responder a esta pregunta se han desarrollado dos hipótesis principales; la primera de ellas plantea que existe una interacción directa entre la proteína de resistencia y la proteína de avirulencia. El principal modelo que evidencia esta hipótesis ocurre en el patosistema de lino y la roya del lino causada por el hongo *Melamspora lini.* Se ha establecido mediante ensayos de doble híbrido, que las proteínas de resistencia L de lino pueden interactuar directamente con la proteínas de avirulencia AvrL567 de *Melamspora lini* (Bent & Mackey, 2007; Ellis *et al.*, 2007). Adicionalmente se ha puesto en evidencia que tanto genes *L* de lino como los genes *AvrL567* están sometidos a alta diversificación, por lo que presentan alto grado de polimorfismo (Ravensdale *et al.*, 2011). El segundo modelo de reconocimiento es conocido como gen guardián y consiste en que la detección de la proteína de avirulencia por parte de la proteína de resistencia es indirecta, por lo tanto se requieren proteínas adicionales. Un claro ejemplo de ello ocurre en la detección de los efectores AvrRpm1, AvrB y AvrRpt2 de *Pseudomonas syringae*. La

presencia de los dos primeros se detecta gracias a la presencia de la proteína de resistencia RPM1, sin embargo para ello se requiere que estos dos efectores fosforilen a la proteína RIN4 (*del inglés RPM1 interacting protein 4*), y a su vez dicha fosforilación sea detectada por RPM1 para que se activen las respuestas de defensa (Abramovitch *et al.*, 2006; Mackey *et al.*, 2002). Para la detección de AvrRpt2 se requiere la presencia del gen *RPS2*, el cual parece ser regulado negativamente por RIN4 dado que el reconocimiento solo ocurre cuando esta es degradada por AvrRpt2 y permite que la proteína RPS2 active las respuestas de defensa (Abramovitch *et al.*, 2006). De esta manera las proteínas de resistencia guardan o vigilan el estado de otra proteína de la planta, la cual es blanco de una modificación ejercida por los efectores sin que exista una interacción directa entre la proteína de resistencia y el efector. Otro ejemplo claro de este tipo de interacción ocurre en el patosistema tomate y *Pseudomonas syringae* pv. tomato en el cual el la proteína Pto actúa a manera de carnada y como un regulador negativo del gen de resistencia tipo NBS-LRR Prf. Cuando Pto interactúa con los efectores de avirulencia AvrPto o AvrPtoB permite que la proteína codificada por el gen Prf cambie su conformación y active las respuestas de defensa (Oh & Martin, 2010).

A pesar de los grandes esfuerzos que se han desarrollado para la investigación en fitopatología, la gran mayoría de los estudios se han realizado sobre patosistemas que involucran especies modelo como arroz, maíz, tomate, tabaco o Arabidopsis. Es por eso que es necesario aumentar los esfuerzos de investigación y trasladar el conocimiento obtenido en especies modelo hacia cultivos de alta relevancia a nivel mundial. Actualmente la yuca es uno de esos cultivos “huérfanos” que tienen una proyección enorme, principalmente por su potencial aplicación en la producción de biocombustibles.

La yuca, *Manihot esculenta* Crantz es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia *Euphorbiaceae* con reproducción sexual monoica, hábito arbustivo, simpodial y raíces capaces de almacenar grandes cantidades de carbohidratos (Cadavid, 2005). Este cultivo es de gran importancia en países tropicales donde se siembra en alturas que van desde 0 hasta 1800 m.s.n.m. (Ceballos, 2002). A nivel mundial la yuca se sitúa como el cuarto cultivo de mayor importancia en cuanto a fuente de calorías y como componente básico de la alimentación de alrededor de 1000 millones de personas en el mundo (FAO, 1998). Entre los principales usos de la yuca se destacan el consumo de hojas y raíces por parte de animales y humanos, la extracción de almidón para procesos industriales y

la producción de etanol para su potencial uso como biocombustible (Ceballos, 2002). Adicionalmente, la yuca es un cultivo que se destaca por su alta tolerancia a la sequía, capacidad de producción en suelos ácidos y degradados típicos de algunas regiones de países tropicales y la resistencia a diversas plagas y enfermedades (Cadavid, 2005).

A diferencia de otros cultivos de importancia como el maíz, arroz y el trigo, la yuca ha sido poco estudiada comparativamente en términos de fitomejoramiento debido a algunas de sus características genéticas y reproductivas. Entre las principales se encuentran su largo ciclo de vida, la alta heterocigocidad, su baja tasa de reproducción sexual por el bajo número de semillas fértiles que produce y la multiplicación asexual por estacas (Ceballos, 2002). La amplia utilización industrial de la yuca se ha visto limitada por la presencia de glucósidos cianogénicos que le pueden conferir determinados niveles de toxicidad, la falta de cultivares específicos para sus distintos usos y la poca duración postcosecha de las raíces frescas dado que no superan los siete días (Ceballos, 2002).

A pesar de que el cultivo de yuca tiende a ser resistente o tolerante a un diverso número de plagas y enfermedades, existen varias que lo afectan; entre las principales se destacan, la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*), el gusano cachón (*Erinnyis ello*), el virus del Mosaico Común de la Yuca (CCMD, *del inglés Cassava Common Mosaic Disease*) causado por el virus potex, la enfermedad del cuero de sapo causada por un virus hasta el momento parcialmente caracterizado y finalmente la bacteriosis o añublo vascular causado por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis (*Xam*) (Alvarez *et al.*, 2002; Calvert *et al.*, 2008).

La bacteriosis vascular de la yuca es una enfermedad muy importante en África y Latinoamérica, lugares en los cuales es endémica, alcanzando pérdidas hasta del 100% en la producción si las condiciones ambientales lo permiten y no se adoptan las prácticas agronómicas adecuadas (Alvarez *et al.*, 2002; Verdier, 2002). Los síntomas de la enfermedad son muy variables y van desde manchas angulares, quemazón y marchitamiento en las hojas, hasta la producción de exudados en el tallo y la muerte de la planta (Lozano, 1986; Verdier, 2002). El principal y mejor método de control consiste en cultivar variedades que sean resistentes y la siembra de estacas provenientes de plantas sanas. Sin embargo la mayoría de variedades resistentes no tienen características de interés agro-económico (Verdier, 2002). A lo largo de las últimas dos décadas se han desarrollado estudios que han permitido la caracterización del patógeno,

la enfermedad y la identificación de posibles genes de resistencia en plantas de yuca con el fin de tener un control óptimo del patógeno y desarrollar variedades resistentes que presenten mejores cualidades agronómicas y ganancias económicas.

Xanthomonas axonopodis pv. manihotis es una bacteria gram negativa con flagelo y características bioquímicas típicas de todas las xanthomonadas (Verdier, 2002). El proceso de infección inicia con la entrada de la bacteria en el mesófilo a través de los estomas o lesiones, posteriormente la infección se vuelve sistémica y la bacteria pasa a ocupar los haces vasculares de la planta (Lozano, 1986). Kpémoua *et al.,* (1996*)* a través de estudios de histoquímica encontraron que la diferencia en las respuestas de defensa entre plantas resistentes y susceptibles se encuentran en la variedad e intensidad de estas presentadas en los haces vasculares. Particularmente el incremento en la cantidad de compuestos fenólicos y la deposición de calosa que bloquean el movimiento de la bacteria en los haces vasculares resaltan en las variedades resistentes que presentan la infección. Dadas las diferencias en la velocidad de colonización de la bacteria y la gama de respuestas encontradas en variedades susceptibles, resistentes y tolerantes se considera que la resistencia es de tipo cuantitativo (Jorge & Verdier, 2002).

Debido a la alta heterocigocidad de la yuca y la variabilidad haplotípica de *Xam* se han elaborado estudios con el fin de conocer qué variedades de yuca son aptas para las distintas zonas edafoclimáticas de Colombia de acuerdo con los patotipos encontrados en cada una de ellas (López *et al.*, 2006). Particularmente los estudios de diversidad mediante el uso de la técnica RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) usando como sonda el gen de patogenicidad *pthb* han permitido discriminar filogenéticamente a los haplotipos encontrados a lo largo de las distintas zonas edafoclimáticas (Restrepo *et al.*, 2004; Restrepo *et al.*, 2000b). Adicionalmente estudios llevados a cabo mediante AFLPs y técnicas de PCR repetitivo han permitido tener tanto una mayor discriminación espacial a nivel de distintos países y zonas edafoclimáticas como una visión temporal de la estabilidad genético-poblacional del patógeno. Particularmente, Restrepo *et al*., (2004) a lo largo de 5 años de estudios poblacionales mediante marcadores moleculares logró determinar que las poblaciones de *Xam* son inestables y la variación puede ocurrir incluso en menos de un año. Por esta razón es indispensable conocer y monitorear continuamente las poblaciones del patógeno con el fin de seleccionar cepas que permitan mapear genes o grupos de genes

que confieran resistencia durable y permitan superar las altas tasas evolutivas del patógeno.

Además de estos estudios es de vital importancia dilucidar los mecanismos de resistencia y los genes que están involucrados dado que a medida que avanzan los ciclos de cultivo la enfermedad se vuelve más agresiva. Como parte de un gran proyecto encaminado a identificar regiones genómicas de yuca implicadas en la resistencia a la bacteriosis vascular, se utilizó la población con la que se construyó el primer mapa genético de yuca para identificar loci asociados a resistencia por medio de análisis de QTLs (*del inglés Quantitative Trait Loci*). Esto permitirá en un futuro aislar los genes responsables e introducirlos a nuevas variedades y de esta manera generar plantas con resistencia durable a través de los ciclos de cultivo (Jorge *et al.*, 2001; Jorge & Verdier, 2002; Lopez *et al.*, 2007).

El mapa genético de yuca fue inicialmente desarrollado por Fregene *et al*.,(1997) con el fin de encontrar QTLs que explicaran resistencia al virus del mosaico africano y características culinarias apreciadas. Para ello se desarrolló una población F1 de 90 individuos provenientes de parentales de los genotipos TMS30572 (MNGA2) y CM2177-2. Posteriores análisis sobre esta población permitieron identificar 12 QTLs asociados a cinco cepas de *Xam*, estos QTLs se analizaron con cepas caracterizadas en los estudios de Restrepo *et al*., (2000a; 2000b) pertenecientes a las distintas zonas edafoclimáticas colombianas (Jorge *et al.*, 2001; Jorge & Verdier, 2002). Entre ellos cabe destacar el QTL que explica el 13% de la resistencia a *Xam* CIO136 ubicado en el grupo de ligamiento X, dado que co-localiza con el gen *RXam1* (inicialmente llamado CBB1) el cual tiene un alto nivel de similitud al gen *Xa21* de arroz (Jorge *et al.*, 2000); (López *et al* observaciones no publicadas). Al igual que el gen de resistencia *Xa21*, *RXam1* posee un dominio STK y un dominio LRR pero solo posteriores estudios permitirán precisar la función de esta proteína (López *et al,* datos no publicados).

Con miras a buscar otros genes de resistencia implicados en la respuesta contra *Xam* López *et al.,*(2003) diseñaron distintos juegos de primers degenerados consenso sobre los dominios TIR y NB presentes en diversas proteínas de resistencia ya descritas lo que les permitió amplificar secuencias correspondientes a genes de resistencia candidatos (RGC, *del inglés Resistance Gene Candidate*). En ese estudio se encontraron 10 genes de tipo NB de los cuales solo el RGC 6 presentaba múltiples copias y hacía parte de una

gran familia génica. Por el contrario el resto de genes solo poseían hasta tres copias sugiriendo la presencia de genes de resistencia de baja copia o copia única (Lopez *et al.*, 2003). El hecho de determinar la presencia de genes de resistencia candidatos permitió desarrollar marcadores moleculares cercanos a estos para realizar nuevos estudios de mapeo genético con distintas cepas a las anteriormente evaluadas para saber si algunos de los RGC se encontraban en QTLs que explicaran resistencia a *Xam* (Lopez et al., 2007). Dos nuevos QTLs fueron encontrados pero solo uno de ellos, ubicado en el grupo de ligamiento U y asociado al mapeo del BAC 39P22 identificado por hibridación con la sonda proveniente del RGC7, explica el 61.6% de la resistencia a la cepa de *Xam* CIO151 y contiene un gen de resistencia candidato de tipo NB-LRR no TIR. El nuevo gen de resistencia candidato es llamado *RXam2* (Lopez et al., 2007).

Además de los dos genes de resistencia implicados en la interacción yuca-*Xam* se han reportado genes implicados en defensa diferencialmente expresados durante la infección identificados a través de la elaboración de colecciones de ESTs (del inglés expressed sequence tags) (Anderson *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2004), análisis por ADNc-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Santaella *et al.*, 2004) y la elaboración de un microarreglo de ADNc de yuca (Lopez *et al.*, 2005). Todos estos estudios han permitido la identificación de genes putativos de yuca implicados en la degradación de proteínas, estallidos oxidativos y genes PR.

A pesar de que los genes de resistencia candidatos encontrados en las distintas variedades co-localicen con QTLs que expliquen resistencia, solo la validación funcional de los mismos permitirá precisar su función. Una de las principales técnicas por las cuales se ha determinado la función de genes candidatos se da a través del análisis de librerías de mutantes o estudios de mutagénesis asistida (Axtell *et al.*, 2001). Sin embargo no para todas las plantas existen este tipo de recursos y por eso se debe recurrir a otro tipo de técnicas que permitan validar la función de los distintos genes sin la necesidad de caracterizar distintos mutantes. Otra forma importante de validación es la complementación con genes candidatos a través de transformación genética estable (Song *et al.*, 1995). Una de las desventajas de la validación por complementación es que se necesita tener clonado el gen completo y que muchas veces la función puede requerir de proteínas adicionales que pueden también estar ausentes en las plantas que no poseen la característica y no se encuentre el fenotipo esperado. Finalmente uno de los

métodos de gran interés que han permitido validar la función de los genes de resistencia se basa en el mecanismo de silenciamiento génico mediado por ARN antisentido o de doble cadena por el cual es posible silenciar genes específicos (Wesley *et al.*, 2001).

El mecanismo de silenciamiento génico se encuentra en todos los eucariotas y al parecer su función inicial fue como resistencia a virus, sin embargo también funciona como mecanismo para la regulación de la expresión génica endógena y protección contra elementos transponibles (Baulcombe, 2004). El mecanismo de silenciamiento se da a través de la generación de moléculas de ARN de doble cadena que es procesado por una ribonucleasa llamada DICER la cual corta el ARN en fragmentos de 21 a 25 nucleótidos llamados ARN pequeños de interferencia (siRNA, *del inglés small interference*). Estas moléculas pequeñas de ARN permiten a la proteína ARGONAUTE detectar por complementariedad de bases las moléculas de ARN que se quieren degradar y las corta en fragmentos más pequeños. Posteriormente los ARNsi permiten que la proteína RdRP (*del inglés RNA-directed RNA polymerase*) generen mas moléculas de ARN de doble cadena que vuelven a ser procesadas por DICER y permiten que haya una amplificación dirigida al silenciamiento de moléculas particulares de ARN (Baulcombe, 2004).

En la actualidad existen dos métodos principales para generar silenciamiento génico. El primero se basa en la elaboración de constructos plasmídicos con el gen antisentido o fragmentos génicos que forman estructuras de ARN de doble cadena una vez son transcritos (Wesley *et al.*, 2001). Estas construcciones son usadas generalmente para transformación estable o expresión transitoria mediada por *A. tumefaciens*. El silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, *del inglés Virus Induced Gene Silencing*) es un método de silenciamiento transitorio que se basa en la formación de moléculas de ácidos nucleicos virales de doble cadena, ya sea este un intermediario de replicación o el material genético propio del virus (Voinnet, 2005). En yuca se ha descrito previamente el sistema VIGS por medio del virus del mosaico africano (un geminivirus) con el cual se ha logrado silenciar un homólogo al gen *su* de *Nicotiana tabacum* el cual está implicado en la quelatación de enzimas propias del cloroplasto produciendo un fenotipo de decoloración foliar. También se han silenciado enzimas implicadas en la producción de compuestos cianogénicos (Fofana *et al.*, 2004). Sin embargo este no es un método

aplicable en Colombia ya que hasta el momento no se ha reportado la presencia del virus en el país.

Wesley *et al.,* (2001) han desarrollado distintos vectores aplicables al silenciamiento génico en plantas por medio de transformación estable con *A. tumefaciens* o biobalística, entre estos cabe destacar la construcción de vectores que contienen fragmentos génicos del gen blanco en sentido y antisentido separados por un intrón. Este método de silenciamiento ha permitido obtener plantas que logran hasta un 90% del silenciamiento del transcrito del gen blanco, por tal razón es uno de los métodos de preferencia a escoger para validar la función de genes o familias poligénicas a través de plantas transgénicas (Helliwell & Waterhouse, 2003; Wesley *et al.*, 2001).

La transformación genética estable de la yuca ha sido posible desde el año 1996 mediante el uso de dos protocolos distintos. El primero de ellos consiste en la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de cotiledones de embriones somáticos maduros producidos a partir de lóbulos de hojas jóvenes provenientes de plantas in-vitro, posteriormente las plantas transgénicas se regeneran bajo selección por medio de organogénesis (Li *et al.*, 1996). El segundo de los métodos reportados, también en el año 1996, se realizó a partir de suspensiones de callo embriogénico friable (CEF) que fueron transformadas por medio de biobalística, posteriormente la fase de regeneración se realizó mediante embriogénesis somática (Schopke *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1996). Estudios posteriores mostraron la posibilidad de transformar CEF con el uso de *A. tumefaciens* y aumentar la efectividad de producción de plantas transgénicas de yuca (González *et al.*, 1998).

Una vez desarrollados los protocolos de transformación se ha podido introducir características de interés agronómico en este cultivo como resistencia a herbicidas (Sarria *et al.*, 2000), reducción de compuestos cianogénicos (Jørgensen *et al.*, 2005; Siritunga *et al.*, 2004; Siritunga & Sayre, 2003), aumento en el contenido y calidad del almidón almacenado en raíz (Ihemere *et al.*, 2006; Raemakers *et al.*, 2005) entre otros.

A pesar de lo anterior, la transformación genética de plantas de yuca presenta varios limitantes debido a que los procesos de embriogénesis somática, producción de CEF y regeneración son cultivar dependientes y la transformación solo ha sido exitosa en cultivares específicos (Raemakers *et al.*, 2001). Adicionalmente los procesos de

transformación mencionados presentan algunas desventajas (Bull *et al.*, 2009). El método basado en transformación de cotiledones y regeneración por organogénesis a pesar de ser más corto presenta mayor número de plantas regeneradas no transgénicas y la producción de plantas quiméricas (Bull *et al.*, 2009). Por el contrario el segundo método tiene un número menor de plantas regeneradas no transgénicas y quimeras pero requiere de cerca del doble de tiempo que el primero (Bull *et al.*, 2009).

Las razones mencionadas han hecho que sea necesario trabajar en mejorar los protocolos de transformación y ampliar el número de cultivares transformables. Antes de iniciar la transformación de nuevos cultivares de yuca es necesario estandarizar procesos que permitan la producción eficiente de embriones somáticos y CEF. Actualmente esto solo es posible de manera muy eficiente en el cultivar 60444, razón por la cual se ha convertido en un modelo de cultivo de tejidos y transformación genética. Previos estudios sobre cultivares diferentes de yuca provenientes de diversos países han pretendido mejorar la producción de embriones somáticos con fines de producción de material certificado y transformación. Para ello se han evaluado distintos tipos de explantes y auxinas sintéticas a concentraciones variables (Feitosa *et al.*, 2007; Mathews *et al.*, 1993; Medero *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2003; Sofiari *et al.*, 1997). Estos estudios han encontrado que los meristemos axilares y apicales son capaces de producir de forma eficiente embriones somáticos (Medero *et al.*, 2000), de igual forma las auxinas sintéticas Picloram y Ácido 2,4-Diclorofenoxi acético (2,4-D) son altamente eficientes en la inducción de embriones somáticos, sin embargo se han encontrado cultivares específicos en los cuales solo se inducen embriones somáticos con auxinas diferentes como dicamba (Ácido 3,6-Dicloro-o-anísico) (Medina *et al.*, 2003). De igual forma se han realizado ensayos para evaluar la producción de CEF con miras a transformar genéticamente distintos cultivares de yuca, sin embargo se ha encontrado que este número de cultivares es reducido y se hace imprescindible la necesidad de seguir evaluando cultivares con mayor interés comercial o investigativo que 60444 (Hankoua *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2001).

Con miras a la validación funcional de genes candidatos de resistencia por medio de RNAi mediante transformación genética estable, Ochoa *et al.,* (datos no publicados) clonaron fragmentos de los RGCs *RXam1* y *RXam2* en el vector de silenciamiento pHellsgate12, el cual permite la inserción de fragmentos en sentido y antisentido de los

genes de interés separados por un intrón y posee el promotor CaMV35s de expresión constitutiva. Esto permite que se generen ARNs de doble cadena en el citoplasma de las células vegetales de yuca que degraden específicamente los transcritos de los genes candidatos y así bloquear el funcionamiento de estos.

El presente trabajo pretende elaborar plantas transgénicas que tengan silenciado el gen candidato de resistencia *RXam2* por medio de ARN de doble cadena con el fin de obtener plantas con susceptibilidad incrementada a la cepa de *Xam* CIO151 con las cuales se elaboraron los estudios de mapeo. Adicionalmente se evaluará la resistencia de algunas variedades de yuca a cepas provenientes de aislamientos actuales con el fin de determinar patotipos, provenientes de haplotipos caracterizados que a futuro permitan determinar si RXam2 está involucrado en la resistencia a nuevos aislamientos.

3. Materiales y Métodos

3.1 Material Vegetal

Las plantas in vitro de los cultivares 60444, BRA685 y SG107-35 fueron obtenidas del banco de germoplasma del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Estas plantas fueron propagadas empleando segmentos nodales en medio 4E el cual contiene sales Murashige y Skoog (MS), sacarosa 2%, Tiamina 1 ppm, Mio-inositol 100ppm, $CuSO_4$ 2 µM, ANA 0.02 ppm, GA_3 0.05 ppm y BAP 0.04 ppm (Roca, 1984) . Las plantas propagadas se mantuvieron a 28°C con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad en una incubadora marca Sanyo MLR 350.

3.2 Transformación de plantas de yuca

3.2.1 Embriogénesis Somática

La embriogénesis primaria se realizó a partir de yemas axilares en medio líquido MS250pi que consta de sales MS suplementado con vitaminas B5 de Gamborg, sacarosa 2%, $CuSO_4$ 2µM, caseína hidrolizada 50 mg/L y picloram 12mg/L o 2,4D 8 mg/L o dicamba 10 mg/L de acuerdo al experimento (Beltrán *et al.*, 2010). Los explantes se incubaron a 28°C por 26 días en oscuridad. Posterior a la embriogénesis primaria se realizó una embriogénesis cíclica en medio MS250pi endurecido con gelrite 0.2% partiendo de los embriones somáticos obtenidos en la embriogénesis primaria. Los embriones se incubaron por 30 días a 28°C en oscuridad.

3.2.2 Producción de Callo Embriogénico Friable

Para inducción del Callo Embriogénico Friable (CEF) se aislaron grupos de embriones globulares cortados en fragmentos de cerca de $3mm^2$ y se transfirieron a medio GD250pi (Sales Greshoff y Doy (GD)), Vitaminas GD 1X, Sacarosa 2%, picloram 50µM, Agar 0.6%) por 45 días a 28° y fotoperiodo 12/12 (Bull *et al.*, 2009). A partir de los clústeres celulares obtenidos se realizó el aislamiento de CEF en medio GD250pi y se renovó el medio a los 22 días. El CEF aislado se incubó a 28°C con un fotoperiodo 12/12.

3.2.3 Transformación de CEF de yuca por medio de *Agrobacterium tumefaciens*

3.2.3.1 Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

El protocolo seguido fue modificado de Jaimes (2005).

Inicialmente se realizó un crecimiento de *A. tumefaciens* cepa AGL1 por agotamiento en medio YEPA, el cual consta de extracto de levadura (10 g/L), peptona (10 g/L), glucosa (20 g/L) y agar (15 g/L). El cultivo se mantuvo incubado durante 18 horas en oscuridad. A partir de una de las colonias aisladas se realizó un precultivo en 2mL de caldo YEP (extracto de levadura (10 g/L), peptona (10 g/L), glucosa (20 g/L)) y se mantuvo incubado a 28°C con agitación a 230 rpm en oscuridad.

Del precultivo realizado se tomaron 0.1mL y se inocularon 2 erlenmeyers con 150 mL de medio YEP. El cultivo se incubó a 28°C con agitación a 250 rpm en oscuridad. Periódicamente se monitoreó el cultivo hasta que alcanzó una densidad óptica OD_{600nm} de 0.9. Una vez alcanzada la densidad óptica se transfirió el cultivo a 6 tubos de centrífuga de 50ml previamente enfriados y se centrifugó a 3000g/min por 10 min a 4°C. El medio se descartó y las células se resuspendieron en 50 mL de glicerol 10% V/V frío. La suspensión celular se centrifugó de nuevo a 3000g/min por 10 min a 4 °C, las células se resuspendieron en 20 mL de glicerol 10% y se juntó el contenido de dos tubos en uno solo. El cultivo se lavó dos veces más con glicerol 10% y finalmente los precipitados

celulares se resuspendieron en 0.25 mL de sorbitol 1M. Las células obtenidas se dispensaron en alícuotas de 25 µL y se almacenaron a -80 °C.

3.2.3.2 Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de las células competentes se realizó en un electroporador Micropulser 165-2100 marca Biorad®. Para esto, 25 µL de células competentes se mezclaron con 2 µL de ADN plasmídico a una concentración de 5 ng/µL y se colocaron en una cubeta de electroporación de 0.1 cm de separación entre placas. Las células se sometieron a un voltaje de 2.5 kV durante 5 ms y se recuperaron durante tres horas en 0.3 mL de caldo LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) a 28°C con agitación de 250 rpm. Finalmente las células se colocaron en placas de agar LB suplementado con espectinomicina 100 mg/L y carbenicilina a 100 mg/L en oscuridad a 28 °C durante 48 h. La presencia del plásmido de transformación se confirmó mediante extracción a pequeña escala de ADN plasmídico y PCR. Estos procedimientos serán descritos más adelante.

3.2.3.3 Elaboración del co-cultivo de CEF de yuca y *Agrobacterium tumefaciens*

Para el crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens* se tomaron colonias aisladas en placas de agar LB suplementado con 100 mg/L de espectinomicina y 100 mg/L de carbenicilina y se realizó un precultivo en 2 mL de caldo LB el día anterior a la transformación. El precultivo se incubó toda la noche a 28 °C y con agitación constante de 250 rpm. Posteriormente se tomó 1 mL del precultivo y se inocularon 50 mL de caldo LB suplementado con 100 mg/L de espectinomicina y 100 mg/L de carbenicilina. El cultivo se mantuvo en oscuridad y agitación constante a 28°C hasta una densidad óptica OD_{600nm} de 0.4. Una vez alcanzada la densidad óptica se realizó una pre-inducción con acetosiringona a una concentración de 200 µM durante tres horas o hasta que se alcanzó una OD_{600nm} entre 0.8 y 1.0. A continuación se centrifugó el cultivo a 6000 g por 10 minutos, se descartó el medio y se resuspendieron las bacterias en medio GD2 50pi líquido suplementado con acetosiringona 200 µM (Jaimes, 2005).

Paralelamente el CEF se dispuso en agrupaciones de 10 mm de diámetro sobre placas de GD2 50pi sólido suplementado con acetosiringona 200 µM. Finalmente se adicionaron 20 µL de suspensión bacteriana a cada uno de los clústeres CEF, se mezcló y se colocó el co-cultivo bajo oscuridad a 22°C por tres días (Jaimes, 2005).

Una vez cumplido el tiempo de co-cultivo se transfirió el CEF infectado a frascos que contenían 10ml de medio GD2 50pi líquido suplementado con cefotaxime 500 mg/L. Posteriormente se realizaron lavados suficientes con el mismo medio hasta que se observó que este estaba totalmente transparente, indicativo de que la bacteria estaba controlada. El régimen de lavados se mantuvo diariamente sobre el CEF en suspensión durante 5 días hasta que la suspensión de callo se encontró macroscópicamente limpia de bacterias con el fin de iniciar con el proceso de selección y regeneración. Finalmente el CEF transformado se colocó sobre placas de medio GD250pi suplementado con cefotaxime 500 mg/L y geneticina (G418) 10 mg/L como agente de selección de CEF transgénico y se incubaron a 28°C con un fotoperiodo 12/12

3.2.3.4 Selección y regeneración de plantas de yuca a partir de CEF transgénico

Tomado de Jaimes (2005)

Para la selección y proliferación del CEF transgénico, este se mantuvo en medio GD250pi suplementado con cefotaxime 500 mg/L y geneticina 10 mg/L durante 4 meses, tiempo durante el cual el medio fue renovado una o dos veces dependiendo de la cantidad de crecimiento observado. Posteriormente el CEF se transfirió a medio MBI (consta de sales MS, vitaminas MS 1X, sacarosa 2%, $CuSO_4$ 2 µM, IBA 0.5 ppm, BAP 1 ppm y agar 0.6%) suplementado con geneticina 10 mg/L durante un tiempo que varió entre 2 y 4 meses hasta que se observó la formación y maduración de embriones somáticos.

Los embriones maduros se transfirieron a medio MS2 C.A. (Sales MS, Vitaminas MS, sacarosa 2% y carbón activado 0.5%) con el fin de inducir la germinación de los embriones maduros. Los embriones se mantuvieron incubados alrededor de 1.5 meses hasta que se observó la formación del meristemo apical del tallo y subsecuentemente de

las partes aéreas de la planta. Los ápices observados se transfirieron finalmente a medio 17N (1/3 sales MS, Vitaminas MS, ANA 0.01 mg/L y GA_3 0.01 mg/L) para estimular enraizamiento.

3.3 Confirmación molecular de plantas transgénicas putativas de yuca y ensayos de expresión

3.3.1 Extracción de ADN de plantas de Yuca

La extracción de ADN de yuca tanto para PCR como para southern blot se realizó a partir de hojas frescas de plantas in vitro que se maceraron en nitrógeno líquido. El buffer de extracción utilizado se compone de TRIS-HCl 0.1 M pH 8.0, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM pH 8.0, Polietilenglicol 6000 1%, $NaHSO_4$ 0.5% y MATAB 2%. Posteriormente el ADN fue purificado con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1 y precipitado con isopropanol (Coca *et al.*, 2004). La concentración de ADN obtenida fue cuantificada con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 TERMO SCIENTIFIC® mediante la medición de absorbancia a 260 y 280 nm.

3.3.2 PCR

La reacción de PCR se elaboró en un volumen final de 10 µl que contenía una concentración de 1X de DreamTaq™ Buffer, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 µM de cada cebador y 0.25 U de DreamTaq™ ADN Polimerasa (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) sobre 10ng de ADN molde. Los ciclos de temperatura llevados a cabo fueron uno de apertura inicial a 93 ºC por 3 min seguido de 35 ciclos de amplificación con 30 s de apertura a 93 ºC, 30 s de anillamiento a una temperatura específica variable de acuerdo al juego de cebadores (Tabla 3-1) y extensión a 72ºC con un tiempo variable de acuerdo con el tamaño del amplicón (Tabla 3-1), con un ciclo final de extensión a 72ºC por 5 min y un tiempo de enfriamiento a 20ºC por 5 min. El producto de amplificación se verificó por electroforesis en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio en buffer TAE 0.5X. El tamaño del fragmento amplificado se confirmó empleando el marcador de peso molecular 1Kb Plus Ladder ® (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.).

Tabla 3-1. Cebadores utilizados durante el estudio.

Nombre	Secuencia 5'- 3'	Temperatura de Anillamiento y Tiempo de Extensión.	Tamaño del Amplicón	Descripción
Tubint Fw	GATCCTACTGGGAAGTACATTGG	Ann: 56 °C Ext. 45s	ADN 600pb ADNc 500pb	Amplificación control de Tubulina, gen de expresión constitutiva
Tubint Rv	CTGCATTCTCCACCAACTGA			
Npt II Fw	GGCAGGATCTCCTGTCATCTCACC	Ann: 58 °C Ext. 30s	513 pb	Gen de selección, Plantas transgénicas
Npt II Rv	CCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAAC			
P27-5	GGGATGACGCACAATCC	Ann 51 °C Ext. 45s	400 pb	Amplificación de los insertos en sentido y antisentido de RXam2 en el vector p Hellsgate12 (Contreras & Lopez, 2008; Helliwell & Waterhouse, 2003)
RXam2 IV Rv	CACATGGATCTTCAATCCATACAT			
P27-3	GAGCTACACATGCTCAGG			
RXam2 qRTF	CCATGTGAGTGGGAGAAGCTTGGA	Ann 60 °C Ext. 30s	170 pb	Expresión RXam2. Contenido en inserto de silenciamiento.
RXam2 qRTR	GCTCGATCCTTGAACAAAGCCCA			
RXam2 XV F	TGTGGTGGTTTTAATCAACTG	Ann 52 °C Ext. 45s	635 pb	Expresión RXam2. No contenido en inserto de silenciamiento.
RXam2 XIII R	ACAAGTGCTGGAGTTTACTA			
PAL Fw	GGTTCAGGCTTAGCTTCTATGG	Ann 55 °C Ext. 60s	801 pb	Gen PR inducido durante la infección.
PAL Rv	GTTCTCCTCCAAGTGTCTCAAGTC			

3.3.3 Southern Blot

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

3.3.4 Extracción de ARN

El ARN fue extraído a partir de material vegetal fresco que se maceró y colectó en nitrógeno líquido. El buffer de extracción utilizado contenía acetato de sodio pH 5.2 100 mM, EDTA pH 7.5 1 mM y SDS 4%. Posteriormente se realizó purificación con fenol ácido (pH 4.5): cloroformo: alcohol isoamílico 24:24:1 y se precipitó con LiCl a una concentración de 2M. Finalmente se lavó el ARN con etanol y se resuspendió en agua

tratada con DEPC a una concentración de 0.1%. La integridad del ARN se observó en gel de agarosa al 1% y se cuantificó con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 TERMO SCIENTIFIC® mediante la medición de absorbancia a 260 y 280 nm.

3.3.5 Síntesis de ADNc

Previo a la realización de la síntesis de ADNc se realizó tratamiento con ADNasa con el fin de garantizar la total ausencia de ADN genómico. El tratamiento enzimático se realizó sobre 600 ng -1000 ng de ARN total y se usó la enzima ADNasa I – libre de ARNasas (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Posterior al tratamiento se realizó un PCR del gen tubulina sobre el ARN como control de calidad del tratamiento enzimático.

La síntesis de primera cadena de ADN se realizó con el First Strand ADNc synthesis Kit (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) de acuerdo al protocolo recomendado por la casa comercial. Para verificar la síntesis correcta de ADNc se realizó un RT-PCR con el gen tubulina, el cual tiene expresión constitutiva, con las condiciones de reacción mencionadas en la Tabla 3-1.

3.4 Evaluación de resistencia/susceptibilidad en las plantas transgénicas y determinación de patotipos.

La inoculación con la bacteria *Xam* cepa CIO151 se realizó sobre plantas transferidas a invernadero con una edad de 7 meses. Para ello se realizó una punción en el tallo entre la tercera y la cuarta hoja con un palillo estéril y sobre la herida se colocó una punta desechable que contenía 10µl de una suspensión bacteriana a una concentración de 10^7 UFC/mL. La evaluación de los síntomas se realizó de acuerdo con lo propuesto por Restrepo *et al*. (2000a), en la cual a los 7, 15 y 30 días post inoculación (dpi) se evalúa la enfermedad de acuerdo con la siguiente escala:

- 1: Presencia de necrosis alrededor del punto de inoculación
- 2: Presencia de exudados a lo largo del tallo
- 3: Marchitez de una o dos hojas
- 4: Marchitez de tres o más hojas

- 5: Muerte total del ápice de la planta inoculada.

Una vez evaluados los síntomas se calcula el AUDPC de acuerdo con la siguiente fórmula.

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

Dónde D corresponde a la escala de la enfermedad de acuerdo con el síntoma observado y t a los días después de la inoculación, con i= 7, 14 o 30 días.

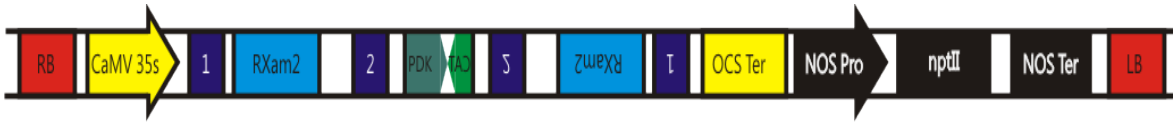
Para el análisis de los resultados se realizó el test de ajuste a normalidad de Shapiro-Wilks y comparación de varianzas y medias con los análisis F de Fischer y t de Student respectivamente con un nivel de confianza de 95% para la comparación entre plantas transgénicas y no transgénicas.

Los análisis de AUDPC para determinación de patotipos se realizaron con la prueba de Kruskal-Wallis.

4. Resultados

La construcción de silenciamiento que se realizó del gen *RXam2* fue elaborada con el uso de tecnología Gateway®. Esta tecnología requiere el uso de un vector de entrada y un vector de destino, evitando el uso de enzimas de restricción y ligasas. En este caso se clonó un fragmento de 618 pb del gen *RXam2* en el vector de entrada pENTR-D TOPO y posteriormente por medio de una reacción de recombinación LR se clonó en sentido y antisentido en el vector pHellsgate12 (Vector de destino) (Ochoa *et al*., datos no publicados). La construcción *RXam2*: pHellsgate12 consta de fragmentos en sentido y antisentido del gen *RXam2* separados por los intrones *pdk* y *cat*, el promotor CaMV 35S y el gen *nptII*, el cual permite la selección de plantas transgénicas durante el proceso de transformación (Figura 4-1).

Figura 4-1: ADN-T del constructo RXam2-Hellsgate.



4.1 Transformación genética del cultivar 60444 con la construcción *RXam2*: pHellsgate12

Para la transformación del cultivar de yuca 60444, el cual es utilizado como modelo en transformación genética, se realizaron dos eventos de transformación diferentes. En total se obtuvieron 53 plantas transgénicas putativas en el primer evento pero no se obtuvieron plantas transgénicas putativas en el segundo evento. A nivel in vitro las

plantas no presentaron malformaciones que pudieron haber ocurrido por el inserto o variación somaclonal.

4.2 Determinación de la transformabilidad genética de los cultivares BRA685 y SG107-35

Los cultivares BRA685 y SG107-35, a pesar de no ser de relevancia económica actualmente, presentan niveles elevados de resistencia a *Xam* y en consecuencia tienen importancia a nivel investigativo o como fuente de resistencia para programas de mejoramiento (Restrepo *et al.*, 2000a).

Dado que el cultivar 60444 es susceptible, no es el más adecuado para la realización del presente trabajo. Sin embargo, en yuca se ha mostrado que el proceso de transformación solo se hace de forma rutinaria en un número reducido de cultivares (Taylor *et al.*, 2001). Por tal razón fue importante en este trabajo tanto la evaluación de la posibilidad de transformación de variedades altamente resistentes, como la transformación de 60444. Además hay que tener en cuenta que la resistencia de yuca a bacteriosis vascular es cuantitativa y a pesar de que la variedad es susceptible, se podría esperar una susceptibilidad incrementada (López *et al.*, 2006).

4.2.1 Evaluación de la embriogénesis primaria y la embriogénesis cíclica de BRA685 y SG107-35

Inicialmente se evaluó el porcentaje de yemas axilares que produjeron embriones somáticos en medio líquido de inducción suplementado con Picloram 12 mg/L en los cultivares bajo estudio. En general se obtuvieron porcentajes de explantes embriogénicos superiores al 60% (Tabla 4-1). Sin embargo en el caso de SG107-35 y BRA685 se observó que los embriones maduraron prematuramente dado que se encontraron en estados acorazonados y de torpedo (Fig. 4-2). Esto no sucedió en el cultivar 60444, el cual fue utilizado como control, y en el que la mayoría de los embriones fueron encontrados en estado globular (Fig. 4-2).

Tabla 4-1: Porcentaje de yemas axilares embriogénicas durante la embriogénesis primaria

Cultivar	Promedio del porcentaje de explantes embriogénicos	Desviación Estándar	Promedio de Yemas Axilares por Réplica	Desviación estándar de Número de yemas evaluadas por ensayo	Cantidad de Ensayos realizados
60444	74,20	4,24	682	26	2
BRA685	62,15	13,79	555	316	8
SG107-35	61,03	12,31	357	96	4

En concordancia con lo anterior la tendencia de maduración embriogénica prematura se mantuvo durante la embriogénesis cíclica. Por tal razón se evaluaron las hormonas 2,4-D a una concentración de 8 mg/L y Dicamba a una concentración de 10 mg/L durante los procesos de embriogénesis somática primaria y embriogénesis cíclica. Bajo las concentraciones hormonales mencionadas se observó una reducción del porcentaje de embriones producidos, particularmente en el cultivar BRA685 en el cual se redujo el porcentaje de yemas axilares embriogénicas a 30% con la hormona 2,4-D y a 21% con la hormona dicamba (Tabla 4-2). Adicionalmente la calidad de los embriones somáticos producidos con estas hormonas fue menor dado que se observó mayor cantidad de callo friable no embriogénico y los clústeres de embriones dentro de este eran de menor tamaño.

Figura 4-2: Embriones somáticos primarios obtenidos en medio MS2 con Picloram 12mg/l en los tres cultivares evaluados

1. embriones en estado globular, 2 embriones acorazonados, 3 embriones en estado de torpedo.

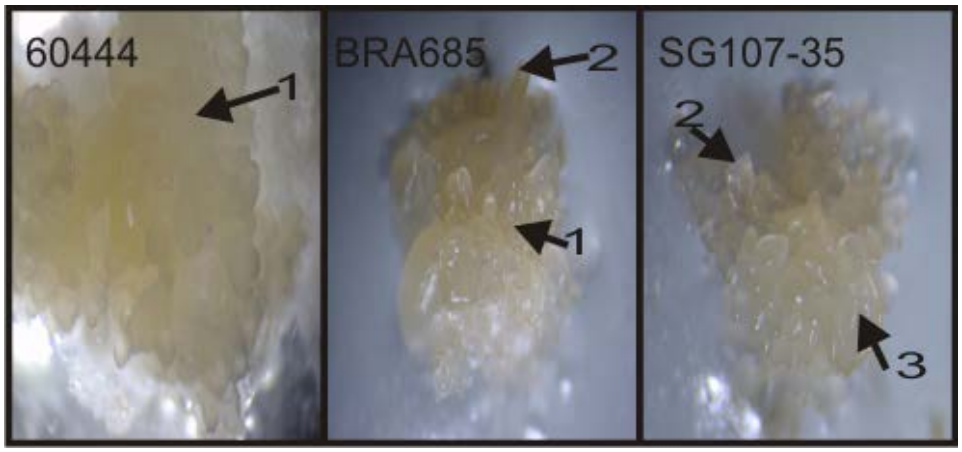


Tabla 4-2: Porcentaje de yemas axilares embriogénicas durante la embriogénesis primaria de BRA685 y SG107-35 con las hormonas dicamba y 2,4-D.

Cultivar	Hormona	Porcentaje de explantes embriogénicos	Cantidad de Yemas axilares evaluadas
BRA685	Picloram	62,15	555
	2,4 D	30	240
	Dicamba	21	110
SG107-35	Picloram	61,03	357
	2,4 D	53	140
	Dicamba	N.E.*	N.E.

*N.E. No evaluado

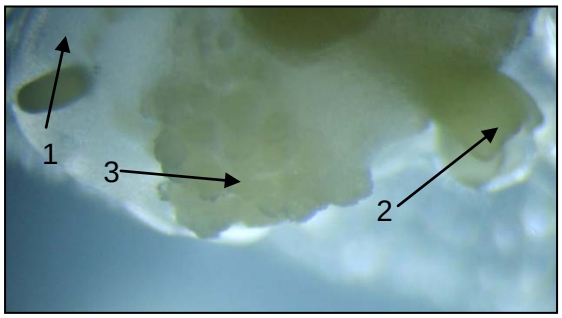
4.2.2 Evaluación de la producción de CEF

Los embriones globulares y acorazonados obtenidos a partir de los tres cultivares mencionados anteriormente fueron utilizados para inducir callo embriogénico friable en medio GD250pi sólido. Para ello estos fueron fraccionados y dispuestos sobre el medio organizados en clústeres celulares. En comparación con el cultivar control 60444 el comportamiento del cultivar BRA685 fue similar en términos macroscópicos dado que se observó crecimiento del clúster celular y una coloración amarillo claro. Por el contrario los clústeres celulares del cultivar SG107-35 presentaron un crecimiento reducido y una coloración parda típica de la producción de compuestos fenólicos indicativos de muerte celular.

Microscópicamente se observó la producción de los cuatro tipos de grupos celulares descritos por Taylor *et al.*(1996) en los cultivares 60444 y BRA685: i) estructuras embriogénicas organizadas, ii) callo friable no embriogénico, iii) callo marrón rígido (en inglés Hard Brown Callus) y iv) CEF (Fig. 4-3). Por el contrario en el cultivar SG107-35 se observó únicamente la formación de los tres primeros grupos celulares. En la figura (4-2) se observa CEF que logró inducirse en el cultivar BRA685, sin embargo las cantidades que se produjeron comparadas con las producidas en el cultivar 60444 son bastante inferiores en más de un 90%. Adicionalmente una vez aislado el CEF de los clústeres celulares solo el del cultivar 60444 fue capaz de proliferar y micropropagarse, por el contrario el CEF obtenido de BRA685 no produjo más cantidades de CEF que las que se obtuvieron en el aislamiento desde la inducción.

Figura 4-3: Clúster de inducción de CEF en BRA685.

El número 1 corresponde a callo friable no embriogénico, el número 2 corresponde a estructuras embriogénicas organizadas y el número 3 a CEF.



4.2.3 Transformación de CEF de BRA685

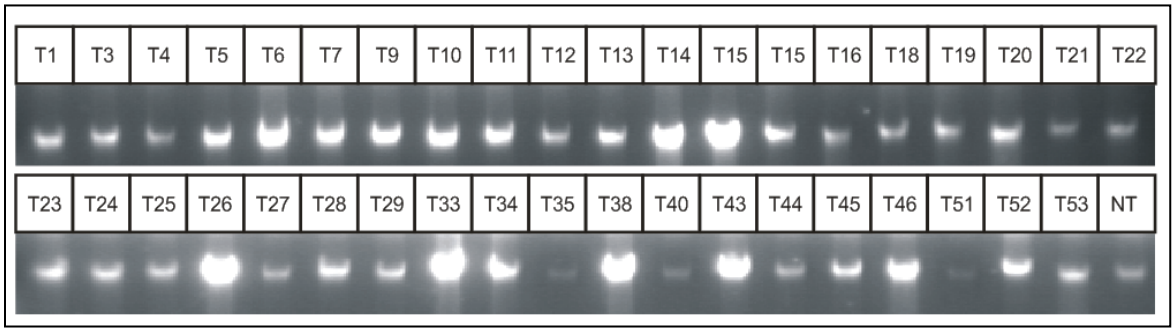
A pesar de que el CEF producido del cultivar BRA685 no pudo proliferar una vez aislado, se realizaron dos intentos de transformación con la construcción *RXam*2: Hellsgate bajo el mismo protocolo realizado para la transformación del cultivar 60444. El CEF de BRA685 transformado fue capaz de inducir embriones somáticos y regenerar plantas cuyo aspecto no mostró signos de variación somaclonal al igual que plantas producidas a partir del CEF obtenido de 60444 a nivel in vitro (Fig. 4-4). Sin embargo dadas las pequeñas cantidades de CEF transformado solo se lograron regenerar 4 plantas transgénicas putativas de yuca de la variedad BRA685.

Figura 4-4: Plantas transgénicas putativas provenientes de los genotipos BRA685 y TMS60444.

4.3 Evaluación molecular de plantas transgénicas de yuca por PCR

Inicialmente se realizó extracción de ADN de hojas de plantas in vitro de acuerdo con el protocolo de extracción mencionado de las plantas obtenidas del cultivar 60444 (Fig. 4-5). Sin embargo las líneas T8, T17, T30, T31, T32, T37, T39, T41, T42, T47, T48, T49, T50, T55 y T56 no presentaron biomasa suficiente para extracción de ADN. En la figura 4-5 se observa ADN de buena calidad a una concentración promedio de 70 ng/µL.

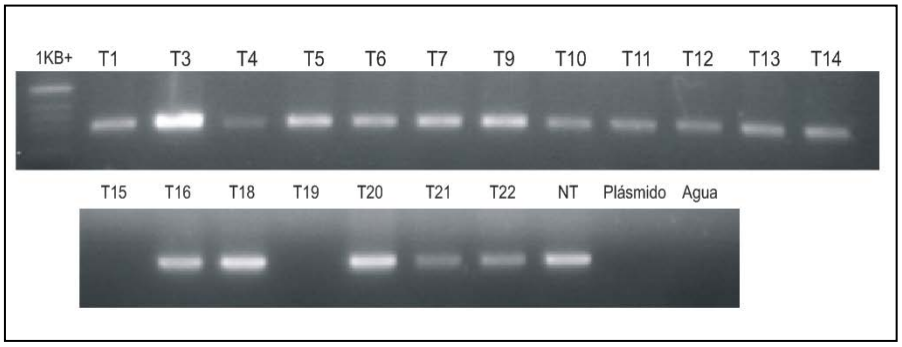
Figura 4-5: Extracciones de ADN de las plantas transgénicas putativas de yuca del genotipo 60444.



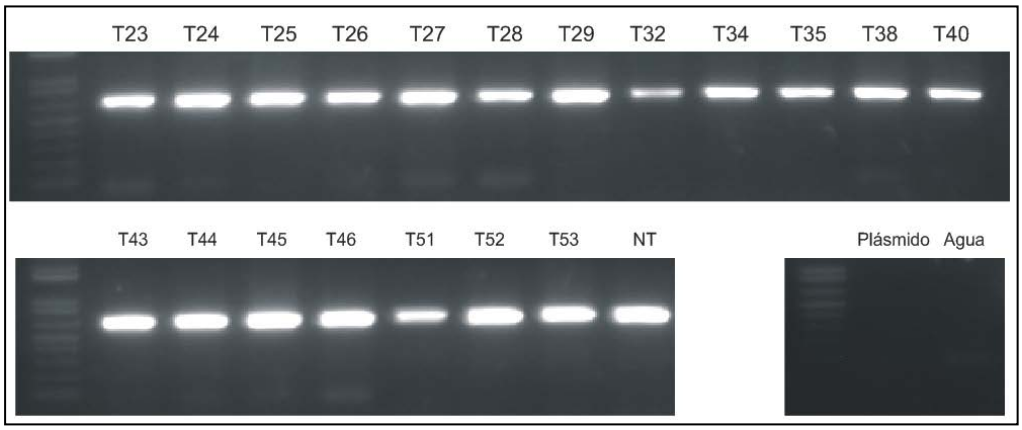
Con el fin de verificar que las extracciones de ADN que se realizaron eran útiles para la realización de PCR, se amplificó el gen de tubulina con los cebadores mencionados en la tabla 1. El resultado nos muestra que el ADN de las plantas T15 y T19 no fue útil para la amplificación. Por el contrario el ADN del resto de las plantas amplificó satisfactoriamente (Fig. 4.6A y Fig. 4.6B)

Figura 4-6: PCR de tubulina sobre extracciones de ADN de plantas transgénicas

A. Amplificación de transgénicas T1 a T22.



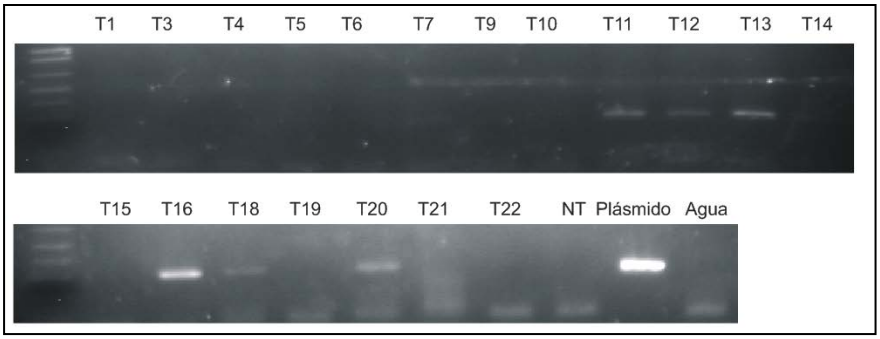
B. Amplificación de Transgénicas T23 a T53.



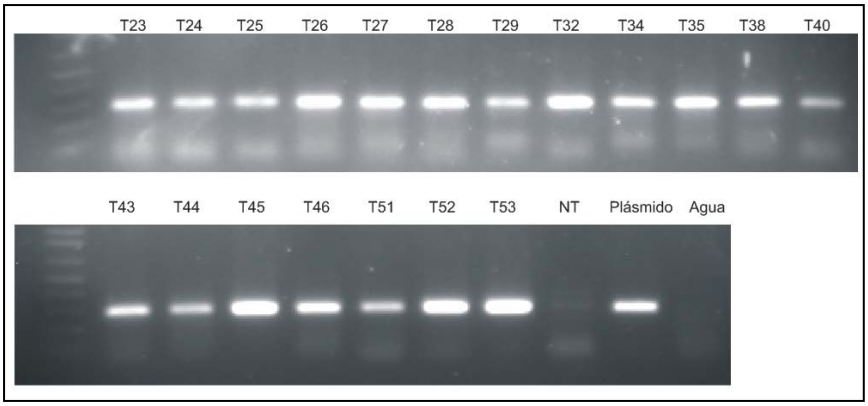
Posteriormente se realizó amplificación del gen de selección *nptII*, el cual confiere resistencia a antibióticos de selección de tipo aminoglucósidos (Geneticina, Kanamicina, Paromomicina) con el fin de determinar cuáles de las plantas regeneradas son transgénicas (Fig. 4-7).

Figura 4-7: PCR de nptII sobre extracciones de ADN de plantas transgénicas.

A. Amplificación de transgénicas T1 a T22.



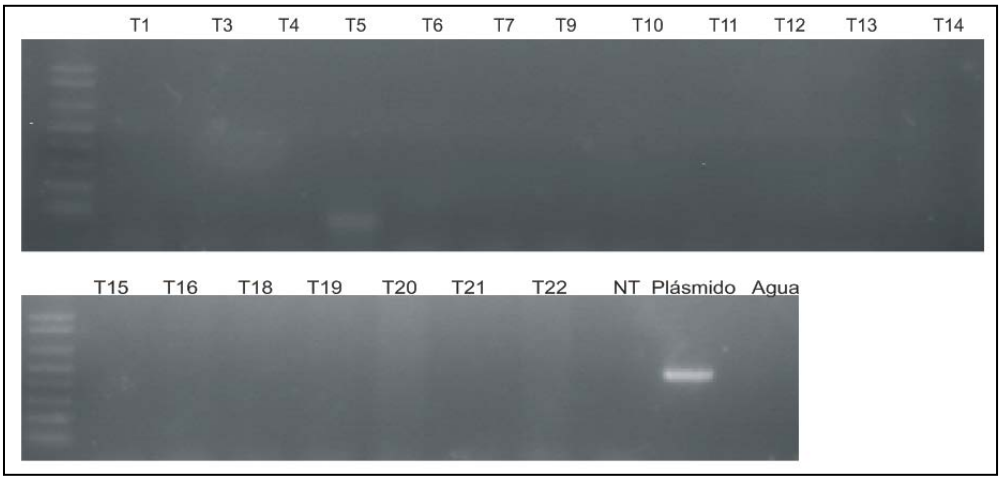
B. Amplificación de transgénicas T23 a T53.



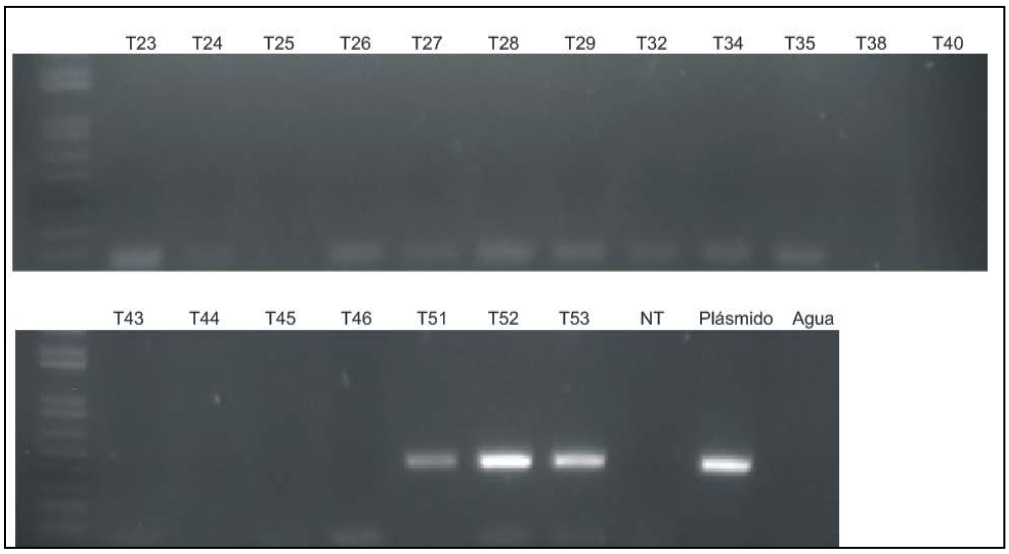
El resultado de amplificación de *nptII* indicó que de las 38 plantas que se evaluaron hasta el momento 25 de ellas son transgénicas. Con el ánimo de confirmar este resultado, se realizó un PCR que amplificó el inserto en sentido del gen *RXam*2 en el vector de transformación pHellsgate12. Para ello se utilizó el cebador p27-5 el cual se encuentra sobre el promotor CaMV 35s y un cebador reverse contenido en el fragmento de *RXam*2 que se clonó en el vector (Fig. 4-8).

Figura 4-8. PCR de *RXam2*: Hellsgate sentido sobre extracciones de ADN de plantas transgénicas.

A. Amplificación de transgénicas T1 a T22.



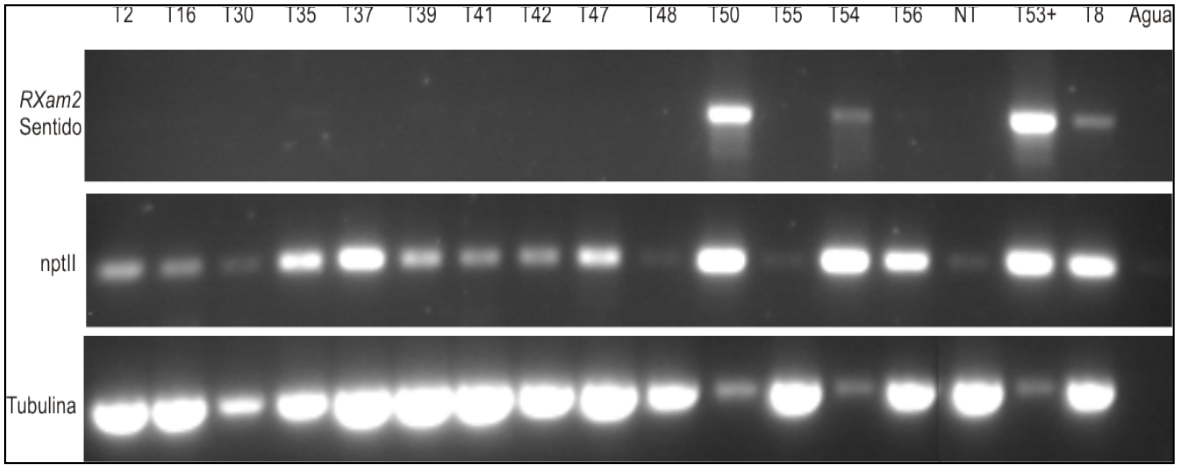
B. Amplificación de transgénicas T23 a T53.



A pesar del resultado anterior, el nuevo análisis arrojó que solo T51, T52 y T53 son transgénicas dado que presentan el amplicón descrito. Por tal razón se tomó la decisión de realizar southern blot a un número de muestras seleccionadas para confirmar la presencia del inserto y el número de copias del mismo. No se repitieron las extracciones de T15 y T19 ya que eran clones de T16 y T20 respectivamente, teniendo en cuenta los datos de regeneración a nivel de cultivo de tejidos.

Con el fin de determinar si las plantas transgénicas que aún no habían sido evaluadas son transgénicas se realizó extracción de ADN y PCR, tal como se realizó con las plantas anteriores. Para ello se realizó PCR de tubulina, *nptII* y *RXam2*: Hellsgate antisentido (Fig. 4-9.)

Figura 4-9. Evaluación Molecular de plantas transgénicas putativas restantes de 60444

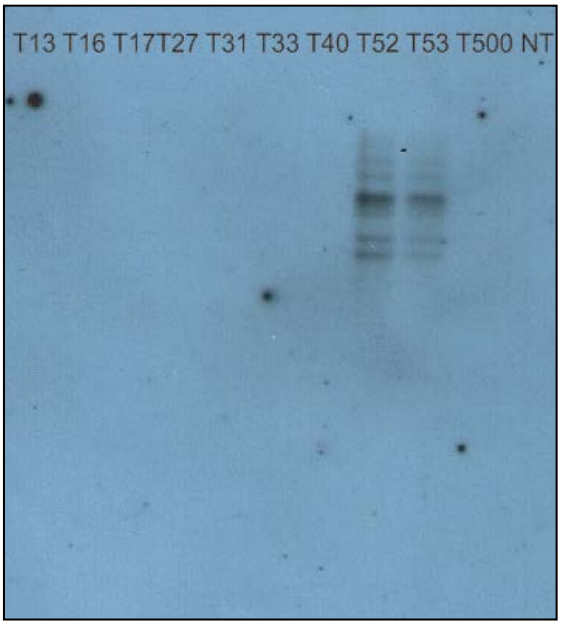


Al igual que en los resultados mencionados inicialmente, empleando los cebadores para *nptII* se logró la amplificación de un número mucho mayor de plantas transgénicas que con *RXam*2: Hellsgate sentido. Aún así T8, T50 y T54 surgen como nuevas candidatas para plantas transgénicas además de T52 y T53, basado en los resultados de PCR teniendo en cuenta que amplifican regiones distintas del cassette de transformación.

4.4 Evaluación molecular de plantas transgénicas de yuca por southern blot

Para el análisis por southern blot se seleccionaron 9 líneas transgénicas teniendo en cuenta que estas hubieran presentado amplificación al menos con los cebadores para *nptII*. Adicionalmente se incluyó en el ensayo una mezcla de ADN de las plantas transgénicas obtenidas a partir de la transformación de la variedad BRA685 (T500). Estas fueron evaluadas previamente por PCR, sin embargo no se detectó presencia del inserto de transformación (datos no mostrados). En la figura 4-10 se presenta el resultado del southern blot realizado. En este se observa que solo en T52 y T53 se detectó hibridación de la sonda de *nptII,* además se puede concluir que ambas plantas provienen del mismo evento de transformación dado que presentan alrededor de 5 copias del inserto y el patrón de bandas es el mismo. Adicionalmente se puede concluir de este ensayo que solo los resultados de evaluación por PCR con el inserto de *RXam2* permiten determinar con seguridad si las plantas que se regeneran son transgénicas y en consecuencia, tener una alta probabilidad de que T8, T50 y T54 sean también plantas transgénicas. Sin embargo no se ha podido realizar southern blot dado que presentan crecimiento lento y dificultad en la propagación.

Figura 4-10: Evaluación por southern blot de plantas transgénicas seleccionadas



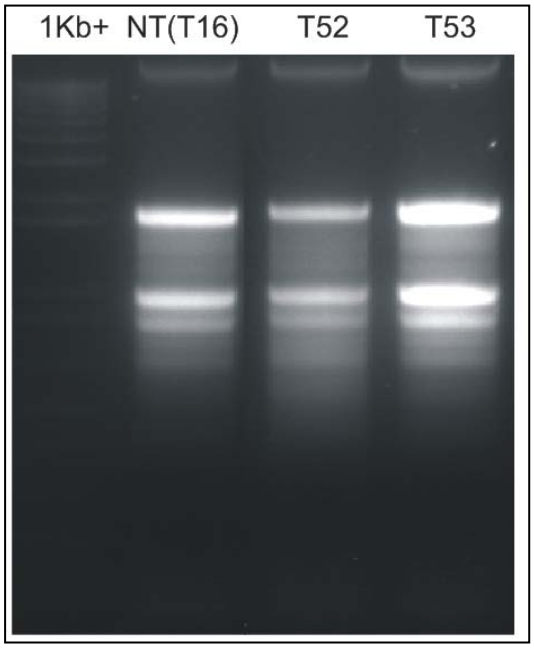
4.5 Evaluación de la expresión del cassette de silenciamiento y *RXam2* en plantas transgénicas por RT-PCR

Con el fin de verificar la expresión del cassette de silenciamiento en plantas transgénicas y la disminución en la transcripción del gen de resistencia candidato silenciado, se determinó por medio de RT-PCR la expresión de los genes *nptII* y *RXam2* tanto en plantas in vitro como en plantas de invernadero.

4.5.1 RT-PCR de *nptII* y *RXam2* sobre ARN de plantas transgénicas *in vitro*

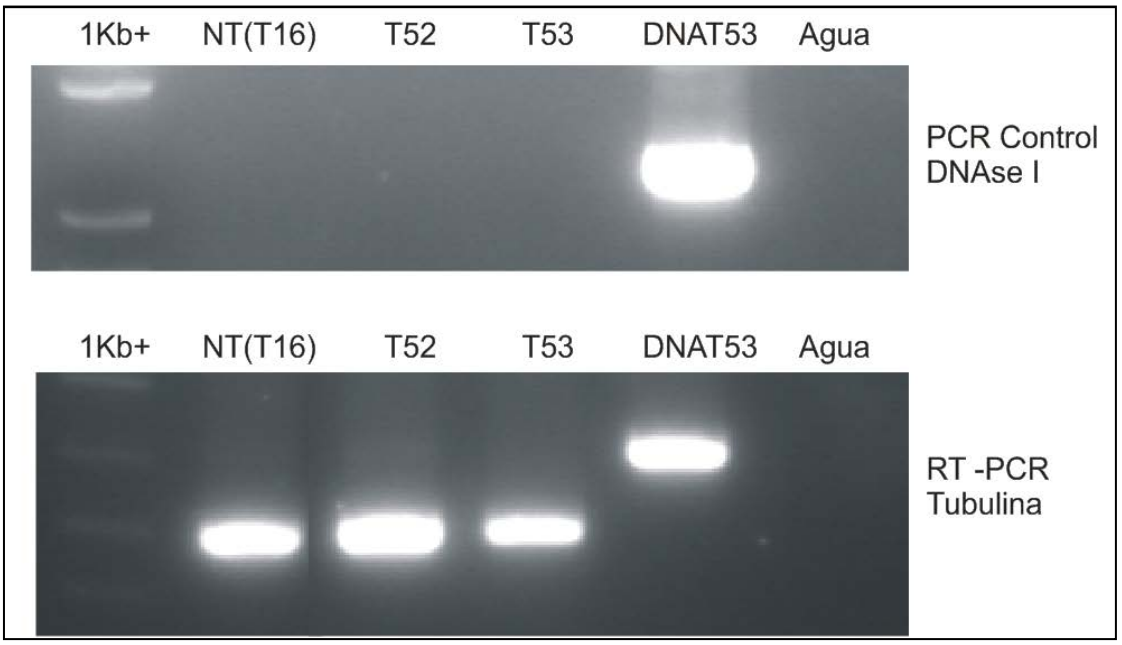
Para determinar la expresión de los genes mencionados se realizó extracción de ARN de hojas de plantas *in vitro* de las líneas transgénicas T52 y T53 (Fig. 4-11). El resultado muestra que se logró obtener ARN de buena calidad teniendo en cuenta las bandas ribosomales observadas. También se realizó extracción de ARN de la planta T16 la cual es una planta regenerada no transgénica. Esta planta será usada durante el resto del trabajo como control no transgénico.

Figura 4-11: ARN total de hojas de plantas transgénicas in vitro



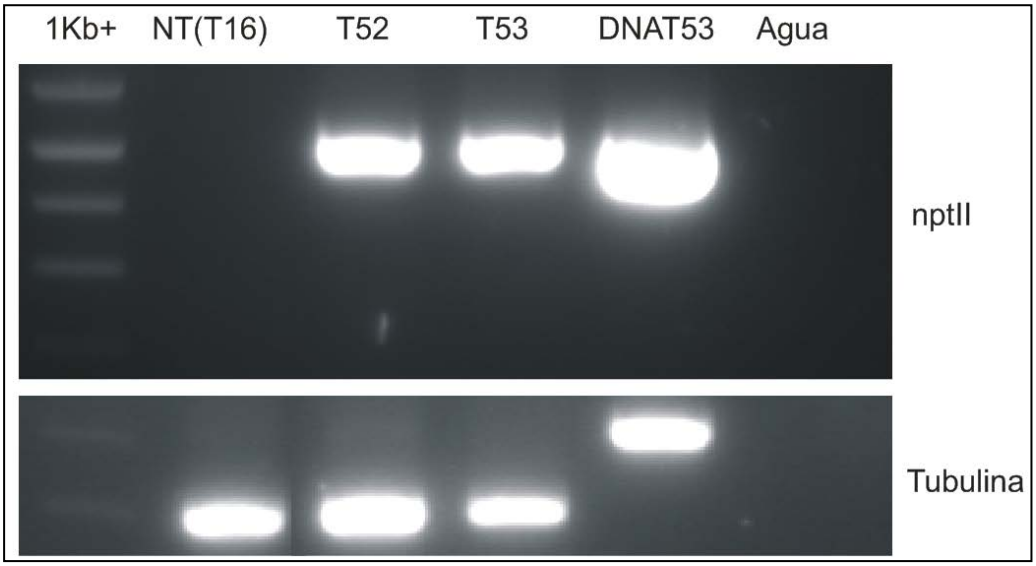
En la figura (4-11) se observa que el ARN extraído presenta ADN, por esta razón las muestras fueron tratadas con ADNasa I antes de realizar la retrotranscripción para sintetizar la primera cadena de ADNc. El tratamiento realizado a las muestras fue exitoso dado que se elaboró PCR de tubulina sobre las muestras de ARN y no se observó amplificación (Fig. 4-12), posteriormente se efectúo la reacción de retrotranscripción y se realizó PCR de tubulina con el fin de verificar la síntesis correcta de primera cadena de ADNc. El resultado de amplificación nos muestra que la reacción fue exitosa en todas las muestras, además una gran ventaja del amplicón de tubulina para la realización de RT-PCR es que contiene un intrón de 100pb y en consecuencia el producto generado a partir de ADNc es de menor tamaño (Fig. 4-12).

Figura 4-12: PCR control de ADNasa y RT-PCR de tubulina de ARN de hojas de plantas transgénicas in vitro



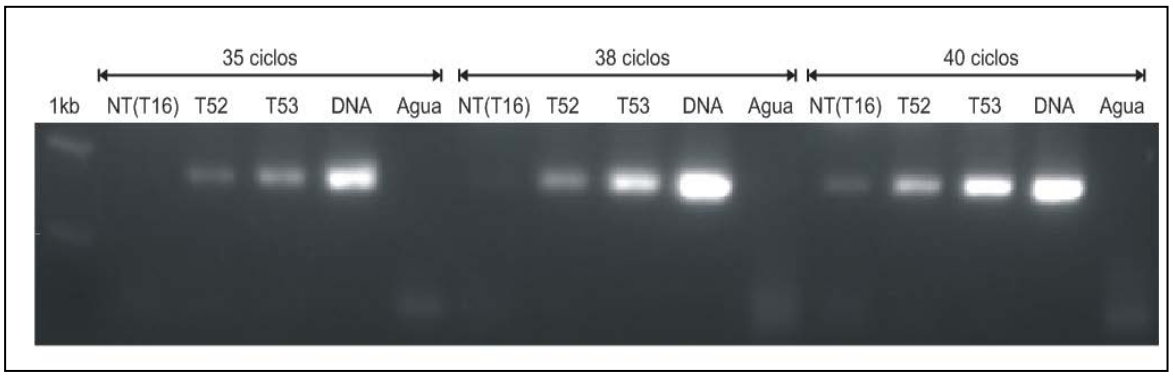
Para determinar que el cassette de silenciamiento se está expresando, se realizó PCR del gen *nptII* sobre el ADNc que se sintetizó. El resultado muestra que T52 y T53 amplifican *nptII*, por el contrario NT (T16) no expresa este gen dado que no es transgénica (Fig. 4-13). Adicionalmente se realizó PCR del inserto del gen *RXam2* con el fin de confirmar los resultados anteriores. Los cebadores utilizados amplifican un fragmento de 170pb contenidos en el fragmento insertado de *RXam2* para silenciamiento.

Figura 4-13: RT-PCR de *nptII* sobre ARN de hojas de plantas transgénicas *in vitro*



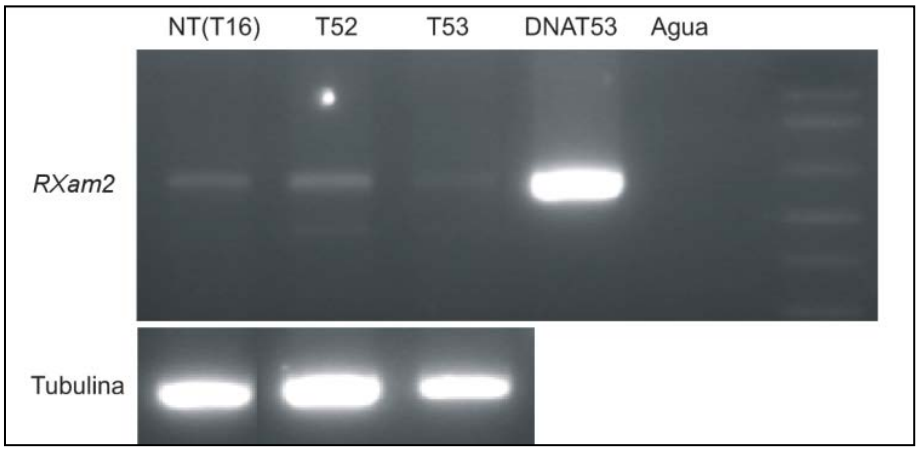
Estudios previos mostraron que el gen *RXam2* es de muy baja expresión y por tal razón se ha requerido de PCR anidado para su detección (Contreras & Lopez, 2008). Con el ánimo de no realizar PCR anidado dado que impide tener una apreciación semicuantitativa, se elaboraron ensayos con 35, 38 y 40 ciclos para determinar el umbral de expresión del gen y así lograr diferenciar si la detección realizada depende del transgén o de la expresión endógena del gen. La amplificación realizada nos mostró que a los 35 ciclos solo se observan transcritos en las plantas transgénicas, por el contrario la detección endógena solo es posible cuando se realizan 40 ciclos dado que es cuando logra detectarse el amplicón en plantas no transgénicas (Fig. 4-14).

Figura 4-14: RT-PCR de un fragmento *RXam2* contenido en el inserto de silenciamiento sobre ARN de hoja de plantas transgénicas *in vitro*



Finalmente, con el objetivo de determinar si existe silenciamiento génico se realizó RT-PCR de *RXam2* con un juego de cebadores que no está incluido dentro del fragmento clonado en el vector de silenciamiento. Este resultado no muestra diferencias claras entre la expresión en las plantas transgénicas y las no transgénicas a pesar de que la banda de T53 se vea levemente más tenue, sin embargo es necesario realizar ensayos mediante métodos más cuantificables como sqRT-PCR o qRT-PCR que permitan determinar de forma concluyente si hay o no silenciamiento del gen de resistencia candidato (Fig. 4-15).

Figura 4-15: RT-PCR de un fragmento *RXam2* no contenido en el inserto de silenciamiento sobre ARN de hoja de plantas transgénicas in vitro

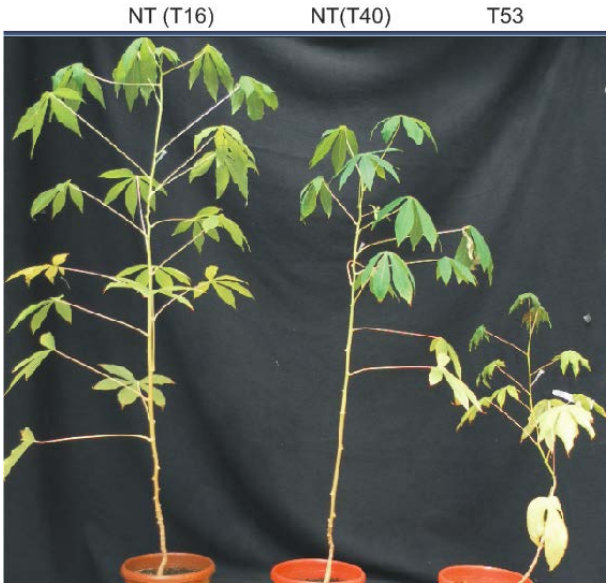


4.5.2 RT-PCR de *nptII* y *RXam2* sobre ARN de plantas transgénicas en invernadero

Una limitación importante a la hora de realizar los ensayos en invernadero fue que las plantas transgénicas presentaron un crecimiento lento y una morfología anormal que se apreció en el hecho de que las hojas eran de menor tamaño y el tallo mucho más delgado. Esta observación también se ha evidenciado a nivel in vitro con las plantas transgénicas T8, T50 y T54 las cuales presentaron dificultades en la propagación y crecimiento lento. Por esta misma razón no se logró realizar southern blot ni RT-PCR en estas plantas transgénicas, indicando que es muy probable que los efectos de retraso sean debidos a efectos pleiotrópicos provocados por el inserto y no a que sean mutantes insercionales o malformaciones producidas por variación somaclonal. En la figura (4-16)

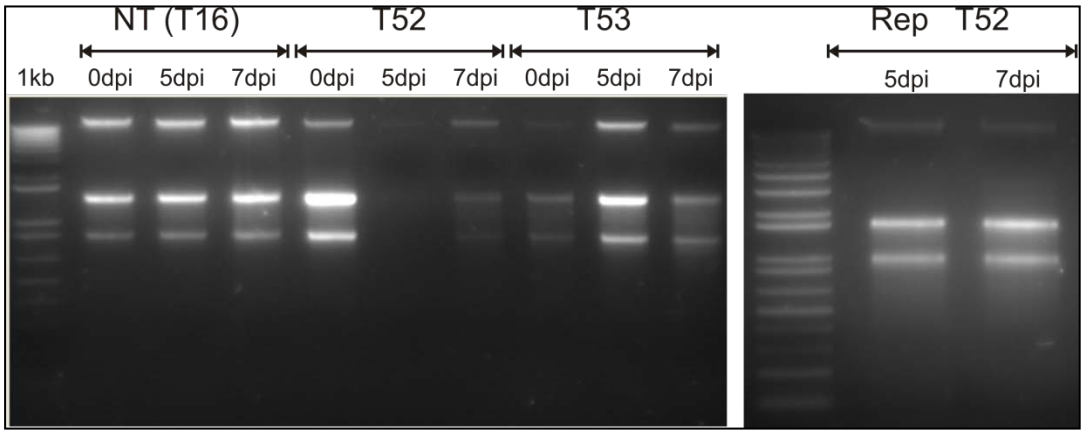
se compara la morfología en invernadero de la planta transgénica T53 con la de la NT (T16) (regenerada no transgénica del mismo evento de transformación).

Figura 4-16: Morfología en invernadero de las plantas transgénicas



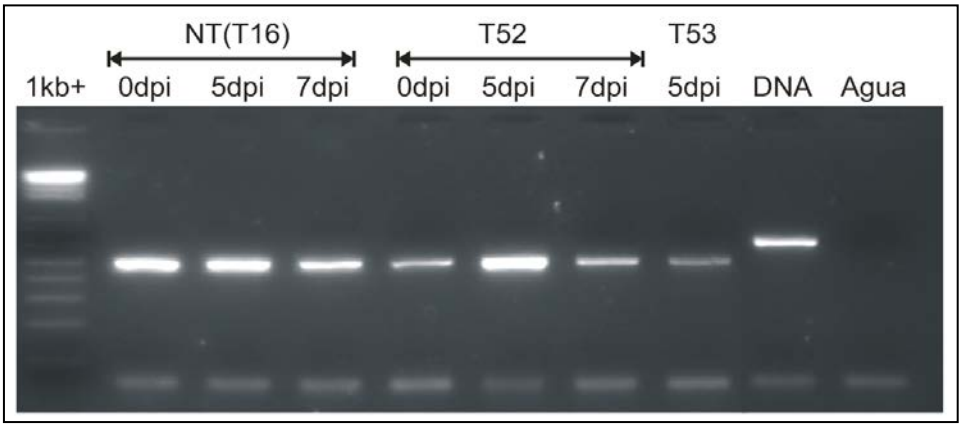
Para la realización de los ensayos de expresión, las plantas de invernadero se inocularon en tallo con *Xam* CIO151 a una concentración de 10^8 UFC/mL tal como se describió anteriormente. Posteriormente se recolectó tejido vegetal para extracción de ARN a los 0, 5 y 7 dpi, tomando 2.5 cm del tallo por encima y por debajo del punto de inoculación. El ARN extraído mostró la integridad deseada, sin embargo el de las plantas T53 a los tiempos 0 dpi y 7 dpi presentaron una concentración inferior a 30 ng/µl y no se utilizaron para los ensayos posteriores de expresión (Fig. 4-17).

Figura 4-17: Extracción de ARN de plantas transgénicas en invernadero



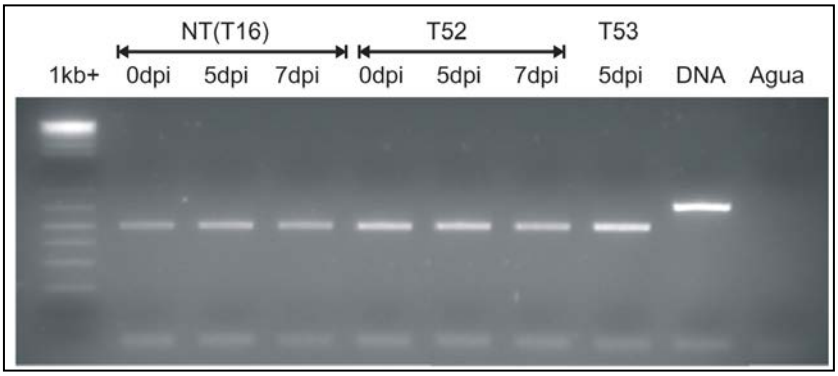
Posteriormente se realizó tratamiento con ADNasa I y la síntesis de primera cadena de ADNc de la misma forma en que se realizó para los ensayos con plantas in vitro. En la figura (4-18) se observa el PCR de tubulina sobre el ADNc sintetizado.

Figura 4-18: RT-PCR de tubulina para verificar síntesis de ADNc a partir de ARN de plantas transgénicas inoculadas en invernadero



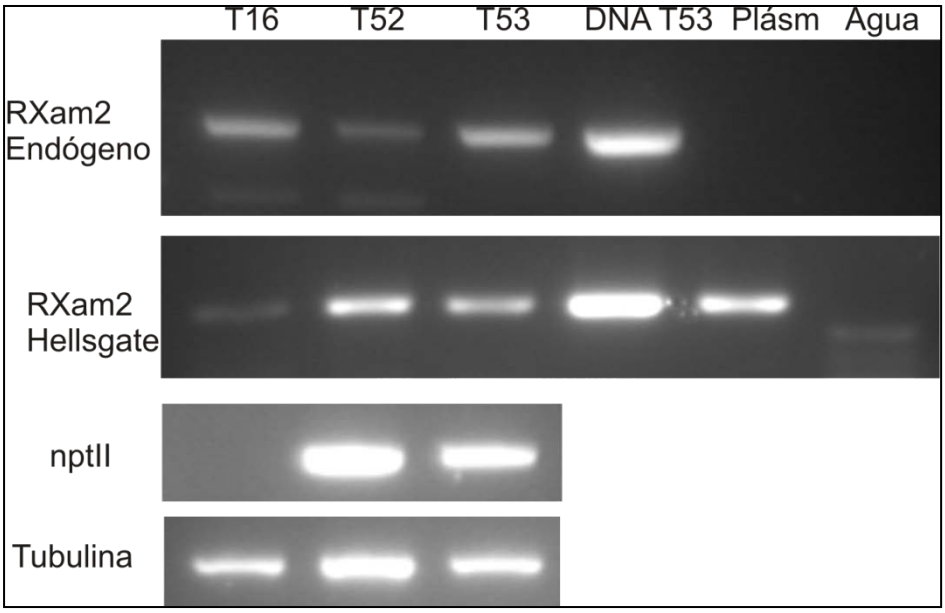
Con el fin de dar carácter semicuantitativo al PCR realizado, se ajustó la cantidad de ADNc que se adicionó a la reacción de PCR de tal forma que al amplificar el gen de la tubulina e impidiendo que la reacción llegará al nivel de saturación, se observaran bandas de igual intensidad en el gel de agarosa. Para ello se realizaron diluciones del ADNc y se estableció, al realizar PCR a 30 ciclos, la cantidad de muestra de ADNc a adicionar para tener un comportamiento estable de la tubulina. Esto se logró después de 4 intentos hasta que las muestras amplificaran la tubulina a una intensidad de banda similar por 30 ciclos (Fig. 4-19).

Figura 4-19: RT-PCR de tubulina para estandarización y realización de PCR semicuantitativo



Para la realización de PCR de expresión de *nptII* y *RXam2* se seleccionaron solo las muestras a 5 dpi de T16, T52 y T53 dado que el gen es de expresión constitutiva (Contreras & Lopez, 2008). El número de ciclos seleccionado y los juegos de cebadores fueron iguales a los que se usaron en la evaluación de plantas in vitro. El resultado indicó que *nptII* y el inserto de *RXam*2 se expresan en las plantas transgénicas. Sin embargo aunque la T52 presentó una banda de menor intensidad que la de NT (T16), T53 presentó una banda de intensidad similar. Esto es un fuerte indicativo de que la baja expresión de *RXam*2 dificulta la posibilidad de ver, por medio de RT-PCR semicuantitativo la reducción en la expresión debida al silenciamiento (Fig. 4-20).

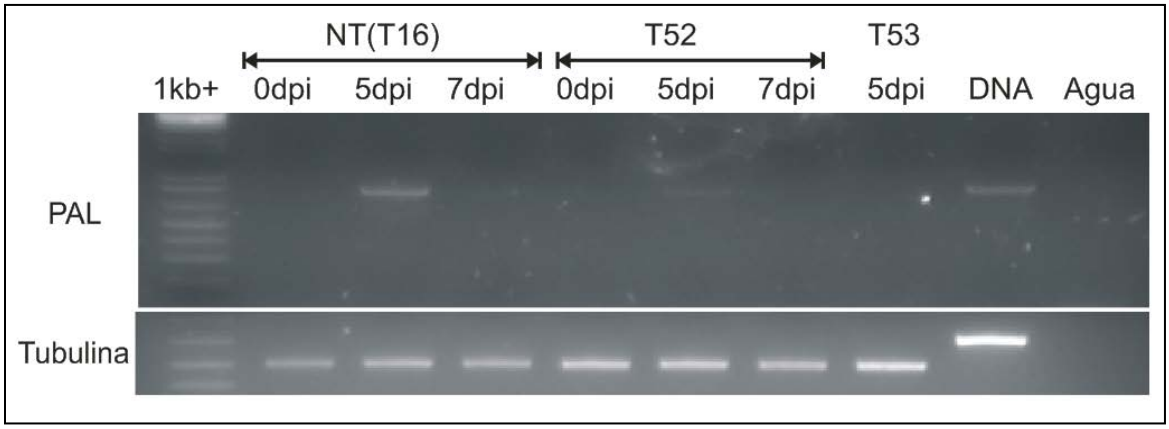
Figura 4-20: RT-PCR de *nptII* y *RXam2* sobre muestras seleccionadas de plantas transgénicas de invernadero



Como análisis adicional para determinar si las plantas transgénicas tienen comprometidas sus respuestas de defensa se realizó un PCR del gen *phenylalanine ammonia-lyase* (PAL). Este gen codifica una enzima que permite la formación de compuestos de tipo fenilpropanoides en respuesta a estrés (Wanner *et al.*, 1995). Resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación determinaron que la expresión de este gen es inducida en tallo en respuesta a la infección. Por tal razón se realizó un PCR a 37 ciclos del gen con base en los resultados obtenidos de estandarización del gen tubulina. Este resultado muestra que la planta no transgénica tiene un pico de expresión a los 5dpi de PAL, en cambio este no se presenta en T53 y en T52 es apenas apreciable (Fig. 4-21), lo que indica que a pesar de que el silenciamiento no sea muy evidente, hay

indicios de que pueden estar comprometidas las respuestas de defensa en las plantas transgénicas.

Figura 4-21: RT-PCR de *PAL* sobre de plantas transgénicas de invernadero inoculadas con Xam CIO151



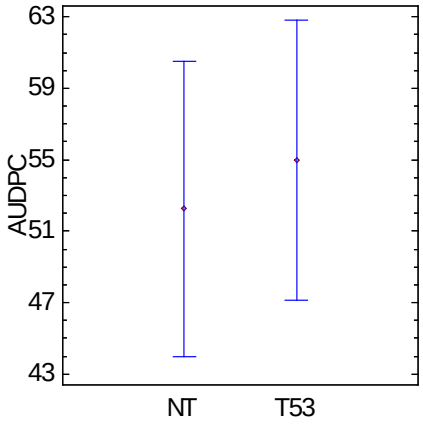
4.6 Evaluación del progreso de la infección en plantas transgénicas de yuca en invernadero

Para determinar si existen diferencias en el nivel de susceptibilidad de las plantas transgénicas comparadas con las no transgénicas, se realizó una inoculación por medio de punción en tallo con la cepa de *Xam* en plantas de yuca trasladadas al invernadero. El inoculo fue preparado a una concentración de 10^7 UFC/mL y se evaluaron los síntomas a los 7, 15 y 30 días después de la inoculación. De cada planta se utilizaron 4 réplicas y se realizó el cálculo de la AUDPC tal como se describió en Materiales y Métodos.

El análisis de los datos se realizó una prueba t con el fin de comparar los promedios de los valores de la AUDPC. El primer requisito para esta prueba es determinar si los datos tienen una distribución normal, por lo cual se realizó un test de Shapiro-Wilk, cuya hipótesis nula es que los datos provienen de dicha distribución. El valor p obtenido para esta prueba fue de 0.094, lo que indica que los datos siguen una distribución normal. Posteriormente se realizó una prueba F con el fin de comparar las desviaciones estándar de las muestras y así determinar qué prueba t debe realizarse. El valor p de la prueba F

fue de 0.933 lo que indicó que las varianzas son estadísticamente iguales. Finalmente el valor p de la prueba t suponiendo varianzas iguales fue de 0.8173, lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de las AUDPC de las muestras (Fig. 4-22).

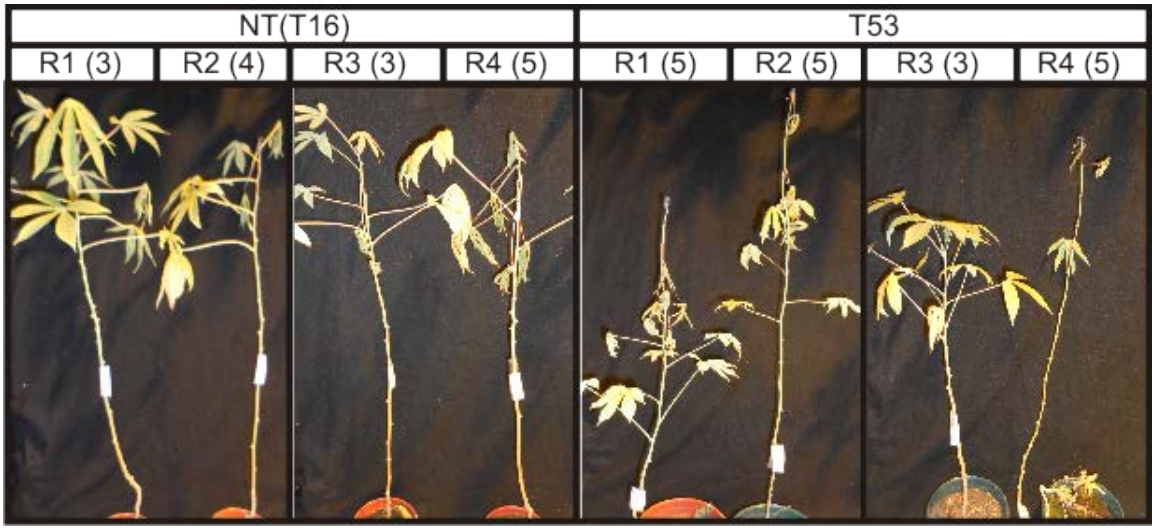
Figura 4-22: Promedio AUDPC de plantas transgénicas comparadas con plantas no transgénicas durante la infección con *Xam* CIO151



A pesar de lo anterior, los síntomas observados y el promedio estadístico mostraron que hay diferencias leves en la susceptibilidad dado que la severidad de los síntomas es más evidente en las plantas transgénicas (Fig. 4-23).

Figura 4-23: Síntomas observados en plantas transgénicas comparados con los observados en la no transgénicas en invernadero.

En cada planta se enumera la réplica y entre paréntesis se observa la evaluación de la enfermedad a los 30 dpi.



4.7 Evaluación de Patotipos en Nuevos Aislamientos.

Para determinar el papel que despeña *RXam2* en la resistencia a cepas de *Xam* actuales deben caracterizarse los aislamientos recientemente colectados. Para ello se inocularon plantas en invernadero con haplotipos de Xam caracterizados por la Universidad de los Andes. Dicha inoculación se realizó por medio de punción en tallo y se calculó el AUDPC como se describió previamente. Las variedades seleccionadas fueron COL1505, CM523-7, CM2177-2, BRA902 y COL1522 y se utilizaron 5 réplicas por haplotipo para determinar el indicador de progreso de la enfermedad.

Inicialmente se determinó si las variedades eran resistentes o susceptibles de acuerdo con lo reportado por Restrepo *et al*.,(2000a), quienes consideraron que una variedad es susceptible si por lo menos alguna de la réplicas de inoculación produce síntomas de nivel 4 o 5 . Los resultados mostraron que la variedad COL1522 es susceptible a todos los aislamientos evaluados, por el contrario CM523-7 mostro resistencia a dos de los aislamientos evaluados, por lo cual es la variedad más resistente hasta el momento evaluada (Tabla 4-3). Adicionalmente se observa que cada uno de los haplotipos evaluados es un patotipo independiente.

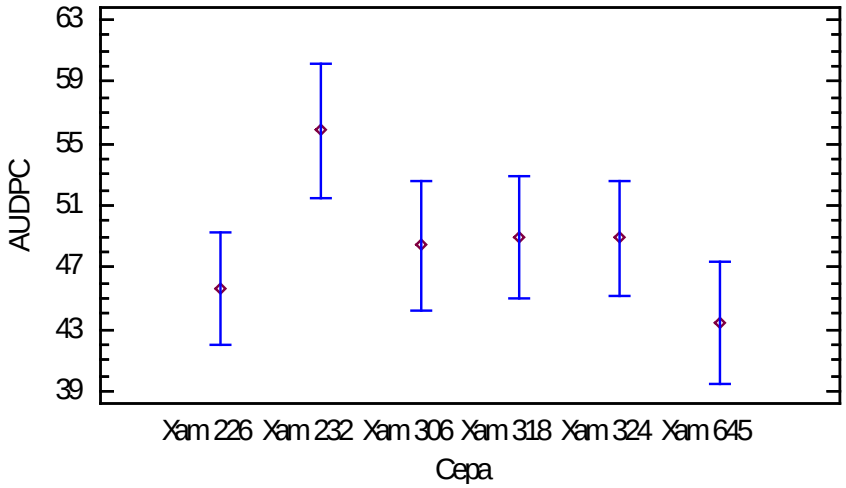
Tabla 4-3: Determinación de la resistencia/susceptibilidad a nuevos haplotipos de Xam.

	Xam226	Xam232	Xam306	Xam318	Xam324	Xam645
COL1505	R	S	S	S	S	S
CM523-7	S	S	R	S	S	R
CM2177-2	S	S	S	S	R	S
BRA902	S	S	S	S	S	R
COL1522	S	S	S	S	S	S

Con base en los datos de AUDPC se realizó una prueba de Kruskal-Wallis dado que los datos no cumplieron el supuesto de normalidad necesario para realizar ANOVA. Los resultados arrojaron que existen diferencia estadísticamente significativas de AUDPC entre los cultivares (P= 0.021), siendo CM523-7 y COL1505 las variedades con mayor nivel de resistencia y COL1522 la que presentó mayores niveles de susceptibilidad. Adicionalmente Xam 232 mostró ser la cepa más virulenta dado que causó

susceptibilidad en todas las variedades y presentó los mayores valores de AUDPC (Fig. 4.24).

Figura 4-24: Comparación de Medias de AUDPC de todos los aislamientos en los distintos cultivares.



5. Discusión

La yuca constituye el pilar de la seguridad alimentaria en países de América Latina, África y Asia. Además de su importancia como producto alimenticio, el almidón de la yuca tiene importantes aplicaciones en la industria, que incluye la producción de bioetanol. Una de las limitantes bióticas más importantes del cultivo de yuca es la bacteriosis vascular. Hasta el momento no se ha logrado clonar y aislar el primer gen de resistencia a esta enfermedad en yuca. En este estudio se logró silenciar el gen candidato *RXam2* en plantas de yuca de la variedad 60444, las cuales mostraron una reducción en la expresión de los genes *RXam2* y *PAL*. Además de esto las plantas transgénicas mostraron un pequeño incremento en la susceptibilidad a *Xam* CIO151, sugiriendo que *RXam2* es un gen de resistencia a *Xam*.

La validación de genes es uno de los aspectos de mayor desarrollo en la biología molecular, principalmente en los últimos años en los que se dispone de la secuencia completa de genomas pero no se conoce la función de muchos de los genes secuenciados y predichos por informática. La validación mediante silenciamiento se convierte en una excelente herramienta para determinar la función del gen a través de la pérdida de un fenotipo particular en una planta. Inicialmente esta tecnología se realizó mediante la inserción del gen blanco de forma invertida para generar ARN de doble cadena en el citoplasma. Posteriormente se han realizado nuevos tipos de silenciamiento génico con efectividad incrementada en los cuales se producen fragmentos de ARN de doble cadena conocidos como ARN hairpin (hpARN) que han logrado incrementar la eficiencia de silenciamiento hasta un 90% en términos de reducción del transcrito (Frizzi & Huang, 2010; Wesley *et al.*, 2001). En este trabajo nosotros empleamos esta estrategia para silenciar el gen *RXam2*. Considerando que si *RXam2* está implicado en la

resistencia se esperaría susceptibilidad si el gen se silencia en plantas resistentes. Sin embargo la variedad modelo en la cual se ha establecido el sistema de transformación es el cultivar 60444, el cual es susceptible a la bacteriosis vascular. Por esta razón se evaluaron las variedades BRA685 y SG107-35, las cuales son altamente resistentes a *Xam*. La base inicial de producción de CEF con fines de transformación genética es la embriogénesis somática. Por tal razón el punto de partida para determinar la posibilidad de transformación de plantas de yuca consiste en tener una producción eficiente de embriones somáticos. Diversos estudios han evaluado varias auxinas sintéticas con fines de producción de embriones somáticos y han encontrado que Picloram y 2,4-D son las hormonas que presentan la mayor eficiencia con valores superiores al 50% (Groll *et al.*, 2001; Mathews *et al.*, 1993; Medero *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2003). En este estudio se evaluó el efecto de picloram, dicamba y 2,4-D y se encontró que la hormona picloram es más eficiente para producir embriones somáticos en BRA685 y SG107-35 que las otras dos.

En el presente estudio se encontró que en uno de los cultivares evaluados, BRA685, es posible la producción de CEF y regeneración de plantas a partir del mismo, sin embargo el bajo número obtenido hace necesario incrementar esfuerzos que permitan mejorar y optimizar el procedimiento para que sea posible realizar transformaciones eficientes y se pueda explotar su característica de resistencia a bacteriosis vascular. En la variedad SG107-35 no se produjo CEF y por lo tanto no fue posible probar la eficiencia de transformación. Trabajos previos han evaluado la posibilidad de producción y transformación de CEF de cultivares alternativos de yuca (Hankoua *et al.*, 2006; López, 2000; Taylor *et al.*, 2001). Sin embargo la capacidad de transformación es mucho más reducida principalmente debido a la posibilidad de producción de líneas de CEF y regeneración del mismo. Taylor *et al*., (2001) evaluaron en 20 cultivares distintos de yuca la posibilidad de transformación genética de CEF, sin embargo en cinco de estos cultivares fue imposible producir CEF. De los 15 cultivares restantes no fue posible generar suspensiones embriogénicas con proliferación autónoma y solo en ocho fue posible la regeneración de plantas a partir del CEF producido en las suspensiones celulares (Taylor *et al.*, 2001). De estos ocho cultivares solo tres pudieron ser transformados exitosamente. Hankoua *et al.,* (2006) evaluaron cinco cultivares africanos distintos a 60444, de los cuales solo dos produjeron CEF, pero ninguno logró ser

transformado porque no se lograron producir líneas de CEF que proliferaran de forma autónoma. En consecuencia, es necesario continuar evaluando la capacidad de producción de CEF y transformación no solamente en variedades de interés comercial sino también en variedades modelo para estudios de investigación básica.

Dados los resultados negativos de transformación en BRA685 y SG107-35 se procedió a realizar el silenciamiento de *RXam2* en la variedad 60444, el genotipo utilizado como modelo de transformación genética. Aunque este cultivar no presenta elevados niveles de resistencia, el silenciamiento de *RXam2*, si realmente esté implicado en resistencia a *Xam*, podría generar una susceptibilidad incrementada.

Los resultados de transformación genética del cultivar 60444 mostraron que se logró producir un número muy bajo de plantas transgénicas en los ensayos realizados. Esto pudo haber ocurrido principalmente por dos razones, la primera de ellas es el gran tamaño del ADN-T de la construcción, el cual fue de cerca de 10kb. Park *et al.,*(2000) mostraron mediante la realización de ensayos de transformación de tabaco, arroz y algodón que la eficiencia de transformación disminuía a medida que el tamaño del ADN-T aumentaba y en consecuencia se requería de realizar transformaciones con mayor cantidad de explantes o tener plásmidos con genes *vir* adicionales. La segunda razón por la cual pudo haberse disminuido la eficiencia de transformación y regeneración de plantas transgénicas es que el silenciamiento del gen *RXam2* afecte otros procesos implicados como embriogénesis, crecimiento o desarrollo. Hewezi *et al*., (2006) por medio de la tecnología de ARNi silenciaron un gen de tipo NBS-LRR en girasol que previamente había sido relacionado con la resistencia a *Plasmopara halstedii,* agente causal del mildeo velloso. Sin embargo el silenciamiento de este gen produjo un resultado similar al obtenido en el presente trabajo dado que hubo una eficiencia de transformación reducida y las plantas transgénicas presentaron anormalidades en su desarrollo. Sin embargo por medio de silenciamiento en un sistema heterólogo (*Nicotiana benthamiana*), se incrementó los niveles de susceptibilidad en esta planta a un patógeno similar (Hewezi *et al.*, 2006).

A pesar de los bajos niveles de eficiencia en las transformaciones se lograron regenerar 5 plantas transgénicas, dos de las cuales pudieron ser caracterizadas en este trabajo. Las tres restantes por las razones de crecimiento retardado no pudieron ser evaluadas

pero serán objeto de un estudio próximo.

Dado que el ADN-T se inserta de forma aleatoria en el genoma y puede haber uno o varios eventos insercionales en una célula transformada se puede afectar la expresión del transgén. Además de esto el hecho de que la inserción sea aleatoria implica que el ADN-T pueda insertarse en zonas transcripcionalmente inactivas del genoma o que la inserción de múltiples copias de un transgén provoque el silenciamiento de los genes que se insertaron (Ghedira, 2009). Todos estos hechos afectan la expresión del transgén. En el presente trabajo se observó una expresión correcta de los transgenes en las dos plantas transgénicas (Fig. 4-20) a pesar de que las plantas no tienen una única inserción del transgén (Fig. 4-10).

La expresión endógena del gen *RXam2* se detectó tanto en plantas transgénicas como plantas no transgénicas (Fig. 4-20). Sin embargo es ampliamente reconocido que el silenciamiento génico nunca logra reducir la totalidad de la expresión. Aún así se ha observado que aunque los porcentajes de reducción en la expresión no son completos, son suficientes para determinar por pérdida de función el papel desempeñado por un gen particular (Eamens *et al.*, 2008). Wroblewski *et al*., (2007) por medio de silenciamiento génico mediado por hpARN evaluaron la función de una familia de genes de tipo NBS-LRR en lechuga. Aunque el silenciamiento de estos genes no superó el 84% y para muchos de ellos estuvo alrededor del 55% si se logró demostrar que los miembros de la familia RGC2 están involucrados en la resistencia a distintos aislamientos de *Bremia lactucae*. Adicionalmente, el gen *RXam2* es de baja expresión, lo que implica mayor dificultad en su detección y cuantificación y presente menor reproducibilidad. Estudios con cuantificación más precisa nos permitirán clarificar si existe una real reducción en la expresión de *RXam2* en las plantas transgénicas. A pesar de esto, si se logró demostrar una reducción en la expresión del gen *PAL* en las plantas transgénicas (Fig. 4-21).

Diversos estudios han mostrado que el gen de la *PAL* es inducido en respuestas de defensa contra distintos patógenos en varias especies vegetales (Cools & Ishii, 2002). En este mismo estudio, por medio de tratamiento con inductores de defensa, se logró inducir el gen *PAL* y detectar el incremento en su expresión por medio de RT-PCR semicuantitativo para aumentar la resistencia contra el patógeno *Colletotrichum*

orbiculare (Cools & Ishii, 2002*)*. También se ha observado una inducción en la expresión de *PAL* solamente en cultivares resistentes de caña de azúcar tratados con elicitores provenientes de *Xanthomonas albilineans*. Este resultado permite concluir que este gen también está involucrado en defensa contra patógenos filogenéticamente relacionados con *Xam* (Santiago *et al*., 2009). Previos estudios en nuestro laboratorio mostraron que este gen es inducido a 5 dpi. La reducción en la expresión del gen PAL en las plantas transgénicas sugieren que estas están comprometidas en las respuestas moleculares de defensa.

Fenotípicamente las plantas transgénicas no mostraron una susceptibilidad estadísticamente significativa a la bacteriosis. Sin embargo visualmente las plantas transgénicas si mostraron una reducción en las respuestas de defensa (Fig. 4-23). La severidad de los síntomas es mucho más evidente en las plantas transgénicas que en las no transgénicas, dado que se observó muerte total de tres de cuatro plantas transgénicas y solo una de cuatro en las plantas no transgénicas.

Tomados en conjunto los resultados sugieren que *RXam2* es una proteína de resistencia a la bacteriosis vascular en yuca.

La estrategia inicial de validación se basó en el silenciamiento génico debido a que para esta no se requiere la secuencia completa del gen. Sin embargo en la actualidad gracias a la secuenciación del genoma de yuca se conoce completamente su secuencia. Resulta importante ahora identificar cultivares en los cuales el gen no se encuentre funcional (por mutaciones en el marco de lectura que produzcan proteínas truncadas o ausencia del gen). A estas variedades, las cuales pueden incluir comerciales, se les podrá introducir el gen esperando una resistencia. Sin embargo, previo es necesario probar la transformabilidad de estas variedades y la presencia de SNPs que permitan determinar qué alelos del gen están implicados en la interacción con *Xam*.

Contar con un gen de resistencia en yuca permitirá desarrollar estrategias de mejoramiento o introducirlo en variedades comerciales susceptibles. Es un gran impacto no solo comercial sino investigativo ya que hasta ahora es el primer gen R identificado en yuca. Con miras a incrementar el impacto de este descubrimiento se ha proyectado evaluar la efectividad de este gen a cepas colectadas recientemente. La dinámica

poblacional de *Xam* se ha estudiado y se han demostrado cambios en las cepas a lo largo del tiempo (Restrepo *et al.*, 2004). El análisis realizado nos permitió comparar la virulencia de seis aislamientos recientes en cinco variedades de yuca. Estos análisis muestran que la variación entre los niveles de escala de la enfermedad varía en cuanto a cepa y cultivar, indicando que hay interacciones específicas debidas a los genotipos de la planta y el microorganismo. De igual forma que lo reportado por Restrepo *et al*., (2000a), los haplotipos correspondieron a patotipos únicos, por lo cual la variabilidad haplotípica corresponde con la variabilidad patotípica encontrada. Actualmente se están realizando más análisis con mayor número de aislamientos y variedades con el fin de determinar la diversidad actual de las poblaciones del patógeno y determinar si el silenciamiento de *RXam2* genera mayor susceptibilidad a una cepa en particular.

6. Conclusiones y recomendaciones

En el presente trabajo se mostró que el silenciamiento de *RXam2* compromete las respuestas de defensa de las plantas de yuca en su interacción con *Xam*. Esto se vio reflejado en la disminución de la expresión de genes implicados en defensa y la susceptibilidad levemente incrementada durante la infección por el patógeno. Esto nos indica que *RXam*2 sería el primer gen de resistencia que se caracteriza en yuca tanto para esta como para otras enfermedades. Nuestros resultados nos permitirán enfocar posteriores estudios de variabilidad alélica de este gen con el fin de determinar cuáles son los alelos que permiten generar la mayor resistencia a *Xam* y si estos alelos están implicados en resistencia a aislamientos recientes del patógeno.

En este trabajo se lograron obtener resultados preliminares que permiten perfilar a la variedad BRA685 para transformación genética dado que es capaz de producir CEF y regenerar plantas a partir de este, sin embargo es necesario evaluar un mayor número de cultivares resistentes y trabajar en mejorar los protocolo de transformación con los que se cuenta actualmente.

Finalmente se logro determinar que la variabilidad haplotípica de Xam se relaciona con su variabilidad patotípica, lo que indica que es necesario continuar con los estudios en búsqueda de mecanismos de resistencia que sean durables en el tiempo y a futuro permitan aumentar la sostenibilidad y rentabilidad del cultivo.

7. Bibliografía

Abramovitch, R.B., Anderson, J.C., & Martin, G.B. (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. In Nat Rev Mol Cell Biol, pp. 601-611.

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.

Alvarez, E., Bellotti, A., Calvert, L., Arias, B., Cadavid, L., pineda, B., Llano, G., & Cuervo, M. (2002). guia practica para el manejo de las enfermedades, las plagas y las deficiencias nutricionales de la yuca (cali, ciat).

Anderson, J.V., Delseny, M., Fregene, M.A., Jorge, V., Mba, C., Lopez, C., Restrepo, S., Soto, M., Piegu, B., Verdier, V.*, et al.* (2004). An EST resource for cassava and other species of Euphorbiaceae. Plant molecular biology *56*, 527-539.

Axtell, M.J., McNellis, T.W., Mudgett, M.B., Hsu, C.S., & Staskawicz, B.J. (2001). Mutational analysis of the Arabidopsis RPS2 disease resistance gene and the corresponding pseudomonas syringae avrRpt2 avirulence gene. Mol Plant Microbe Interact *14*, 181-188.

Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. Nature *431*, 356-363.

Beltrán, J., Prías, M., Al-Babili, S., Ladino, J., López, D., Beyer, P., Chavarriaga, P., & Tohme, J. (2010). Expression pattern conferred by a glutamic acid-rich protein gene promoter in Weld-grown transgenic cassava (Manihot esculenta Crantz). Planta *231*, 1413–1424.

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

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

Cadavid, L.F. (2005). Produccion de Yuca, 1 edn (Cali, CIAT).

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

Ceballos, H. (2002). La yuca en Colombia y el mundo: nuevas perspectivas para un cultivo milenario. En: CIAT (eds) La yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización, 586.

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

Contreras, E., & Lopez, C. (2008). Expression Of Two Resistance Gene Candidates Against Cassava Bacterial Blight In Cassava. Acta biolColomb *13*, 175-188.

Cools, H., & Ishii, H. (2002). Pretreatment of cucumber plants with acibenzolar-s-methyl sistemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene PAL1 for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. Physiological and Molecular Plant Pathology *61*, 273-280.

Cornelis, G.R. (2006). The type III secretion injectisome. Nat Rev Microbiol *4*, 811-825.

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.

Dangl, J.L., & Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature *411*, 826-833.

Delmer, D.P. (2005). Agriculture in the developing world: Connecting innovations in plant research to downstream applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 15739-15746.

Eamens, A., Wang, M.B., Smith, N.A., & Waterhouse, P.M. (2008). RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. Plant physiology *147*, 456-468.

Ellis, J.G., Dodds, P.N., & Lawrence, G.J. (2007). Flax Rust Resistance Gene Specificity is Based on Direct Resistance-Avirulence Protein Interactions. Annual review of phytopathology *45*, 289-306.

FAO (1998). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Agricultural commodity Projections edn (FAO, Roma).

Feitosa, T., Pinheiro, J.L., Aguiar, L.F., Jucá, T.L., & Paiva, F. (2007). Somatic Embryogenesis in Cassava Genotypes from the Northeast of Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology *50*, 201-206.

Fofana, I.B., Sangare, A., Collier, R., Taylor, C., & Fauquet, C.M. (2004). A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. Plant molecular biology *56*, 613-624.

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

Frizzi, A., & Huang, S. (2010). Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology. Plant Biotechnology Journal *8*, 655-677.

Ghedira, R. (2009). T-DNA Transfer, Integration, Stability and Quantification in Transgenic Plants. In Faculty of Science,Department of Plant Biotechnology and Genetics (Ghent, Ghent University), pp. 261.

Goff, S., & Salmeron, J.M. (2004). Back to the future of cereals. Scientific American, 42-49.

González, A.E., Schöpke, C., Taylor, N.J., Beachy, R.N., & Fauquet, C.M. (1998). Regeneration of transgenic cassava plants (Manihot esculenta Crantz) through Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic suspension cultures. Plant Cell Reports *17*, 827-831.

Groll, J., Mycock, D., Gray, V., & Laminski, S. (2001). Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. Plant Cell, Tissue and Organ Culture *65*, 201-210.

Hankoua, B.B., Taylor, N.J., Ng, S.Y.C., Fawole, I., Puonti-Kaerlas, J., Padmanabhan, C., Yadav, J.S., Fauquet, C.M., Dixon, A.G.O., & Fondong, V.N. (2006). Production of the first transgenic cassava in Africa via direct shoot organogenesis from friable embryogenic calli and germination of maturing somatic embryos. African Journal of Biotechnology *5*, 13.

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

Helliwell, C., & Waterhouse, P. (2003). Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. Methods (San Diego, Calif *30*, 289-295.

Hewezi, T., Mouzeyar, S., Thion, L., Rickauer, M., Alibert, G., Nicolas, P., & Kallerhoff1, J. (2006). Antisense expression of a NBS-LRR sequence in sunflower (Helianthus annuus L.) and tobacco (Nicotiana tabacum L.): evidence for a dual role in plant development and fungal resistance. Transgenic Research *15*, 165-180.

Ihemere, U., Arias-Garzon, D., Lawrence, S., & Sayre, R.T. (2006). Genetic modification of cassava for enhanced starch production. Plant Biotechnology Journal *4*, 453-465.

Jaimes, H. (2005). Mejora del protocolo para la transformación genética de yuca (Manihot esculenta Crantz) mediada por Agrobacterium tumefaciens usando callo embriogénico friable. In Ciencias (Santiago de Cali, Universidad del Valle), pp. 95.

Jha, G., Rajeshwari, R., & Sonti, R.V. (2005). Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. Mol Plant Microbe Interact *18*, 891-898.

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

Jorge, V., Fregene, M., Vélez, C.M., Duque, M.C., Tohme, J., & Verdier, V. (2001). QTL analysis of field resistance to Xanthomonas axonopodis pv. manihotis in cassava. *102*, 564-571.

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.

Jorge, V., & Verdier, V. (2002). Qualitative and quantitative evaluation of cassava bacterial blight resistance in F 1 progeny of a cross between elite cassava clones. Euphytica *123*, 41-48.

Jørgensen, K., Bak, S., Busk, P.K., Sørensen, C., Olsen, C.E., Puonti-Kaerlas, J., & Møller, B.L. (2005). Cassava Plants with a Depleted Cyanogenic Glucoside Content in Leaves and Tubers. Distribution of Cyanogenic Glucosides, Their Site of Synthesis and Transport, and Blockage of the Biosynthesis by RNA Interference Technology. Plant Physiology *139*, 363-374.

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.

Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. Annual review of phytopathology *44*, 41-60.

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.

Kpémoua, 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.

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

Li, H.Q., Sautter, C., Potrykus, I., & Puonti-Kaerlas, J. (1996). Genetic transformation of cassava (Manihot esculenta Crantz). Nature biotechnology *14*, 736-740.

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. (2006). 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.

Lopez, C.E. (2007). Fitopatología Molecular, 1 edn (Bogotá, Universidad Nacional de Colombia).

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

Lopez, C.E., Zuluaga, A.P., Cooke, R., Delseny, M., Tohme, J., & Verdier, V. (2003). Isolation of Resistance Gene Candidates (RGCs) and characterization of an RGC cluster in cassava. Mol Genet Genomics *269*, 658-671.

López, D. (2000). Inducción de callo embriogénico friable, CEF, y regeneración de plantas de la variedad de yuca Manihot esculenta, Crantz, MCol 2215. In Facultad de Ciencias Agropecuarias (Palmira, Valle, Universidad Nacional de Colombia.), pp. 70.

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

Mackey, D., Holt, B.F., 3rd, Wiig, A., & Dangl, J.L. (2002). RIN4 interacts with Pseudomonas syringae type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. Cell *108*, 743-754.

Mathews, H., Schopke, C., Carcamo, R., Chavarriaga, P., Fauquet, C., & Beachy, R.N. (1993). Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. Plant Cell Reports *12*, 328-333.

McCullen, C.A., & Binns, A.N. (2006). Agrobacterium tumefaciens and Plant Cell Interactions and Activities Required for Interkingdom Macromolecular Transfer. Annual review of cell and developmental biology *22*, 101-127.

Medero, V.R., Borroto, C., Rodríguez, S., Gómez, R., López, J., García, M., Ventura, J., Espinosa, L., Cabrera, M., Martínez, M.*, et al.* (2000). Embriogénesis somática a partir de meristemos axilares en yuca. Biotecnología Vegetal *1*, 21-26.

Medina, R.D., Faloci, M.M., Solís-Neffa, V., & Mroginski, L.A. (2003). Embriogénesis Somática y Regeneración de Plantas de Mandioca (Manihot esculenta Crantz) de Cultivares de Interés Para Argentina. Revista de Investigaciones Agropecuarias *32*, 143-160.

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

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

Oh, C.-S., & Martin, G. (2010). Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase. Trends in plant science *16*, 132-140.

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

Park, S.H., Lee, B.-M., Salas, M.G., Srivatanakul, M., & Smith, R.H. (2000). Shorter T-DNA or additional virulence genes improve Agrobacterium-mediated transformation. Theor Appl Genet *101*, 1015-1020.

Raemakers, K., Schreuder, M., Pereira, I., Munyikwa, T., Jacobsen, E., & Visser, R. (2001). Progress made in FEC transformation of cassava. Euphytica *120*, 15-24.

Raemakers, K., Schreuder, M., Suurs, L., Furrer-Verhorst, H., Vincken, J.-P., Vetten, N.d., Jacobsen, E., & Visser, R.G.F. (2005). Improved cassava starch by antisense inhibition of granule-bound starch synthase I. Molecular Breeding *16*, 163-172.

Ravensdale, M., Nemri, A., Thrall, P., Ellis, J., & Dodds, P. (2011). Co-evolutionary interactions between host resistance and pathogen effector genes in flax rust disease. Mol Plant Pathol *12*, 93-102.

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

Restrepo, S., Velez, C.M., & Verdier, V. (2000b). Measuring the Genetic Diversity of Xanthomonas axonopodis pv. manihotis Within Different Fields in Colombia. Phythopathology *90*, 683-690.

Roca, W.M. (1984). Cassava. In Handbook of plant cell culture (Macmillan Publishing; London, GB : Collier Macmillan Publishers. New York, NY, USA.), pp. 269-301.

Roche, M.B. (2000). DIG application manual for filter hibridization, Roche, ed. (Mannheim, Germany).

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

Santiago, R., de Armas, R., Legaz, M., & Vicente, C. (2009). Changes in phenolic acids content, phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in sugarcane leaves induced by elicitors isolated from Xanthomonas albilineans. Australasian Plant Pathology *38*, 357-365.

Sarria, R., Torres, E., Angel, F., Chavarriaga, P., & Roca, W.M. (2000). Transgenic plants of cassava (Manihot esculenta) with resistance to Basta obtained by Agrobacterium-mediated transformation. Plant Cell Reports *19*, 339-344.

Schopke, C., Taylor, N., Carcamo, R., Konan, N.K., Marmey, P., Henshaw, G.G., Beachy, R.N., & Fauquet, C. (1996). Regeneration of transgenic cassava plants (Manihot esculenta Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures. Nat Biotechnol *14*, 731-735.

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

Siritunga, D., Arias-Garzon, D., White, W., & Sayre, R.T. (2004). Over-expression of hydroxynitrile lyase in transgenic cassava roots accelerates cyanogenesis and food detoxification. Plant Biotechnology Journal *2*, 37-43.

Siritunga, D., & Sayre, R.T. (2003). Generation of cyanogen-free transgenic cassava. Planta *217*, 367-373.

Sofiari, E., Raemakers, C., E, K., Danso, K., van Lammeren, A., Jacobsen, E., & Visser, R. (1997). Comparison of NAA and 2,4D induced somatic embryogenesis in cassava. Plant Cell Tiss Org Cult *50*, 45–56.

Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H*., et al.* (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. Science (New York, NY *270*, 1804-1806.

Strange, R.N., & Scott, P.R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. Annual review of phytopathology *43*, 83-116.

Szurek, B., Rossier, O., Hause, G., & Bonas, U. (2002). Type III-dependent translocation of the Xanthomonas AvrBs3 protein into the plant cell. Molecular microbiology *46*, 13-23.

Takken, F.L., Albrecht, M., & Tameling, W.I. (2006). Resistance proteins: molecular switches of plant defence. Current opinion in plant biology *9*, 383-390.

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

Taylor, N.J., Masona, M.V., Carcamo, R., Ho, T., Schöpke, C., & Fauquet, C.M. (2001). Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (Manihot esculenta Crantz). Euphytica *120*, 25-34.

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, and M. Cuervo, eds. (Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)), pp. 148 - 159.

Voinnet, O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. Nature reviews *6*, 206-220.

Wanner, L., Li, G., Ware, D., Somssich, I., & Davis, K. (1995). The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol *27*, 327-338.

Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A*., et al.* (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. Plant J *27*, 581-590.

Wroblewski, T., Piskurewicz, U., Tomczak, A., Ochoa, O., & Michelmore, R.W. (2007). Silencing of the major family of NBS-LRR-encoding genes in lettuce results in the loss of multiple resistance specificities. The Plant Journal *51*, 803-818.

Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J.*, et al.* (2008). Pseudomonas syringae Effector AvrPto Blocks Innate Immunity by Targeting Receptor Kinases. Curr Biol *18*, 74-80.