Acta biol. Colomb., Vol. 13 No. 2, 2008 175 - 188

EXPRESIÓN DE DOS GENES CANDIDATOS A RESISTENCIA CONTRA LA BACTERIOSIS VASCULAR EN YUCA

Expression Of Two Resistance Gene Candidates Against Cassava Bacterial Blight In Cassava

ELÍZABETH CONTRERAS NIETO[1], Bióloga; CAMILO E. LÓPEZ CARRASCAL[2], Ph. D.
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, AA 14490,
Bogotá, Colombia.
[1] econtrerasn@unal.edu.co - [2] celopezc@unal.edu.co

Presentado 22 de octubre de 2007, aceptado 6 de mayo de 2008, correcciones 6 de junio de 2008.

RESUMEN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae) es el cuarto cultivo en importancia a nivel mundial como fuente de calorías para la población humana y cuya producción se ve afectada por la bacteriosis vascular, enfermedad ocasionada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). La resistencia a enfermedades en plantas depende de la presencia de genes de resistencia (*R*), los cuales reconocen a los patógenos y simultáneamente permiten desencadenar la respuesta de defensa. A pesar de recientes esfuerzos encaminados a la identificación de genes *R* en yuca, aún no se ha logrado clonar el primer gen *R* en este cultivo. En el presente trabajo se estudió el perfil de expresión de dos Genes Candidatos a Resistencia (RGCs) asociados a QTLs de defensa contra la bacteriosis vascular en yuca. A partir de la técnica transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se evaluó la expresión de los genes *RXam1* y *RXam2* en tallos y hojas de las variedades resistentes SG107-35 y MBRA685 de yuca, después de ser inoculadas con la cepa CIO151 de *Xam*. Se observó que *RXam1* es inducido a partir de los cinco días post-inoculación tanto en tallos como hojas de las dos variedades, mientras que *RXam2* es expresado de manera constitutiva en la variedad MBRA685.

Palabras clave: *Manihot esculenta; Xam;* RGC; RT-PCR.

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae) is the fourth food crop used as an important energy source for human population worldwide. Cassava Bacterial Blight (CBB) is the most important disease of this crop. CBB is caused by the pathogenic bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). Plants have developed sophisticated mechanisms to detect and respond to infection by pathogens. These mechanisms depend on the presence of resistance (*R*) genes, which recognize proteins produced by pathogens. Although efforts have been conducted to identify R genes in

cassava, the first *R* gene in this crop has not been cloned. The present work studied the expression profile of two resistance gene candidates (RGCs) which are linked to QTL associated with resistance to CBB. Gene expression of *RXam1* and *RXam2* was evaluated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in stems and leaves of SG107-35 and MBRA685, two cassava resistant cultivars, which were challenged with *Xam* CIO151. We observed that the expression of *RXam1* is induced starting five days post-inoculation in the two cultivars studied and in both tissues while the gene *RXam2* was constitutively expressed in MBRA685 cultivar.

Key words: *Manihot esculenta; Xam;* RGC; RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

Las plantas frente al ataque de los patógenos han desarrollado un "sistema inmune" que de acuerdo al reconocimiento molecular del patógeno y evolución del mismo se ha diferenciado en dos ramas (Jones y Dangl, 2006). La primera rama reconoce moléculas comunes de diversas clases de microorganismos, los MAMPs (del inglés, *Microbe-Associated Molecular Patterns*) los cuales son percibidos por receptores PRRs (del inglés, *Pattern Recognition Receptors*). Este tipo de resistencia se ha denominado defensa basal (Chisholm *et al.*, 2006). Los patógenos a su vez han desarrollado mecanismos para bloquear este primer nivel de defensa a través de la introducción de factores proteicos denominados efectores. En el caso de bacterias, los efectores son liberados por el Sistema de Secreción Tipo Tres -T3SS- (del inglés, *Type Three Secretion System*). Las plantas han desarrollado una segunda rama de defensa conocida como resistencia raza-especifica, en la cual las proteínas de resistencia (R) permiten el reconocimiento de los efectores. Cuando los efectores son reconocidos reciben el nombre de proteínas de avirulencia (Avr) (Jones y Dangl, 2006). Las variedades de plantas que posean la proteína R que reconozca la proteína Avr correspondiente de una raza de un patógeno determinado presentarán este tipo de resistencia (resistencia monogénica o cualitativa). El carácter monogénico de la resistencia raza-específica ha hecho que esta sea la más estudiada. Sin embargo la resistencia gobernada por varios genes (poligénica o cuantitativa) es quizás la resistencia que se presenta con mayor frecuencia en la naturaleza. Esta resistencia presenta la ventaja de ser más durable y de amplio espectro. La manera de identificar las regiones genómicas implicadas en este tipo de resistencia se hace a través del estudio e identificación de loci de caracteres cuantitativos -QTLs- (del inglés, *Quantitative Trait Loci*).

Las proteínas R a pesar de conferir resistencia a diversos patógenos presentan un grupo limitado de dominios estructurales conservados. La mayoría de genes *R* codifican para proteínas que presentan un dominio NBS (del inglés, *Nucleotide Binding Sites*) en su extremo N-terminal y un dominio LRR (del inglés, *Leucine Rich Repeats*) en el extremo C-terminal. Otro grupo importante de genes *R* es el que codifica proteínas que presentan un dominio LRR extracelular y pueden contener además un dominio transmembranal y un dominio kinasa intracelular (RLK del inglés, *Receptor Like Kinase*). De manera interesante se ha observado que las proteínas que controlan la defensa basal y la resistencia raza-específica poseen un dominio RLK similar. Las proteínas

FLS2, EFR y Xa21 presentan esta estructura. La dos primeras son PRRs que reconocen los PAMPs flagelina y EF-Tu, mientras que Xa21 es una proteína R de arroz que reconoce cepas de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) que portan el efector AvrXa21.

La presencia de dominios conservados en las proteínas R ha permitido desarrollar estrategias encaminadas a identificar genes de resistencia candidatos o RGCs (del inglés, *Resistance Gene Candidates*), que pueden ser aislados mediante PCR empleando primers degenerados diseñados a partir dichos dominios. Algunos RGCs se han mapeado y han co-localizado con loci de genes R o con QTLs asociados a resistencia (Ramalingam *et al.*, 2003).

La yuca (*Manihot esculenta,* Crantz) se constituye como uno de los productos agrícolas de vital importancia para la seguridad alimentaría siendo el componente básico de la dieta de más de 1.000 millones de personas al día en el mundo (DANE, 2004; Nicaragua *et al.*, 2004). Recientemente, el cultivo de la yuca ha despertado un gran interés por ser un cultivo promisorio en la producción de biocombustibles (Ceballos, 2002). Una de las enfermedades de mayor importancia es la Bacteriosis Vascular también conocida como Añublo Vascular. Esta enfermedad está presente tanto en África como en América Latina y es causada por la bacteria gram-negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis -Xam,* (Vauterin, 1995)-. Las pérdidas ocasionadas por la bacteriosis han llegado hasta el 100% en dos o tres ciclos de cultivo (Verdier, 2002).

Los estudios citoquímicos de la interacción yuca-*Xam* han revelado que la defensa se da a nivel de tejidos vasculares mediante respuestas de refuerzo de las paredes celulares, lo cual se presenta tanto en plantas resistentes como susceptibles y cuya diferencia está dada por el grado de intensidad y velocidad en las cuales ocurren estas respuestas (Kpémoua *et al.*, 1996; Boher *et al.*, 1997).

La ausencia de respuesta hipersensible (Verdier, 2002) y la diferencia en la intensidad de reacción entre cultivares resistentes y susceptibles en yuca muestran que la resistencia es de tipo cuantitativo (López *et al.*, 2005). Los análisis de segregación de la resistencia a la bacteriosis han permitido identificar 12 QTLs asociados a cinco cepas de *Xam,* los cuales explican entre el 8 al 30% de la variación fenotípica (Jorge *et al.*, 2000, 2001). Recientemente en yuca ha sido posible la identificación de varios RGCs, algunos de los cuales se han asociado con QTLs de resistencia a *Xam*. Empleando primers diseñados a partir del gen Xa21 de arroz se logró amplificar un fragmento en yuca, el cual co-localizó con un QTL que explica el 13% de la resistencia a la cepa CIO136. Hace poco se identificó la secuencia completa de dicho gen demostrando que codifica una proteína tipo RLK y ha sido denominado *RXam1* (Resistencia a *Xam* y ser el posible primer gen *R* en yuca). Estudios recientes han mostrado que *RXam1* es inducido en plantas MBRA685 resistentes a la cepa CIO136 presentando un pico de expresión a cinco días post-inoculación (dpi) (López *et al.*, 2007a). Otro RGC de tipo NBS asociado a un QTL que explica el 62% de la resistencia a la cepa CIO151 (López *et al.*, 2007b) se identificó mediante el empleo de primers degenerados (López *et al.*, 2003) y fue en consecuencia denominado *RXam2* (Resistencia a *Xam* y ser el posible segundo gen *R* en yuca).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión e inducción de los genes *RXam1* y *RXam2* en respuesta a la infección con la cepa CIO151 de *Xam.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal e inoculación

Las variedades de yuca empleadas fueron MBRA685 y SG107-35 reportadas como resistentes a la cepa CIO151 de *Xam* (Restrepo *et al.*, 2000). Las plantas propagadas *in vitro* se obtuvieron de la colección de germoplasma del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) de las variedades mencionadas se transfirieron a suelo estéril, dejándolas crecer por tres meses en un invernadero de CIAT para el caso de MBRA685 (temperatura de 28 °C/19 °C día/noche; humedad relativa de 80%; altitud de 965 msnm (Segovia *et al.*, 2000) y en el invernadero de la finca Los Buganvilles del municipio de La Vega, Colombia, para las plantas de la variedad SG107-35 (temperatura 24-31/19-20 °C día/noche; humedad relativa de 95%; altitud de 1.230 msnm). Las plantas de tres meses de edad fueron inoculadas en tallos y hojas con la cepa CIO151 de *Xam*. La cepa CIO151 pertenece al haplotipo C20, y fue colectada en la ecozona 2, correspondiente a los Llanos Orientales (Restrepo *et al.*, 2000). La cepa de *Xam* CIO151 se creció en medio LPGA a 28 °C con dos días de anterioridad a la inoculación la cual se empleó en la preparación de una suspensión de 10^8 unidades formadoras de colonia (CFU) aproximadamente. Hojas cercanas al tercer nudo se perforaron con un sacabocados, alrededor de seis orificios se abrieron por folíolo, en donde se depositó una gota de la suspensión de *Xam*. El tallo situado entre las terceras y cuartas hojas se inoculó por punción con un palillo de madera con bacteria *Xam* crecida directamente del medio LPGA (Restrepo *et al.*, 2000). Se colectaron cinco tiempos post-inoculación: 0, 24, 48 horas y cinco y siete días. Se emplearon tres plantas por cada tiempo post-inoculación, y de cada una de éstas se colectaron dos hojas. Para tallos, se colectaron 2 cm arriba y abajo del punto de inoculación de cada planta.

Diseño de primers

Las secuencias del RGC7 y del BAC 39P22 reportadas para el gen *RXam2* (López *et al.*, 2003a) se alinearon en BLAST resultando un fragmento de 1084 pb (Fig. 1) utilizado para el diseño de los primers *RXam2*-IF -IR y -IVF -IVR los cuales amplifican fragmentos de 564 pb y 135 pb, respectivamente (Fig. 1). El diseño de los primers se hizo con el programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000). Los primers empleados para el gen *RXam1* (Cassav-Cassa) fueron descritos previamente (López *et al.*, 2007a) y amplifican un fragmento de 700 pb cuando se emplea ADN genómico y de 600 pb al utilizar ADN complementario (ADNc), ya que estos primers están diseñados de tal forma que amplifican una región de *RXam1* que incluye un intrón de 100 pb lo que permite identificar si en las muestras de ADNc existe contaminación con ADN genómico. Se utilizaron primers para el gen G3PDH que amplifican aproximadamente 230 pb, empleado como control para evaluar la integridad y existencia de ADNc. Además, el gen G3PDH es un gen constitutivo no implicado en las respuestas de defensa y por tanto su nivel de expresión se mantiene constante durante los tiempos post-inoculación (López *et al.*, 2004) (Tabla 1).

Extracción de ADN

Se maceraron 3 g de tejido de cada variedad en nitrógeno líquido y se procedió a extraer su ADN genómico de acuerdo al protocolo descrito por Dellaporta *et al.* (1983). El ADN

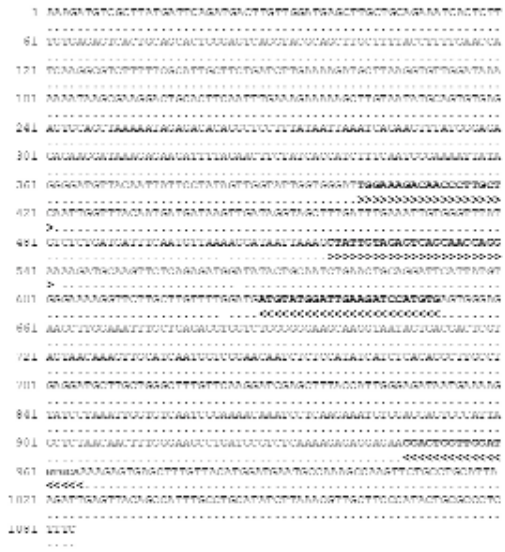

Figura 1. Fragmento de 1.084 pb resultado del ensamblaje de las secuencias del RGC7 y BAC 39P22, a partir del cual se diseñaron los primers *RXam2*-I.R-I.F (externos) y *RXam2*-IV.R-IV.F (internos) empleados para ver la expresión del gen *RXam2*. *Primers forward* (>); *Primers reverse* (<).

genómico se empleó para estandarizar la temperatura de alineamiento de los primers que se utilizaron.

Extracción de ARN

El tejido de cada tiempo post-inoculación y de cada variedad de yuca se maceró en nitrógeno líquido y se utilizó para extraer el ARN empleando el kit SV Total RNA Isolation System® el cual incluye un tratamiento con DNAsa (Promega, Madison, WI, USA). Para eliminar cualquier traza de ADN genómico, las muestras fueron nuevamente tratadas con DNAsa® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El ARN se cuantificó en el espectofotómetro Smart-Spec 3000 BIO-RAD. Para visualizar la calidad y concentración del ARN se corrieron 0,5 µl de ARN en un gel de agarosa al 1,2%.

Primer	Secuencia	Fragmento
Cassav.F	5'-GGTTGCATCTACCAGTTTCAGC-3'	ADN genómico: 700 pb
Cassa.R	5'- GACAAGTTAATGGCCCCTGA-3'	ADNc: 600 pb
RXam2-I.F	5'-TGGAAAGACAACCCTTGCTC-3'	564 pb
RXam2-I.R	5'-CTATTGTAGAGTCAGCAACCAGGA-3'	
RXam2-IV.F	5'-CTATTGTAGAGTCAGCAACCAGGA-3'	135 pb
RXam2-IV.R	5'-CACATGGATCTTCAATCCATACAT-3'	
G3PDH.F	5'-CCGTGTTCCAACTGTTGATG-3'	230 pb
G3PDH.R	5'-CTGCACACCCACCAGAGTAA-3'	

Tabla 1. Descripción de los cuatro pares de primers empleados. Cassav-Cassava amplifica un fragmento del gen *RXam1*. *RXam2*-I.F-*RXam2*-I-R y *RXam2*-IV.F-*RXam2*-IV-R amplifican fragmentos del gen *RXam2*. G3PDH.F- G3PDH.R amplifican un fragmento del gen constitutivo G3PDH.

Síntesis de ADN complementario (ADNc) y amplificación de los RGCs

0,5 µg de ARN se emplearon para sintetizar ADNc de una cadena utilizando la transcriptasa reversa SuperScript III® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y una mezcla de oligo dT y primers aleatorios. La reacción de PCR se hizo en un volumen final de 50 µl que contenía: 1X de buffer de PCR (50 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl, 0,1% de TritónX-100), 2,5 mM de MgCl2, 0,2 mM de dNTPs, 0,1 µM de cada primer y 2,5 U de Taq polimerasa (Promega, Biotech, Madison Wis.), (CIAT, Cali, Colombia) y 6 µl de ADNc. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo bajo las siguiente condiciones de temperatura: denaturación inicial a 94 °C por 2 min seguido de 35 ciclos de amplificación que incluía una denaturación por 30 s a 94 °C, un annealing por 30 s a la temperatura correspondiente a cada primer (Tabla 1) y una extensión por 1 min a 72 °C. Los productos de PCR de 300-600 pb y 100-300 pb se corrieron en geles de agarosa al 1,2% y 2,0%, respectivamente en buffer TAE 0,5%. Los geles se observaron en un transiluminador con luz ultravioleta y el tamaño de los fragmentos amplificados se determinaron con el marcador de peso molecular 1 Kb Plus Ladder ® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para el gen *RXam2* se hizo un PCR anidado par-tiendo del primer producto de PCR obtenido con los primers *RXam2*-I.R *RXam2*-I.F. Este producto se diluyó 1:20 y se tomaron 5 ul para realizar un segundo PCR con los primers internos *RXam2*-IV.R *RXam2*-IV.F.

RESULTADOS

Inoculación, extracción de ARN y síntesis de ADNc control

Como se observa en la figura 2, se obtuvo un ARN de buena calidad para todos los tiempos post-inoculación. A partir de este ARN se procedió con la síntesis de ADNc. La existencia e integridad del ADNc se verificó amplificando el gen constitutivo G3PDH. El gen G3PDH fue amplificado de manera positiva en todos los ADNc ensayados (Figs. 3, 4 y 5). La intensidad de la banda observada en el gel de agarosa del producto de amplificación correspondiente al gen G3PDH fue similar entre los diferentes tiempos post-inoculación, tanto para el caso de tallos y de hojas en la variedad MBRA685. Para la variedad SG107-35 se observó una intensidad un poco mayor a 48 horas post-inoculación (hpi) y siete días post-inoculación (dpi). Esta leve diferencia solo puede ser explicada producto de una eficiencia diferencial en la sín-

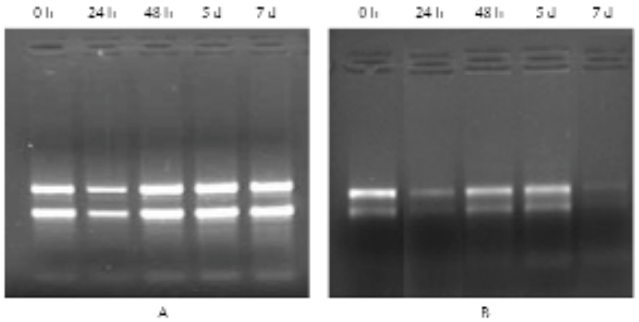

Figura 2. Calidad e integridad de ARN en el proceso de extracción en la variedad MBRA685 en los cinco tiempos post-inoculación del tejido de tallos (A) y de hojas (B).

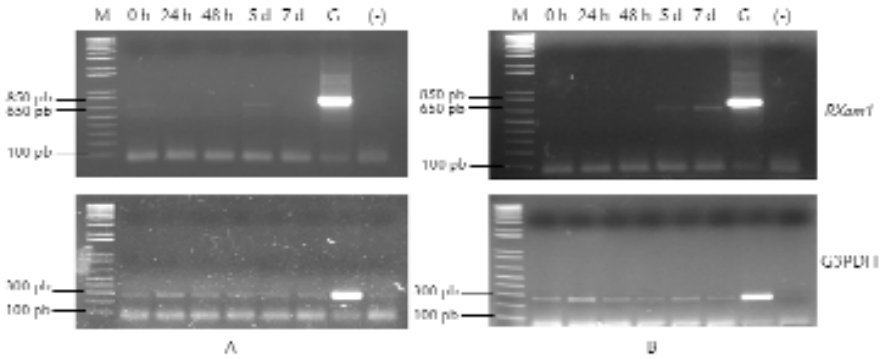

Fig. 3 Perfil de expresión del gen *RXam1* por Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en el cultivar resistente MBRA685 de yuca inoculado con la cepa CIO151 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). Expresión evaluada en tejidos de hojas (A) y de tallos (B), los cuales fueron colectados a las 0, 24, 48 horas post-inoculación (hpi), cinco y siete días post-inoculación (dpi). Amplificación de 600 pb en ADN complementario (ADNc) y de 700 pb en ADN genómico del gen *RXam1*. Amplificación de 280 pb del gen constitutivo G3PDH. El gen G3PDH se utilizó para corroborar la integridad del ADNc. M: Marcador de peso molecular 1Kb Ladder; G: ADN genómico de MBRA685; (-): Agua, como control negativo del PCR.

tesis de ADNc en cada tiempo dado que el G3PDH es un gen constitutivo cuya expresión no varia. A pesar de estas sutiles diferencias, y considerando que el principal objetivo de este trabajo era evaluar si existe o no expresión, se puede indicar que las cantidades de ADNc para las diferentes muestras fueron homogéneas y de observarse diferencias en la intensidad en el producto de amplificación para los genes *RXam1* y *RXam2*, éstas podrían explicarse como una respuesta diferencial frente a la infección. Por esta razón se empleó la misma cantidad de ADNc (6 µl) para las evaluaciones del perfil de expresión de los genes *RXam1* y *RXam2*.

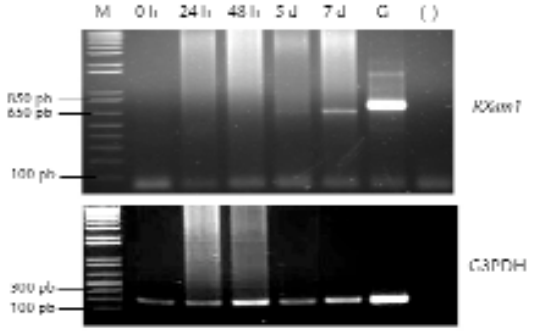

Figura 4. Perfil de expresión del gen *RXam1* por Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en el cultivar resistente SG107-35 de yuca inoculado con la cepa CIO151 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). Expresión evaluada en tejidos de tallos, que fueron colectados a las 0, 24, 48 horas post-inoculación (hpi), 5 y 7 días post-inoculación (dpi). Amplificación de 600 pb en ADN complementario (ADNc) y de 700 pb en ADN genómico del gen *RXam1*. Amplificación de 280 pb del gen constitutivo G3PDH. El gen G3PDH se utilizó para corroborar la integridad del ADNc. M: Marcador de peso molecular 1Kb Ladder; G: ADN genómico de MBRA685; (-): Agua, como control negativo del PCR.

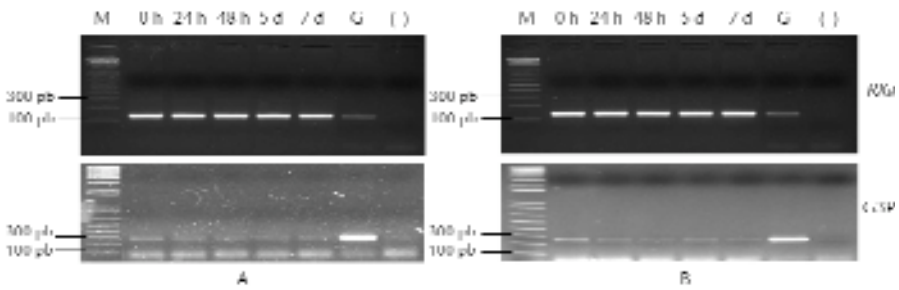

Figura 5. Perfil de expresión del gen *RXam2* por Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en el cultivar resistente MBRA685 de yuca inoculado con la cepa CIO151 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). Expresión evaluada en tejidos de hojas (A) y de tallos (B), los cuales fueron colectados a las 0, 24, 48 horas post-inoculación (hpi), cinco y siete días post-inoculación (dpi). Amplificación de 135 pb del gen *RXam2*. Amplificación de 280 pb del gen constitutivo G3PDH. El gen G3PDH se utilizó para corroborar la integridad del ADNc. M: Marcador de peso molecular 1Kb Ladder; G: ADN genómico de MBRA685; (-): Agua, como control negativo del PCR.

Perfil de expresión de *RXam1*

El gen *RXam1* co-localiza con un QTL que explica el 13% de la resistencia a la cepa CIO136 y es inducido en plantas MBRA685 resistentes a esta cepa presentando un pico de expresión a 5 dpi (López *et al.*, 2007a). En este trabajo se evaluó si *RXam1* es igualmente inducido por otra cepa de *Xam*, la CIO151, en variedades resistentes. El ADNc obtenido como se describió anteriormente se empleó para evaluar la expresión del gen *RXam1*. Para amplificar un fragmento correspondiente al gen *RXam1* se emplearon los primers cassav-cassa (López *et al.*, 2007a), los cuales amplifican dos tipos de fragmentos dependiendo de la muestra que se emplee. A partir de ADNc se amplifica un fragmento de 600 pb, y empleando ADN genómico uno de 700 pb, ya que los primers están diseñados sobre una región que incluye un intrón de 100 pb. Este hecho permite evaluar simultáneamente si existe contaminación de ADN genómico en la preparación de ARN.

Como se observa en la figuras 3 y 4 se obtuvo una amplificación de un fragmento esperado de 600 pb correspondiente al gen *RXam1* en las dos variedades resistentes de yuca. En la variedad MBRA685 la expresión de *RXam1* se presentó en los dos tipos de tejidos evaluados. En hojas se observó una expresión a los 5 dpi, la cual desapareció a los siete días post-inoculación, mientras que en tallos la expresión a 5 dpi fue más leve comparada con la de hojas pero se mantuvo y se incrementó a los 7 dpi (Fig. 3). En tallos de la variedad SG107-35 *RXam1* se presentó una expresión a los 5 dpi con un incremento a los 7 dpi.

Perfil de expresión de *RXam2*

Los ensayos previos de amplificación del gen *RXam2* empleando ADN genómico como molde se realizaron con los primers *RXam2*-I.R- *RXam2*-I.F (Tabla 1), los cuales amplificaron un fragmento de 564 pb (datos no mostrados). Estos primers fueron empleados en los primeros estudios de expresión génica del gen *RXam2*, sin embargo no se observó amplificación del gen en ninguna variedad (MBRA685 o SG107-35) ni en ningún tipo de tejido (tallos y hojas) (datos no mostrados). Se decidió evaluar la

expresión de *RXam2* efectuando un PCR anidado. Para esto, el producto de amplificación obtenido con los primers *RXam2*-I.R-I.F fue empleado como molde en un segundo PCR con los primers *RXam2*-IV.R-IV.F (Fig. 1 y Tabla 1) en cuyo caso se esperaba un fragmento de 135 pb.
En la variedad MBRA685 se observó una leve amplificación del fragmento esperado en todos los tiempos evaluados, indicando una baja expresión del gen *RXam2* tanto en hojas como en tallos (Fig. 5).

DISCUSIÓN

En yuca, recientemente, se han identificado dos genes de resistencia candidatos: *RXam1* y *RXam2*. Estos genes codifican proteínas putativas con dominios LRR-STK y NBS-LRR, respectivamente, propios de la mayoría de proteínas de resistencia. *RXam1* y *RXam2* colocalizan con QTLs que explican el 13% y el 62% de la resistencia a las cepas CIO136 y CIO151, respectivamente. En este estudio hemos demostrado que el gen *RXam1* es inducido en respuesta a la infección por *Xam* en dos variedades resistentes de yuca.
Previamente se ha establecido que *RXam1* es inducido en respuesta a la infección con la cepa CIO136 de *Xam* (López *et al.*, 2007a). La cepa CIO136 pertenece al haplotipo C17 y fue colectada en la Ecozona 2 (Llanos Orientales). En el presente estudio se demostró que este gen también se induce en respuesta a la infección con la cepa CIO151, la cual a pesar de ser colectada en la misma región geográfica que la cepa CIO136, corresponde a un haplotipo diferente. La inducción de la expresión de *RXam1* en plantas de yuca inoculadas con estas dos cepas, sugiere que este gen puede tener un rol de amplio espectro en la resistencia a diferentes cepas. El gen *Xa21* de arroz, que presenta dominios de tipo LRR-STK como *RXam1*, es un gen de amplio espectro en resistencia a diferentes cepas de *Xoo* que contienen la proteína de avirulencia AvrXa21 (Wang *et al.*, 1996). La contribución de *RXam1* a la resistencia a la cepa CIO151 puede no ser tan importante, razón que explicaría la falta de asociación de este gen en los análisis de QTLs (López, *et al.*, 2007b).
La proteína FLS2 de defensa basal en Arabidopsis, que reconoce el PAMP flagelina, presenta los dominios LRR-STK (Gómez-Gómez y Boller, 2000). Este tipo de dominios están presentes también en la proteína de resistencia raza-específica Xa21 de arroz. La proteína putativa codificada por el gen *RXam1*, también presenta los dominios LRR-STK. De demostrarse que *RXam1* es el gen de resistencia asociado al QTL se podría establecer que las proteínas implicadas en defensa basal, resistencia raza-específica y resistencia cuantitativa comparten dominios conservados. Esta similitud, muy posiblemente determine elementos comunes entre sí en las vías de transducción de señales que dichas proteínas desencadenan. Sin embargo, las diferencias entre los tipos de resistencia estarían determinadas por la intensidad y velocidad a la cual las respuestas de defensa se desencadenan, como se ha propuesto para explicar las diferencias entre las interacciones compatible e incompatible y la resistencia no hospedero (defensa basal) (Tao *et al.*, 2003).
El gen *RXam2* se encuentra asociado a un QTL que explica el 62% de resistencia a la cepa CIO151, considerándose como un gen mayor (López *et al.*, 2007b). En este trabajo se observó una expresión constitutiva *RXam2*, lo que no permitió corroborar su expresión

exclusivamente ante la infección con *Xam*. Sin embargo, la evaluación de expresión realizada solo fue de tipo cualitativo, lo que no permite determinar realmente si se presentan variaciones en la expresión en los diferentes tiempos post-inoculación. Por esta razón, estudios de expresión cuantitativa empleando por ejemplo qRT-PCR (del inglés; *quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction*) permitirán evaluar si existen diferencias durante la cinética de infección. Adicionalmente, un aspecto interesante a estudiar es la inducción de *RXam2* en variedades de yuca diferentes inoculadas con diversas cepas de *Xam* y observar si este gen presenta un amplio espectro en resistencia

En yuca se ha reportado 199 transcritos inducidos por inoculación con CIO151 en la variedad MBRA685, de los cuales el 57% se expresan diferencialmente a 7 dpi y menos del 20% antes de las 48 hpi (López *et al.*, 2005). *RXam1* se expresa a partir de los 5 y 7 dpi, lo que implica un reconocimiento tardío de *Xam* por parte de *RXam1* y corresponde a uno de los picos más importantes en la inducción de genes en respuesta a la infección con *Xam* (López *et al.*, 2005). El gen *RXam1* presenta una expresión diferencial según el tipo de tejido (Figs. 3 y 4), lo cual se explicaría por la forma como la bacteria coloniza los tejidos vegetales. La bacteria presenta una fase preliminar de desarrollo intercelular en el mesófilo antes de pasar a los haces vasculares del tallo principalmente (Verdier, 2002). En este caso, se establecería primero un reconocimiento en los haces de las hojas, que correspondería a la expresión de *RXam1* a los 5 dpi para posteriormente mantenerse e incrementarse a los 7 dpi en el tallo.

La mayoría de estudios sugieren que los genes R se expresan de manera constitutiva a niveles muy bajos (Radwan *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha reportado también algunos casos de inducción de genes *R*, como el caso de *Xa1,* (Yoshimura *et al.*, 1998) y *Xa27* (Gu *et al.*, 2005). En nuestro caso pudimos observar que *RXam1* es inducido mientras que nuestros resultados preliminares sugieren que la expresión de *RXam2* es constitutiva.

Se cree que muchos de los mecanismos de señalización que involucra la resistencia son adoptados de los procesos habituales de desarrollo de la planta, lo cual supone una reducción en los costos de producción y mantenimiento de estos sistemas de señalización sugiriendo una redirección de recursos energéticos para defenderse de los patógenos (Cipollini *et al.*, 2003). Varios estudios han mostrado, que en respuesta a patógenos, las plantas reprimen la expresión de genes implicados en fotosíntesis (López *et al.*, 2005, Swarbrick *et al.*, 2006) de tal forma que en plantas la expresión constitutiva de genes *R* desencadenaría una resistencia constitutiva que en ausencia del patógeno implica ciertos costos en la adaptación de las plantas. El hecho de que algunos genes *R* sólo se activen cuando la planta está siendo atacada (expresión inducida) implica menores costos en la adaptación de la planta, resaltando la importancia de una expresión inducida sobre una expresión constitutiva.

Adicionalmente, es necesaria la validación funcional de estos genes que puede llevarse a cabo mediante transformación genética, la cual en el caso de yuca puede tardar varios años. Recientemente, se han desarrollado alternativas basadas en silenciamiento génico, lo cual se puede realizar mediante ARN de interferencia (ARNi) (Graham *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2006) o mediante VIGS (Fofana *et al.*, 2004).

La posibilidad de contar con genes de resistencia cuantitativa y de amplio espectro contra la bacteriosis serán aspectos importantes para el entendimiento de la interacción yuca-*Xam* lo que permitirá el desarrollo de mejores estrategias de mejoramiento.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está enmarcado dentro del proyecto: "Clonación y secuenciación de un gen de resistencia asociado a un QTL de defensa a la bacteriosis vascular en yuca" financiado por la DIB de la Universidad Nacional de Colombia. A Valerie Verdier, Paul Chavarriaga y Jesús Beltrán por su asesoría científica en los experimentos de inoculación y de síntesis de ADNc.

BIBLIOGRAFÍA

BOHER B, NICOLE M, POTIN M, GEIGER JP. Extracellular Polysaccharides from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Interact with Cassava Cell Walls During Pathogenesis. Mol. Plant Microbe Interact. 1997;10(7):803-811.

CEBALLOS H. La yuca en Colombia y el mundo: nuevas perspectivas para un cultivo milenario. En: Ospina B. y Cebalos H, editores. La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y Consorcio Latinoamericano y del Caribe de Apoyo a la Investigación y Desarrollo de la Yuca (CLAYUCA). Proyecto IP-3. Mejoramiento de yuca. Cali, Colombia. 2002. p.1-13.

CIPOLLINI MBAGWU J, BARTO K, HILLSTROM C, ENRIGHT S. Expression of constitutive and inducible chemical defenses in native and invasive populations of *Alliaria petiolata*. J. Chem. Ecol. 2005;31:1255-67.

CHISHOLM ST, COAKER G, DAY B, STASKAWICZ. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. Cell. 2006;124:803-814.

DANE. ENA-Encuesta Nacional Agropecuaria-. Estudios Especiales. 2004 Censo de producción de yuca para uso industrial. Separata de resultados disponible en: http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/ena/censo_yuca_industrial.pdf. Consultada el 22 de abril de 2007.

DELLAPORTA SL, WOOD JB, HICKS. A Plant DNA Minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1983;1:19-21.

FOFANA IBF, SANGARÉ A, COLLIER R, TAYLOR C, FAUQUET CM. A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. Plant Mol. Biol. 2004;56:613-624.

GOMEZ-GOMEZ L, BOLLER T. FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in Arabidopsis. Mol. Cell 2000;5:1003-1011.

GRAHAM TL, GRAHAM MY, SUBRAMANIAN S, YU O. RNAi Silencing of Genes for Elicitation or Biosynthesis of 5-Deoxyisoflavonoids Suppresses Race-Specific Resistance and Hypersensitive Cell Death in *Phytophthora sojae* Infected Tissues. Plant physiol. 2007;144:728-740.

GU K, YANG B, TIAN D, WU L, WANG D, SREEKALA C, *et al.* R Gene Expression Induced by a Type-III Effector Triggers Disease Resistance in Rice. Nature. 2005;435:1122-1125.

JORGE V, FREGENE MA, DUQUE MC, BONIERBALE MW, TOHME J, VERDIERV. Genetic Mapping of Resistance to Bacterial Blight Disease in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Theor. Appl. Genet. 2000;101:865-872.

JORGE V, FREGENE M, VELEZ CM, DUQUE MC, TOHME J, VERDIER V. QTL Analysis of Field Resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Cassava. Theor. Appl. Genet. 2001;102:564-571.

JONES JDG, DANGL JL. The Plant Immune System. Nature 2006;444:323-329.

KPÉMOUA K, BOHER B, NICOLE M, CALATAYUD P, GEIGER JP. Cytochemistry of Defense Responses in Cassava Infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Can. J. Microbiol. 1996;42:1131-1143.

KUMAR, D, GUSTAFSSON, C, AND KLESSIG, DF. Validation of RNAi Silencing Specificity using Synthetic Genes: Salicylic Acid-binding Protein 2 is Required for Innate Immunity in Plants. Plant J. 2006;45:863-868.

LÓPEZ CE, ZULUAGA EAP, COOKE ER, DELSENY EM, TOHME J, VERDIER VJ. Isolation of Resistance Gene Candidates (RGCs) and Characterization of an RGC Cluster in Cassava. Mol. Gen. Genomics. 2003;269:658-671.

LÓPEZ C, JORGE V, PIÉGU B, MBA C, CORTES D, RESTREPO S, *et al.* A Unigene Catalogue of 5700 Expressed Genes in Cassava. Plant Mol. Biol. 2004;56:541-554.

LÓPEZ C, SOTO, M, RESTREPO S, PIÉGU B, COOKE R, DELSENY, *et al.* A Gene Expression Profile in Response to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Infection in Cassava Using a cDNA Microarray. Plant Mol. Biol. 2005;57:393-410.

LÓPEZ CE, BELTRÁN J, CONTRERAS E, CHAVARRIAGA P, TOHME J, VERDIER V. A *Xa21*-like Resistance Gene in Cassava: Implications for Cassava Resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis.* XIII FS-MPMI Congreso Jul. 22-26. 2007a.

LÓPEZ CE, QUESADA-OCAMPO LM, BOHORQUEZ A, DUQUE MC, VARGAS J, TOHME J, *et al.* Mapping EST-derived SSRs and ESTs Involved in Resistance to Bacterial Blight in *Manihot esculenta* Crantz. Genome. 2007b;50:1078-1088.

NICARAGUA K, PAVÓN F, CHAVARRÍA E. Guía MIP del Cultivo de la Yuca. Impresión Comercial La Prensa. 2004. 48pp.

RADWAN O, MOUZEYAR S, NICOLAS P, BOUZIDI MF. Induction of a Sunflower CC-NBS-LRR Resistance Gene Analogue during Incompatible Interaction with *Plasmopora halstedii*. J. Exp. Bot. 2005;56:567-575.

RAMALINGAM J, VERA CRUZ CM, KUKREJA K, CHITTOOR JM, WU JL, LEE SW, *et al.* Candidate Defense Genes From Rice, Barley, And Maize And Their Association With Qualitative And Quantitative Resistance In Rice. Mol. Plant Microbe Interact. 2003;16:14-24.

RESTREPO S, DUQUE MC, VERDIER V. Characterization of Pathotypes Among Isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. Plant Pathol. 2000;49:680-687.

ROZEN S, SKALETSKY H. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. En: Krawetz, S., Misener, S. (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ. 2000 p-365-386.

SEGOVIA RJ, SEDANO R, REINA G, LÓPEZ G, van SCHOONHOVEN, A. Árboles, arbustos y aves en el agrosistema del CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 2000. 55pg.

SWARBRICK PJ, SCHULZE-LEFERT P, SCHOLES JD. Metabolic Consequences of Susceptibility and Resistance (Race-specific and Broad-spectrum) in Barley Leaves Challenged with *Powdery Mildew*. Plant Cell Environ. 2006;29:1061-1076.

TAO Y, XIE Z, CHEN W, GLAZEBROOK J, CHANG HS, HAN B, *et al*. Quantitative Nature of *Arabidopsis* Responses during Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial *Pathogen Pseudomonas* syringae. Plant Cell. 2003;15:317-330.

VERDIER V. Bacteriosis Vascular (o Añublo Bacteriano de la Yuca Causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. En: Ospina B., Ceballos H., editores. La Yuca en el Tercer Milenio. CIAT, CLAYUCA eds. 2002.

WANG GL, SONG WY, RUAN DL, SIDERIS S, RONALD PC. The Cloned Gene, Xa21, Confers Resistance to Multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Isolates in Transgenic Plants. Mol. Plant Microbe Interact. 1996;9:850-855.

YOSHIMURA S, YAMANOUCHI U, KATAYOSE Y, TOKI S, WANG ZX, KONO I, *et al*. Expression of *Xa1,* a Bacterial Blight-Resistance Gene in Rice, is Induced by Bacterial Inoculation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998;95:1663-1668.