

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA PUTATIVAS PROTEÍNAS PR EN YUCA (*Manihot esculenta* Crantz)Studying the Expression of Genes Coding for Putative PR Proteins in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz)Mariana HERRERA¹, David PORTILLO¹, Marlon Adrian PULIDO¹, Paula Alejandra DÍAZ TATIS², Camilo Ernesto LÓPEZ CARRASCAL¹.¹ Grupo de investigación Manihot Biotec, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Cra 30 n.º 45-03. Bogotá, Colombia.² Grupo de Ciencias Biológicas y Químicas, Departamento de Biología, Universidad Antonio Nariño, Cra. 1 n.º 47A15. Bogotá, Colombia.*For correspondence. celopezc@unal.edu.coReceived: 14th April 2018, Returned for revision: 18th July 2018, Accepted: 2nd August 2018.

Associate Editor: Francisco José Martínez Pérez.

Citation/Citar este artículo como: Herrera M, Portillo D, Pulido MA, Díaz-Tatis PA, López Carrascal CE. Estudio de la expresión de genes que codifican para putativas proteínas PR en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Acta biol. Colomb. 2018;23(3):242-252. DOI:<http://dx.doi.org/10.15446/abc.v23n3.70878>

RESUMEN

Posterior al reconocimiento de agentes patógenos las plantas activan una serie de cascadas de señalización que culminan con la activación de factores de transcripción. Esto genera una concomitante reprogramación de la expresión génica que incluye la activación de la transcripción de los genes *PR* (*relacionados con patogenicidad*). Las proteínas *PR* son conocidas por poseer actividad antimicrobiana y evitan la posterior colonización del patógeno. En este estudio se empleó una aproximación bioinformática para identificar el repertorio de posibles proteínas *PR* en el genoma de yuca. Adicionalmente, se evaluó la expresión de nueve genes *PR* a lo largo del tiempo en variedades de yuca resistentes y susceptibles en respuesta a la inoculación con la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) mediante RT-PCR. Se encontró que varios genes *PR* fueron inducidos producto de la herida que se realiza durante el proceso de inoculación. Con el fin de evaluar cuantitativamente la contribución real de la infección bacteriana en la expresión de estos genes, se llevó a cabo una RT-PCR en tiempo real (QRT, Quantitative Real-Time PCR). Se encontró que en la variedad resistente el gen que codifica para MePR1 (*Manes06G026900.1*) presentó una inducción en su expresión a diferentes tiempos post-inoculación, lo cual no se observó en la variedad susceptible. De esta manera, este gen se constituye en un excelente marcador para evaluar la respuesta molecular de resistencia en plantas de yuca.

Palabras clave: bacteriosis vascular, expresión génica, genes relacionados con patogenicidad, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

ABSTRACT

Once pathogens are perceived by plants a signal transduction pathway is activated leading to the induction of transcription factors, which in turn reprogram the host gene expression including the transcription of *PR* (*Pathogenesis-Related*) genes. The *PR* proteins are well known for their antimicrobial activity and for contributing to arrest the invasion of pathogens. In this work, a bioinformatics approach was used to identify the repertoire of possible *PR* proteins in the cassava genome. Additionally, the expression of nine *PR* genes was evaluated over a time course in resistant and susceptible cassava varieties in response to inoculation with the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) by semiquantitative RT-PCR. It was found that several *PR* genes were induced as a result of the wound that is made during the inoculation process. In order to evaluate quantitatively the real contribution of the bacterial infection in the expression of the genes, a Real Time RT-PCR (qRT, quantitative Real-Time PCR) was carried out. In the resistant variety the gene coding for MePR1 (*Manes06G026900*) was induced at different post-inoculation times, which was not observed in the susceptible variety. Therefore, this gene constitutes an excellent marker to evaluate the molecular resistance response in cassava plants.

Keywords: cassava bacterial blight, gene expression, pathogenesis-related genes, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

INTRODUCCIÓN

En respuesta a patógenos, las plantas han desarrollado un sofisticado mecanismo de acción, el cual depende en primera medida de la capacidad de reconocer moléculas propias del patógeno y extrañas para la planta, tanto en la resistencia cuantitativa como cualitativa (Boller y He, 2009; Vásquez *et al.*, 2018). A nivel de la membrana plasmática, el reconocimiento de los patógenos depende de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) los cuales reconocen patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs). Por otro lado, a nivel intracelular el reconocimiento depende de las proteínas codificadas por los genes de resistencia *R*, las cuales reconocen proteínas efectoras inyectadas por los patógenos (Monaghan y Zipfel, 2012; Jones *et al.*, 2016). Una vez ocurre el reconocimiento del patógeno por parte de la planta se desencadena una serie de respuestas de defensa. Estas defensas incluyen el fortalecimiento de la pared celular a través de la síntesis de calosa y lignina (Hauck *et al.*, 2003), la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos como fitoalexinas (Almagro *et al.*, 2009) y la activación de las cascadas de señalización por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Meng y Zhang, 2013), entre otras. Todas estas respuestas culminan con la inducción de expresión de genes dentro de los cuales se encuentran aquellos que codifican para proteínas relacionadas con patogenicidad (*PR*) (van Loon, *et al.*, 2006).

Las proteínas *PR* están asociadas con la defensa de la planta, especialmente en interacciones incompatibles, en las cuales se impide el progreso del patógeno. Estas proteínas no poseen un alto grado de especificidad en la respuesta a patógenos y son coordinadas a nivel transcripcional (van Loon *et al.*, 1999). Clásicamente, los genes *PR* se han definido como aquellos que son inducidos únicamente en respuesta a patógenos y no bajo ningún otro tipo de estímulo o respuesta, sin embargo, esta definición es problemática porque un *PR* en un patosistema puede no serlo en otro (van Loon *et al.*, 2006). Aunque muchas de las proteínas *PR* poseen una actividad antimicrobiana *in vitro* y su acumulación está asociada con una respuesta de resistencia de la planta, la función de estas proteínas *in vivo* es poco conocida (Sels *et al.*, 2008). Basada en su similitud de secuencia y actividad, las proteínas *PR* se han clasificado en 17 familias denominadas *PR1* a *PR17* (van Loon *et al.*, 2006). Estas proteínas poseen una masa molecular relativamente baja e incluyen, por ejemplo, proteínas con actividad tipo quitinasa (*PR3*, 4, 8 y 11), glucanasa (*PR2*) y ribonucleasa (*PR10*). Una de las *PR* más empleadas como marcador de activación de la resistencia es *PR1* cuya función o actividad aún se desconoce (van Loon *et al.*, 2006). Adicionalmente, se conoce que las proteínas *PR* son activadas por varias hormonas tales como el ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (Sels *et al.*, 2008).

La yuca es una de las principales fuentes de alimentación en África, Asia y Latinoamérica (FAO, 2017). Sin embargo, su producción se ve fuertemente afectada por la bacteriosis vascular, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). En los últimos años se han empleado diferentes estrategias para comprender mejor los mecanismos celulares y moleculares de la interacción yuca-*Xam*. Gracias a estudios histológicos (Boher *et al.*, 1995; Kpémoua *et al.*, 1996) y al mapeo de loci de rasgos cuantitativos (QTL) (Jorge *et al.*, 2000; Soto *et al.*, 2016), se ha podido establecer que la resistencia a *Xam* es de tipo cuantitativa. El nivel de resistencia entre las diferentes variedades es muy variable, en tanto que la velocidad de la respuesta es genotipo-dependiente. Se ha observado que las respuestas son más rápidas e intensas en variedades resistentes comparadas con las susceptibles (Kpémoua *et al.*, 1996; López *et al.*, 2005; Sandino *et al.*, 2015). Adicionalmente, se han realizado varios estudios con el fin de identificar proteínas involucradas en el reconocimiento del patógeno, así como el estudio del cambio de la expresión génica global durante la interacción yuca-*Xam*, tanto en variedades resistentes como susceptibles (Santaella *et al.*, 2004; López *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2015). Estos estudios han evidenciado el aumento en los niveles de expresión de posibles genes de defensa presentes en yuca y que han sido previamente descritos en otros patosistemas. Estos incluyen genes involucrados en el estallido oxidativo (ascorbato peroxidasa, glutatión-S-transferasa), reconocimiento de patógenos potenciales (proteínas con dominios LRR) y reguladores de transcripción (factores de transcripción de tipo WRKY). También se han identificado como diferencialmente expresados genes que codifican para una quitinasa y osmotina, los cuales basados en su similitud y en su potencial función se acuñaron como putativos genes *PR* (López *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta hace poco tiempo no se había establecido con certeza cuáles son los genes de tipo *PR* que se inducen en respuesta a *Xam* y si esta expresión es diferencial entre variedades resistentes y susceptibles. Un primer estudio que aborda esta problemática fue reportado por Yooder *et al.* (2018) quienes evaluaron genes que codifican para proteínas *R*, RLKs, WRKY y *PRs* en dos variedades durante la infección con una cepa de *Xam* empleando plantas *in vitro* sin considerar la evaluación sobre plantas provenientes de estacas maduras. Tres genes de tipo WRKY, *PR1* y *PDF2.2* fueron inducidos y su expresión se incrementó con un previo tratamiento con hormonas vegetales (Yooder *et al.*, 2018). Este tipo de conocimiento es fundamental no sólo para evaluar si existen respuestas moleculares diferenciales entre variedades resistentes y susceptibles sino también para contar con genes marcadores que permitan determinar rápidamente si se están activando procesos moleculares inducidos en respuesta a una infección. Con este tipo de conocimiento se podría realizar una mejor caracterización

de variedades resistentes y compararlas con susceptibles, y determinar molecularmente las respuestas que se establecen en yuca cuando se emplean aproximaciones en las que se busca generar resistencia a diversos patógenos.

Con el fin de identificar genes *PR* en yuca, en este estudio se empleó en primera instancia una aproximación bioinformática para identificar putativos genes *PR* en el genoma de yuca, posteriormente un set de ellos fue seleccionado para evaluar su expresión mediante RT-PCR y qRT-PCR en plantas de yuca adultas de variedades resistentes y susceptibles tras la inoculación con *Xam* en condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda de PR candidatos y diseño de cebadores

Para identificar el repertorio de proteínas PR en yuca, en primera instancia, se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos Uniprot empleando como motor de búsqueda palabras conteniendo los nombres de cada uno de los PR: “PR1”, “PR2”, hasta “PR17”. También se emplearon palabras que abarcaran su función molecular tales como: proteínas relacionadas con patogénesis (pathogenesis-related protein) y la actividad asociada al tipo de familia.

A partir de las secuencias seleccionadas, se realizó un alineamiento tipo BLASTP de cada una contra el proteoma de yuca y se seleccionaron los cinco mejores resultados a condición de que tuvieran un porcentaje de similitud mayor al 60 % para cada uno de los *PR* de referencia de Uniprot. A partir de las secuencias codificantes (CDS, coding sequence) de los PR candidatos obtenidos de yuca, se diseñaron los cebadores empleando el programa Primer3 (Untergasse *et al.*, 2012).

Material vegetal e inoculación

Plantas de las variedades cv.60444 y SG107-35 se crecieron durante dos meses en el invernadero de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, bajo las siguientes condiciones: temperatura de 28°C/21°C (día/noche), humedad relativa de 80 %, con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

Las bacterias se crecieron por agotamiento a partir del stock almacenado a -80 °C del cepario del laboratorio del grupo Manihot Biotec de la Universidad Nacional, en medio LPGA (5 g extracto de levadura, 5 g peptona, 5 g glucosa y 15 g agar por 1 L de agua destilada). Las bacterias se crecieron a 28 °C durante dos días. Tras obtener colonias aisladas, se tomó una de ellas y se realizó el cultivo en 3 mL de medio LPG a 28 °C a 250 rpm durante 12 h. Se centrifugó 1 mL del cultivo a 6000 rpm durante 4 min, se descartó el sobrenadante, y posteriormente se resuspendió el precipitado en 1 mL de MgCl₂. Se ajustó a una DO_{600 nm} de 0,02 que corresponde a 10⁷ UFC/mL (unidades formadoras

de colonia). La concentración de bacterias empleada se verificó por diluciones seriadas.

La inoculación se realizó en el tallo mediante punción entre la segunda y tercera hoja totalmente extendida con un palillo de madera estéril. El palillo fue removido y se reemplazó por una punta pequeña estéril con 10 µL de la solución bacteriana de Xam686. Para las plantas control se realizó el mismo procedimiento, pero con una solución de MgCl₂ 10 mM. Se tomó la región del tallo que comprendía 1.5 cm hacia arriba (ápice) y 1.5 cm hacia abajo desde el punto de inoculación. Para cada tratamiento se colectó el tallo en nitrógeno líquido. Los tiempos de toma de muestra fueron: 0 y 24 horas post-inoculación (hpi) y 3, 5 y 7 días post-inoculación (dpi). Se empleó un diseño completamente aleatorizado para la distribución de las plantas en el invernadero.

Extracción de ARN, síntesis de ADNc y RT-PCR

El material vegetal se maceró en un mortero utilizando nitrógeno líquido. El buffer de extracción utilizado contenía acetato de sodio 100 mM, EDTA pH 7.5 1 mM y SDS 4 % (pH 5,2). Posteriormente se purificó con fenol ácido (pH 4,5): cloroformo: alcohol isoamílico 24:24:1. La fenolización se repitió una vez y se realizó la extracción con cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, dos veces. Finalmente, se precipitó con isopropanol. El ARN se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en agua ultra-pura (libre de nucleasas). A partir del ARN extraído manualmente, se realizó una purificación empleando el Invitrap® Spin plant RNA minikit (STRATEC, Berlín, GER). La integridad del ARN se verificó en gel de agarosa al 1% y se cuantificó con el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) mediante la medición de absorbancia a 260 y 280 nm. Una vez obtenido el ARN, se trató con DNase I (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) sobre 600 ng-1000 ng de ARN total, con el fin de remover el ADN genómico y así poder proceder con la síntesis de ADNc. Posteriormente se realizó un PCR del gen tubulina sobre el ARN tratado previamente con DNase I, como control. La síntesis de primera cadena de ADN se realizó con el kit First Strand cDNA Synthesis (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). Para verificar la síntesis correcta de ADNc se realizó un RT-PCR con cebadores diseñados a partir del gen tubulina, el cual se expresa constitutivamente (Tabla suplementaria 1).

qRT-PCR

Todas las reacciones de qRT-PCR se realizaron con el kit SsoAdvanced Universal Inhibitor SYBR Green Supermix (Bio-Rad) en un termociclador LightCycler® 96 System (Roche Diagnostics GmbH, Indianapolis, IN, USA). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µL (0,1 mM de cada primer, 0,1 mM de dNTPs) conteniendo 1 µL de ADNc. Las condiciones de amplificación fueron: denaturación inicial a

Tabla 1. Familias de proteínas PR seleccionadas para el estudio en yuca.

PR	Familia	ID del gen en el genoma de yuca (v.6)
PR1a	Pfam:00188 Cysteine-rich secretory protein family	Manes.07G050700
PR1b	Pfam:00188 Cysteine-rich secretory protein family	Manes.07G050400
PR1c	Pfam:00188 Cysteine-rich secretory protein family	Manes.07G050300
MePR1	Pfam:00188 Cysteine-rich secretory protein family	Manes.06G026900.1
PR2a	Pfam:00332 Glycosyl hydrolases family 17	Manes.03G202900
PR2b	Pfam:00407 Pathogenesis-related protein Bet v I family	Manes.15G007900
PR3a	Pfam:00182 Chitinase class I	Manes.04G067900
PR3b	Pfam:00182 Chitinase class I	Manes.11G106100
PR4a	Pfam:00187 Chitin recognition protein	Manes.01G064200
PR4b	Pfam:00187 Chitin recognition protein	Manes.08G135100
PR4c	Pfam:00967 Barwin family	Manes.08G135200
PR8a	Pfam:00704 Glycosyl hydrolases family 18	Manes.06G155500
PR8b	Pfam:00704 Glycosyl hydrolases family 18	Manes.06G155400
PR9	Pfam:00141 Peroxidase	Manes.15G104200
PR10a	Pfam:00407 Pathogenesis-related protein Bet v I family	cassava4.1_022277m*
PR10b	Pfam:00407 Pathogenesis-related protein Bet v I family	Manes.15G008700

* Los genes se identificaron en la versión 4.1 del genoma de yuca y al buscar su correspondencia en la versión actual (v. 6.1) se observó que no lista como anotado (www.phytozome.net).

95 °C por 10 min, 45 ciclos de 95 °C por 20 s, 60 °C por 20 s y 72 °C por 20 s. Se realizaron las curvas de calibración de los cebadores utilizando cinco diluciones seriadas usando un factor de dilución de 1:10. Para la evaluación de los genes se utilizaron 3 réplicas biológicas por cada una de las dos variedades y tres tiempos evaluados para plantas con tratamiento de inoculación y mock. Los resultados se analizaron con el software LightCycler 96 SW 1.1 (Roche). Para el cálculo de la expresión relativa de los genes de interés se utilizó el gen HK2 (*Manes06G114200.1* como gen de referencia (normalizador). Se realizaron dos análisis de expresión relativa empleando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Para el análisis de expresión en relación al tiempo 0 hpi, se empleó el modelo matemático de la siguiente manera: $\Delta C_t(60444/SG10735 \text{ inoculadas a 3 y 7 dpi}) = C_t(\text{target gene}) - C_t(\text{reference gene})$; $\Delta C_t(60444/SG10735 \text{ inoculadas a 0 hpi}) = C_t(\text{target gene}) - C_t(\text{reference gene})$; $\Delta\Delta C_t(60444/SG10735) = \Delta C_t(60444/SG10735 \text{ inoculadas a 3 y 7 dpi}) - \Delta C_t(60444/SG10735 \text{ inoculadas a 0 hpi})$. Por otro lado, para el análisis de expresión en relación a la herida con $MgCl_2$, se empleó el modelo matemático de la siguiente manera: $\Delta C_t(60444/SG10735 \text{ inoculadas a 0, 3 y 7 dpi}) = C_t(\text{target gene}) - C_t(\text{reference gene})$; $\Delta C_t(60444/SG10735 \text{ herida con } MgCl_2 \text{ a 0, 3 y 7 dpi}) = C_t(\text{target gene}) - C_t(\text{reference gene})$; $\Delta\Delta C_t(60444/SG10735 \text{ de la inoculación en relación a la herida}) = \Delta C_t(60444/SG10735 \text{ inoculadas a 0, 3 y 7 dpi}) - \Delta C_t(60444/SG10735 \text{ herida con } MgCl_2 \text{ a 0, 3 y 7 dpi})$.

RESULTADOS

Búsqueda de proteínas de tipo PR y diseño de cebadores para homólogos de PRs en yuca

Al realizar la búsqueda en la base de datos de Uniprot empleando como motor de búsqueda el término “PR”, su nombre y la función molecular asociada a PRs, se seleccionaron 50 proteínas de este tipo (Tabla suplementaria 1). La mayor cantidad de proteínas PR reportadas provienen de tabaco (*Nicotiana tabacum*) con 20 secuencias, seguido de tomate (*Solanum lycopersicum*) con 11 y *Arabidopsis thaliana* con siete proteínas. Las demás especies tan sólo presentan una proteína reportada, como el caso de cebada (*Hordeum vulgare*) con el PR14 y la proteína de maíz (*Zea mays*) de la familia PR6. La familia con mayor número de proteínas reportadas es la PR1, con nueve proteínas, seguido de la familia PR5 con ocho proteínas reportadas y PR2 y PR4 con seis proteínas cada una. Las familias PR3 y PR10 presentaron cuatro proteínas seguido de PR-9 y PR-6. Las demás familias (PR7, 11, 14 y 17) presentaron tan sólo un reporte (Fig. 1).

Las secuencias de estas proteínas PR se descargaron y se procedió a realizar un BLASTP contra el proteoma de yuca v4.1 y así identificar los genes similares en el genoma de yuca. A partir de estos resultados se construyó una lista de los genes PRs por especie y su similar en yuca (Tabla suplementaria 1). Una vez creada la matriz de los diferentes PR reportados y los candidatos similares en yuca, se evaluó si las secuencias

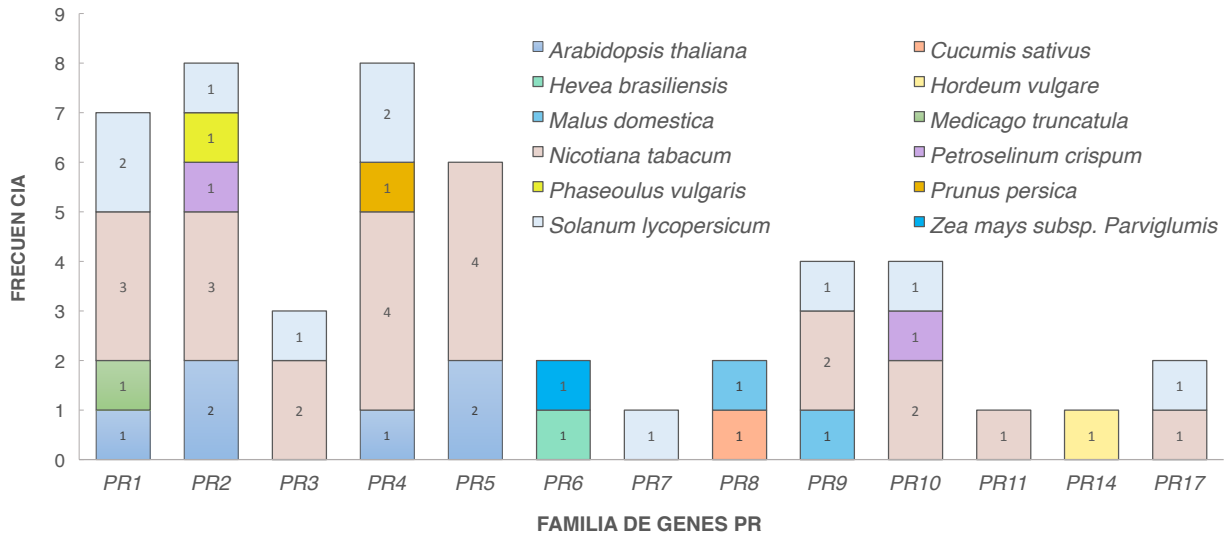


Figura 1. Número de genes PR por cada familia presentes en diferentes especies de plantas según la búsqueda realizada en Uniprot.

de dichos PR candidatos identificados estaban presentes en el microarreglo reportado previamente por López *et al.* (2005). Sin embargo, no se encontraron en esta colección de *marcadores de secuencias expresadas (ESTs)*. Se evaluó el nivel de expresión según los datos de RNAseq disponibles (Gomez *et al.* sometido) de las secuencias similares en yuca para cada una de las 50 proteínas PR reportadas. Para la selección de los genes se tuvo en cuenta aquellos que mostraran un mayor incremento en la expresión, fuese o no este significativo, con respecto al control (plantas no inoculadas) y que representaran miembros de diferentes familias de PRs.

Evaluación de la expresión mediante RT-PCR semicuantitativa

En total, se sintetizaron 15 juegos de cebadores en dirección sentido-antisentido, tres para PR1 y PR4, dos cebadores para PR2, PR3, PR8 y PR10 y uno para PR9 (Tabla 1). Para verificar el correcto diseño de los cebadores y amplificación se realizó un PCR sobre ADN genómico de las variedades cv.60444 y SG107-35 y empleando una temperatura de anillamiento de 52 °C para todos ellos. De los 15 candidatos, 14 amplificaron en las dos variedades (Fig. 2). El único juego de cebadores que no amplificó fue el correspondiente a PR10b.

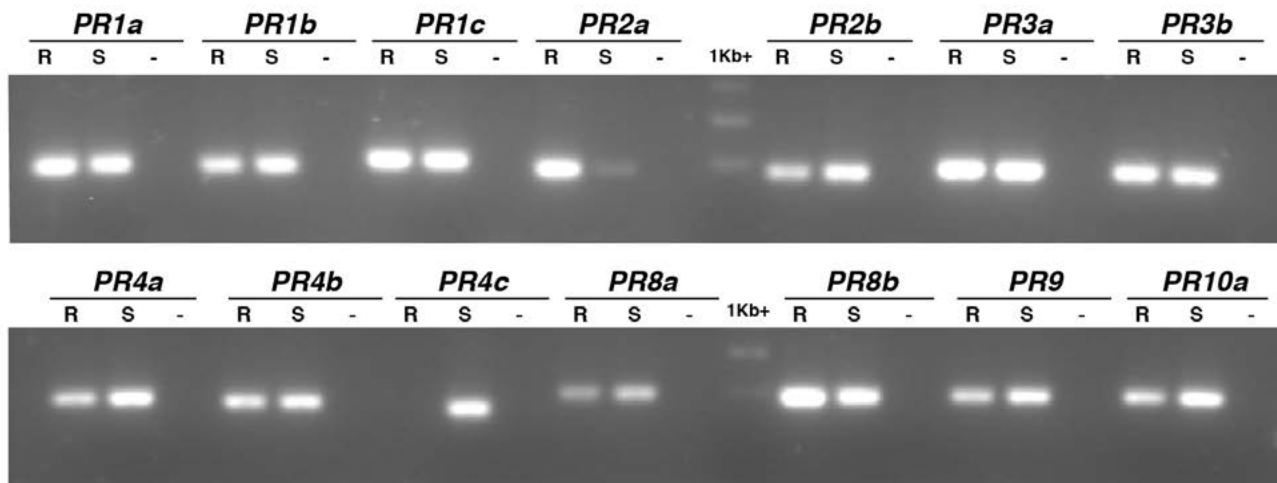


Figura 2. Amplificación de genes PR candidatos sobre ADN genómico de SG107-35 (R) y cv.60444 (S).

Una vez verificado que los cebadores podrían amplificar los genes respectivos sobre el ADN genómico de las dos variedades, se evaluó su expresión empleando el ADNc obtenido a partir de las plantas de yuca de las dos variedades y colectado a diferentes tiempos post-inoculación. A partir del ADNc sintetizado se realizó la amplificación del gen constitutivo tubulina (*Manes.08G061700*) con el fin de verificar la calidad del ADNc. En la figura 3, en el panel superior se observa la amplificación de dicho gen. Cada carril representa el ADNc obtenido de las dos variedades SG107-35 y cv.60444, tratadas con la solución control ($MgCl_2$ 10 mM) o con la bacteria (*Xam686*) y colectado a 0, 1, 3, 5 y 7 dpi. Después de realizar una curva de calibración modificando número de ciclos y cantidades de ADNc en cada muestra se logró obtener un amplicón para tubulina visualmente homogéneo en la mayoría de las muestras, aunque con una pequeña diferencia en algunos tiempos para la variedad susceptible (Fig. 3). Con esta misma cantidad de ADNc se llevaron a cabo las amplificaciones de los genes correspondientes a los *PR* seleccionados. Dado el gran volumen de trabajo se decidió evaluar inicialmente los genes *PR1a*, *PR1b*, *PR8a* y *PR8b* en las dos variedades. Además, se

incluyó el gen que codifica para la Glutacion-S- transferasa el cual ha sido previamente reportado como inducido en una variedad resistente en respuesta a *Xam* (Lopez *et al.*, 2005). El gen *PR8b* no mostró expresión en ninguna de las dos variedades, mientras que el gen *GST* se expresó de manera constitutiva en las dos variedades, incluyendo tanto las plantas no inoculadas (NI) como en las que se trataron con solución de $MgCl_2$ (Fig. 3). Para los genes *PR1a* y *PR1b* se observa una leve inducción de la expresión a lo largo del tiempo, particularmente el *PR1b* muestra una inducción en la variedad resistente y al día 5 post inoculación. El gen *PR8a* (glicosil-hidrolasa) mostró una expresión desde el tiempo cero tanto en las plantas tratadas con la solución control como las infectadas con *Xam* en la variedad resistente SG107-35 (Fig. 3). En la variedad susceptible, cv.60444, el gen *PR8a* se expresa en todos los tratamientos, con una fuerte inducción en la planta inoculada con la solución control y colectada a los 7 dpi. De igual manera, se observó un incremento de la expresión en las plantas inoculadas con *Xam* y colectadas a los 5 y 7 dpi, siendo mayor en este último tiempo (Fig. 3). Sin embargo, al comparar el perfil de expresión obtenido en las plantas tratadas con $MgCl_2$ se observa también una expresión

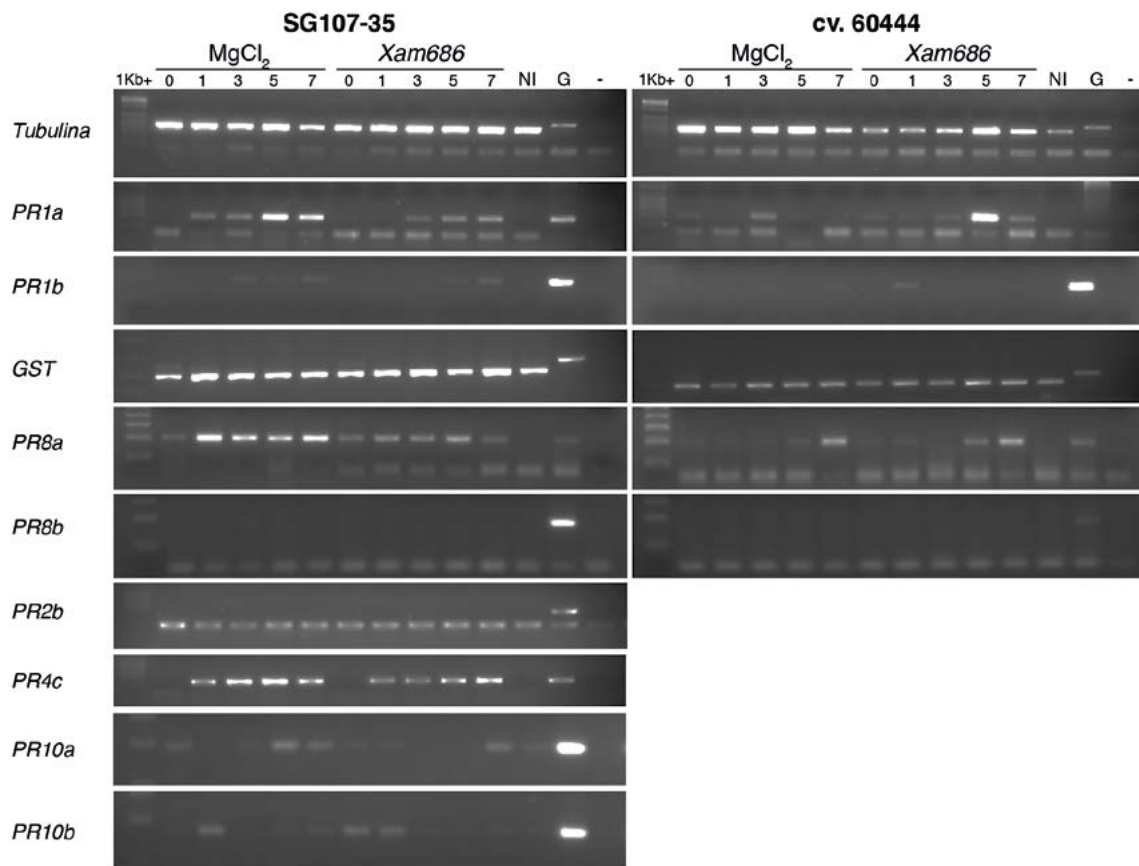


Figura 3. Cinética de expresión de varios genes *PR* en las variedades resistentes (SG107-35) y susceptible (cv.60444) a lo largo del tiempo tras la inoculación con la bacteria *Xam686*. NI: No inoculado; G: control de ADN genómico.

y/o inducción, sugiriendo que solo el proceso de punción y herida induce la expresión de estos genes, haciendo difícil determinar la contribución cuantitativa real de la inducción provocada por la bacteria misma.

La expresión de los genes *PR2b*, *PR4c*, *PR10a* y *PR10b* se evaluó solamente en la variedad resistente. El gen *PR2b* no mostró expresión a ningún tiempo ni en ninguna de las condiciones evaluadas. El gen *PR4c* se indujo tanto para las plantas tratadas con la solución control, como en las infectadas con *Xam* en todos los tiempos a partir de 1 dpi. Los genes *PR10a* y *PR10b* presentaron una amplificación sin una aparente tendencia, incluso hay una leve amplificación en el control absoluto (plantas de la misma edad a las que no se les realizó la inoculación ni con la solución control ni con *Xam*) (Fig. 3). De esta manera el perfil de los genes *PR4c*, *PR10a* y *PR10b* fue similar al descrito para los genes *PR1a*, *PR1b* y *PR8*, razón por la cual no se pudo determinar la contribución real de la inducción ocasionada por la bacteria misma.

Evaluación de la expresión de genes *PR* mediante qRT-PCR

Con el fin de lograr una determinación cuantitativa y no basada en la inspección visual de la intensidad de las bandas, se evaluó la expresión de algunos genes *PR* mediante qRT-PCR (quantitative reverse transcription-PCR). Para ello se determinó el nivel de expresión relativo de cada gen utilizando como gen de referencia *Manes06G114200.1* tanto para las muestras provenientes de las plantas inoculadas con *Xam* como de las plantas tratadas con la solución de $MgCl_2$. De esta manera la relación entre estos dos valores permite determinar el efecto de la inoculación bacteriana sobre la expresión de los genes *PR*. Para este ensayo se realizó en primera instancia las curvas de eficiencia y la eficacia de los mismos cebadores para los ensayos de QRT. Los cebadores para los genes *PR1c*, *PR3a*, *PR8b* y *PR10b*, presentaron problemas, baja amplificación (valores de Ct muy altos), presencia de productos inespecíficos y no permitieron ser evaluados en las dos variedades (datos no mostrados). Los genes *PR1b* y *PR2b* no mostraron amplificación en ninguna de las dos variedades y en ninguno de los dos tiempos evaluados, confirmando los datos obtenidos mediante RT-PCR semicuantitativa. Los valores de expresión más relevantes se obtuvieron empleando los cebadores para *PR1a* y *PR9*. Adicionalmente se incluyó el gen candidato *MePR1* (*Manes.06G026900.1*) recientemente reportado en la literatura (Yodee *et al.*, 2018). Si bien este gen fue identificado en el primer análisis utilizando la base de datos de Uniprot, no fue considerado inicialmente por no presentar uno de los mejores *E-value* (Tabla suplementaria 1). Dado el gran número de muestras se decidió evaluar la expresión de estos tres genes en las dos variedades a los tiempos 0, 3 y 7 dpi, tomando de esta forma un tiempo relativamente temprano (3 dpi) y otro tardío (7 dpi) con el objetivo de tener un amplio espectro del perfil de expresión.

Con el fin de evaluar la expresión relativa de *PR1a*, *PR9* y *MePR1* en respuesta a la inoculación con *Xam*, se comparó la expresión de cada gen a lo largo del tiempo en ambas variedades con respecto a 0 dpi. Los resultados indican que la expresión de *PR1a* mostró un perfil interesante donde se observa claramente una inducción a los 3 dpi exclusivamente en la variedad resistente, incrementando su expresión a los 7 dpi (Fig. 4a).

Correspondientemente, el perfil de expresión de *PR9* es similar al de *PR1a*, sin embargo, los valores de expresión de *PR9* en la variedad resistente son mucho más bajos comparados con la expresión de *PR1a* en esa misma variedad (Fig. 4b). Por otro lado, la expresión de *MePR1* es inducida por la bacteria en la variedad resistente al compararla con la susceptible a los 3 dpi y no a los 7 dpi (Fig. 4c). De manera notable, estudios previos han mostrado que la herida que se genera al momento de la inoculación puede producir la inducción de genes de manera diferencial (Gomez *et al.* sometido). Por esta razón, se decidió evaluar la expresión relativa de *PR1a*, *PR9* y *MePR1* con respecto a la herida. Para esto, se realizó un nuevo cálculo de la expresión relativa de cada gen en las dos variedades inoculadas con *Xam* con respecto a la inoculación con $MgCl_2$. Los resultados de este análisis muestran que la expresión relativa de *PR1a* y *PR9* es muy similar en la variedad resistente comparada con la susceptible para los tres tiempos evaluados (Fig. 5a, 5b). En particular, el gen *PR1a* mostró una baja expresión en las dos variedades a los 0 y 3 dpi. Aunque a los 7 dpi hay una inducción en la variedad susceptible, por problemas técnicos no se pudo evaluar la expresión en este tiempo para la variedad resistente (Fig. 5a). Por otro lado, y de manera interesante se encontró una baja expresión del gen *MePR1* a 0 y 3 dpi en ambas variedades y una clara inducción a 7 dpi exclusivamente en la variedad resistente (Fig. 5c). En conjunto estos resultados sugieren que, si bien parece presentarse una inducción de los genes *PR1a*, *PR9* y *MePR1* en la variedad resistente inoculada con *Xam* a lo largo del tiempo (Fig. 4), esta inducción puede estar explicada en parte por la herida que se realiza durante el proceso de inoculación.

DISCUSIÓN

Las proteínas *PR* tienen una actividad muy importante durante las respuestas inmunes (van Loon *et al.*, 2006). La producción de tales proteínas es inducida por la activación de la señalización que se genera ante el reconocimiento del patógeno. Las proteínas *PR* tienen actividad antimicrobiana y afectan directamente la viabilidad y crecimiento del patógeno. Además, su inducción suele ser diferencial durante reacciones de resistencia y susceptibilidad (van Loon *et al.*, 1999). La determinación de la expresión de las proteínas *PR* se convierte en un excelente marcador de la activación de la respuesta inmune (van Loon *et al.*, 2006). A pesar de la importancia de este tipo de proteínas, son muy

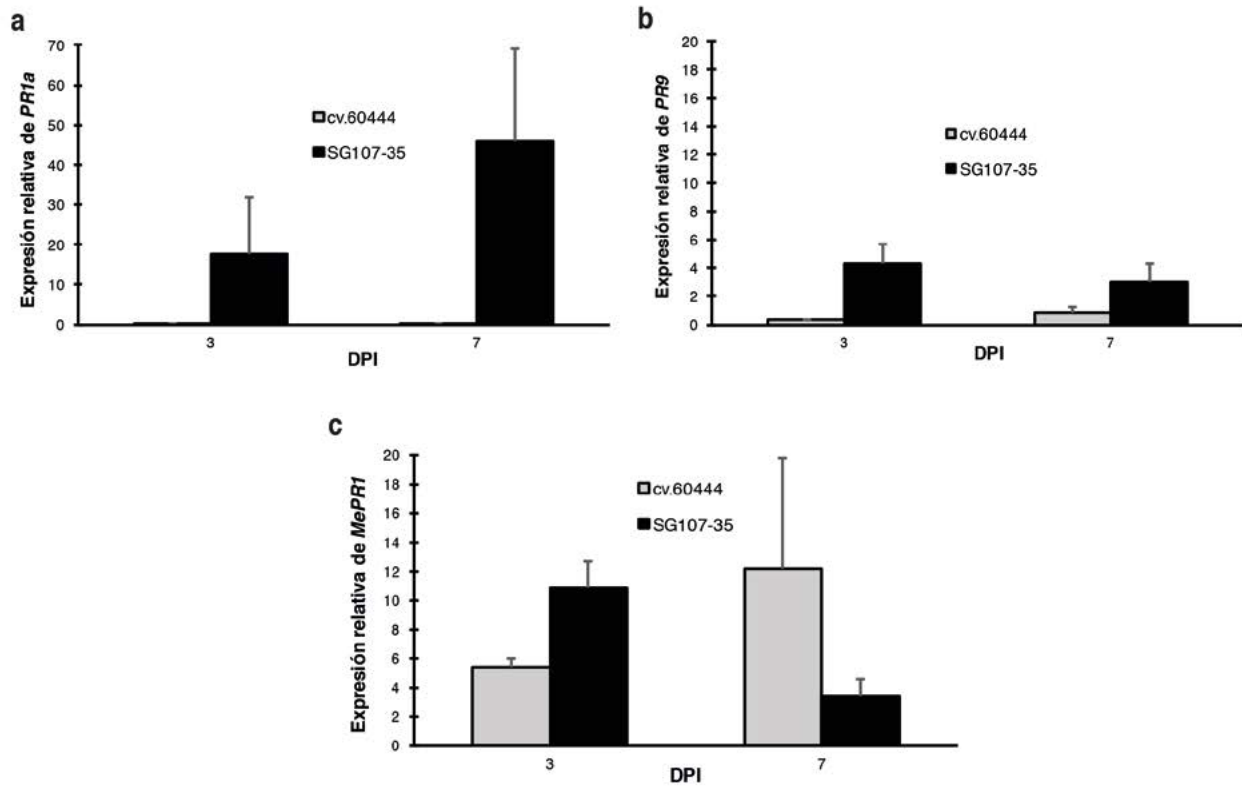


Figura 4. Expresión de genes *PR1a*, *PR9* y *MePR1* en plantas inoculadas en relación al tiempo 0.

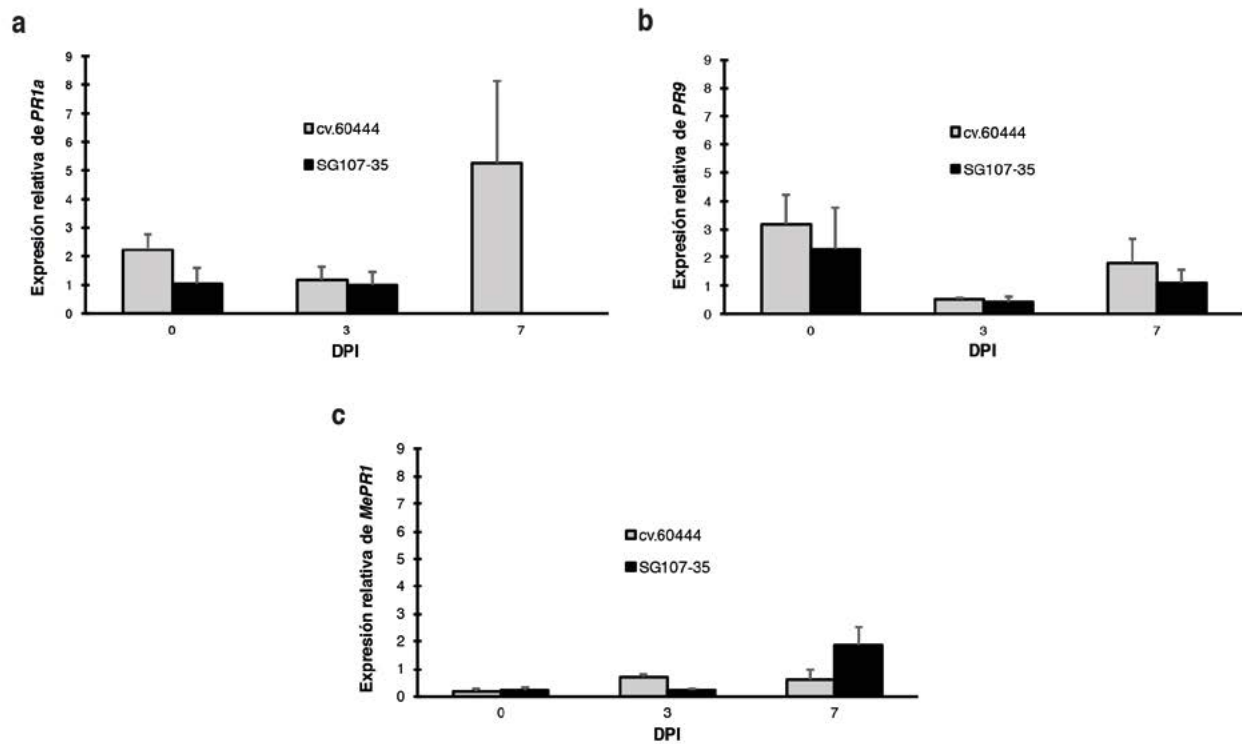


Figura 5. Expresión de genes *PR1a*, *PR9* y *MePR1* en plantas inoculadas en relación a la herida.

escasos los estudios de PRs en yuca durante la interacción con *Xam* (López *et al.*, 2005; Yooder *et al.*, 2018). Para llenar este vacío en primera instancia se realizó una aproximación bioinformática basada en la similitud de estas proteínas entre especies para identificar un grupo de genes *PR* candidatos en el genoma de yuca. A partir de 50 secuencias de *PR* de otras plantas se logró obtener un grupo de 15 posibles genes *PR* en yuca. Las secuencias de los genes que codifican para proteínas PR hacen parte de familias multigénicas (Sudisha *et al.*, 2012). Así por ejemplo para el caso de PR1 existe el PR1a, PR1b y PR1c. Algo similar sucede con el PR2, PR4, PR8 y PR10. Estas proteínas presentan un alto grado de especificidad en respuesta a un patógeno y son reguladas a nivel transcripcional (van Loon *et al.*, 1999). Por esta razón resulta difícil determinar cuáles de los diferentes miembros identificados en yuca están implicados en la respuesta a *Xam*. Para cada uno de los genes *PR* se identificaron en general más de cuatro posibles genes en yuca. Esto llevaría a evaluar más de 50 posibles juegos de cebadores; por esta razón en este estudio se seleccionó sólo un subgrupo de ellos para evaluar experimentalmente el nivel de expresión en plantas de yuca de dos variedades, una resistente y otra susceptible durante la infección con *Xam*. Para definir respuestas diferenciales, clásicamente se ha empleado el valor de AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) que está determinado por el desarrollo de síntomas en el tiempo. A mayores valores de AUDPC las plantas son más susceptibles. Las variedades SG107-35 y cv.60444 presentan una respuesta contrastante ante la cepa *Xam*686 con valores de AUDPC de 1,44 y 1,90 respectivamente, por lo cual se catalogan como resistente y susceptible respectivamente para esta cepa de *Xam* (Trujillo *et al.*, 2014).

Los genes que codifican para proteínas PR por definición son aquellos que se inducen en respuesta a patógenos. En general, el análisis de expresión de los 14 genes *PR* evaluados mediante RT-PCR semicuantitativa demostraron en varios casos que la herida que se hace para llevar a cabo la inoculación genera por sí misma una respuesta de la planta evidenciada por una expresión tenue en plantas control absoluto o una expresión inducida y en algunos casos fuerte en las plantas tratadas con la solución de $MgCl_2$, por lo tanto con esta información no es posible determinar si la inducción de los genes se da en respuesta a la herida o al patógeno (Fig. 3). Previamente se ha reportado la expresión de genes *PR* en plantas sanas, sin ningún tipo de estrés (Tuzun, 2001). En el caso de yuca quizás la herida en el tallo este generando una respuesta que puede ser similar a la que ocasionan patógenos necrótrofos o herbívoros, y esto puede llevar a la inducción de genes *PR*. Para lograr estimar la diferencia en la expresión de los genes entre la respuesta ocasionada por la herida y la infección ocasionada por *Xam* se realizó un estudio mediante QRT-PCR para algunos genes *PR*, el cual toma en consideración la expresión relativa de cada gen en las plantas inoculadas con *Xam* con respecto a las plantas

tratadas con $MgCl_2$. Mientras que el patrón de expresión del gen *PR1* no mostró una inducción en respuesta a *Xam*, el gen *MePR1* mostró ser claramente inducido a 7 dpi solamente en la variedad resistente (Fig. 5). Estos resultados apoyan la idea presentada anteriormente respecto a la presencia de varios miembros dentro de la misma familia de genes *PR*. Si bien uno de los miembros de *PR1a* (*Manes.07G050700*) no mostró un perfil correspondiente a la definición de gen *PR*, otro de ellos sí lo mostró (*MePR1*, *Manes.06G026900.1*). Estos resultados ponen en evidencia la necesidad de evaluar cada miembro de la familia frente a diferentes patógenos, pues uno de ellos puede ser considerado como un real PR frente a algunos patógenos y otros no. En arroz se ha reportado la inducción de dos *PR1* (a y b) por la infección causada por el *Magnaporthe grisea* (Agrawal *et al.*, 2001) y por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Mitsuhashi *et al.*, 2008). En *Arabidopsis* se demostró que de 22 genes *PR1* predichos similares a *PR1a* de tabaco, sólo uno respondía a este patógeno (van Loon *et al.*, 2006). Una situación similar se esta presentando en yuca, en donde no todos los miembros de la familia PR1 parecen estar implicados en la inmunidad.

Los genes de la familia *PR1* son inducidos por ácido salicílico y por la presencia de patógenos, razón por la cual se ha empleado particularmente como marcador de resistencia. Sin embargo, Mitsuhashi *et al.* (2008) reportan la inducción de genes de esta familia ante interacciones compatibles e incompatibles frente al añublo, aunque también se da frente a otros estímulos. A pesar de ser empleados extensamente en el estudio de interacciones planta patógeno, aún se desconoce la función de los genes *PR1*. El gen *MePR1* (*Manes.06G026900.1*) ha sido recientemente identificado como inducido en hojas de plantas de yuca *in vitro* durante la respuesta a *Xam* (Yooder *et al.*, 2018). El hecho de haber encontrado en este estudio una inducción diferencial de este mismo gen entre variedades resistentes y susceptibles, a diferentes tiempos y en el tallo de plantas de yuca provenientes de estacas corrobora su papel en la respuesta a *Xam*, su alta reproducibilidad y robustez erigiéndose como un excelente gen *PR* marcador de inmunidad.

CONCLUSIONES

Este estudio permitió demostrar la naturaleza inducida de algunos genes en respuesta a la infección por *Xam*. Bajos estas consideraciones se recomienda en particular el uso del gen *MePR1* (*Manes.06G026900.1*) como marcador de la resistencia, el cual podrá ser empleado en posteriores estudios. Por ejemplo, se podría esperar que en variedades silenciadas para genes de resistencia candidatos la expresión de este gen sea baja, tardía o nula debido a que no se activan las vías de respuesta. De manera similar, en plantas transgénicas con genes de resistencia heterólogos o complementadas con genes de resistencia endógenos se esperaría que presentasen una mayor inducción de este gen o que su expresión se vea inducida a tiempos mas tempranos.

AGRADECIMIENTOS

El soporte financiero para el desarrollo de este proyecto proviene de la Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional, sede Bogotá y de Colciencias. Agradecimientos a Luis Fernando Cadavid por facilitarnos el termociclador LightCycler® 96 System.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaramos que no tenemos conflictos de interés.

REFERENCIAS

- Almagro L, Ros LG, Belchi-Navarro S, Bru R, Barceló AR, Pedreño MA. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot*. 2009;60:377-390. Doi:10.1093/jxb/ern277
- Agrawal GK, Rakwal R, Jwa NS, Agrawal VP. Signalling molecules and blast pathogen attack activates rice OsPR1a and OsPR1b genes: A model illustrating components participating during defence/stress response. *Plant Physiol Biochem*. 2011;39:1095-1103. Doi:10.1016/S0981-9428(01)01333-X
- Boher B, Kpémoua K, Nicole M, Luisetti, J, Geiger, JP. Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*: cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. *Phytopathology*. 1995;85:777-788. Doi:10.1094/Phyto-85-777
- Boller T, He SY. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*. 2009;324:742-744. Doi:10.1126/science.1171647
- Dodds PN, Rathjen JP. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet*. 2010;11:539-548. Doi:10.1038/nrg2812
- FAO. Food Outlook- Biannual Report on global Food Markets. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma: FAO; 2017. 144 p.
- Hauck P, Thilmony R, He SY. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8577-8582. Doi:10.1073/pnas.1431173100
- Jones J, Vance R, Dangl J. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science*. 2016;354:117-125. Doi:10.1126/science.aaf6395
- Jorge V, Fregene M, Duque MC, Bonierbale MW, Tohme J, Verdier V. Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theoret Appl Genet*. 2000;101:865-872. Doi:10.1007/s001220051554
- 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. Doi:10.1139/m96-145
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-408. Doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lopez C, Soto M, Restrepo S, Piegu B, Cooke R, Delseny M, Tohme J, Verdier V. Gene expression profile in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* infection in cassava using a cDNA microarray. *Plant Mol Biol*. 2005;57:393-410. Doi:10.1007/s11103-004-7819-3
- Meng X, Zhang S. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu Rev Phytopathol*. 2013;51:245-266. Doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102314
- Mitsuhashi I., Iwai T, Seo S, Yanagawa Y, Kawahigasi H, Hirose S, Ohkawa Y, Ohashi Y. Characteristic expression of twelve rice *PR1* family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds. *Mol Genet Genomics*. 2008;279:415-427. Doi:10.1007/s00438-008-0322-9
- Monaghan J, Zipfel C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol*. 2012;15:349-357. Doi:10.1016/j.pbi.2012.05.006
- Muñoz A, Perez A, Gomez-Cano F, Gil J, Michelmore R, Bernal A, Szurek B, Lopez C. RNAseq analysis of cassava reveals similar plant responses upon infection with pathogenic and non-pathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Plant Cell Rep*. 2014;33:1901-1912. Doi:10.1007/s00299-014-1667-7
- Phytozome [Internet]. The Plant Comparative Genomics portal of the Department of Energy's Joint Genome Institute; 1997. Available in: <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> [Accessed February 2017].
- Santaella M, Suarez E, López C, Gonzalez C, Mosquera G, Restrepo S, Tohme J, Badillo A, Verdier VR. Identification of genes in cassava that are differentially expressed during infection with *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Mol Plant Pathol*. 2004;5:549-558. Doi:10.1111/j.1364-3703.2004.00254.x
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem*. 2008;46:941-950. Doi:10.1016/j.plaphy.2008.06.011
- Soto J, Mora R, Mathew B, Leon J, Gomez F, Ballvora A, López C. Major Novel QTL for Resistance to Cassava bacterial blight identified through a multi-environmental analysis. *Front Plant Sci*. 2017;8:1169. Doi:10.3389/fpls.2017.01169
- Sudisha J, Sharathchandra RG, Amruthesh KN, Kumar A, Shetty HS. Pathogenesis related proteins in plant defense response. In *Plant Defence: Biological Control*. Springer: Netherlands; 2012. 379-403 p.
- Trujillo CA, Ochoa JC, Mideros MF, Restrepo S, López C, Bernal A. A complex population structure of the Cassava pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in recent

- years in the Caribbean Region of Colombia. *Microb Ecol.* 2014;67:155-167. Doi:10.1007/s00248-014-0411-8
- Tuzun S. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. *Eur J Plant Pathol.* 2001;107: 85-93. Doi:10.1023/A:10087844
- Uniprot Consortium [Internet]. EMBL-EBI, SIB y PIR; 2003. Available in: <https://www.uniprot.org/> [Accessed February 2017].
- Untergasse A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen S. Primer 3-New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40.e115. Doi:10.1093/nar/gks596
- Van Loon LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol.* 1999;55:85-97. Doi:10.1006/pmpp.1999.0213
- Van Loon M, Rep M, Pieterse CMJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.* 2006;44:135-162. Doi:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143321
- Vásquez A, Soto J, López C. Unraveling the molecules hidden in the gray shadows of quantitative disease resistance. *Acta Biol Colomb.* 2018;23:5-16. Doi:10.15446/abc.v23n1.66487
- Yoodee S, Kobayashi Y, Songnuan W, Boonchird C, Thitamadee S, Kobayashi I, Narangajavana J. Phytohormone priming elevates the accumulation of defense-related gene transcripts and enhances bacterial blight disease resistance in cassava. *Plant Physiol Biochem.* 2018;122:65-77. Doi:10.1016/j.plaphy.2017.11.016.