

HpaF de *Xanthomonas axonopodis* PV. *manihotis* regula negativamente genes relacionados con metabolismo y defensa en hojas de yuca

HpaF from *Xanthomonas axonopodis* PV. *manihotis* down-regulate metabolism and defense genes in cassava

Paula A. Díaz-Tatis^{1, 5}, César A. Trujillo-Beltrán^{2, 6}, Adriana J. Bernal-Giraldo^{3, 7}, Camilo E. López-Carrascal^{4, 8}

Resumen

Las bacterias fitopatógenas de los géneros *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Xanthomonas* causan una gran cantidad de enfermedades en diversos cultivos. La base molecular que explica parcialmente la patogenicidad de estas bacterias radica en la translocación de proteínas efectoras hacia el interior de las células hospederas a través del sistema de secreción tipo tres (SST3). *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) es un bacilo gram negativo y es el agente causal de la bacteriosis vascular de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Los estudios derivados de la secuenciación del genoma de diversas cepas de *Xam* han permitido la identificación de *hrp-associated F* (HpaF) como un efector principal presente en todas las cepas secuenciadas de Latinoamérica, África y Asia. En este trabajo se evaluó la importancia de HpaF en la virulencia de *Xam* empleando dos estrategias. Primeramente, se pudo determinar a nivel histológico cambios morfológicos en las células de yuca causadas por HpaF. En segundo lugar, se empleó una estrategia de transcriptómica comparativa empleando un microarreglo de ADNc de yuca y ARN obtenido de plantas de yuca inoculadas con cepas de *Xam* mutadas en *hpaF* ($\Delta hpaF$) o complementadas ($\Delta hpaF + hpaF$). Los datos obtenidos sugieren que HpaF es un factor de virulencia de *Xam* ya que regula negativamente genes involucrados en el metabolismo y defensa de la planta.

Palabras clave: HpaF, efector tipo tres, microarreglo de ADNc, yuca, *Xam*

Abstract

Plant pathogenic bacteria of the genera *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Pantoea* and *Xanthomonas* cause diverse diseases in various crops. The molecular basis that partially explains the pathogenicity of these bacteria resides in the translocation of effector proteins into the interior of host cells through the type three secretion system (TTSS). *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) is a gram negative bacillus and is the causal agent of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) bacterial blight. Studies derived from the genomic sequencing of different *Xam* strains has allowed the identification of *hrp-associated F* (HpaF) as a principal effector present in all sequenced strains from Latin America, Africa, and Asia. In this study we evaluated the importance of HpaF in *Xam* virulence using two strategies. First, we could determine histologically morphological changes in cassava cells caused by HpaF. Second, a comparative transcriptomic approach was used employing microarrays of cassava ADNC and RNA obtained from cassava plants inoculated with strains of *Xam* mutated in *hpaF* ($\Delta hpaF$) or complemented ($\Delta hpaF + hpaF$). The data obtained suggest that HpaF is a virulence factor in *Xam* since it negatively regulates genes involved in the metabolism and defense of the plant.

Key words: cassava, cDNA microarray, HpaF, type three effector, *Xam*

Recibido: febrero 2014; aceptado: octubre 2014

¹ Cra 30 N 45-03 Departamento de Biología, Lab 150

² Carrera 1 # 18-10, Edificio J, Lab J201

³ Carrera 1 # 18-10, Edificio J, Lab J201

⁴ Cra 30 N 45-03 Departamento de Biología, Of 222

Correos electrónicos: ⁵ <padiazta@unal.edu.co>; ⁶ <ce-truji@uniandes.edu.co>; ⁷ <abernal@uniandes.edu.co>; ⁸ <celopezc@unal.edu.co>.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles que se enfrentan a una gran diversidad de patógenos y son capaces de defenderse gracias a la presencia de una inmunidad innata de varios niveles. En el sitio de contacto con el patógeno, el primer nivel de inmunidad llamado **MTI** (del inglés, *MAMP-triggered immunity*) se induce gracias al reconocimiento de moléculas altamente conservadas o **MAMPs** (del inglés, *microbe-associated molecular patterns*) presentes en toda clase de microorganismos, incluyendo los patogénicos y no patogénicos (Dodds y Rathjen 2010, Jones y Dangl 2006). Este reconocimiento de MAMPs ocurre mediante proteínas de reconocimiento denominadas **PRRs** (del inglés, *pattern recognition receptors*), que se encuentran en la membrana plasmática de la célula vegetal (Segonzac y Zipfel 2011). Después de la percepción del ligando por parte de los PRRs, se desencadena una cascada de señalización que es efectiva contra patógenos no adaptados (Boller y Felix 2009). Patógenos adaptados son capaces de translocar al interior de la célula vegetal proteínas efectoras con el fin de suprimir la MTI (Bernoux et al. 2011). En bacterias Gram-negativas, la translocación de las proteínas efectoras al citoplasma de la célula vegetal depende del sistema de secreción tipo 3 (**SST3**). Este sistema está formado por un complejo proteico similar a una jeringa y es codificado por un grupo de genes denominados *hrp* (del inglés, *hypersensitive response and pathogenicity*) (Alfano y Collmer 1997). Las proteínas efectoras cumplen dos funciones principales: la primera es ser reconocidas por proteínas de la planta (en el caso de una interacción incompatible o de resistencia) activando lo que se conoce como **ETI** (del inglés, *effector-triggered immunity*). La segunda función está relacionada con la supresión de la MTI (en el caso de una interacción compatible o de susceptibilidad) (Boller y Felix 2009). La ETI se basa en la percepción directa o indirecta de las proteínas efectoras por parte de proteínas de resistencia (proteínas R) presentes al interior de la célula vegetal, la cual desencadena una respuesta inmune más robusta que la MTI (Chisholm et al. 2006).

La acción de proteínas efectoras, tradicionalmente se han combatido mediante el empleo de proteínas R en programas de mejoramiento, sin embargo esta resistencia puede ser vencida rápidamente por el patógeno gracias a la rápida evolución de proteínas efectoras (Dodds y Rathjen 2010). Se ha encontrado que diversos efectores son capaces de degradar o inactivar componentes de la MTI, esto lo logran mediante su actividad proteasa al igual que por la manipulación del proteasoma 26S y la maquinaria de ubiquitinación, entre otras (Block y Alfano 2011). Un

ejemplo interesante de adaptación a la resistencia, mediada por el gen recesivo *xa5*, lo constituye *pthXo7*. Este efector es capaz de inducir la expresión de un parálogo de *TFIIA γ* (antes llamado *xa5*) que en variedades resistentes de arroz se encuentra mutado (Iyer y McCouch 2004). Se cree que con esto logra restaurar la virulencia de otros efectores de tipo **TAL** (del inglés, *Transcription Activator-Like*) de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) al reclutar la maquinaria transcripcional en arroz (Sugio et al. 2007).

La yuca junto con el maíz, la caña de azúcar y el arroz se encuentra dentro de las principales fuentes de alimento y energía para muchos países en el mundo. Actualmente la yuca provee alimento a casi 1.000 millones de personas en todo el mundo (Ceballos et al. 2010). Su producción se ve comprometida por varias enfermedades virales, fúngicas y bacterianas, entre las cuales se destaca el añublo bacteriano causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*).

A pesar de que son pocos los factores de patogenicidad identificados en *Xam*, la disponibilidad de la secuencia del genoma de la cepa *Xam* CIO151 y de la secuenciación parcial de otras 65 cepas, ha permitido la identificación de 25 efectores candidatos (Arrieta-Ortiz et al. 2013, Bart et al. 2012, López y Bernal 2012). Estos trabajos han permitido la caracterización de un grupo de efectores principales que se encuentran presentes en una amplia variedad de cepas de *Xam* no sólo aisladas de Latinoamérica sino también de África y Asia. Dentro de este grupo de efectores principales se encuentra *hrp-associated F* (**HpaF**), perteneciente al grupo de genes *hpa* (*hrp-associated*) y conservado también en el género *Xanthomonas*. En algunas especies HpaF juega un rol fundamental en la virulencia (Kim et al. 2003). Aunque en *Xam* se ha encontrado que es importante para la virulencia de la bacteria, no se conoce aún su mecanismo de acción.

Con el objetivo de evaluar la contribución de HpaF en la patogenicidad de *Xam* en una interacción compatible, se evaluó el efecto de esta proteína en la modulación de la expresión de genes de yuca y posibles cambios morfológicos en las células de yuca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Las plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) in vitro de la variedad MCOL1522 fueron proporcionadas por el banco de germoplasma del Centro Internacional de Agricultura Tropical (**CIAT**), se

endurecieron y se propagaron en la Vega, Cundinamarca (05° 00' 188" N y 74° 21' 005" O). A partir de estacas se crecieron plantas bajo condiciones de invernadero (28 °C, fotoperíodo de 12 h). Plantas de 4-5 semanas fueron empleadas para los experimentos de inoculación.

Material bacteriano. Las cepas de *Xam* que se utilizaron para realizar las inoculaciones fueron: **i)** CFBP1851 (cepa silvestre); **ii)** *Xam ΔhpaF* (mutante para HpaF); y **iii)** *Xam ΔhpaF +hpaF* (mutante complementado con HpaF). La cepa *Xam ΔhpaF* se generó mediante recombinación homóloga por medio del vector suicida pCR[®]4-TOPO (Invitrogen Life Technologies Carlsbad, CA, U. S. A.), y sobre esta cepa se llevó a cabo la complementación de HpaF por medio de transformación genética con el plásmido pBAV226 (Vinatzer et al. 2006) conteniendo el gen. Las bacterias se crecieron en medio LPGA (0,5% extracto de levadura, 0,5% peptona, 0,5% glucosa y 1,5% agar) durante 48 h a 28 °C a partir del stock de glicerol a -80. Para el crecimiento en líquido se utilizó LPG (0,5% extracto de levadura, 0,5% peptona y 0,5% glucosa).

Inoculación. Para la evaluación microscópica del tejido inoculado, se realizó una punción con una aguja estéril en la nervadura principal del haz del foliolo central a una distancia de 1 cm debajo del ápice, y se agregaron 10 μl de una suspensión bacteriana a una $DO_{600nm} = 0,2$ (figura 1A). Este procedimiento se realizó de igual manera para las tres cepas de *Xam*. La inoculación para los experimentos de expresión de genes se realizó en cuatro puntos, dos en el mesófilo y dos en el nervio principal, de todos los folíolos de la hoja de la variedad MCOL1522 con las tres cepas ya mencionadas empleando el mismo procedimiento de punción (figura 1B).

Cortes semifinos y tinciones diferenciales. Para la recolección del material vegetal se hizo un corte en la hoja en forma de cuadrado con 0,5 cm de diámetro aproximadamente, tangencial al punto de inoculación (figura 1C). Este experimento se realizó dos veces con material vegetal diferente. Una vez recolectada la muestra se procedió a hacer la fijación y aclaramiento de la misma, se realizó el montaje en bloques de parafina, y se seccionaron en micrótopo de rotación. Se hicieron cortes de 5 μm de grosor, entre 1-2 mm hacia arriba del punto de inoculación, y se fijaron en tres láminas de 10 cortes cada una. Para la detección de lignina se realizó la coloración no permanente con fluoroglucinol al 1% y HCl al 25%, se agregó glicerol y se fotografiaron inmediatamente los cortes. Para la tinción policromática con azul de toluidina se incubaron los cortes en azul de toluidina al 0,05%, se secan con calor y se fijaron con xilol al 100%.

Construcción del microarreglo de ADNc. Los microarreglos se construyeron a partir de colonias que contienen los insertos de ADNc de cada uno de los 5.700 genes únicos (López et al. 2004, López et al. 2005). Estas bacterias se encuentran organizadas en 14 placas de 384 pozos y se encuentra disponible en el CIAT. Los insertos fueron amplificados por PCR a partir de los clones de bacteria. Los productos de PCR se secan y se resuspendieron en buffer de impresión (NaCl 0,45 M, citrato de sodio 0,045 M y betaína 1,5 M) y finalmente se transfirieron a placas de 384 pozos para ser impresos sobre láminas de vidrio cubiertas con poly-L-lisina (ThermoScientific, Waltham, MA, U. S. A.) usando un pin de 6X4 del SPBIO Microarray Spotting Station ubicado en el CIAT. El ADN de los microarreglos se denaturó al ubicar la lámina de vidrio sobre una plancha caliente



Figura 1. A. Método de inoculación utilizada de plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en los ensayos de histología. B. Método de inoculación de las hojas utilizadas en los ensayos de transcriptómica. En ambos casos, se colocaron 10 μl del cultivo bacteriano una $DO_{600nm} = 0,2$ en cada punto de inoculación. C. Esquema del experimento de la evaluación fenotípica microscópica de la enfermedad. Para seleccionar el tejido empleado en los cortes de parafina se hizo un corte en forma de cuadrado tangencial al punto de inoculación

a 95 °C por 10 s, se fijó con ultravioleta a 410 mJ y se incubó 2 h a 70 °C, luego se guardó en un lugar seco hasta la prehibridización.

Diseño experimental microarreglos. Se recolectó el tejido vegetal en tres tiempos: 0, 4 y 8 días post inoculación (**DPI**). Con el fin de permitir el ingreso del inóculo a la hoja, para el día 0 se recolectó el tejido vegetal a 3 h post inoculación (**HPI**). Se tomaron 5 hojas inoculadas provenientes de 5 plantas distintas o réplicas, se mezclaron y se almacenaron directamente en nitrógeno líquido. El experimento se realizó dos veces bajo las mismas condiciones (réplicas biológicas). Sobre cada lámina del microarreglo se hibridizaron los ADNc de los dos tratamientos a evaluar (plantas inoculadas con *Xam ΔhpaF* y plantas inoculadas con *Xam ΔhpaF + hpaF*). Se realizaron tres réplicas técnicas para cada tiempo, una de las cuales correspondía a un inversión del marcaje del ADNc (*dye-swap*) para un total de 9 láminas hibridizadas (3 tiempos y 3 réplicas técnicas) en cada experimento o réplica biológica.

Extracción de ARN, marcaje de ADNc e hibridización. Las extracciones de ARN se realizaron utilizando fenol:cloroformo, luego se procedió a hacer un tratamiento con DNAsa. Una vez se obtuvo el ARN total libre de ADN genómico, se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa y NanoDrop (ThermoScientific, Waltham, MA, U. S. A.). La síntesis de ADNc se realizó empleando el método SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, CA, U. S. A.). La síntesis de primera cadena se llevó a cabo empleando un cebador oligodT modificado y adicionando la enzima MMLV Reserse Transcriptase (Clontech, CA, U. S. A.). El ADNc amplificado se limpió empleando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, U. S. A.). Posteriormente, se visualizó por electroforesis en gel de agarosa y se evaluó la calidad con NanoDrop (ThermoScientific, Waltham, MA, U. S. A.). Para el marcaje de las sondas de ADNc se empleó un protocolo de marcaje directo en el cual se incorporaron Cy3 o Cy5 (Cy3-dUTP ó Cy5-dUTP, GE Healthcare, U. K.) mediante una reacción de síntesis utilizando cebadores aleatorios y la enzima Exonuclease-free Klenow (USB Corp., Cleveland, OH, U. S. A.). Una vez terminada la reacción de marcaje se realizó nuevamente una limpieza del ADNc empleando QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, GER) y se evaluó la pureza y eficiencia del marcaje por NanoDrop (ThermoScientific, Waltham, MA, U. S. A.).

Para la prehibridización de los microarreglos se lavaron las láminas en SDS al 0,2%, luego se incubaron a 55 °C

durante 45 min en solución de prehibridización (BSA 1%, SSC 5X y SDS 0,1%), se lavaron con agua destilada y luego con isopropanol, se secaron por centrifugación y se hibridizaron inmediatamente. Para la hibridización se adicionó a la lámina *buffer* de hibridización 2x (formamida 50%, SSC 10x y SDS 0,2%), se denaturó a 95 °C, y se mantuvo a 4 °C mientras se adicionó el ADNc marcado. Se realizó la hibridización a 42 °C durante 16 h. Se realizó un primer lavado a 55 °C con SSC 2%, SDS 1%, dos lavados a temperatura ambiente con SSC 1% y un último lavado a temperatura ambiente con SSC 0,1%, se secaron las láminas por centrifugación.

Análisis de la imagen, identificación de genes diferencialmente expresados. Las láminas se escanearon utilizando el escaner VersArray ChipReader 10 μm system (BIO-RAD, Hercules, CA, U. S. A.). Para extraer la información de cada punto se utilizó el programa VersArray Analyzer, se desarrolló una plantilla con la información de la impresión de la lámina y se extrajo la información de intensidad cruda para los puntos de ambos canales y el background para cada punto a un archivo de Excel. La normalización de los datos crudos se realizó usando el programa MIDAS (Saeed et al. 2003) mediante normalización de intensidad de Lowess y regularización de la desviación estándar. Los datos se transformaron con LOG2 y se empleó el programa SAM (Tusher 2001) utilizando un diseño dos clases no pareado con 1.000 permutaciones para identificar los genes diferencialmente expresados. Con el fin de identificar los genes correspondientes al genoma de yuca, se hizo un BLASTn de los ESTs contra el genoma de yuca (<www.phytozome.net>).

RESULTADOS

Efectos histológicos de HpaF en células de yuca. Para evaluar el proceso de infección a nivel microscópico se inocularon hojas de plantas de la variedad MCOL1522 con las cepas *Xam* WT, *Xam ΔhpaF* y *Xam ΔhpaF + hpaF*. A partir de este tejido se realizaron cortes cerca al ápice de la hoja a los 8 DPI (ver materiales y métodos). Como control de la inoculación se realizaron cortes de plantas inoculadas con MgCl₂. En una primera serie de experimentos se llevó a cabo una tinción con fluoroglucinol-HCl o prueba de Weissner, la cual ha sido ampliamente utilizada para la detección de lignina tanto en hojas como en tallos (Bart et al. 2010, Jones et al. 2001, Kpemoua et al. 1996). El fluoroglucinol reacciona con aldehídos aromáticos produciendo una coloración rosada/roja para el caso de aldehídos de tipo hidroxicinamil o una coloración roja/

café para el caso de hidroxibenzaldehídos (Pomar et al. 2002). En la figura 2 se muestra una variación en la intensidad de la coloración roja en los vasos del xilema asociada a la inoculación con las distintas cepas de *Xam*. Al parecer, la ausencia de HpaF se evidencia en la falta de coloración de las paredes del xilema (figuras 2 E, F). Adicionalmente, en plantas inoculadas con cepas que

contienen HpaF (*Xam WT* y *Xam ΔhpaF* + *hpaF*) se observó una coloración café la cual es predominante en las células que hacen parte del mesófilo de empalizada. Esta coloración no se observa en las hojas de plantas inoculadas con la cepa *Xam ΔhpaF*, indicando que en estas últimas células no se presentó daño y/o acumulación de hidroxibenzaldehídos (figuras 2 D, H).

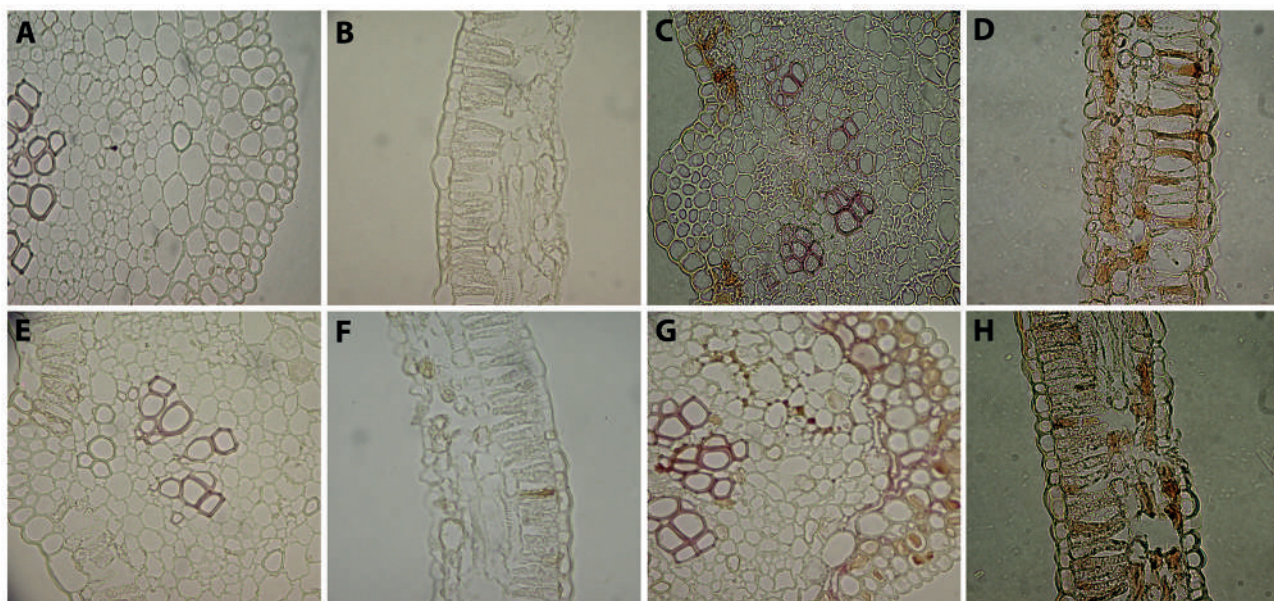


Figura 2. Cortes transversales de hojas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) inoculadas con *Xam* a 8DPI y teñidas con fluoroglucinol-HCl. Las imágenes A, C, E, G muestran el nervio central del foliolo, mientras que B, D, F, H muestran el mesófilo de foliolo. A-B. Las tinciones se realizaron sobre plantas inoculadas con $MgCl_2$; C-D. Plantas inoculadas con la cepa *Xam WT*; E-F. *Xam ΔhpaF*; G-H. *Xam ΔhpaF* + *hpaF* (aumento: 400X)

Adicionalmente, los cortes se sometieron a una tinción policromática con azul de toluidina que ha sido una de las tinciones más empleadas en estudios de histología en plantas gracias a la versatilidad en la coloración de los distintos tipos celulares (Curtis 1986, O'Brien et al. 1965). La tinción con azul de toluidina en hojas de yuca en plantas control (inoculadas con $MgCl_2$) revela las paredes de los vasos de xilema y el parénquima de empalizada y esponjoso con una coloración azul-verdosa (figuras 3 A, B). Las células del colénquima y los tubos cribosos se aprecian como una coloración morada (figuras 3 A, B). Asociada a la inoculación con *Xam* se presenta aumento en la coloración morada y degradación del tejido, lo cual es predominante en las inoculaciones con las cepas que presentan HpaF y se pierde en gran medida con la ausencia del efector (figura 3). Este aumento en la coloración se observa principalmente asociado a los vasos del xilema, aunque también es abundante en las células del mesófilo (figura 3). Notablemente y también asociado a la presencia de

la proteína efectora en *Xam*, se presenta una fuerte coloración al interior de los vasos del xilema en el nervio central del foliolo (figuras 3 C, G) la cual se aprecia atenuada en la ausencia de HpaF (figura 3E). Esta coloración fuerte al interior de los vasos del xilema no sólo se presenta en la nervadura principal del foliolo sino que también está presente en nervios secundarios del mesófilo (figura 3H). El xilema es un tejido que al madurar pierde el protoplasto, por lo tanto no es común apreciar coloración en sus vasos. Es posible que esta fuerte coloración esté indicando presencia de bacterias al interior de los vasos del xilema.

Expresión diferencial por microarreglos. Con el fin de determinar cambios en el perfil de expresión de genes asociados a la presencia de la proteína HpaF de *Xam* en las plantas de yuca, se inocularon hojas de yuca de la variedad MCOL1522 con los genotipos *ΔhpaF* y *ΔhpaF* + *hpaF*. Se recolectó material vegetal a los 0, 4 y 8 DPI, y se realizó la hibridación al microarreglo de 5.700 ESTs de yuca.

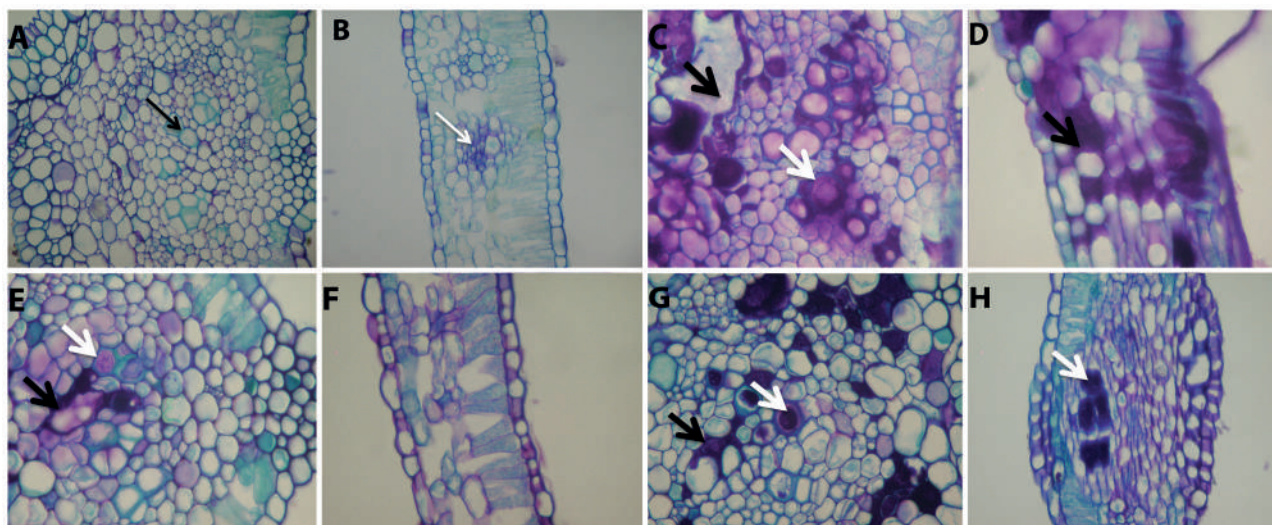


Figura 3. Cortes transversales de hojas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) inoculadas con *Xam* a 8DPI y teñidas con azul de toluidina. Las imágenes A, C, E, G muestran el nervio central del foliolo, mientras que B, D, F, H muestran el mesófilo de foliolo. A-B. Las tinciones se realizaron sobre plantas inoculadas con $MgCl_2$; C-D. Plantas inoculadas con la cepa *Xam* WT; E-F. *Xam* $\Delta hpaF$; G-H. *Xam* $\Delta hpaF$ + *hpaF* (la flecha delgada negra señala los vasos del xilema en el nervio central del foliolo; la flecha delgada blanca señala nervios terciarios en el mesófilo; las flechas gruesas negras señalan una densa coloración morada tanto en la nervadura central como en el mesófilo asociada a la degradación de tejido; las flechas gruesas blancas muestran una fuerte coloración morada dentro de los vasos del xilema; aumento: 400X)

Para las hibridaciones se mezclaron en una misma lámina del microarreglo el ADNc de plantas inoculadas con *Xam* $\Delta hpaF$ y de plantas inoculadas con *Xam* $\Delta hpaF$ + *hpaF*, para cada uno de los tiempos por separado. Esto se realizó con el fin de evaluar la expresión diferencial de genes dada por la presencia de HpaF en *Xam* a distintos tiempos post inoculación.

Se encontraron únicamente siete genes reprimidos por HpaF en el tiempo 4DPI, mientras que a 8DPI no se encontraron genes diferencialmente expresados. En la tabla 1, se muestran los genes reprimidos a 4DPI por la inoculación con *Xam* $\Delta hpaF$ + *hpaF*. Dentro de estas proteínas reprimidas se observan proteínas del metabolismo celular relacionadas con defensa, como alcohol deshidrogenasa y proteína de unión a calmodulina (cassava4.1_014376m y cassava4.1_018395m). Adicionalmente se encontró una proteína relacionada con la fotosíntesis (cassava4.1_014062m), la cual ya se ha registrado previamente como reprimida en respuesta a la infección con *Xam* (López et al. 2005). De manera interesante se encontró una proteína relacionada con respuesta a hormonas, como un factor de transcripción en yuca con dominio AP2 (cassava4.1_013214m), similar

a proteínas de unión a elementos de respuesta a etileno. La proteína cassava4.1_022976m presenta alta similitud con proteínas de la familia de respuesta de auxinas, las cuales también se han relacionado con defensa en plantas (Fu et al. 2010).

DISCUSIÓN

Estudios previos de caracterización y validación de genes asociados a virulencia y patogenicidad en *Xam* han permitido identificar que HpaF es un factor de virulencia, ya que al ser mutado en la bacteria esta pierde su virulencia y al ser transformado de vuelta sobre dicho mutante, la bacteria la recupera (Trujillo et al. datos no publicados). En este trabajo demostramos que HpaF produce cambios morfológicos en las células de yuca infectadas y juega un papel importante en la represión de la expresión de algunos genes de la planta.

En términos generales son escasos los estudios que se realizan a nivel microscópico para evaluar el efecto de la mutación de un efector sobre las respuestas de defensa de la planta (Marois et al. 2002). A pesar de que nuestros

Tabla 1. Lista de genes diferencialmente reprimidos a 4DPI por la inoculación con *Xam* Δ hpaF +hpaF (Delta: 0,318; tasa descubrimiento de falsos positivos: 0%)

Accesión		Anotación/homología	Nivel de expresión
Genbank	ID gen		(fold change)
CK651226	cassava4.1_014376m	Deshidrogenasas con diferentes especificidades (relacionada con alcohol deshidrogenasas de cadena corta)	0,36
CK647922	cassava4.1_018395m	Calmodulina y proteínas relacionadas (superfamilia EF-Hand)	0,40
CK641470	cassava4.1_014062m	Proteína 151 de unión a clorofila a-b, precursor cloroplasto	0,42
CK641421	cassava4.1_004713m	Proteína de unión a poliadenilato (superfamilia RRM)	0,49
CK644932	cassava4.1_003244m	Chaperona molecular GRP78/BiP/KAR2, superfamilia HSP70	0,50
CK651014	cassava4.1_013214m	Factor de transcripción, dominio AP2	0,48
CK646145	cassava4.1_022976m	Proteína putativa de respuesta a auxina [<i>A. thaliana</i>].	0,42

resultados no muestran hipertrofia de células del mesófilo como se ha registrado en el patosistema pimentón-*Xanthomonas euvesicatoria* (Marois et al. 2002), sí muestran diferencias en la tinción con fluoroglucinol-HCl asociadas a la presencia de HpaF en *Xam* (figura 2). Notablemente se observa coloración café en las células del mesófilo. Es conocido que esta coloración es producida por hidroxibenzaldehídos (Pomar et al. 2002), pero es poco lo que se entiende sobre el mecanismo de acción de estos compuestos en la defensa contra microorganismos. Estudios de una interacción incompatible en tomate, han mostrado que después de la infección con *Verticillium dahliae*, se incrementa la producción de especies de oxígeno reactivas, la actividad de la enzima fenil-amonioliasa y el contenido de *p*-hidroxibenzaldehído (Gayoso et al. 2010). Específicamente, el 4-hidroxibenzaldehído se ha encontrado como principal compuesto antifúngico en la savia producida por heridas en hojas de *Phaseolus lunatus* (Bell 1970). En general, benzaldehídos se han encontrado en semillas de *Arabidopsis*, los cuales por acción de aldehído oxidasas son transformados a ácido benzoico, que es a su vez precursor de glucosinolatos (Ibdah et al. 2009). De estos últimos, tradicionalmente se ha conocido su actividad repelente contra herbívoros principalmente insectos (Halkier y Gershenzon 2006). De manera similar, se ha encontrado que los glucosinolatos también contribuyen con la defensa de amplio espectro contra hongos (Bednarek et al. 2009, Clay et al. 2009).

Por otra parte, la tinción con azul de toluidina ha sido empleada en yuca para la detección de compuestos fenólicos (Kpemoua et al. 1996). En este estudio se muestra que la coloración está asociada a la presencia de HpaF en *Xam* (figura 3). Al parecer el azul de toluidina está revelando sitios colonizados con bacterias, tanto en los haces vasculares como en el mesófilo (figura 3). Lo anterior concuerda con los bolsillos de lisis bacteriana encontrados en áreas del floema y xilema de plantas susceptibles infectadas con *Xam* (Kpemoua et al. 1996). En otros pastosistemas como arroz-*Xanthomonas oryzae* PV *oryzae* también se observa colonización en los haces vasculares del xilema con la inoculación por *piercing* en hoja (Xu et al. 2008).

En general, los resultados histológicos sugieren que la presencia de HpaF en la bacteria contribuye con la movilidad de *Xam* en la hoja principalmente a través de los haces vasculares. Adicionalmente, la presencia de HpaF en *Xam* se relaciona con la producción de fenol e hidroxibenzaldehídos en el sitio de la inoculación. En este sentido podemos especular que HpaF promueve la virulencia de *Xam* y genera respuestas basales de defensa en la planta.

El estudio del transcriptoma de yuca permitió identificar sólo siete genes reprimidos como consecuencia de la acción del efector HpaF de *Xam* en hojas de yuca

a 4DPI (tabla 1). Entre estos genes se encuentran algunos involucrados en procesos biológicos tales como fotosíntesis (cassava4.1_014062m), regulación de la transcripción (cassava4.1_013214m), unión a Ca^{++} , ciclo celular y procesos celulares (cassava4.1_018395m), otros genes están involucrados en función molecular como unión a ATP (cassava4.1_003244m), unión a ARN (cassava4.1_004713m) y finalmente oxido-reducción (cassava4.1_014376m). Un gen que no presenta anotación funcional, codifica para una proteína similar a proteínas de respuesta a auxinas en *Arabidopsis* (cassava4.1_022976m). De manera interesante, estudios anteriores han mostrado que el gen cassava4.1_014062m se encuentra regulado negativamente como respuesta a la infección por *Xam* en variedades resistentes a bacteriosis vascular (López et al. 2005). La bacteria utilizada en aquel estudio contiene HpaF en su genoma (Bart et al. 2010). Asimismo, en otro estudio se encontró este mismo gen regulado negativamente en variedades resistentes a mosca blanca como respuesta a la infección después de 14DPI (Bohórquez 2011). Lo anterior sugiere que HpaF está actuando sobre la maquinaria fotosintética con el fin de suprimir las defensas de la planta. Otro gen que se encontró suprimido fue el gen cassava4.1_003244m, el cual codifica para una chaperona de la superfamilia HSP70. Ensayos de doble híbrido utilizando como carnada HpaF han mostrado que uno de sus interactores es una co-chaperona de la superfamilia HSP90 (Trujillo 2013).

Es factible considerar que cambios fenotípicos observados en las plantas inoculadas con la cepa silvestre comparados con las plantas inoculadas con *Xam ΔhpaF* estén asociados con cambios importantes en la expresión génica. Considerando que el microarreglo de yuca sólo contiene 5.700 de los aproximadamente 35 mil genes predichos en el genoma de yuca (www.phytozome.net), es posible que varios de los genes responsables de las diferencias fenotípicas observadas no hayan sido detectados. Este hecho también puede explicar porque a los 8DPI no se identificaron genes diferencialmente expresados. Adicionalmente, es posible que otros genes regulados por HpaF no se expresaron en las condiciones bajo las cuales se construyeron las librerías de ADNc y librerías sustractivas con las que se construyó el microarreglo (López et al. 2004, López et al. 2005), y por lo tanto, no pudieron ser detectados en este estudio. Recientemente se han desarrollado nuevas plataformas para la evaluación del transcriptoma de yuca, las cuales constituyen una ayuda importante para futuros estudios de expresión génica en yuca (Utsumi et al. 2011, Utsumi et al. 2012). Actualmente, estrategias de secuenciación de ARN de alto rendimiento

(ARN-seq) permitirían identificar mayor número de genes regulados como consecuencia de la presencia de HpaF.

En un futuro el uso de sistemas que permitan el estudio de un efector a la vez podría ser empleado para la caracterización individual de efectores de *Xam*. El uso de sistemas heterólogos y el envío al interior de la planta únicamente del efector de interés ha permitido la caracterización de efectores como supresores de defensa (Guo et al. 2009, Rodríguez-Herva et al. 2012). De esta forma, mediante el uso de estos sistemas se podrá dilucidar específicamente el papel de HpaF al interior de las células vegetales.

AGRADECIMIENTOS

A Adriana Bohórquez y Joe Tohme por las facilidades brindadas en la Unidad de biotecnología en CIAT. A Liliana López por la ayuda en el manejo estadístico de los datos. A Xavier Marquínez por el apoyo en la realización de los cortes histológicos y tinciones. Este proyecto fue financiado parcialmente por el MADR Contrato N.º 205-2008Z4490-3489.

REFERENCIAS

- Alfano JR, Collmer A. 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *Journal of Bacteriology*, 179 (18): 5655-5662.
- Arrieta-Ortiz ML, Rodríguez-R LM, Pérez-Quintero AL, Poulin L, Díaz A, Arias-Rojas N, Trujillo C, Restrepo-Benavides M, Bart R, Boch J, Boureau T, Darrasse A, David P, Dugé de Bernonville T, Fontanilla P, Gagnevin L, Guérin F, Jacques MA, Lauber E, Lefeuvr P, Medina C, Medina E, Montenegro N, Muñoz-Bodnar A, Noël L, Ortiz-Quifones JF, Osorio D, Pardo C, Patil PB, Poussier S, Pruvost O, Robène-Soustrade I, Ryan RP, Tabima J, Urrego-Morales OG, Vernière C, Carrere S, Verdier V, Szurek B, Restrepo S, López C, Koebnik R, Bernal A. 2013. Genomic Survey of Pathogenicity Determinants and VNTR Markers in the Cassava Bacterial Pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* Strain CIO151. *Plos One* [Internet]. 8 (11): 1-18. Fecha de acceso: 02 de diciembre de 2013. Disponible en: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0079704>>.
- Bart R, Cohn M, Kassen A, McCallum EJ, Shybut M, Petriello A, Krasileva K, Dahlbeck D, Medina C, Alicai T, Kumar L, Moreira LM, Neto JR, Verdier V, Santana MA, Kositcharoenkul N, Vanderschuren H, Gruissem W, Bernal A, Staskawicz BJ. 2012. High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences [Internet]. 109: 1-8. Fecha de acceso: 28 de agosto de 2012. Disponible en: <<http://www.pnas.org/content/early/2012/06/12/1208003109>>.
- Bart R, Chern M, Vega-Sanchez ME, Canlas P, Ronald PC. 2010. Rice Snl6, a cinnamoyl-CoA reductase-like gene family member, is required for NH1-mediated immunity to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Plos Genetics [Internet]. 6 (9): 1-10. Fecha de acceso: 18 de diciembre de 2010. Disponible en: <<http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgn.1001123>>.
- Bednarek P, Pislewska-Bednarek M, Svatos A, Schneider B, Doubek J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, Molina A, Schulze-Lefert P. 2009. A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. Science, 323: 101-106.
- Bell AA. 1970. 4-hydroxybenzaldehyde and vanillin as toxins formed in leaf wound sap of *Phaseolus lunatus*. Phytopathology 60: 161-165.
- Bernoux M, Ellis JG, Dodds PN. 2011. New insights in plant immunity signaling activation. Current Opinion in Plant Biology, 14: 512-518.
- Block A, Alfano JR. 2011. Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys. Current Opinion in Microbiology, 14: 1-8.
- Bohórquez A. 2011. Aislamiento de secuencias expresadas diferencialmente durante la respuesta de defensa al ataque de la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*) en el cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mediante genómica funcional [Tesis de doctorado]. [Cali (Colombia)]: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. p. 236.
- Boller T, Felix G. 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. Annual Review of Plant Biology, 60: 379-406.
- Ceballos H, Okogbenin E, Pérez JC, Becerra LA, Debouck D. 2010. Cassava. En: Bradshaw JE, editor. Root and tuber crops. New York (United States): SpringerLink. p. 53-96.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell, 124: 803-814.
- Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM. 2009. Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. Science, 323: 95-101.
- Curtis J. 1986. Microtecnia vegetal. Mexico D.F. (México): Tritillas. p.106
- Dodds PN, Rathjen JP. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. Nature Reviews, 11: 539-548.
- Fu J, Liu H, Li Y, Yu H, Li X, Xiao J, Wang S. 2010. Manipulating Broad-Spectrum Disease Resistance by Suppressing Pathogen-Induced Auxin Accumulation in Rice. Plant Physiology, 155: 589-602.
- Gayoso C, Pomar F, Novo-Uzal E, Merino F, Martínez de Ilárduya O. 2010. The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. BioMed Central Plant Biology, 10: 1-19.
- Guo M, Tian F, Wamboldt Y, Alfano JR. 2009. The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 can suppress plant immunity. Molecular Plant-Microbe Interactions, 22: 1069-1080.
- Halkier BA, Gershenzon J. 2006. Biology and Biochemistry of glucosinolates. Annual Review of Plant Biology, 57: 303-333.
- Ibdah M, Chen YT, Wilkerson CG, Pichersky E. 2009. An aldehyde oxidase in developing seeds of *Arabidopsis* converts benzaldehyde to benzoic acid. Plant Physiology, 150: 416-423.
- Iyer AS, McCouch S. 2004. The Rice Bacterial Blight Resistance Gene *xa5* Encodes a Novel Form of Disease Resistance. Molecular Plant-Microbe Interactions, 17: 1348-1354.
- Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. Nature, 444: 323-329.
- Jones L, Ennos AR, Turner SR. 2001. Cloning and characterization of irregular xylem4 (*irx4*): a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*. Plant Journal, 26: 205-216.
- Kim JG, Park BK, Yoo CH, Jeon E, Oh J, Hwang I. 2003. Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp Pathogenicity Island. Journal of Bacteriology, 185: 3155-3166.
- Kpemoua K, Boher B, Nicole M, Calatayud P, Geiger JP. 1996. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Canadian Journal of Microbiology, 42: 1131-1143.
- López C, Jorge V, Piegu B, Mba C, Cortes D, Restrepo S, Soto M, Laudie M, Berger C, Cooke R, Delseny M, Tohme J, Verdier V. 2004. A unigene catalogue of 5700 expressed genes in cassava. Plant Molecular Biology, 56: 541-554.
- López C, Soto M, Restrepo S, Piegu B, Cooke R, Delseny M, Tohme J, Verdier V. 2005. Gene expression profile in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* infection in cassava using a cDNA microarray. Plant Molecular Biology, 57: 393-410.
- López C, Bernal A. 2012. Cassava Bacterial Blight: Using Genomics for the Elucidation and Management of an Old Problem. Tropical Plant Biology, 5: 117-126.
- Marois E, Van den Ackerveken G, Bonas U. 2002. The xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. Molecular Plant-Microbe Interactions, 15: 637-646.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma, 59: 368-373.
- Oh HS, Collmer A. 2005. Basal resistance against bacteria in *Nicotiana benthamiana* leaves is accompanied by reduced vascular staining and suppressed by multiple *Pseudomonas syringae* type III secretion system effector proteins. Plant Journal, 44: 348-359.
- Pomar F, Merino F, Barcelo AR. 2002. O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. Protoplasma, 220: 17-28.
- Rodríguez-Herva JJ, González-Melendi P, Cuartas-Lanza R, Antúnez-Lamas M, Río-Alvarez I, Li Z, López-Torrejón G, Díaz I, del Pozo JC, Chakravarthy S, Collmer A, Rodríguez-Palenzuela P, López-Solanilla E. 2012. A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. Cellular Microbiology, 14: 669-681.
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati NK, Braisted, JC, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovskiy I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. 2003. TM4: a

- free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques*, 34: 374-378.
- Segonzac C, Zipfel C. 2011. Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 14:1-8.
- Sugio A, Yang B, Zhu T, White FF. 2007. Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes OsTFIIA γ 1 and OsTFX1 during bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 10720-10725.
- Tusher VG. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 5116-5121.
- Trujillo C. 2013. Genetic structure of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* populations in two cassava producer regions in Colombia and characterization of an effector protein [Tesis de doctorado]. [Bogotá (Colombia)]: Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes. p. 137.
- Utsumi Y, Sakurai T, Umemura Y, Ayling S, Ishitani M, Narangajavana J, Sojikul P, Triwitayakorn K, Matsui M, Manabe R, Shinozaki K, Seki M. 2011. RIKEN Cassava Initiative: Establishment of a Cassava Functional Genomics Platform. *Tropical Plant Biology*, 5:110-116.
- Utsumi Y, Tanaka M, Morosawa T, Kurotani A, Yoshida T, Mochida K, Matsui A, Umemura Y, Ishitani M, Shinozaki K, Sakurai T, Seki M. 2012. Transcriptome Analysis Using a High-Density Oligomicroarray under Drought Stress in Various Genotypes of Cassava: An Important Tropical Crop. *DNA Research*, 19: 335-345.
- Vinatzer BA, Teitzel GM, Lee MW, Jelenska J, Hotton S, Fairfax K, Jenrette J, Greenberg JT. 2006. The type III effector repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and its role in survival and disease on host and non-host plants. *Molecular Microbiology*, 62: 26-44.
- Wei CF, Kvitko BH, Shimizu R, Crabill E, Alfano JR, Lin NC, Martin GB, Huang HC, Collmer A. 2007. A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*, 51: 32-46.
- Xu RQ, Blanvillain S, Feng JX, Jiang BL, Li XZ, Wei HY, Kroj T, Lauber E, Roby D, Chen B, He YQ, Lu GT, Tang DJ, Vasse J, Arlat M, Tang JL. 2008. AvrACXcc8004, a Type III Effector with a Leucine-Rich Repeat Domain from *Xanthomonas campestris* *Pathovar campestris* Confers Avirulence in Vascular Tissues of *Arabidopsis thaliana* Ecotype Col-0. *Journal of Bacteriology*, 190: 343-355.