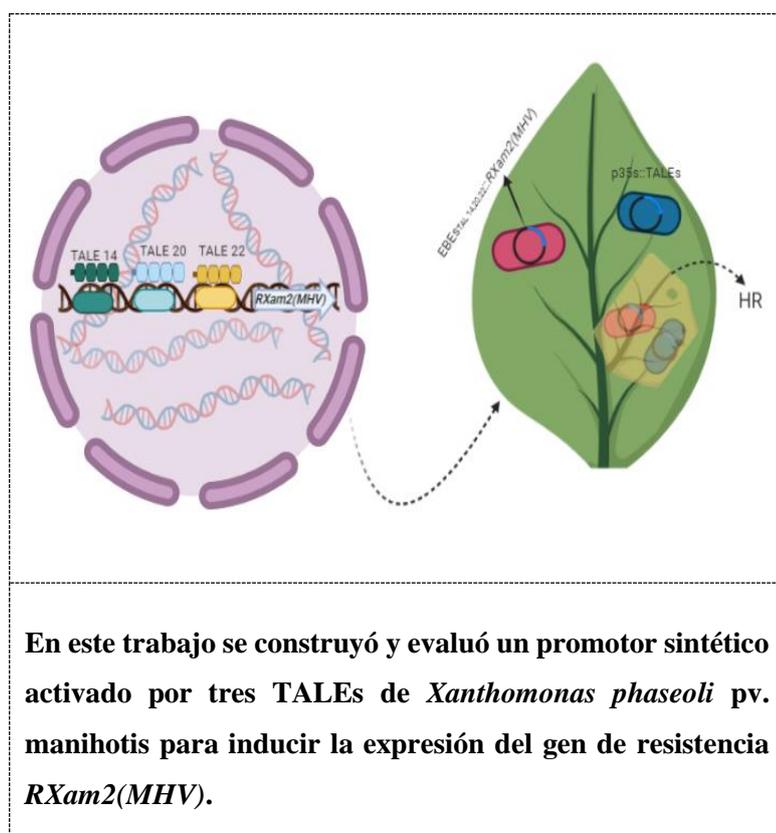


Inducción de la expresión del gen de resistencia de yuca *RXam2* mediante un promotor inducible por tres efectores tipo TAL de

***Xanthomonas phaseoli* pv. manihotis**

Induction of the expression of the cassava resistance gene *RXam2* by a promoter induced by three TAL-type effectors of *Xanthomonas*

***phaseoli* pv. manihotis**



**Inducción de la expresión del gen de resistencia de yuca *RXam2*
mediante un promotor inducible por tres efectores tipo TAL de**

Xanthomonas phaseoli pv. manihotis

**Induction of the expression of the cassava resistance gene *RXam2* by a
promoter induced by three TAL-type effectors of *Xanthomonas***

phaseoli pv. manihotis

Brian David Santamaría Rodríguez*

Directora: Paula Alejandra Díaz Tatis

Codirector: Juan Sebastian Sanchez Ferro

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

bsantamaria20@uan.edu.co, jssanchezf@unal.edu.co, padiazta@uan.edu.co

...

Resumen

Xanthomonas phaseoli pv. manihotis (Xpm) es el agente causal de la bacteriosis vascular de la yuca, enfermedad que puede generar pérdidas considerables en este cultivo. Esta bacteria posee proteínas efectoras que son inyectadas al interior de la célula hospedera a través del sistema de secreción tipo tres y que funcionan como factores de virulencia. Los efectores llamados TALEs (del inglés, *Transcription-Activator Like Effector*), ingresan al núcleo de las células hospederas, se unen de manera específica a las secuencias de ADN del hospedero, denominadas elementos de unión al efector (EBE) y actúan como factores de transcripción para modular la expresión de genes del hospedero. El conocimiento del modo de acción de los TALEs ha permitido desarrollar estrategias biotecnológicas para generar resistencia de amplio espectro a patógenos de plantas. En este estudio se elaboró un promotor trampa activado por tres TALEs predominantes en cepas de *Xpm* para inducir la expresión del gen de resistencia *RXam2(MHV)*. Los resultados de los experimentos de expresión transitoria muestran que la co-infiltración de los TALEs 14, 20 y 22 junto con el promotor trampa que contiene los EBEs para estos tres efectores causan una respuesta hipersensible en el área infiltrada en hojas de *N.tabacum*.

palabras clave: bacteriosis vascular de la yuca, promotor trampa, respuesta hipersensible.

Abstract

Xanthomonas phaseoli pv. *manihotis* (*Xpm*) is the causal agent of cassava bacterial blight, a disease that can generate considerable losses in this crop. This bacterium possesses effector proteins that are injected into the host cell through the type-three secretion system and that function as virulence factors. Some of these effectors, called TALEs (Transcription-Activator Like Effectors), enter the nucleus of host cells, bind specifically to host DNA sequences, called effector-binding elements (EBEs), and act as transcription factors to modulate host gene expression. The knowledge of the mode of action for TALEs in species as rice has allowed the development of biotechnological strategies to generate broad-spectrum resistance to pathogens. In this study, a trap promoter was developed that is activated by three predominant TALEs in *Xpm* strains that allow the expression of the resistance gene *RXam2(MHV)*. Our results show that when TALEs 14, 20 and 22 are co-infiltrated with the synthetic promoter that contains the EBEs for this TALEs a hypersensitive response is produced in the infiltrated area in leaves of *N. tabacum*. These results represent an important achievement for the use of this strategy in future cassava breeding programs.

keywords: cassava bacterial blight, trap promoter, hypersensitive response.

Introducción

La yuca, *Manihot esculenta* Crantz, es la fuente calórica para alrededor de 1000 millones de personas en el mundo (Suárez & Mederos, 2011). Actualmente, representa un recurso importante para la seguridad alimentaria, siendo uno de los cultivos con mayor producción y área cultivada (FAO, 2017). Además, es un cultivo muy versátil utilizado por pequeños productores en más de 100 países (FAO, 2013), y tanto sus raíces como las hojas son una fuente de alimento y energía para humanos y animales (Aguilera, 2012)(FAO, 2008). Si bien son variadas las ventajas que presenta este cultivo, también presenta diversas limitaciones, como el manejo y bajos rendimientos, debido a los limitados insumos como fertilizantes, pesticidas y herbicidas (FAO, 2017). Adicionalmente, se han reportado virus, hongos y bacterias que causan enfermedades en este cultivo, generando pérdidas considerables en el rendimiento (McCallum, Anjanappa, & Gruissem, 2017).

Una de las enfermedades más frecuentes que afecta al cultivo de yuca es el bacteriosis vascular, causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), un patógeno bacteriano que coloniza los haces vasculares de la planta (López & Bernal, 2012). *Xpm* ingresa a las plantas de yuca por estomas o heridas en la superficie vegetal y su multiplicación se favorece en épocas de alta humedad y lluvias (López & Bernal, 2012). Una vez la bacteria ha logrado ingresar al tejido vegetal, se dirige hacia el xilema donde se acumula y obstruye el paso de nutrientes lo que causa el marchitamiento de la planta (Verdier, 2002). El taponamiento de los haces vasculares genera una progresión de síntomas que comienza con la aparición de manchas angulares en las hojas, seguida de la formación de lesiones foliares y caulinares, y la secreción de exudado gomoso en tallos y peciolo (Lozano, 2008). Se han empleado medidas sanitarias para contrarrestar la enfermedad como lo son rotación de cultivos, cultivos intercalados con plantas de crecimiento rápido, siembras en temporada seca y uso y desarrollo de variedades reconocidas como resistentes (Lopez, Restrepo, & Verdier, 2006). La resistencia de las plantas de yuca se evidencia por un lento crecimiento y progreso del patógeno, reforzamiento de las barreras estructurales, y principalmente se caracteriza por inducir cascadas de señalización a nivel intracelular como una respuesta de defensa frente al patógeno (McCallum, Anjanappa, & Gruissem, 2017). Sin embargo, existe un gran vacío en el conocimiento de los mecanismos moleculares que explican la resistencia en plantas como la yuca.

La primera rama de defensa de las plantas se basa en el reconocimiento de moléculas presentes en patógenos con una estructura altamente conservada denominadas PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)(Yu, Feng, He, & Shan, 2017). La percepción extracelular de los PAMPs es llevada a cabo por receptores ubicados en la membrana plasmática de las células hospederas llamados PRRs (del inglés, *Pattern Recognition Receptors*). Estos receptores se categorizan como RLKs (del inglés, *Receptor Like Kinase*) o RLPs (del inglés, *Receptor Like Protein*) dependiendo de los dominios presentes en la porción intracelular, que permiten la activación de cascadas de señalización en la planta que desencadenan la producción de especies reactivas de oxígeno, activación de MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*), activación de quinasas dependientes de Calcio, deposición de calosa, activación de genes relacionados con la defensa y producción

de ácido salicílico, etileno o fitoalexinas confluyendo en un solo proceso denominado PTI (del inglés, *Pattern Triggered Immunity*) (Wan et al., 2019; Yu et al., 2017)

En contraste, las bacterias fitopatógenas se caracterizan por inyectar proteínas efectoras al interior de las células hospederas por medio de un sistema inyector denominado sistema de secreción tipo III (del inglés, *Type-Three Secretion System*) (Silva et al., 2018). Estos efectores tipo III se encargan de suprimir en diferentes maneras la PTI causando virulencia (Pfeilmeier, Caly, & Malone, 2016; Jacques et al., 2016). Los efectores tipo III suprimen la inmunidad de la planta mediante mecanismos moleculares como la degradación de los receptores PRRs, cambios en la regulación hormonal, degradación de quinasas en la cascada de señalización activada por PRRs, modificación de proteínas por medio de enlaces con grupos alquilo y manipulación del transcriptoma evitando así que se desencadene la respuesta de tipo PTI (Yu et al., 2017; Silva et al., 2018).

Por otro lado, plantas que presentan genes de resistencia (*R*) pueden reconocer los efectores de patógenos adaptados a nivel intracelular llevando a la activación de una segunda rama de inmunidad conocida como inmunidad desencadenada por efectores o ETI (del inglés, *Effector-Triggered Immunity*), la cual es más rápida y fuerte que la PTI y a menudo culmina en una respuesta hipersensible o HR (*Hypersensitive Response*) la cual es una muerte celular programada en el área de infección (Noman, Aqeel, & Lou, 2019; Zhang et al., 2018). El reconocimiento intracelular de los efectores ocurre mediante la interacción con proteínas codificadas por genes *R* las cuales median el reconocimiento y la ejecución de los mecanismos de defensa que conllevan al desarrollo de la ETI (Silva et al., 2018). Estas proteínas poseen dominios de repeticiones ricas en leucina (LRR) y de unión a nucleótidos (NB), lo cual le permiten reconocer a los efectores e inducir cascadas de señalización que converge en el desarrollo de la ETI (X. Zhang, Dodds, & Bernoux, 2017). Estas proteínas se activan mediante el intercambio de ADP por ATP en el dominio NB (X. Zhang et al., 2017; Wang et al., 2019). Se ha evidenciado que cambios en el motivo de aminoácidos metionina-histidina-aspartato (MHD) del subdominio ARC2 (APAF-1, R proteins, and CED-4), se encuentra involucrada en la unión del ADP en el estado inhibido (X. Zhang et al., 2017). Mediante mutación en el dominio MHD en el aminoácido aspartato conlleva a una actividad sin presencia del ligando, presentando una mayor afinidad por ATP, y desencadenando la cascada de señalización que culmina en HR (X. Zhang et al., 2017).

De manera particular, bacterias del género *Xanthomonas* se caracterizan por presentar un grupo de efectores de tipo III llamados TALEs (*Transcription Activator-Like Effectors*) que constituyen un grupo importante de efectores que manipulan el transcriptoma de la planta (White & Yang, 2009). Estructuralmente, los TALEs poseen tres dominios: el dominio N-terminal (NTD) que contiene una señal de secreción de tipo III, la región de repetición central (CRR) responsable del reconocimiento y unión al ADN del hospedero, y el dominio C-terminal (CTD) que contiene señales de localización nuclear (NLS) y el dominio de activación transcripcional (AD), los cuales controlan el ingreso al núcleo de los TALEs y la interacción con la maquinaria basal de la transcripción (Mücke et al., 2019). Los TALEs difieren predominantemente en su región central, que está compuesta de repeticiones casi idénticas ordenadas en tándem (Boch, Bonas, & Lahaye, 2014). Las

repeticiones están constituidas de 33-35 aminoácidos altamente conservados, exceptuando los residuos 12 y 13 conocidos como RVDs (*Repeat Variable Diresidue*), los cuales son hipervariables y establecen una interacción directa y específica con las bases nitrogenadas del ADN del hospedero (Grau et al., 2013). Al ser trasladados a la célula vegetal los TALEs son importados al núcleo donde se unen de manera específica a secuencias de ADN en la región promotora de genes blanco, denominadas elementos de unión al efector (EBEs) (Effector Binding Elements), y activan la transcripción de genes de *susceptibilidad* (*S*) cuya expresión promueve la enfermedad (Boch et al., 2014). Con el conocimiento de los efectores y el uso de *genes S* por parte del patógeno para causar enfermedad en la planta, se ha implementado la edición génica para generar resistencia por pérdida de susceptibilidad frente a los TALEs de patógenos de arroz (Blanvillain-Baufumé et al., 2017). Se ha evidenciado que los genes SWEET son objetivos blanco de *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* (*Xoo*) causante del tizón bacteriano en plantas de arroz (Yang, Sugio, & White, 2006). Mediante modificación del EBE del promotor del gen SWEET14 perteneciente a esta familia disminuía su susceptibilidad causando resistencia hacia el tizón bacteriano (Yang et al., 2006; Antony et al., 2010).

En contraparte, las plantas han desarrollado mecanismos de resistencia a los TALEs que se han descrito con anterioridad en arroz y pimentón (J. Zhang, Yin, & White, 2015). La resistencia dominante dependiente de la actividad transcripcional de los TALEs es una estrategia en la cual la interacción de un TALE con su respectivo EBE lleva a la activación de *genes ejecutores* (*E*) de los mecanismos de defensa de la planta (J. Zhang et al., 2015). De este modo los casetes de los genes *E* funcionan como una estrategia de ganancia de resistencia que funciona a manera de activadores trampa, con la capacidad de activar la defensa vegetal en presencia de bacterias que contengan TALEs. A partir de dicha estrategia se ha planteado el desarrollo de activadores trampa sintéticos (promotores trampa) para desarrollar una resistencia de amplio espectro frente a patógenos del género *Xanthomonas* (Hummel, Doyle, & Bogdanove, 2012). La construcción de los promotores trampa presenta un módulo sensor capaz de interactuar con los TALEs y un módulo ejecutor capaz de activar los mecanismos de defensa de la planta (Díaz, 2016; Sánchez Ferro, 2020). Este sistema se ha implementado previamente en arroz, donde se modificó el promotor del gen de resistencia *Xa10*, agregando cinco EBEs dispuestos en tándem que reconocen a TALEs específicos de *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (*Xoo*) (Zeng et al., 2015). En este trabajo se evidenció la resistencia dependiente de los TALEs presentes en 27 cepas de *Xoo* colectadas en 11 países (Zeng et al., 2015). Lo anterior indica que la estrategia basada en promotores activados por múltiples TALEs puede ser utilizada como herramienta biotecnológica para causar resistencia de amplio espectro frente a varias cepas de patógenos del género *Xanthomonas*.

Con el fin utilizar los promotores trampa como una medida de control para la bacteriosis vascular en yuca, es necesario emplear un gen que funcione como gen ejecutor. En otros estudios previos de la Universidad Nacional, se encontró un gen mediante la estrategia de gen de resistencia candidato, el cual explica el 61,6% de la resistencia a la cepa CIO151 (López et al., 2003). Este gen, denominado *RXam2*, codifica para una proteína típica de resistencia de tipo NB-LRR cuya expresión es constitutiva pero baja. Estudios en plantas con el gen *RXam2* silenciado muestran una mayor susceptibilidad a las cepas *CIO151*, *Xam306*, *Xam232*,

Xam571 y *Xam686*, y su sobreexpresión ha mostrado conferir resistencia a dichas cepas (Díaz et al., 2020, unpublished results). Este gen se ha empleado con anterioridad como módulo ejecutor en un sistema de promotor trampa inducido por TALE1_{Xpm}, pero con una modificación en el dominio MHD cambiando el aminoácido aspartato por una valina quedando así en su forma activa sin presencia de los TALEs, el cual se nombró *RXam2* auto-activo (*RXam2[MHV]*) (Díaz, 2016). Estos resultados indican que *RXam2* que puede funcionar como un gen *E* bajo el control de un promotor trampa para generar resistencia de amplio espectro hacia la bacteriosis vascular en yuca.

Por otro lado, en estudios recientes enfocados en el entendimiento de los mecanismos moleculares que explica la interacción yuca-*Xpm* han logrado estudiar el contenido de TALEs en cepas de *Xpm* de Colombia y han encontrado una presencia frecuente de los TALE 14, TALE 20 y TALE 22 en los aislamientos del patógeno colectados en cultivos de yuca en la región Caribe y la región Orinoquía entre 1966 y 2012 (Zárate et al., 2015; Trujillo et al., 2014). Por otro lado, los TALEs 14 y 20 han mostrado ser importantes para la progresión de los síntomas y de la enfermedad (Cohn et al., 2014). Mientras que la presencia del TALE 22 se correlaciona levemente con la virulencia de las cepas de *Xpm* (Zárate, 2015). Estos datos sugieren que estos tres efectores pueden ser importantes para la virulencia de cepas de *Xpm*.

Basados en la información de frecuencia de los TALE 14, TALE 20 y TALE 22 en cepas colombianas, en el grupo de investigación Manihot biotec se han generado recientemente promotores sintéticos que contienen las secuencias de unión para los TALEs 14, 20 y 22 (promotor denominado TriEBE) para inducir la expresión del gen reportero *GUSPLUS* (Sánchez Ferro, 2020). Los resultados de la coexpresión transitoria de los TALEs con el promotor TriEBE en *Nicotiana Tabacum*, muestran una activación transcripcional significativa por parte de los TALEs 14 y 20. Por lo tanto, este promotor trampa se perfila como un casete de reconocimiento para las cepas de *Xpm* que presenten a TALE 14 o TALE 20 en su repertorio de efectores (Sánchez Ferro, 2020). De esta manera, el objetivo de este trabajo fue emplear el gen de resistencia *RXam2(MHV)* como módulo ejecutor en un promotor trampa con los sitios de unión a los TALEs 14, 20 y 22 de *Xanthomonas phaseoli* pv. manihotis y la evaluación funcional de dicha construcción, con miras a ser implementado en el desarrollo de una herramienta biotecnológica alternativa para el control de la bacteriosis vascular para la generación de resistencia de amplio espectro a cepas de *Xpm* que contienen los TALEs respectivos.

1. Materiales y Métodos

1.1 Construcción del promotor sintético

Digestión y ligación del gen *RXam2(MHV)*

Para la clonación del gen de resistencia *RXam2(MHV)* se partió de dos vectores p35S::*RXam2(MHV)* (Díaz, 2016), y el promotor trampa con los EBEs de los TALEs 14, 20, y 22 de *Xpm* con el gen reportero *GUSPLUS*

(Sánchez Ferro, 2020) que se encuentran en el vector pENTR/D-TOPO® con lo cual se generó el constructo pENTR/D-TOPO® EBES_{TAL14,20,22}::*RXam2(MHV)* mediante doble digestión con las enzimas KpnI y AscI.

Para obtener esta construcción, tanto al constructo de p35S::*RXam2(MHV)* como a EBES_{TAL14,20,22}::*GUS*, se les realizó una doble digestión con enzimas de restricción para liberar *RXam2(MHV)* y el gen *GUS*. Las digestiones se realizaron a 37°C durante 3 h en un volumen final de 20µL: 2µL de buffer 10X, 1µg de plásmido y 10U de enzima de restricción KpnI y AscI las cuales tienen sitios de corte que flanquean el gen reportero y también el gen *RXam2(MHV)*. Una vez se liberaron estos dos fragmentos, se visualizó el producto en un gel de agarosa 1% para separar el vector con los tres EBES (~3000pb) y *RXam2(MHV)* que presenta un tamaño de 4000pb. Luego se eluyeron las dos bandas y se purificaron con el Kit The Wizard™ SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, U.S.).

La ligación en el vector pENTR/D-TOPO® EBES_{TAL14,20,22} se llevó a cabo a una temperatura de 22°C durante 2 h con la enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.) en un volumen de 20µL: 2µL de Buffer 10X T4 DNA Ligase Buffer, 6µL de vector (~40ng), 11µL del inserto (~165ng) y 5U de Ligasa. El producto de ligación se transformó con un electroporador en *E. coli* cepa DH10B, las colonias positivas fueron seleccionadas con el antibiótico kanamicina (50µg/mL) en medio LB (Tryptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, Cloruro de Sodio 5 g/L) con agar bacteriológico (15 g/L). Para la confirmación de los clones, se picaron colonias al azar con palillos estériles y se resuspendieron en 20µL de agua y fueron incubadas a 95°C durante 5min. Las PCRs se realizaron en un volumen final de 10µL: 2µL de suspensión, 0,1µL de cada primer específico, 5µL DreamTaq Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.). Se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 32 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 2 minutos) y una extensión final por 72°C de 5 minutos. Para la PCR del EBETAL14*Xpm* fue llevada a cabo con los primers Del UPT Fw (5'- ATAGTCAAGCTAACGAAAC -3') y EBE14Rv (5'- GCGGGATTGATTTGTTTATAATAG-3'), para EBETAL22*Xpm* con la pareja de primers EBE22 Fw (5'- TATCTTTCCTTCTCCTTCTTC-3') y *RXam2*inicioRv (5'-ATAGGCAATGACTGCTGTAGCTTCTC-3'), la del EBETAL20*Xpm* con los primers EBE20 Fw (5'-GAATTCCTCGAGTATTATAAACAATCAC-3') y *RXam2*inicioRv (5'-ATAGGCAATGACTGCTGTAGCTTCTC-3'), y por último para el gen *RXam2(MHV)* los primers 179ECN_*RXam2*-XV.F (5'-TGTGGTGGTTTTAATCAACTG-3'), 172ECN_*RXam2*-XI.F (5'- ATTATGTGGGAAAAGGTTCTT-3') y 175ECN_*RXam2*-XIII.R (5'-TGACAAAGAGATAATATTGC-3'). Para cada caso las PCRs utilizan los parámetros anteriormente descritos, excepto la temperatura de anillamiento para los primers (EBETAL14*Xpm* y EBETAL22*Xpm* 43°C, para EBETAL20*Xpm* y para *RXam2(MHV)* 40°C). Las colonias positivas fueron recrecidas en LB líquido, los cultivos en suspensión fueron empleados para la extracción de ADN plasmídico con el kit de extracción GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.). Una vez se obtuvo el ADN plasmídico se realizó el protocolo estándar anteriormente mencionado para las PCRs para verificar directamente sobre el plásmido el producto de clonación, y posteriormente se corroboró la identidad por secuenciación.

Recombinación de EBEs TAL14,20,22:: *RXam2(MHV)* en el vector binario pMDC32

El vector pENTR/D-TOPO® EBEs TAL14,20,22:: *RXam2(MHV)* fue clonado en un vector binario de expresión en plantas pMCD32 ccdB mediante el sistema Gateway (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.). Las reacciones se realizaron a una temperatura de 25°C y se incubaron durante toda la noche en un volumen final de 5µL empleando: 1µL de vector de destino (150ng/µL), 3µL de vector de entrada (50ng/ µL) y 1µL de clonasa LR o BP.

Por medio de reacciones sucesivas de recombinación con el sistema Gateway se clonó el constructo en pLAW11, pDONR207 y finalmente en pMDC32 esto se debe a que el antibiótico de selección para pMDC32 y pENTR/D-TOPO® es el mismo. Los clones fueron seleccionados en medios suplementados con antibiótico carbenicilina (100ng/ µL), gentamicina (100ng/ µL) y kanamicina (50µg/mL), respectivamente. En cada paso de recombinación se confirmó la correcta clonación por PCR sobre colonias utilizando los primers 179ECN_RXam2-XV. F y 172ECN_RXam2-XI.F. Adicionalmente, la correcta recombinación en pMDC32, se evaluó por medio de PCR del p35s con los primers 35SEcoRIFw (5'-GCAGAATTCTCAACATGGTGGAGCAC-3') y 35SsacIRv (5'-TGCGAGCTCGTCCCCGGTGTTCTCTCC-3') y una temperatura de anillamiento de 58°C. Finalmente, se comprobó la identidad de la construcción por medio de secuenciación.

Transformación del constructo pMDC32 en *Agrobacterium tumefaciens*

El plásmido pMDC32 EBEs TAL14,20,22:: *RXam2(MHV)* se transformó en células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 por electroporación, luego las bacterias fueron plaquedas en medio LB con agar bacteriológico con antibiótico de selección rifampicina (100µg/mL) y Kanamicina (50µg/mL), y se crecieron a una temperatura de 28°C durante 3 días. Posteriormente, para verificar que los clones que crecieron presentaran el constructo en el vector de expresión pMDC32 se verificó por PCRs directamente sobre las colonias del p35s y del gen de resistencia *RXam2(MHV)* con el protocolo estándar anteriormente mencionado. Las colonias positivas fueron recreadas en LB líquido para los experimentos de infiltración y cierta parte fue almacenado como stock en glicerol al 15% a una temperatura de -80°C.

1.2 Crecimiento de plantas

Germinación de las plantas de *Nicotiana tabacum* y su mantenimiento

Para la germinación de las semillas de *Nicotiana tabacum* se utilizó Turba Especial Mejorada de suelo (Anasac), una humedad relativa de 30-50%, con temperatura de 28°C, una intensidad lumínica de 70µmol/s/m²

y un fotoperiodo de 12 h luz 8 h oscuridad. Luego de que las semillas germinaran, se mantuvieron durante 2 a 3 semanas en la misma turba y con las mismas condiciones hasta evidenciar el crecimiento de la primera hoja, luego se trasplantó a un sustrato de Turba-tierra las plántulas de *N. tabacum* y se mantuvieron las condiciones de temperatura y fotoperíodo con variación de la intensidad lumínica $150\mu\text{mol/s/m}^2$ y humedad relativa de 50-70% durante tres semanas. Posteriormente, entre la semana quinta y sexta la humedad relativa se disminuyó a 30-50% y se redujo la intensidad lumínica a $115\mu\text{mol/s/m}^2$ manteniendo estas condiciones durante una semana. Una vez las plantas tuvieran siete semanas de edad con un aspecto similar entre sí, se seleccionaron para los experimentos de infiltración.

1.3 Infiltración

Preparación del inóculo

Para los experimentos de infiltración se utilizaron los clones de *A. tumefaciens* los cuales ya se habían realizado en el grupo de investigación de la Universidad Nacional que contienen los vectores pBAV139 *p35s::TALE14*, *p35s::TALE20*, *p35s::TALE22*, *p35s::RXam2(MHV)* y pBAV139 EV además del constructo elaborado en este trabajo. Cada uno de los clones fue reactivado realizando una siembra por agotamiento en medio LB con agar bacteriológico en una temperatura de 28°C durante dos días. Se aislaron colonias individuales y sembradas por agotamiento en medio LB con agar bacteriológico, luego fueron incubadas a una temperatura de 28°C durante dos días. A partir de cada siembra, nuevamente se seleccionaron colonias individuales, se aislaron y se crecieron en medio líquido a 28°C con una agitación de 250rpm.

Una vez los cultivos en suspensión alcanzaron una $\text{OD}_{600\text{nm}}=1.0$, para realizar las coinfiltraciones se realizó una serie de diluciones de las bacterias que fueron colectadas por centrifugación a 4000rpm por 15 min y se realizaron lavados por centrifugación a 4000rpm por 15 min y resuspensión en solución de agroinfiltración (10 mM MES, 10 mM MgCl_2 , 150 μM acetosiringona, pH 5.6). Las suspensiones bacterianas de los clones pMDC32 EBES *TAL14,20,22::RXam2(MHV)*, pBAV139 EV fueron ajustadas a una $\text{DO}_{600\text{nm}}=0.6$ y pBAV139 *p35s::RXam2(MHV)* a 0.3. Para los clones de los TALEs se ajustó en un inicio una $\text{DO}_{600\text{nm}}=0.9$ luego una parte de estas suspensiones de bacterias se unieron en proporción 1:1:1 para tener una $\text{DO}_{600\text{nm}}=0.3$ y la otra parte se reajustó a 0.6 para realizar la combinatoria con pMDC32 EBES *TAL14,20,22::RXam2(MHV)* y pBAV139 EV para al final obtener una $\text{DO}_{600\text{nm}}=0.3$ para cada clon. Posteriormente la densidad óptica de la suspensión bacteriana de pMDC32 EBES *TAL14,20,22::RXam2(MHV)*, fue ajustada a 0.3.

Infiltración de los clones en *Nicotiana tabacum*

Para los experimentos de infiltración en *N. tabacum* se emplearon jeringas estériles de 1mL con aguja removible, y se infiltró en el envés de la tercera hoja de cada planta. Para el EBES *TAL14,20,22::RXam2(MHV)* y

los clones de los TALEs los experimentos de coinfiltración fueron realizados sobreponiendo las infiltraciones de las bacterias que contenían el promotor y las combinatorias de los clones de los TALEs. Primero se infiltró la combinatoria de los TALEs y después de una hora se sobrepuso la solución correspondiente a EBEs $TAL_{14,20,22}::RXam2(MHV)$ con $OD_{600nm}=0.3$. Se realizaron dos replicas biológicas de infiltración en hojas de diferentes plantas de *N.tabacum*.

2. Resultados y Discusión

2.1 Construcción del promotor trampa EBEs $TAL_{14,20,22}::RXam2(MHV)$

Para la construcción del promotor se partió del diseño del promotor trampa EBEs $TAL_{14,20,22}::GUS$ (Sánchez-ferro 2020) (Figura 1a) y el constructo $p35s::RXam2(MHV)$ (Díaz, 2016) (Figura 1b), los cuales poseen dos sitios de corte con las enzimas de restricción KpnI y Ascl que flanquean al gen reportero *GUSPLUS* y el gen *RXam2(MHV)*, mediante estas dos enzimas se realizó el corte de cada gen, se retiró del promotor trampa el gen *GUS* y se insertó mediante ligación el gen *RXam2(MHV)*, obteniendo como resultado el constructo pENTR/D-TOPO® EBEs $TAL_{14,20,22}::RXam2(MHV)$ (Figura 1c). La identidad del constructo se corroboró mediante PCR colonia (Figura 2), con primers específicos para cada EBE y para el gen *RXam2(MHV)*.

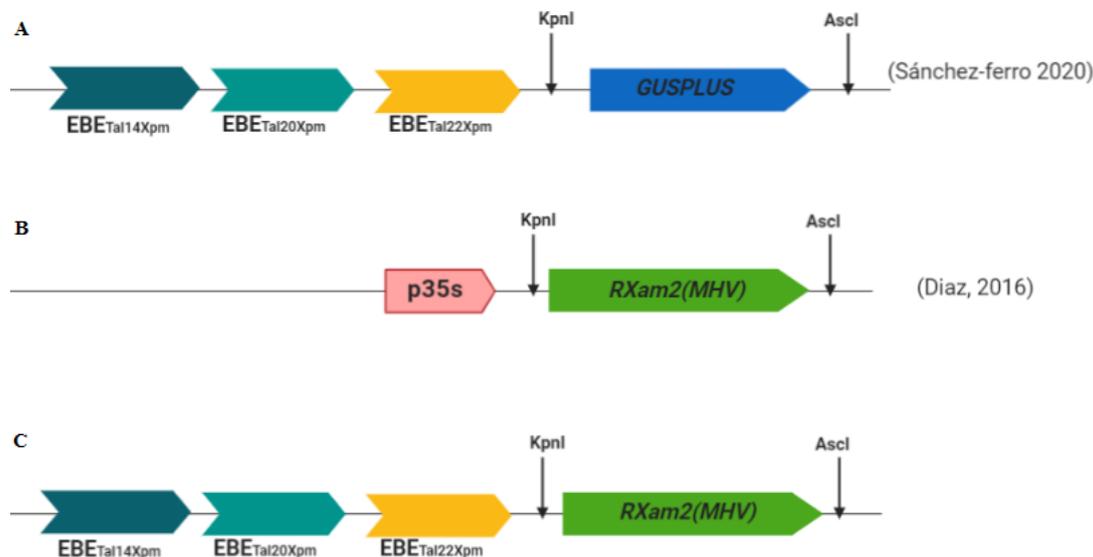


Figura 1 Esquema de la construcción del promotor trampa EBEs $TAL_{14,20,22}::RXam2(MHV)$. En el esquema se muestra el diseño de los promotores. Donde la flecha negra (↓) indica el sitio de corte para enzimas de restricción KpnI y Ascl. (A) Constructo que contiene los sitios de unión para los TALE 14 de color Azul acero, TALE 20 de color Turquesa menta y TALE 22 de color amarillo y corriente abajo el gen reportero *GUSPLUS* de color azul. (B) Constructo que contiene el gen de resistencia *RXam2(MHV)* de color verde, controlado por el promotor 35s de color rosado. (C) Constructo final con los tres EBEs controlando la expresión del gen de resistencia.

Se seleccionaron cinco colonias transformantes a las cuales se les realizó PCR colonia. En la Figura 2a se muestra el resultado de la PCR colonia con primers diseñados sobre el $EBE_{TAL14Xpm}$ que genera un amplicón de 300pb que permite corroborar la presencia del $EBE_{TAL14Xpm}$ en las colonias 7,8,9, y 10. En la Figura 2b se

observa un amplicón de 350pb en las colonias 7, 8 y 10 para el EBE_{TAL20Xpm}. Por último, la presencia del EBE_{TAL22Xpm} se comprobó para las colonias 7, 8, 9 y 10 en las cuales se obtuvo un producto de 250pb (**Figura 2c**). Para el caso de la PCR del gen de resistencia *RXam2(MHV)*, se obtuvo un amplicón de 650pb en todas las colonias como se observa en la (**figura 2d**), lo que indica la correcta construcción del promotor trampa EBEs_{TAL14,20,22}:: *RXam2(MHV)* en el vector pENTR/D-TOPO®.

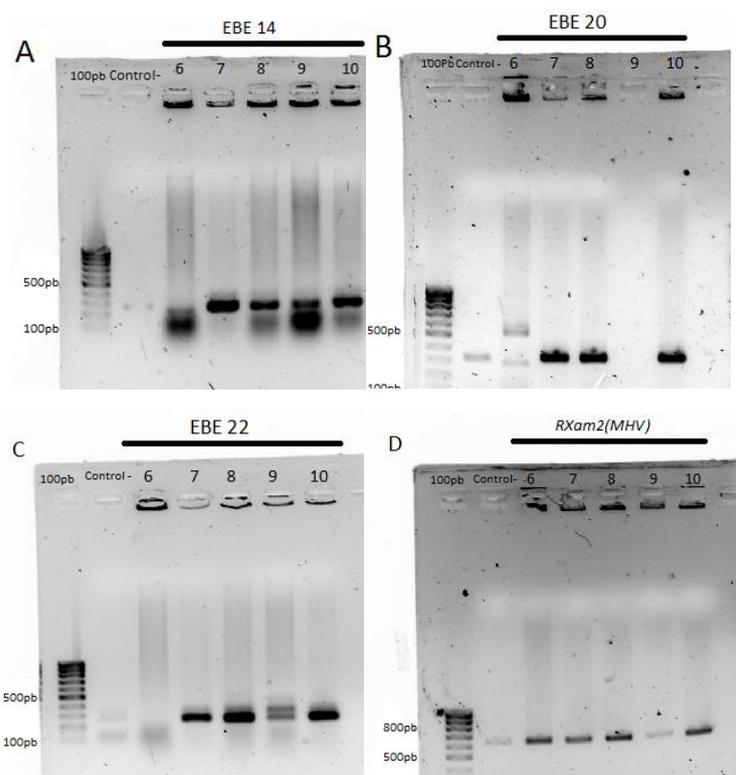


Figura 2. Confirmación de la clonación mediante PCR colonia de EBEs 14, 20, 22 y *RXam2(MHV)*. La construcción del promotor trampa fue corroborada mediante PCR directa sobre colonias aleatorias. (a) Para el EBE_{TAL14Xpm} se utilizaron los primers DelUPT1Fw y EBE14Rv. (b) Para el caso del EBE_{TAL20Xpm} los primers EBE20Fw y *RXam2*inicioRv. (c) Para el EBE_{TAL22Xpm} los primers EBE22Fw y *RXam2*inicioRv. (d) Por último para corroborar la inserción del gen *RXam2(MHV)*, se utilizaron los primers 179ECN_*RXam2*.XVFW y 175ECN_*RXam2*-XIII.Rv.

De acuerdo a los resultados de las PCRs de colonia, se seleccionaron las colonias 7, 8 y 10 para realizar la extracción de plásmido. Las PCRs se repitieron sobre los plásmidos para re-confirmar los resultados obtenidos por PCR de colonia y posteriormente se secuenció la región del promotor EBEs_{TAL14,20,22} y la región donde se encuentra el gen de resistencia *RXam2(MHV)*. Los resultados de secuenciación muestran la correcta inserción del gen de resistencia *RXam2(MHV)* en el vector pENTR/D-TOPO® y su identidad la cual no se vio afectada por la clonación, además se verificó que los EBEs estuvieran ubicados corriente arriba del gen y que no tuvieran ninguna mutación que afecte la unión de los TALEs (datos no mostrados).

2.2 Recombinación del promotor trampa en pMDC32

La construcción del promotor EBEs_{TAL14,20,22} con el gen de resistencia de yuca *RXam2*(*MHV*) en el vector de clonación pENTR/D-TOPO® se transfirió al vector binario de expresión en plantas pMDC32, mediante reacciones de recombinación LR y BP. Primero se clonó en pLAW11 mediante una LR, luego mediante una BP a pDONR207 y finalmente se realizó una LR a pMDC32 (**Figura 3**).

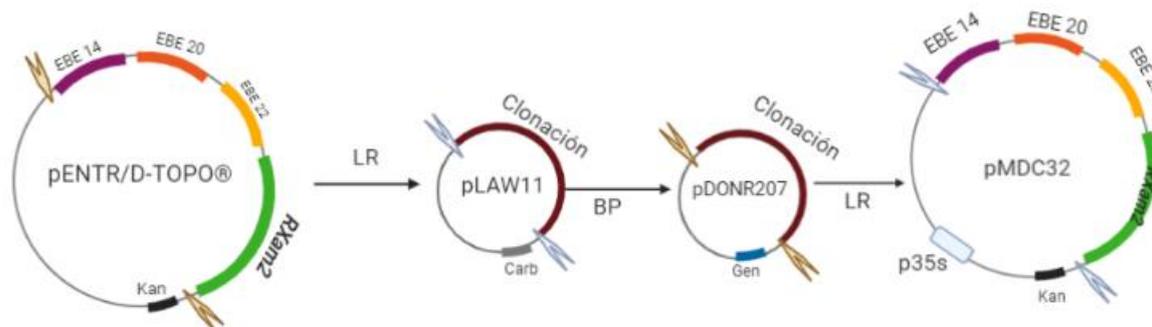


Figura 3. Esquema de la recombinación en pMDC32. Reacción de recombinación con las enzimas Clonasa LR Y BP con vectores intermedarios.

La correcta recombinación del promotor trampa en los vectores intermedarios se verificó por la presencia del gen de resistencia *RXam2*(*MHV*) utilizando primers específicos para este gen (**Figura 4**). Para el caso de la primera recombinación se observa que las colonias que dieron positivas fueron la 1,2,4 (**Figura 4 gel de lado izquierdo**). Se tomó la colonia 4 para realizar extracción de ADN plasmídico y posteriormente realizar la reacción de BP. Luego de realizar la recombinación en el vector pDONR207 se verificó por PCR colonia (**Figura 4 gel de lado derecho**) la presencia del gen de resistencia con los mismos primers y se evidenció que todas las colonias contienen el gen. Se tomó la colonia 4 para realizar la extracción de ADN plasmídico para luego realizar la última recombinación al vector pMDC32.

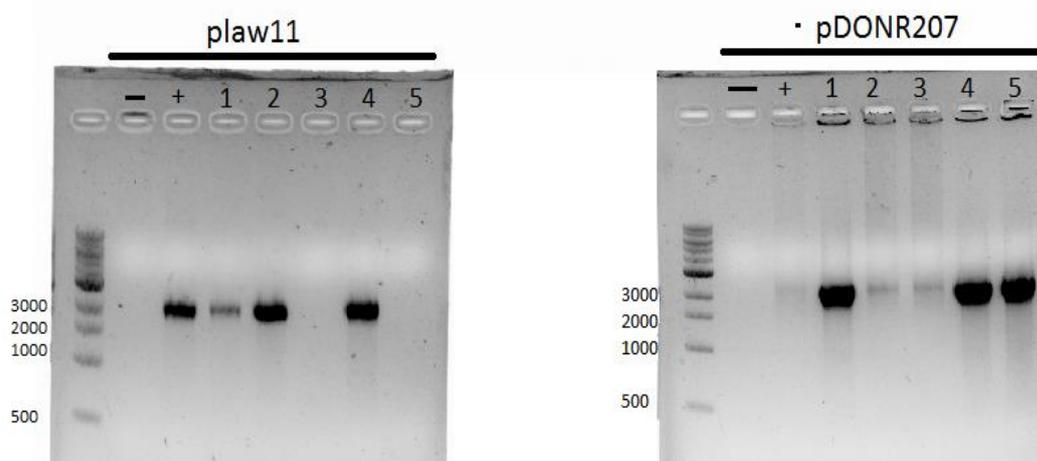


Figura 4. Confirmación de la recombinación en pLAW11 y pDONR207. La correcta clonación en los vectores intermedarios se verifico por PCR colonia por la presencia del gen de resistencia *RXam2*(*MHV*) con los primers 172ECN_RXam2-XI.F y 175ECN_RXam2-XIII.R

Una vez se realizaron las reacciones de recombinación y con el fin de confirmar la correcta recombinación y evidenciar que la construcción se encontrara en el vector de expresión pMDC32 se evaluó por PCR la presencia del gen de resistencia *RXam2(MHV)* y de p35s (**figura 5**) el cual se encuentra solo en el vector pMDC32 y controla la inducción del gen *hpt* que codifica para la enzima *Hygromicina fosfotransferasa*. Se evidenció que las colonias 1, 4 y 5 tienen un amplicón de 4000pb que corresponde con el gen *RXam2(MHV)* (**figura 5 gel derecho**), indicando que dichos clones presentan la construcción del promotor trampa. Por otro lado, las colonias 2, 4 y 5 presentaron un amplicón de 450pb correspondiente al p35s (**figura 5 gel izquierdo**), mostrando que estos clones presentan el vector binario. Por lo cual se seleccionaron las colonias 4 y 5 doblemente positivas conteniendo la construcción del promotor trampa clonada en el vector pMDC32. Se seleccionaron las colonias 4 y 5 las cuales mostraron ser positivas para la amplificación del p35s y el gen *RXam2(MHV)* para realizar extracción de plásmido y corroborar su identidad por PCR directamente sobre el plásmido (**Figura 6**). Posteriormente, se secuenció la región correspondiente al promotor trampa donde se encuentran los EBEs y el gen de resistencia *RXam2(MHV)* y se logró corroborar que la recombinación del promotor EBEs_{TAL14,20,22} y el gen *RXam2(MHV)* en el vector binario de expresión pMDC32 se llevó a cabo con éxito en el clon 4.

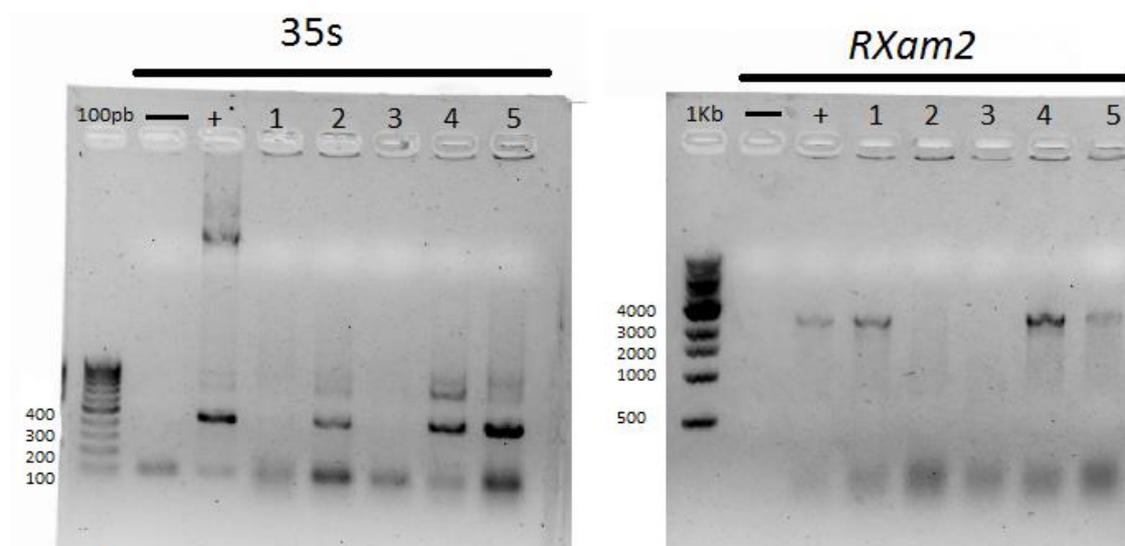


Figura 5. PCR colonia de p35s y *RXam2(MHV)* para verificar la correcta recombinación en el vector pMDC32. La correcta recombinación se verificó por PCR colonia del p35s con los primers 661_35sEcoRIfw y 662_35sSacIRv presente en el vector binario de expresión pMDC32, y el gen de resistencia *RXam2(MHV)* con los primers 172ECN_RXam2-XI.F y 175ECN_RXam2-XIII.R.

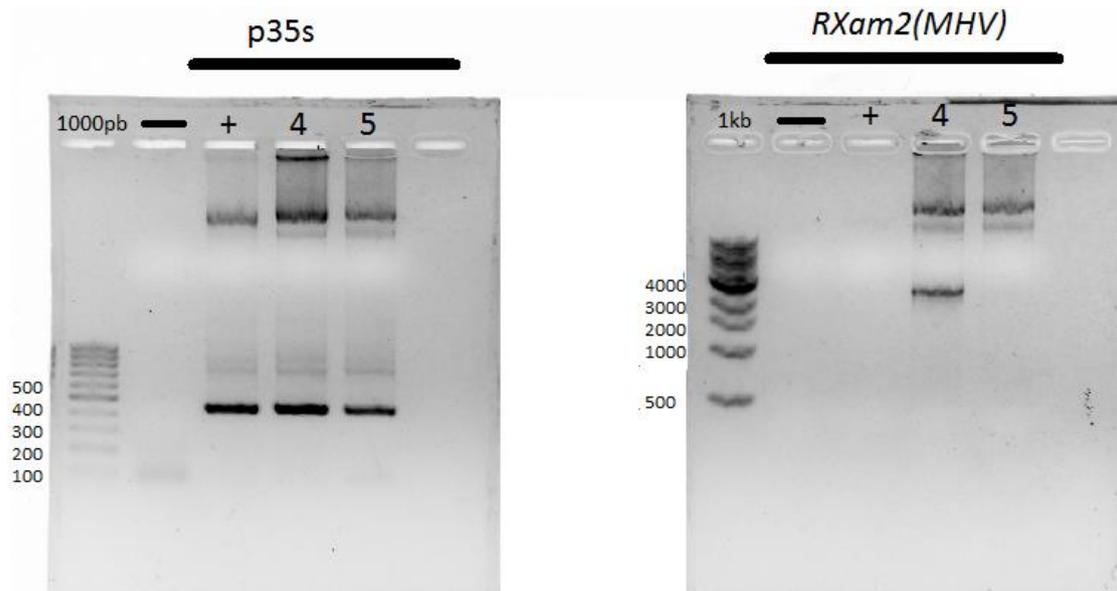


Figura 6 Confirmación por amplificación directa sobre el plásmido pMDC32 de *RXam2(MHV)* y el p35s. Se utilizaron los primers 661_35sEcoRI_{fw} y 662_35sSacI_{Rv} para p35s obteniendo un amplicón de 450pb aproximadamente y para *RXam2(MHV)* con los primers 172ECN_*RXam2*-XI.F y 175ECN_*RXam2*-XIII.R amplicón de 4000pb aproximadamente.

2.3 Transformación de pMCD32 en *Agrobacterium tumefaciens* para infiltración en plantas de *Nicotiana tabacum*

Una vez fue corroborada la identidad del plásmido pMDC32 con el promotor EBES_{TAL14,20,22}::*RXam2(MHV)*, se realizó la transformación en *A. tumefaciens* cepa GV3101 para llevar a cabo los experimentos de infiltración en *N. tabacum* (Figuras 7, 8, 9).

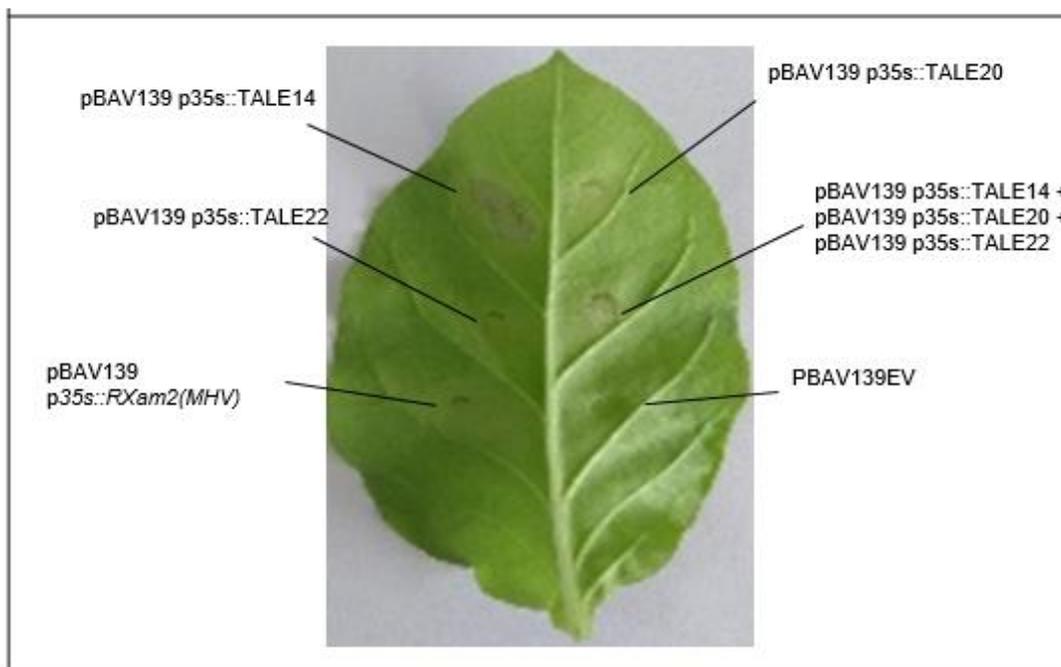


Figura 7 Expresión de los TALEs sin presencia del promotor trampa. Se muestra la fotografía de la infiltración de los vectores por separado, y en combinatoria para los TALEs, como control negativo se utilizó el PBAV139EV fotografía representativa de 2 réplicas biológicas.

En la **Figura 7** se muestra el resultado de la infiltración individual de los TALEs para evaluar el efecto de estas proteínas bacterianas en el fenotipo de *N. tabacum* en ausencia del promotor trampa. Los resultados muestran que el TALE 14 (costado izquierdo de la hoja) induce una HR que se observa como una necrosis en dicha área y pérdida del color de la hoja. Por el contrario, los TALEs 20 y 22 no indujeron una HR (**Figura 7**). No obstante, al ser infiltrados los tres TALEs simultáneamente en el costado derecho de la hoja no se observó ningún efecto. Como control negativo se utilizó el vector vacío donde se clonaron los TALEs denotado como pBAV139EV (**Figura 7** costado derecho de la hoja). Adicionalmente, como control positivo se empleó el vector pBAV139 p35s::RXam2(MHV) (costado izquierdo). Sin embargo, no se observó una respuesta hipersensible en el control positivo esto puede deberse al mal aislamiento o reactivación que se realizó de la bacteria. Los resultados observados en la (**figura 7**) muestran que los que el TALE 14 por si solo puede generar una respuesta en la planta, al contrario de los TALEs 20 y 22 que no se evidenció ninguna actividad en el área de infiltración.

Como control negativo se utilizó pBAV139EV + el promotor EBEs TAL14,20,22:: RXam2(MHV) costado izquierdo inicio de la hoja donde no se observa actividad (**figura 8**). Y como control positivo p35s::RXam2(MHV) el cual no generó ninguna respuesta de HR (**figura 8**).

Con el fin de evaluar la activación del promotor trampa dependiente y específica de la presencia de los TALEs se coinfiltró cada uno de los efectores con el EBEs TAL14,20,22:: RXam2(MHV) (**figura 8**) La coexpresión de los TALEs 14 y 20 se evidencia una HR lo que sugiere que los TALEs pueden activar transcripcionalmente el promotor trampa. Sugiriendo que la actividad transcripcional del constructo es potenciada por la interacción

con los efectores y que no tiene actividad sin presencia de estos. Para la infiltración de promotor EBES_{TAL14,20,22::} *RXam2(MHV)* con el TALE 22 costado izquierdo en medio de la hoja no se observa ningún desarrollo de HR mostrando que la actividad del promotor no puede ser potenciada por este efector. En conjunto los resultados muestran que la actividad del promotor trampa es específica y dependiente de la presencia de los TALEs 14 y 20 y que la actividad del gen de resistencia se ve potencia por ellos al observarse el desarrollo de la respuesta hipersensible más intensa en presencia de estos.

Para el caso del TALE 22 cuando se realizó la infiltración con el promotor EBES_{TAL14,20,22::} *RXam2(MHV)* (**figura 8**) costado izquierdo en el medio de la hoja, no parece generar una actividad sobre el constructo y no ocurre una inducción del gen *RXam2(MHV)*, indicando que este efector no es capaz de activar el constructo. Estos resultados se relacionan con los obtenidos por (Sánchez Ferro, 2020), el cual menciona que los TALEs 14 y 20 pueden generar una actividad potenciada sobre los promotores trampa EBETAL20Xpm::GUS, EBETAL14Xpm::GUS y EBES_{TAL14,20,22::}GUS, pero el TALE 22 no parece generar una actividad potenciada sobre el promotor EBETAL22Xpm::GUS y EBES_{TAL14,20,22::}GUS. Lo cual indica que hay una especificidad de unión de los TALEs 14 y 20 hacia el promotor, pero no para el caso del TALE 22.

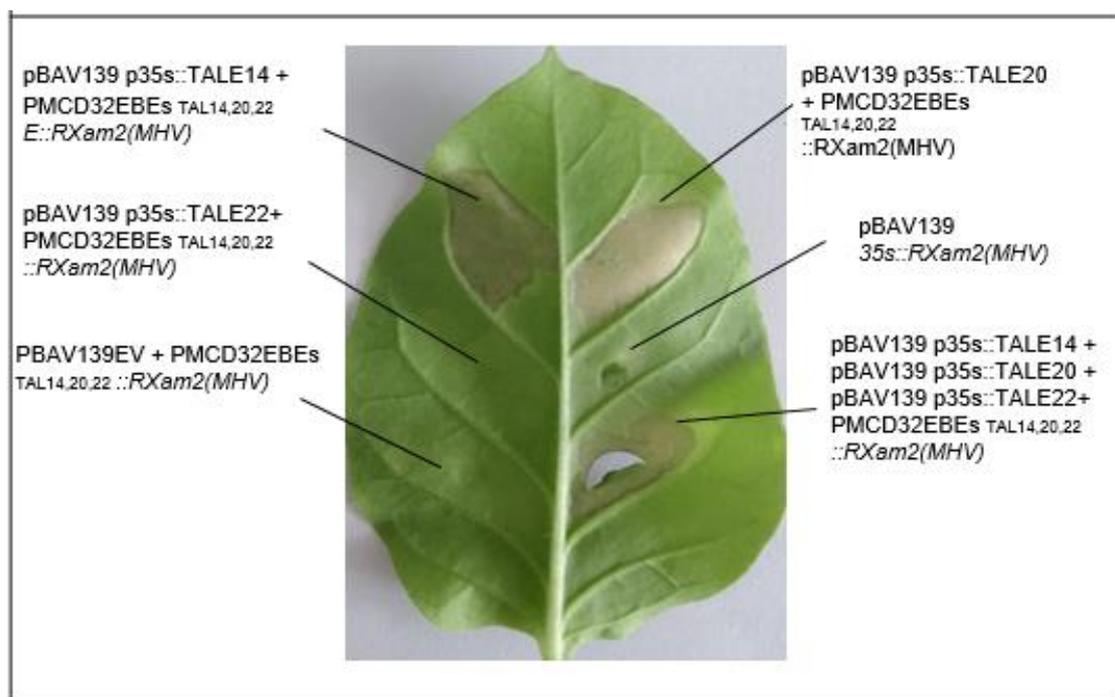


Figura 8 Coinfiltración de los TALEs con el promotor trampa. Se observa en la imagen hoja de *N. tabacum* con las respectivas combinatorias de infiltraciones con los TALEs y sobre las infiltraciones se ingresó el promotor EBES_{TAL14,20,22::} *RXam2(MHV)* la cual es una fotografía representativa de 2 réplicas biológicas.

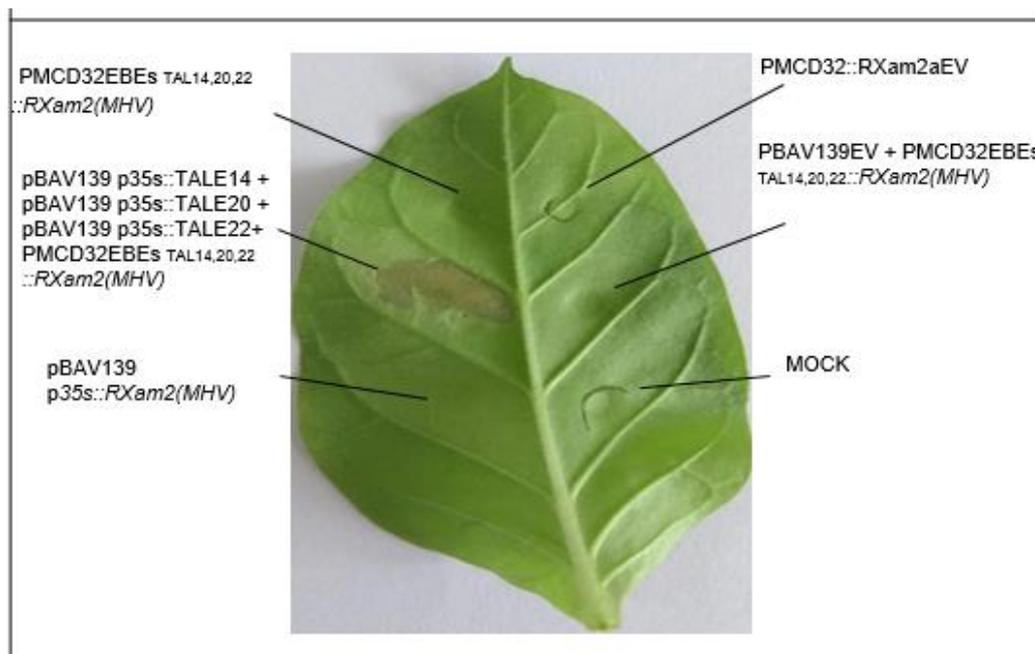


Figura 9 Infiltración del promotor trampa con y sin presencia de los TALEs. Hoja de *N. tabacum* se infiltró con la combinatoria de los TALEs y sobre esta se ingresó el promotor EBES TAL14,20,22:: *RXam2(MHV)* como control negativo se utiliza el MOCK, *PBAV139EV + PMDC32 EBES TAL14,20,22:: RXam2(MHV)* fotografía representativa de 2 réplicas biológicas.

Por otro lado, con el fin de evaluar un posible efecto de la activación del promotor EBES TAL14,20,22:: *RXam2(MHV)* , mediante la interacción de los tres TALEs, se realizó la infiltración en hojas de *N. tabacum* de las combinatorias de los TALEs 14, 20 y 22 y sobre estas se infiltró la construcción EBES TAL14,20,22:: *RXam2(MHV)* (**figura 8 y 9**). Se empleó la coinfiltración de pBAV139EV y pMDC32 EBES TAL14,20,22:: *RXam2(MHV)* como control negativo. Los datos muestran que en los dos casos hubo una respuesta hipersensible en la coinfiltración con los TALEs y el promotor trampa, lo cual indica una dependencia de la presencia de los TALEs para la expresión del gen de resistencia *RXam2(MHV)* el cual desarrolló la HR en toda el área de infiltración. Además, la presencia simultánea de los tres TALEs no genera un efecto negativo en la activación del promotor trampa. Lo cual se relaciona con resultados obtenidos por (Sánchez Ferro, 2020) cuando se coinfiltraron los tres TALEs con el promotor EBES TAL14,20,22::GUS evidenciando la fuerte activación de la expresión del gen reportero por parte de los TALE 14 y 20 y 22 pero no un efecto sinérgico entre los TALEs. Para finalizar los datos obtenidos de las infiltraciones con los TALEs y el promotor trampa muestran que no varían entre las hojas que se infiltraron de las plantas de *N. tabacum* utilizadas en los experimentos. El gen de resistencia *RXam2(MHV)* a pesar de no ver resultados de HR en el control positivo si refleja una expresión potenciada cuando están los TALEs 14 y 20 lo que indica que puede ser utilizado como gen ejecutor. La respuesta HR solo se evidenció en las coinfiltraciones de los TALEs con el constructo, lo que permite decir que el promotor trampa no tiene ninguna actividad sin presencia de los efectores, lo cual indica que a futuro puede emplearse este constructo para la elaboración de plantas transgénicas y así generar una resistencia de amplio espectro frente a cepas de *Xpm*.

3. Conclusiones

En este estudio fue posible construir el promotor trampa EBES_{TAL14,20,22} para controlar la expresión del gen de resistencia *RXam2(MHV)* y se realizó la evaluación funcional del promotor por expresión transitoria en plantas de *N. Tabacum*. Esta estrategia de promotor trampa activado por TALEs de *Xpm* tiene potencial para ser empleado como una estrategia para generar resistencia de amplio espectro frente a cepas de *Xpm* que posean en su repertorio de efectores los TALEs 14 y 20. El TALE 22 no mostró inducir la expresión del gen de resistencia lo cual indica que no hay especificidad de unión por el promotor EBES_{TAL14,20,22}::*RXam2(MHV)*. También se observó que el constructo sin presencia de los TALEs no generaba ninguna actividad de HR lo cual permite que este promotor trampa sea candidato para ser utilizado a futuro en el desarrollo de plantas transgénicas.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología (FPIT) del Banco de la República (Convenio 201826 proyecto 4229) y por la Vicerrectoría de Ciencia, Tecnología e Innovación (VCTI) de la Universidad Antonio Nariño (Proyecto 2017238). Agradezco la colaboración del grupo de investigación ManihotBiotec y al laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. Adicionalmente agradezco a VCTI de la Universidad Antonio Nariño por otorgarme el subsidio de IC2 que me brindó los recursos necesarios para sostenerme durante mi último semestre. A la profesora Paula Díaz por su apoyo comprensión paciencia y enseñanzas en el desarrollo de este trabajo. A Juan Sebastián Sánchez por el apoyo constante en el laboratorio y en la elaboración de este trabajo. Al profesor Camilo López por abrirme las puertas de su grupo de investigación y ofrecerme su apoyo y enseñanzas. Y finalmente, a mi familia por apoyarme constantemente a culminar mis estudios.

Referencias

- Aguilera, M. (2012). a Agroindustrial. *Centro de Estudios Económicos Regionales (CEER) - Cartagena*, 158. Retrieved from http://www.banrep.gov.co/docum/Lectura_finanzas/pdf/dtser_158.pdf
- Boch, J., Bonas, U., & Lahaye, T. (2014). TAL effectors - pathogen strategies and plant resistance engineering. *New Phytologist*, 204(4), 823–832. <https://doi.org/10.1111/nph.13015>
- Cohn, M., Bart, R. S., Shybut, M., Dahlbeck, D., Gomez, M., Morbitzer, R., ... Staskawicz, B. J. (2014). *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector - Mediated induction of a SWEET sugar transporter in Cassava. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(11), 1–13. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-14-0161-R>
- Díaz, P. (2016). *Transference of RXam2 and Bs2 genes to confer resistance against cassava bacterial blight (CBB)*. 1–187.
- FAO. (2008). Yuca para la seguridad alimentaria y energética. *Sala De Prensa*, 3–4. Retrieved from <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2008/1000899/index.html>

- FAO. (2013). Noticias: La yuca tiene gran potencial como cultivo del siglo XXI. 28/05/2013, 3–5. Retrieved from <http://www.fao.org/news/story/es/item/176821/icode/>
- FAO. (2017). FAOSTAT Database. Crops. Retrieved August 26, 2019, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Grau, J., Wolf, A., Reschke, M., Bonas, U., Posch, S., & Boch, J. (2013). Computational Predictions Provide Insights into the Biology of TAL Effector Target Sites. *PLoS Computational Biology*, 9(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002962>
- Hummel, A. W., Doyle, E. L., & Bogdanove, A. J. (2012). Addition of transcription activator-like effector binding sites to a pathogen strain-specific rice bacterial blight resistance gene makes it effective against additional strains and against bacterial leaf streak. *New Phytologist*, 195(4), 883–893. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04216.x>
- Jacques, M.-A., Arlat, M., Boulanger, A., Boureau, T., Carrère, S., Cesbron, S., ... Vernière, C. (2016). Using Ecology, Physiology, and Genomics to Understand Host Specificity in *Xanthomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, 54(1), 163–29. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100147>
- Juan Sebastian Sánchez Ferro. (2020). *CONSTRUCCIÓN DE PROMOTORES TRAMPA BASADOS EN EFECTORES TAL DE Xanthomonas axonopodis pv. manihotis*. 1–135.
- López, C. E., & Bernal, A. J. (2012). Cassava Bacterial Blight: Using Genomics for the Elucidation and Management of an Old Problem. *Tropical Plant Biology*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12042-011-9092-3>
- Lopez, C., Restrepo, S., & Verdier, V. (2006). Limitaciones de la bacteriosis vascular de yuca: Nuevos avances. *Acta Biol. Colomb*, 1–25.
- Lozano, J. C. (2008). Cassava Bacterial Blight: A Manageable Disease. *Plant Disease*, Vol. 70, p. 1089. <https://doi.org/10.1094/pd-70-1089>
- McCallum, E. J., Anjanappa, R. B., & Gruissem, W. (2017). Tackling agriculturally relevant diseases in the staple crop cassava (*Manihot esculenta*). *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.008>
- Mücke, S., Reschke, M., Erkes, A., Schwietzer, C. A., Becker, S., Streubel, J., ... Boch, J. (2019). Transcriptional reprogramming of rice cells by *Xanthomonas oryzae* tales. *Frontiers in Plant Science*, 10(February), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00162>
- Noman, A., Aqeel, M., & Lou, Y. (2019). PRRs and NB-LRRs: From signal perception to activation of plant innate immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8). <https://doi.org/10.3390/ijms20081882>
- Pfeilmeier, S., Caly, D. L., & Malone, J. G. (2016). Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *Molecular Plant Pathology*, 17(8), 1–16. <https://doi.org/10.1111/mpp.12427>
- Silva, M. S., Arraes, F. B. M., Campos, M. de A., Grossi-de-Sa, M., Fernandez, D., Cândido, E. de S., ... Grossi-de-Sa, M. F. (2018). Review: Potential biotechnological assets related to plant immunity modulation applicable in engineering disease-resistant crops. *Plant Science*, 270(October 2017), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.013>
- Suárez, L., & Mederos, V. R. (2011). Revisión bibliográfica. APUNTES SOBRE EL CULTIVO DE LA YUCA (*Manihot esculenta* Crantz). TENDENCIAS ACTUALES. *Cultivos Tropicales*, 32(3), 27–35.

- Trujillo, C. A., Arias-Rojas, N., Poulin, L., Medina, C. A., Tapiero, A., Restrepo, S., ... Bernal, A. J. (2014). Population typing of the causal agent of cassava bacterial blight in the Eastern Plains of Colombia using two types of molecular markers. *BMC Microbiology*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-161>
- Verdier, V. (2002). Bacteriosis Vascular (o Añublo Bacteriano) de la Yuca Causada por *Xanthomonas axonopodis* pv . *manihotis*. *La Yuca En El Tercer Milenio: Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización.*, pp. 148–159.
- Wan, W. L., Zhang, L., Pruitt, R., Zaidem, M., Brugman, R., Ma, X., ... Nürnberger, T. (2019). Comparing Arabidopsis receptor kinase and receptor protein-mediated immune signaling reveals BIK1-dependent differences. *New Phytologist*, *221*(4), 2080–2095. <https://doi.org/10.1111/nph.15497>
- Wang, J., Wang, J., Hu, M., Wu, S., Qi, J., Wang, G., ... Chai, J. (2019). Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science*, *364*(6435), 1–12. <https://doi.org/10.1126/science.aav5868>
- White, F. F., & Yang, B. (2009). Host and Pathogen Factors Controlling the Rice-*Xanthomonas oryzae* Interaction. *PLANT PHYSIOLOGY*, *150*(4), 1677–1686. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139360>
- Yu, X., Feng, B., He, P., & Shan, L. (2017). From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annual Review of Phytopathology*, *55*(1), 109–137. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035649>
- Zárate, C. A. (2015). Diversity of TALE content in *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strains is a valuable tool to improve target gene searching methodologies. Universidad de los Andes.
- Zeng, X., Tian, D., Gu, K., Zhou, Z., Yang, X., Luo, Y., ... Yin, Z. (2015). Genetic engineering of the Xa10 promoter for broad-spectrum and durable resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Biotechnology Journal*, *13*(7), 1–9. <https://doi.org/10.1111/pbi.12342>
- Zhang, J., Yin, Z., & White, F. (2015). TAL effectors and the executor R genes. *Frontiers in Plant Science*, *6*(AUG), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00641>
- Zhang, M., Chiang, Y. H., Toruño, T. Y., Lee, D. H., Ma, M., Liang, X., ... Coaker, G. (2018). The MAP4 Kinase SIK1 Ensures Robust Extracellular ROS Burst and Antibacterial Immunity in Plants. *Cell Host and Microbe*, *24*(3), 379-391.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.08.007>
- Zhang, X., Dodds, P. N., & Bernoux, M. (2017). What Do We Know About NOD-Like Receptors in Plant Immunity? *Annual Review of Phytopathology*, *55*(1), 205–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035250>

