



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**CONSTRUCCIÓN DE PROMOTORES TRAMPA BASADOS EN EFECTORES
TAL DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis***

Juan Sebastian Sánchez Ferro

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá DC, Colombia
2020

**CONSTRUCCIÓN DE PROMOTORES TRAMPA BASADOS EN
EFECTORES TAL DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis***

Juan Sebastian Sánchez Ferro

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Biología

Directora:

PhD. Paula Alejandra Díaz Tatis

Codirector:

PhD. Camilo Ernesto López Carrascal

Línea de Investigación:

Fitopatología molecular

Grupo de Investigación:

Manihot biotec

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

2020

*A la memoria de mi abuelo,
a mi tía y mi mama*

"Einstein: lo que más admiro de tu arte es la universalidad: no dices ni una palabra, pero todo el mundo te entiende"

"Chaplin: Cierto, pero tu gloria es aún mayor: el mundo entero te admira, aunque nadie te entiende".

Agradecimientos

Agradezco a Paula Díaz y a Camilo López por permitirme formar parte de su grupo de investigación y adoptarme, por su constante apoyo sin el cual no habría podido avanzar lo suficiente y su infinita paciencia para con mi persona a la hora de escribir este documento. También les agradezco por sus sugerencias, enseñanzas y por su manera de ser, por darme la oportunidad de crecer un poco más.

Agradezco al grupo Manihot biotec en el que he habitado durante estos años y a todos sus miembros, cada uno es una pequeña parte de mis experiencias y conocimiento ahora. Agradezco especialmente a Edilene por todo lo que me enseñó del laboratorio, su compañerismo y por sus consejos para el desarrollo de mi Maestría.

Agradezco a Adriana Bernal y Carlos Zárate que amablemente compartieron con nosotros las construcciones de los TALEs clonados en los vectores de expresión en *Xanthomonas* pSKX1.

Agradezco a mi familia y amigos. Gracias por ser comprensivos, por esperarme y no olvidarme. Gracias por tanta paciencia a pesar de mis constantes ausencias en cada una de las reuniones, por apreciarme a pesar de tantos desaires en estos años y por brindarme ese apoyo tan cálido que solo ustedes pueden brindar. Gracias totales a mi mamá, sin ella nunca hubiera podido llegar hasta acá, es el pilar más fuerte en mi vida.

Agradezco a Laura Rodríguez por su querer incondicional, por cada uno de los momentos que hemos estado juntos, por el apoyo mutuo que tuvimos en desarrollo de nuestras Maestrías y por ser mi fuerza cuando más débil estuve.

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia, a la Facultad de Ciencias y al Departamento de Biología, mi primer hogar más que mi propia casa durante casi tres años de mi existencia. Gracias por dejarme ser parte de su gran comunidad.

Agradezco a la Facultad de Ciencias por otorgarme la Beca de Auxiliar Docente, que me brindo los recursos necesarios para llevar a cabo mis estudios. Gracias a mis jefas del área de microbiología Yih Wen Fung, Jimena Sánchez y Angie Gonzales, que me enseñaron y apoyaron cada vez que lo necesite. También muchísimas gracias a Elkin Marcelo Ruiz, que hizo de maestro, compañero y amigo desde que inicie en mis labores como monitor.

Finalmente, agradezco al Banco de la Republica y a la Vicerrectoría de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Universidad Antonio Nariño por el apoyo económico al proyecto de investigación titulado: “Construcción de promotores sintéticos activados por efectores TAL como una herramienta biotecnológica para el mejoramiento de la resistencia a la bacteriosis vascular de la yuca”, Convenio Proyecto #4.229. Agradezco de nuevo a la Vicerrectoría de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Universidad Antonio Nariño, por el apoyo económico para la participación en el III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2 y en el V Bogotá Microbial Meeting BoMM.

Resumen

La bacteriosis vascular de la yuca, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*), es la principal enfermedad bacteriana que afecta al cultivo de yuca. La virulencia de *Xam* ha sido atribuida principalmente a los TALEs (*Transcription Activator-Like Effectors*), los cuales se unen a elementos en el promotor de genes blanco del hospedero para inducir su expresión. La caracterización del TALoma en diversas cepas colombianas de *Xam* ha llevado a la identificación de los efectores TAL14, TAL20 y TAL22 como los más frecuentes en las poblaciones del patógeno. Con el fin de desarrollar una herramienta para producir resistencia de amplio espectro a *Xam*, en este trabajo se generó una construcción genética de un promotor trampa conteniendo los *EBEs* (*Effector Binding Elements*) para los TALEs 14, 20 y 22. Los *EBEs* fueron insertados por mutagénesis dirigida en el promotor mínimo de Bs3 (pBs3min) y para la construcción de un promotor *TriEBE* se clonaron *EBE*_{TAL14*Xam*} y *EBE*_{TAL22*Xam*} alrededor del *EBE*_{TAL20*Xam*}. Las secuencias del gen *GUS**plus* y el terminador 35s fueron clonadas flanqueando los promotores. La expresión transitoria de los constructos en *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* evidenció la activación de los promotores debido a la presencia de los TALEs 14 y 20 en hojas coinfiltradas con los promotores junto los efectores. Estos resultados indican que los promotores trampa generados en este estudio tienen la capacidad de ser activados por cualquier cepa de *Xam* que presente TAL14 o TAL20 en su TALoma, planteándose como un cassette de reconocimiento para la mayoría de las cepas del patógeno en el país.

Palabras clave: Biotecnología, Bacteriosis vascular de la yuca, Resistencia de amplio espectro

Abstract

Cassava bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam), is the main bacterial disease that affects Cassava crops. Xam virulence has been attributed to TALEs (Transcription Activator-Like Effectors), that bind to promoter elements of the host target genes to induce their expression. The TALome characterization of diverse Colombian strains of Xam have led to the identification of TAL14, TAL20, and TAL22 as the most recurrent TAL effectors in the pathogen populations in the country. With the purpose to develop a biotechnological tool for producing broad-spectrum resistance against Xam, this study generated a genetic construction of a trap promoter containing EBEs (Effector Binding Elements) for TALEs 14, 20 and 22. The EBE sequences were inserted in the minimal Bs3 promoter (pBs3min) using site-directed mutagenesis, to construct the TriEBE promoter EBETAL14Xam and EBETAL22Xam were cloned flanking EBETAL20Xam. The reporter gene GUSplus and 35s terminator were inserted flanking the promoter, the resulting vectors were used to transform *Agrobacterium tumefaciens* and perform the functional evaluation in *Nicotiana tabacum*. Finally, the promoters activation was evidenced because of TAL14 and TAL20 presence in co-infiltrated leaves. These results suggest that trap promoters developed in the present research can be activated by any Xam strain with TAL14 or TAL20 in its TALome, therefore representing a novel recognition cassette for most strains of the pathogen in Colombia.

Keywords: Biotechnology, Cassava bacterial blight, Broad-spectrum resistance

Contenido

	Pag
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XII
Lista de tablas	XIII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIV
Introducción	1
1. Marco teórico.....	5
1.1. <i>Casabe transcontinental.....</i>	<i>5</i>
1.2. <i>Limitantes del cultivo y bacteriosis vascular</i>	<i>8</i>
1.3. <i>Resistencia vegetal en la interacción yuca-Xam.....</i>	<i>12</i>
1.4. <i>El género Xanthomonas y sus mecanismos de patogénesis</i>	<i>18</i>
1.5. <i>TALEs: De la susceptibilidad a la resistencia</i>	<i>25</i>
2. Objetivos.....	35
3. Materiales y métodos	36
3.1. <i>Diseño y construcción de los promotores trampa</i>	<i>36</i>
3.2. <i>Clonación de los efectores TAL.....</i>	<i>41</i>
3.3. <i>Evaluación funcional por expresión transitoria.....</i>	<i>43</i>
3.4. <i>Aproximación teórica a la obtención de EBEs genéricos.....</i>	<i>49</i>
4. Resultados.....	55
4.1. <i>Diseño y construcción de los promotores trampa</i>	<i>55</i>
4.2. <i>Clonación de los efectores TAL.....</i>	<i>62</i>
4.3. <i>Evaluación funcional por expresión transitoria.....</i>	<i>66</i>
4.4. <i>Aproximación teórica a la obtención de EBEs genéricos.....</i>	<i>74</i>
5. Discusión.....	80
6. Conclusiones y recomendaciones.....	90
6.1. <i>Conclusiones.....</i>	<i>90</i>
6.2. <i>Recomendaciones.....</i>	<i>91</i>
7. Anexos: Material suplementario	93
Bibliografía	101

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Arquitectura de los TALEs.	26
Figura 1-2. Mecanismos de resistencia asociados a los TALEs.	30
Figura 3-1. Mutagénesis dirigida de pBs3min.	38
Figura 3-2. Representación esquemática de los T-ADNs empleados en los experimentos de expresión transitoria.	44
Figura 3-3. Representación gráfica de la metodología para la obtención de las secuencias de unión para TAL14, TAL20 y TAL22.	49
Figura 4-1. Diseño de promotores trampa <i>UniEBE</i> y <i>TriEBE</i>	55
Figura 4-2. Construcción de promotores trampa.	58
Figura 4-3. Desarrollo de promotor sin <i>EBEs</i>	59
Figura 4-4. Evaluación de la identidad de los constructos.	60
Figura 4-5. Verificación de la recombinación en el vector binario pMDC32.	62
Figura 4-6. Clonación de los TALEs en pENTR/D-TOPO.	63
Figura 4-7. Recombinación de los efectores en pBAV139.	65
Figura 4-8. Confirmación de la transformación en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	67
Figura 4-9. Evaluación funcional de la actividad de los promotores trampa.	68
Figura 4-10. Actividad de los constructos coinfiltrados con los TALEs 14, 20 y 22.71	
Figura 4-11. Evaluación de la actividad del promotor <i>TriEBE</i>	72
Figura 4-12. Efecto de múltiples TALEs en la actividad del promotor <i>TriEBE</i>	73
Figura 4-13. Distribución de la probabilidad de <i>EBEs</i> predichos en genes sobreexpresados.	75
Figura 4-14. Obtención de <i>EBEs</i> genéricos para los TALEs 14, 20 y 22.	76
Figura 4-15. Coeficiente de la probabilidad de unión de los TALEs 14, 20 y 22 a los <i>EBEs</i>	78
Figura S 7-1. Estrategia de clonación para la construcción de los promotores trampa.	93
Figura S 7-2. Estrategia de clonación de los TALEs 14, 20 y 22.	95
Figura S 7-3. Probabilidad de unión de TAL14 a los <i>EBEs</i>	97
Figura S 7-4. Probabilidad de unión de TAL20 a los <i>EBEs</i>	98
Figura S 7-5. Probabilidad de unión de TAL22 a los <i>EBEs</i>	99

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 3-1. Probabilidad de unión de los RVDs a las bases nitrogenadas.	52
Tabla S 7-1. Probabilidad de los <i>EBEs</i> predichos (λ) para los TALEs 14, 20 y 22 de <i>Xam</i>	96

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
°C	<i>Grados Celsius</i>
AAD	<i>Acidic Activation Domain</i>
ADN	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
ADP	<i>Adenosine Diphosphate</i>
ARN	<i>Ácido ribonucleico</i>
ARNm	<i>ARN mensajero</i>
ARC	<i>APAF-1, R proteins, and CED-4</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
Avr	<i>Avirulencia</i>
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
CC	<i>Coiled Coil</i>
CP _e	Coeficiente de probabilidad para los <i>EBEs</i> experimentales
CP _g	Coeficiente de probabilidad para los <i>EBEs</i> genéricos
CRR	<i>Central Region Repeats</i>
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Pattern</i>
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
dNTP	Deoxynucleotide
DSF	<i>Diffusible Signal Factor</i>
EBE	<i>Effector Binding Element</i>
EBE _e	<i>EBEs</i> experimentales
EBE _g	<i>EBEs</i> genéricos
ETI	<i>Effector-triggered immunity</i>
ETS	<i>Effector-Triggered Susceptibility</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
Ha	<i>Hectárea</i>
Hpa	<i>hrp associated</i>
HR	<i>Hypersensitive Response</i>
Hrp	<i>hypersensitive response and pathogenicity</i>
IRP	<i>Immunity Related Protein</i>
LRR	<i>Leucine-Rich Repeat</i>
LysM	Lysine Motifs
M	<i>Metro</i>
Ma	<i>Millones de años</i>
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MHD	Metionina, Histidina y Aspartato
Mm	<i>Milímetro</i>
NBS	<i>Nucleotide-Binding Site</i>

Abreviatura	Término
<i>NLR</i>	<i>Nucleotide binding and Oligomerization Domain-Like Receptors</i>
<i>NLS</i>	<i>Nuclear Localization Signal</i>
<i>OD</i>	<i>Optical Density</i>
<i>OECD</i>	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
<i>PAMP</i>	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
<i>pBs3min</i>	<i>Promotor mínimo de Bs3</i>
<i>pEBE_e</i>	Probabilidad de unión a los <i>EBEs</i> experimentales
<i>pEBE_g</i>	Probabilidad de unión a los <i>EBEs</i> genéricos
<i>pEBE_{max}</i>	Probabilidad de unión a los <i>EBEs</i> máximos teóricos
<i>PR</i>	<i>Pathogenesis Related</i>
<i>PRR</i>	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
<i>PTI</i>	<i>Pattern Triggered Immunity</i>
<i>QTL</i>	<i>Quantitative Traits Loci</i>
<i>RGC</i>	<i>Resistance Gene Candidate</i>
<i>RLCK</i>	<i>Receptor Like Cytoplasmatic Kinase</i>
<i>RLK</i>	<i>Receptor Like Kinase</i>
<i>RLP</i>	<i>Receptor Like Protein</i>
<i>rpf</i>	<i>regulation of pathogenicity factors</i>
<i>RVD</i>	<i>Repeat Variable Diresidue</i>
<i>RXam1</i>	<i>Resistance to Xam 1</i>
<i>RXam2</i>	<i>Resistance to Xam 2</i>
<i>SM</i>	<i>Saturación Media</i>
<i>SMR</i>	<i>Saturación Media Relativa</i>
<i>t</i>	<i>Tonelada</i>
<i>T2SS</i>	<i>Type II Secretion System</i>
<i>T3S</i>	<i>Type III Signal</i>
<i>T3SS</i>	<i>Type III Secretion System</i>
<i>T3E</i>	<i>Type III Effectors</i>
<i>TALE</i>	<i>Transcription Activator-Like Effector</i>
<i>TFIIA</i>	<i>Transcription Factor II A</i>
<i>TFIID</i>	<i>Transcription Factor II D</i>
<i>TIR</i>	<i>Toll-interleukin-1 receptor</i>
<i>UPT1</i>	<i>Up-regulated by TALE1_{xam}</i>
<i>Xam</i>	<i>Xanthomonas axonopodis pv. manihotis</i>
<i>Xoc</i>	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzicola</i>
<i>Xoo</i>	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>
<i>xps</i>	<i>Xanthomonas protein secretion</i>

Introducción

El cultivo de yuca es la principal fuente energética para cerca de un décimo de la población mundial y una de las fuentes calóricas de mayor relevancia en los países en vías de desarrollo del trópico (Bart et al., 2017; Howeler, Litaladio, & Thomas, 2013). Las raíces de almacenamiento de la yuca presentan un alto contenido de almidón lo que ha llevado a que esta planta sea empleada como recurso calórico animal y humano, especialmente en África y Latinoamérica (Howeler et al., 2013). No obstante, es una especie vegetal que es afectada por patógenos bacterianos, víricos y fúngicos que causan deterioros en distintos órganos de la planta y repercuten notablemente en el decrecimiento de la producción y el rendimiento (McCallum, Anjanappa, & Gruissem, 2017).

La bacteriosis vascular de la yuca es la enfermedad bacteriana más prevalente de este cultivo llegando a causar pérdidas completas en la producción (Lozano, 1986). Esta enfermedad es provocada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam). El género *Xanthomonas* es una agrupación de especies de bacterias fitopatógenas que afectan a cerca de 400 de plantas de importancia agrícola, siendo una causa frecuente de pérdidas en cultivos en todo el planeta (Ryan, Vorhölter, Potnis, & Jones, 2011). A partir de análisis de genómica funcional de varias especies de *Xanthomonas* se han identificado subgrupos de genes implicados en la virulencia, entre los que destacan los genes que codifican para los T3E, del inglés *Type three Effectors* (Ryan et al., 2011). Estos efectores son proteínas que interactúan con la maquinaria de inmunidad del hospedero, con el fin último de suprimir la defensa de las plantas y promover la virulencia (Jacques et al., 2016; Pfeilmeier, Caly, & Malone, 2016).

Particularmente, los TALEs (*Transcription Activator-Like Effectors*) son un tipo especial de T3E que funcionan como factores de transcripción eucariotas. La región central de repeticiones (CRR, *Central Repeat Regions*) de los TALEs reconoce una secuencia específica en el ADN denominada elemento de unión al efector (*EBE, Effector Binding Element*), mientras que el dominio de activación (AAD, *Acidic Activation Domain*) recluta al

complejo pretranscripcional del hospedero, lo que le permite al efector manipular el transcriptoma de las células vegetales llevando a la activación de genes de susceptibilidad (genes *S*) que potencian la virulencia del patógeno y la susceptibilidad del hospedero (Mücke et al., 2019; Pérez-Quintero & Szurek, 2019).

En contraposición a patógenos del género *Xanthomonas*, 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). El más frecuente de estos mecanismos consiste en el reconocimiento de un *EBE* en promotores que promueven la activación de genes ejecutores de defensa (genes *E*) funcionando como una carnada para TALEs, un conjunto de elementos conocido como activador trampa (Boch, Bonas, & Lahaye, 2014; J. Zhang et al., 2015). A partir de este mecanismo, investigadores han construido activadores trampa sintéticos (promotores trampa) para promover los mecanismos de defensa en pimentón frente a efectores de dos patógenos diferentes (Romer, Recht, & Lahaye, 2009). Igualmente, en arroz se empleó la misma estrategia para conferir resistencia a cepas que posean seis TALEs diferentes presentes en dos patovares (Hummel, Doyle, & Bogdanove, 2012) y en cítricos frente a 19 cepas de una sola especie de patógeno con un repertorio de 14 TALEs (Shantharaj et al., 2016). Estos trabajos demuestran que el sistema de promotores trampa puede ser empleado como una alternativa para la promoción de resistencia de amplio espectro a varias especies del género *Xanthomonas*.

Estudios previos de diversidad de TALEs en cepas de *Xam* derivadas de la región Caribe y región Orinoquia de Colombia han indicado una presencia con una frecuencia por encima del 75% de TAL14, TAL20 y TAL22 en los aislamientos del patógeno (Zárate, 2015). Esta alta recurrencia entre distintas cepas indica que estos efectores tienen un rol biológico importante para el patógeno. En este sentido, otras investigaciones muestran que TAL14 y TAL20 promueven el fenotipo de susceptibilidad en yuca, estos se han visto implicados en la activación de genes cuya inducción se ha asociado con el desarrollo de manchas angulares pequeñas y de aspecto acuoso en las hojas infectadas con *Xam*, por tanto se han mostrado relevantes para la progresión de los síntomas de la enfermedad (Cohn et al., 2014, Cohn, Morbitzer, Lahaye, & Staskawicz, 2016).

Previamente en el grupo de investigación Manihot biotec, se desarrolló un constructo genético constituido de un promotor con la secuencia de unión al TAL14 de *Xam*, el cual regula la expresión del gen de resistencia *RXam2*. La coexpresión transitoria de TAL14 y

del promotor trampa en *Nicotiana benthamiana*, y la evaluación funcional del constructo en plantas de yuca transgénicas inoculadas con varias cepas de *Xam* presentando el TAL14, mostraron que el sistema puede ser empleado como una herramienta biotecnológica para el desarrollo de resistencia a *Xam* en yuca (Díaz, 2016). En este estudio se pretende generar una construcción genética de un promotor trampa con múltiples sitios de reconocimiento para los efectores TAL14, TAL20 y TAL22 presentes en cepas colombianas, con miras a ser posteriormente implementado en el desarrollo de una herramienta biotecnológica como método alternativo para el control de la bacteriosis vascular por medio del desarrollo de resistencia de amplio espectro a *Xam*.

1. Marco teórico

1.1. *Casabe transcontinental*

La yuca

Yuca es una palabra del idioma de los nativos de las Antillas que se refiere a la raíz de una planta cuyo nombre común entre los Taínos era *Yucubia* y que hoy en día se le asigna el nombre científico de *Manihot esculenta* (Lope, 1981). Popularmente la *Yucubia* es conocida en distintos países de América como casabe, mandioca, tapioca, aipi o simplemente yuca. Dentro del género *Manihot* se han descrito 98 especies de plantas, todas originarias del nuevo mundo (Isendahl, 2011), de las cuales la yuca es la única que actualmente representa un recurso importante para la seguridad alimentaria, siendo uno de los cultivos con mayor producción, área cultivada y aporte calórico *per capita* diario a nivel mundial (FAO, 2013, 2017).

La yuca es una planta perenne de hábito arbustivo que se caracteriza por desarrollar raíces tuberosas que almacenan grandes cantidades de carbohidratos. La planta crece en una variada gama de condiciones ambientales, desde el nivel del mar hasta los 1800m de altura en temperaturas comprendidas entre 20-30°C, humedad relativa entre 50 y 90% y precipitación media anual entre 600 y 3000 mm (Howeler et al., 2013; OECD, 2016a). Tiene la capacidad de crecer en zonas climáticas con baja precipitación, temporadas secas o en suelos pobres en nutrientes, ácidos y secos, lo que le da ventajas sobre otros tipos de cultivos en regiones marginales (Howeler et al., 2013; OECD, 2016a).

Origen y dispersión de la yuca

El origen botánico de la yuca se remonta a un periodo comprendido entre el Mioceno tardío (6.6ma) y el Pleistoceno en la ecorregión de la sabana tropical brasileña de “El Cerrado”, al sur de los bosques de la cuenca amazónica (Chacón, Madriñán, Debouck, Rodriguez, &

Tohme, 2008; Isendahl, 2011). Por otro lado, evidencia paleoetnobotánica indica que la yuca fue domesticada entre el Pleistoceno tardío y el Holoceno temprano hace 7000 a 12000 años atrás (Isendahl, 2011). Prontamente, la planta fue dispersada por medio de redes de intercambio de alimentos hacia la costa Pacífica de Sur América (9000 años atrás), los Andes (8000 años atrás) y Mesoamérica (6500 años atrás) (Isendahl, 2011), llegando a representar un elemento importante para la subsistencia y el sedentarismo en las comunidades establecidas en América en el Holoceno temprano y medio (Allem, 2002; Pérez, Mora, & López, 2019).

A la llegada de los europeos al nuevo continente en el siglo XV, la yuca hacía parte esencial de la alimentación de los nativos de las Antillas, los cuales realizaban una especie de pan a partir de la yuca denominado *Casabe*, el cual podía ser fácilmente almacenado por largos periodos de tiempo sin presentar enmohecimiento (Livi, 2008; Luján, 2017). Dada su alta capacidad de conservación, los conquistadores adoptaron al *Casabe* como propio y lo utilizaron como reservas de alimento en largos viajes intra y transcontinentales (Luján, 2017). Entre los siglos XVI y XVIII los conquistadores españoles y portugueses dispersaron el cultivo de yuca en África, Filipinas y el sur de Asia debido a su fácil propagación por medio de estacas (OECD, 2016b).

Potencial de la yuca a nivel global

El cultivo de yuca presenta ventajas como resistencia a condiciones climáticas adversas, baja inversión en insumos y reducido consumo de agua, lo que en la actualidad lo ha convertido en uno de los cultivos más relevantes para la seguridad alimentaria de pequeños productores en países en vías de desarrollo del trópico del nuevo y del viejo mundo (FAO, 2018; Howeler et al., 2013). En el año 2017 los cultivos de yuca produjeron un total de 291.99 millones de toneladas ocupando el noveno lugar a nivel mundial, con un rendimiento de 11.08 t/ha, superior al de otros cultivos básicos como el maíz (5.75 t/ha), arroz (4.60 t/ha), trigo (3.53 t/ha) y soya (2.85 t/ha), mostrando un alto potencial para el desarrollo rural (FAO, 2017). Los mayores productores de yuca se encuentran en países del Occidente de África al sur del Sahara (Nigeria, Ghana, República Democrática del Congo), el Sudeste asiático (Tailandia, Indonesia, Filipinas) y Sur América (Brasil, Perú, Paraguay y Colombia), representando una fuente calórica importante especialmente en África y América Latina, mientras que en Asia es empleada como una materia prima valiosa

en la industria del bioetanol para así reducir las emisiones a la atmosfera (FAO, 2013, 2018).

Relevancia del cultivo de yuca en Colombia

La yuca es un importante recurso alimentario en zonas rurales de Colombia y un legado cultural invaluable en comunidades indígenas de la Amazonia, además presenta un alto potencial para el desarrollo rural y agroindustrial del país (Aguilera, 2012; Sandoval & Chavez, 2017). Históricamente el cultivo de yuca en Colombia ha sido empleado principalmente para subsistencia y no ha tenido un exitoso papel en el campo industrial por lo cual su producción a tendido a caer (Aguilera, 2012). No obstante, en recientes años la producción de yuca en el país ha venido en incremento, presentando un pico en 2017 con cerca de un millón de toneladas y representando un aumento en la producción nacional de aproximadamente 130% respecto a lo reportado en el 2011 (0.46 millones de toneladas) (DANE, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016b, 2017). El buen rendimiento que ha mantenido el cultivo de yuca en varios departamentos de Colombia ha favorecido a los pequeños productores y a la comercialización local de la raíz. Además su bajo costo de producción y un rendimiento más competitivo frente otros cultivos, muestra un alto potencial para el desarrollo industrial enfocado hacia la industria alimenticia como insumo para producir harina seca, la industria productora como materia prima de alimentos balanceados para animales y la industria no alimenticia en la producción de alcohol carburante (Aguilera, 2012; DANE, 2016a).

Los mayores productores nacionales de yuca se encuentran en la Región Caribe y la Región Orinoquia, concretamente en los departamentos de Bolívar, Meta, Sucre, Córdoba, Magdalena y La Guajira (DANE, 2017), principalmente con fines de autoconsumo y ventas a nivel local. Comportándose como un cultivo de subsistencia en zonas del país en donde la pobreza multidimensional sobrepasa el 50% en zonas rurales (DANE, 2018; Sandoval & Chavez, 2017). Adicionalmente, la yuca es de vital importancia para diversos asentamientos indígenas de la amazonia colombiana, conformando gran parte de su sustento diario por medio de diversas preparaciones culinarias (Acosta & Camacho, 2005; Sandoval & Chavez, 2017). Las tradiciones ancestrales de cultivo y manejo de las comunidades indígenas han permitido preservar a lo largo del tiempo gran cantidad de variedades de la especie, siendo un resguardo para la diversidad de genotipos de yuca y

presentando un alto potencial para conservar el cultivo dada su relevancia en la seguridad alimentaria a nivel mundial, nacional y local (Acosta & Camacho, 2005; Pérez et al., 2019).

1.2. Limitantes del cultivo y bacteriosis vascular

Factores limitantes del cultivo de yuca

Al igual que otras plantas de interés agrícola, el cultivo de yuca se ve afectado por factores socioeconómicos, relacionados al manejo, bióticos y abióticos que generan grandes pérdidas, entre 37% y 53% de la producción (Howeler et al., 2013; Waddington, Li, Dixon, Hyman, & de Vicente, 2010). Al ser principalmente un cultivo de subsistencia de pequeños productores, los elementos que más afectan negativamente al cultivo se relacionan a problemas socioeconómicos y de manejo, siendo algunas de las mayores limitantes ausencia de políticas que incentiven el cultivo, dificultad de acceso a financiamiento y prácticas de cultivo inadecuadas (Howeler et al., 2013; Waddington et al., 2010). Por otro lado, los limitantes bióticos y abióticos más comunes como enfermedades y disminución en la fertilidad de los suelos por sobreexplotación se ven potenciados sinérgicamente con los factores limitantes socioeconómicos y de manejo llevando a una mayor pérdida en la producción (Waddington et al., 2010).

Particularmente, el manejo inadecuado de las enfermedades en yuca ha tenido como resultado neto la dispersión de distintos patógenos en diferentes regiones geográficas (Howeler et al., 2013; Verdier, López, & Bernal, 2011). Esto a su vez se ha agravado dado a la disminución de la variabilidad genética debido a la propagación clonal y la disminución del cruzamiento genético, llevando a pérdidas por una mayor susceptibilidad frente a patógenos víricos, fúngicos y bacterianos (Herrera, Hyman, & Bellotti, 2011; Howeler et al., 2013). Entre las enfermedades que mayor afectación han generado en el cultivo destacan la enfermedad del mosaico de la yuca, la enfermedad de la veta marrón de la yuca y la bacteriosis vascular de la yuca como potenciales amenazas de la seguridad alimentaria mundial. En el caso de las primeras la distribución geográfica se restringe al continente Africano, mientras la bacteriosis vascular se presenta en todo el holotrópico (Herrera et al., 2011; McCallum et al., 2017).

Distribución geográfica de la bacteriosis vascular

La bacteriosis vascular es la enfermedad bacteriana de mayor impacto en el cultivo de yuca, llegando a generar pérdidas entre el 12 y 100% de la producción (Howeler et al., 2013; Lozano, 1986; McCallum et al., 2017). Inicialmente la bacteriosis vascular de la yuca se limitaba geográficamente a países de África y Latinoamérica, hacia los años 70 la enfermedad fue la causante de pérdidas entre el 75 y el 80% de la producción desencadenando una hambruna padecida en varios países de África Subsahariana y Central por la pérdida total de las raíces y del material disponible para sembrar (Lozano, 1986). A mediados de esa misma década, las pérdidas por la enfermedad en Brasil e Hispanoamérica fueron de 50% y 4-40% presentándose como uno de los mayores limitantes del cultivo de yuca para ese entonces (Hillocks & Wydra, 2002; Lozano, 1986). Más recientemente, se ha registrado la enfermedad en varios países del Sudeste asiático y en islas de Oceanía, mostrando ser una fuerte amenaza para la economía regional (Howeler et al., 2013; Quang, Quan, Quang, Nguyen, & Xuan, 2019; Taylor et al., 2017). Actualmente, la bacteriosis vascular de la yuca se encuentra extendida en todas las regiones con cultivos de yuca en el mundo, afectando principalmente a los pequeños productores de los países de África y Latinoamérica (Howeler et al., 2013; McCallum et al., 2017).

Etiología y síntomas de la bacteriosis vascular de la yuca

La enfermedad se caracteriza por generar manchas angulares pequeñas y de aspecto acuoso en las hojas, que se unen formando una mancha marrón (quemazón o añublo), seguido de marchitez, exudación gomosa en tallos y peciolos, y muerte progresiva desde los tejidos más apicales (Lozano, 1986). El agente causal es la bacteria Gram-negativa *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* (*Xam*), recientemente renombrado *Xanthomonas phaseoli* pv *manihotis* (Constantin et al., 2016), la cual en su fase no patogénica habita sobre la superficie de las plantas (López & Restrepo, 2006; Lozano, 1986). La entrada del patógeno a los tejidos vegetales se da a través de heridas o aperturas como estomas, siendo favorecida por condiciones ambientales de alta humedad relativa (Lozano, 1986). Una vez ingresa la bacteria a la planta, *Xam* invade el mesófilo y luego se establece en el xilema en donde prolifera y se acumula, obstruyendo el transporte de nutrientes y agua a las hojas, lo que disminuye la fotosíntesis y causa el marchitamiento de la yuca (López & Bernal, 2012; Verdier & Jorge, 2004).

Medidas de manejo de la bacteriosis vascular

El uso de estacas y herramientas contaminadas para la propagación del cultivo es el principal foco de diseminación de la enfermedad entre regiones geográficas diferentes. La bacteria usa el agua como medio de diseminación dentro del cultivo, favoreciendo su dispersión especialmente en temporada de lluvias, debido a la salpicadura entre plantas (Lozano, 1986). Prácticas de cultivo adecuadas y medidas de saneamiento han sido llevadas a cabo para limitar las pérdidas en producción generadas por la bacteriosis vascular de la yuca (López & Bernal, 2012; Lozano, 1986)

La combinación de prácticas culturales como la rotación de cultivos utilizando estacas no contaminadas, cultivos intercalados con plantas de crecimiento rápido y siembras en temporada seca se han empleado para limitar la dispersión y la proliferación de *Xam* (Howeler et al., 2013; Lozano, 1986; Verdier et al., 2011). Adicionalmente, medidas fitosanitarias como la evaluación de la calidad de las estacas, el tratamiento térmico del material vegetal para eliminar el patógeno, la quema de plantas contaminadas y la desinfección de las herramientas de trabajo con hipoclorito han mostrado ser útiles en el control de la bacteriosis vascular (Antoine & Wydra, 2015; Lozano, 1986). Finalmente, la medida de control más empleada para contrarrestar la bacteriosis vascular ha sido recurrir al uso y desarrollo de variedades reconocidas como resistentes, caracterizadas por un lento crecimiento y progreso bacteriano en los tejidos vasculares, producción de fenoles y reforzamiento de barreras estructurales (Howeler et al., 2013; Kpemoua, Boher, Nicole, Calatayud, & Geiger, 1996; Lozano, 1986).

La introducción de genotipos de yuca resistentes ha resultado ser el método más eficaz para controlar la enfermedad en los cultivos de yuca (Howeler et al., 2013). No obstante, la alta variación de la agresividad del patógeno en varias regiones geográficas y distintas zonas edafoclimáticas mostró la existencia de una alta diversidad de la bacteria, que se ha presentado como la respuesta evolutiva a las variedades resistentes (Banito, Kpémoua, Bissang, & Wydra, 2010; Dixon, Ngeve, & Nukenine, 2002; López & Bernal, 2012; Trujillo, Arias, et al., 2014; Trujillo, Ochoa, Mideros, & Restrepo, 2014; Verdier et al., 2011). La investigación sobre la variabilidad del patógeno en diferentes regiones geográficas y

diversas zonas edafoclimáticas se ha vuelto indispensable para la búsqueda de fuentes de resistencia que permitan un adecuado manejo para controlar la bacteriosis vascular de la yuca (Verdier et al., 2011)

Diversidad de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

Los estudios poblacionales de *Xam* realizados en diferentes regiones geográficas del mundo han registrado cambios rápidos en sus poblaciones en Sur América y África, mostrando posibles migraciones y una alta plasticidad del patógeno (Rache et al., 2019; Verdier et al., 2011). Análisis de diversidad genética de *Xam* llevados a cabo sobre poblaciones africanas encontraron una estructura poblacional clonal de la bacteria. No obstante, estudios posteriores identificaron nueve haplotipos diferentes en 218 aislamientos colectados en Togo (Verdier & Jorge, 2004). Más recientemente, en Nigeria y Kenia se reportó que las poblaciones del patógeno se comportan de distinta manera entre los países africanos (Chege, Wamunyokoli, Kamau, & Nyaboga, 2017; Ogunjobi, Fagade, & Dixon, 2006, 2007, 2010). En Nigeria, las poblaciones de *Xam* muestran ser altamente diversas presentando haplotipos y patotipos diferentes asociados a orígenes geográficos variados (Ogunjobi et al., 2006, 2007, 2010). Por otro lado, en Kenia las poblaciones de *Xam* son homogéneas, observándose un mismo haplotipo en diferentes aislamientos (Chege et al., 2017). Adicionalmente, cepas provenientes de varios países africanos se comportan como diferentes patotipos, indicando que la diversidad de *Xam* en África es mayor a la reportada previamente (Wydra, Zinsou, Jorge, & Verdier, 2004).

La variabilidad genética de *Xam* en Sur América analizada en Brasil, Venezuela y Colombia ha mostrado ser mayor que la diversidad genética en África, posiblemente debido a que el origen geográfico del patógeno se remonta a esta región (López & Bernal, 2012). En Brasil se han identificado 38 haplotipos de 79 aislamientos colectados en tres diferentes ecozonas y en Venezuela se identificaron 28 haplotipos de 91 aislamientos (Restrepo, Valle, Duque, & Verdier, 1999; Restrepo et al., 1998). En Colombia se identificaron 45 haplotipos de 736 aislamientos pertenecientes a las zonas edafoclimáticas de la Costa Atlántica, Llanos Orientales y Zona Andina (Restrepo, Duque, & Verdier, 2000). Particularmente, estudios de diversidad de *Xam* en la Región Caribe y la Región Orinoquia de Colombia indican que la estructura poblacional de *Xam* es altamente diversa y dinámica con un alto flujo génico entre poblaciones de una misma zona edafoclimática, lo cual hace

que los haplotipos sean inestables en el tiempo (Rache et al., 2019; Trujillo, Arias, et al., 2014; Trujillo, Ochoa, et al., 2014).

La dinámica poblacional de *Xam* ha complicado el manejo de la bacteriosis vascular, la inestabilidad de los haplotipos del patógeno a través del tiempo dificulta el empleo de variedades resistentes, logrando superar la resistencia debido a una alta diversidad de la bacteria que cambia constantemente (Trujillo, Arias, et al., 2014; Trujillo, Ochoa, et al., 2014; Verdier et al., 2011). Por lo cual, la búsqueda de fuentes de resistencia alternativas, durables y de amplio espectro es indispensable para el buen manejo de la bacteriosis vascular (López & Bernal, 2012; Verdier et al., 2011). Una comprensión más profunda de la respuesta inmune de la yuca a *Xam* es necesaria para generar estrategias de control alternativas basadas en las interacciones moleculares entre la planta y el patógeno (Chavarriaga et al., 2016; Jones & Dangl, 2006; Silva et al., 2018).

1.3. Resistencia vegetal en la interacción yuca-*Xam*

Bases moleculares generales de la inmunidad vegetal

La inmunidad es un conjunto de procesos biológicos que involucran moléculas, células y órganos y comprende la discriminación de lo propio frente a lo ajeno que funciona como un sistema de defensa contra organismos invasores (patógenos y simbiontes). La resistencia y la susceptibilidad a patógenos es el resultado de una compleja red de elementos interactuando a nivel poblacional, genético y molecular (Wenbo Ma, Dong, Stavrínides, & Guttman, 2006; X. Zhang, Dodds, & Bernoux, 2017). En el caso de la interacción planta-patógeno, la inmunidad ocurre en tres fases basadas en el reconocimiento de moléculas asociadas al patógeno: Percepción extracelular, evasión de la inmunidad basal y reconocimiento intracelular (Jones & Dangl, 2006).

La percepción extracelular consiste en el reconocimiento de moléculas presentes en potenciales patógenos, funcionalmente esenciales y con una estructura altamente conservada denominadas PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), lo que desencadena la inmunidad basal de las células vegetales o PTI (*Pattern Triggered Immunity*) (Yu, Feng, He, & Shan, 2017). La percepción extracelular de los PAMPs está mediada por receptores ubicados en la membrana plasmática de las células vegetales denominados PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). Estos receptores pueden ser

categorizados como RLKs (*Receptor Like Kinase*) o RLPs (*Receptor Like Protein*), de acuerdo con los dominios conservados que presentan en su estructura (Wan et al., 2019; Yu et al., 2017). Los receptores presentan un dominio transmembranal y un dominio extracelular variable que permite el reconocimiento de los PAMPs, siendo los más comunes los dominios LRR (*Leucine-Rich Repeat*) y LysM (*Lysine Motifs*). No obstante, los dos tipos de PRRs se distinguen en su sección intracelular, la cual se encarga de la señalización y activación de la PTI (Yu et al., 2017).

En el caso de los RLKs, la región intracelular está conformada por un dominio quinasa que es el encargado de fosforilar a proteínas RLCKs (*Receptor Like Cytoplasmic Kinase*), las cuales desencadenan la señalización luego de la percepción de los PAMPs (Saijo, Loo, & Yasuda, 2018). Por otro lado, los RLPs no presentan un dominio quinasa, por lo cual se asocian con una quinasa adaptadora que les permite transducir la señal (Gust & Felix, 2014). Ambas vías de transducción desembocan en una respuesta inmune caracterizada por la producción de especies reactivas de oxígeno, activación de MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*), influjo de Calcio, activación de quinasas dependientes de Calcio, deposición de calosa, activación de genes relacionados con la defensa y producción de ácido salicílico, etileno o fitoalexinas (Wan et al., 2019; Yu et al., 2017)

Durante la segunda fase, los patógenos adaptados secretan un amplio repertorio de proteínas llamadas efectores que son capaces de evadir el sistema extracelular de reconocimiento y suprimir la inmunidad basal de la planta, lo que permite la invasión del patógeno y resulta en un estado fisiológico de potenciada susceptibilidad, denominada ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*) (Jones & Dangl, 2006; Silva et al., 2018). Los efectores pueden suprimir la inmunidad del hospedero mediante mecanismos moleculares como la degradación de PRRs y RLCKs, desfosforilación de quinasas en las cascadas de señalización, modificación de proteínas por medio de enlaces con grupos alquilo, cambios en la regulación hormonal que promueven la apertura estomática y manipulación del transcriptoma que convergen en la invasión y progresión del patógeno en el organismo vegetal (Toruño, Stergiopoulos, & Coaker, 2016).

En la tercera fase, algunas plantas que han desarrollado mecanismos de resistencia a los patógenos adaptados reconocen los efectores directa o indirectamente a través de proteínas codificadas por genes de resistencia (*R*) lo que activa una segunda rama de

inmunidad denominada ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (Jones & Dangl, 2006; X. Zhang et al., 2017). El reconocimiento de efectores a nivel intracelular mediado por proteínas R esta dado por la detección de modificaciones sobre blancos por parte de los efectores o por la interacción directa proteína-proteína con los efectores, lo que culmina en la ETI (Noman, Aqeel, & Lou, 2019). La estructura conservada de las proteínas R se caracteriza por contener un dominio TIR (*Toll-interleukin-1 receptor*) o CC (*Coiled Coil*) en el extremo N-terminal, un dominio NBS (*Nucleotide-Binding Site*) en la región central y un dominio LRR en el extremo C-terminal, por lo cual son denominadas NLR (*Nucleotide binding and Oligomerization Domain-Like Receptors*) (X. Zhang et al., 2017). Una vez el efector es reconocido, este se denomina proteína de avirulencia (Avr) y promueve la resistencia desencadenando una respuesta de defensa similar a la PTI, pero con una mayor intensidad (Noman et al., 2019). Las proteínas NLRs son expresadas constitutivamente, presentan como función el reconocimiento de efectores y la ejecución de la defensa que típicamente converge en una reacción de muerte celular localizada conocida como HR (*Hypersensitive Response*) (Jones & Dangl, 2006; Silva et al., 2018; X. Zhang et al., 2017).

A pesar de la expresión constitutiva de los NLR, su actividad se encuentra regulada por interacciones intramoleculares que en ausencia de un ligando llevan a un estado autoinhibido de la proteína que impide la autoinmunidad en las células vegetales (X. Zhang et al., 2017). Al detectar el ligando, las proteínas NLRs sufren un cambio conformacional que lleva al intercambio de ADP por ATP al presentar una configuración espacial más abierta (J. Wang et al., 2019). Se ha mostrado que los motivos MHD (Metionina, Histidina y Aspartato) de la subunidad ARC2 (*APAF-1, R proteins, and CED-4*) del dominio NBS son relevantes para estabilizar la unión de ADP en el estado inactivo de las NLR (X. Zhang et al., 2017). Motivos MHD mutados en residuos de histidina o aspartato llevan a un estado autoactivo de las NLRs, presentando una mayor afinidad por ATP, lo cual desencadena la señalización inmune y lleva a una HR sin unión a ligando (X. Zhang et al., 2017).

Resistencia cuantitativa a la bacteriosis vascular

En algunos casos la interacción con patógenos adaptados no se comporta como un estado dual de susceptibilidad y resistencia, mostrándose como un rasgo continuo con diferentes grados de inmunidad entre variedades de una misma especie de hospedero (Roux et al., 2014). La resistencia en la mayoría de patosistemas es un carácter fenotípico que no puede ser explicado por un único gen *R*, sino que es controlado por varios genes

involucrados en diversos procesos celulares que contribuyen en distinto nivel a la reducción de la enfermedad. Este tipo de resistencia poligénica ha sido denominada resistencia cuantitativa a enfermedades (Roux et al., 2014; Vásquez, Soto, & López, 2018). A nivel celular la resistencia cuantitativa puede ser dada como el resultado de débiles respuestas de PTI o ETI, que solo pueden contribuir parcialmente a la inmunidad de la planta (Vásquez et al., 2018). No obstante, el aporte de genes en común involucrados en ambas ramas de la inmunidad otorga a la resistencia cuantitativa las características de durabilidad y de amplio espectro. El estudio de QTLs (*Quantitative Traits Loci*) se ha convertido en una herramienta importante para elucidar regiones génomicas implicadas en una resistencia estable a patógenos (Roux et al., 2014; Vásquez et al., 2018)

Mecanismos moleculares de la resistencia de yuca a la bacteriosis

La alta variabilidad de la resistencia a la bacteriosis vascular entre diferentes genotipos de yuca llevó a plantear esta condición como un rasgo fenotípico cuantitativo, abriendo la posibilidad a un gran número de factores determinantes en la inmunidad a *Xam* (López & Bernal, 2012). Con la construcción del primer mapa genético de la yuca a partir del cruce entre las variedades CM2177-2 y TMS30572 (Fregene et al., 1997), se realizaron análisis de QTL para la búsqueda de regiones del genoma implicadas en la resistencia cuantitativa a la bacteriosis vascular (Jorge et al., 2000, 2001). La identificación de 12 QTL que explican entre 9-27% de la variación fenotípica en condiciones de invernadero y de ocho QTL que explican entre 6-18% de la variación fenotípica en campo en respuesta a cepas de *Xam* confirmaron el carácter cuantitativo de la resistencia a la bacteriosis vascular de la yuca (Jorge et al., 2000, 2001). Adicionalmente, la inestabilidad de los QTL bajo distintas condiciones ambientales mostró un fuerte efecto, indicando que factores externos pueden determinar en gran medida la resistencia a *Xam* presentando unos pocas regiones génomicas estables con elementos determinantes en el fenotipo de resistencia (Jorge et al., 2000, 2001; Wydra et al., 2004).

A partir de la búsqueda de nuevos marcadores que permitieron una mayor resolución en los análisis, se evidenciaron dos nuevos QTL asociados con la resistencia a *Xam*, uno explicó 21.4% de la resistencia a la cepa CIO121 y el otro 61.4% a la cepa CIO151. Este último QTL contiene genes codificantes para proteínas *R* con dominios NBS y LRR (López et al., 2007). Otros dos QTL que explicaron 10.9-12.6% de la resistencia fueron reportados pero ninguno estuvo asociado con genes que estuvieran involucrados directamente con la

PTI o la ETI de acuerdo con el modelo de inmunidad vegetal (Soto, Mora, Calle, & López, 2017). Con el desarrollo de un mapa genético de alta densidad se reportaron cinco nuevos QTL involucrados en la resistencia contra las cepas *Xam318* y *Xam681* que en conjunto explican 15.8 – 22.1% de la variación fenotípica. Dentro de estas regiones se identificaron genes codificantes para proteínas relacionadas con la ETI y la ejecución de la defensa como NLRs, un factor de transcripción WRKY y una proteasa similar a subtilisina (Soto, Mora, Mathew, et al., 2017). Mas recientemente, se reportaron tres QTL que explican 13.8-26.5% de la resistencia a la bacteria, en dichas regiones se identificaron genes codificantes para PRRs, el sistema de ubiquitinas, el influjo de calcio y el control de ARNm (Tappiban, Sraphet, Srisawad, Smith, & Triwitayakorn, 2018).

Los análisis de QTL han permitido la identificación de regiones en el genoma de yuca que albergan conjuntos de genes que posiblemente estén relacionados con la interacción molecular entre la yuca y *Xam*, presentando una alta especificidad asociada con las cepas y una fuerte variación en los resultados dependiente de las condiciones ambientales (López & Bernal, 2012; Soto, Mora, Mathew, et al., 2017; Verdier & Jorge, 2004). No obstante, por medio de este tipo de estudios se desconoce con exactitud cuáles de estos posibles genes son los responsables de explicar la variación fenotípica de la resistencia a la bacteriosis vascular. Mediante aproximaciones de genes candidatos de resistencia (RGC, *Resistance Gene Candidate*) se han identificado regiones genómicas que incluyen estos genes y dan soporte a los resultados de QTL, lo cual ha permitido también describir con mayor exactitud los elementos moleculares involucrados en la respuesta inmune a *Xam* (López & Bernal, 2012; Verdier & Jorge, 2004).

Genes que promueven la resistencia a la bacteriosis

Por medio de diferentes metodologías, la búsqueda de genes que promueven la resistencia a *Xam* se ha focalizado en la identificación de genes relacionados con el reconocimiento y la ejecución de los mecanismos de defensa (López & Bernal, 2012; Verdier & Jorge, 2004). Técnicas moleculares han permitido el aislamiento y clonación de RGCs basados en la estructura conservada de los receptores inmunes (RLKs y NLRs) en el genoma de yuca (López & Bernal, 2012). Alternativamente, análisis de expresión diferencial han revelado un gran número de genes que se expresan o se reprimen en respuesta a la infección con diferentes cepas de *Xam* (López & Bernal, 2012; Ramírez, 2019).

El primer gen de resistencia a *Xam* fue aislado por medio de la amplificación con primers diseñados a partir del gen *Xa21*, involucrado en la resistencia de amplio espectro a *X. oryzae* en arroz (Jorge et al., 2000; Song et al., 1995). El gen análogo fue mapeado y colocalizado con un QTL que explicó 13% del fenotipo de resistencia a la cepa CIO136 (Jorge et al., 2000; Tomkins et al., 2004). El gen se denominó *RXam1* (*Resistance to Xam* 1), el cual codifica para un RLK cuya actividad es posiblemente regulada por proteólisis asociada a E3 ubiquitin ligasas (Gil & López, 2019). En respuesta al patógeno, se ha evidenciado que la expresión de *RXam1* es inducida específicamente por la presencia de la cepa CIO136, siendo capaz de promover una resistencia parcial (Contreras & López, 2008; Díaz et al., 2018).

La elucidación de un segundo gen de resistencia a *Xam* tuvo lugar con la implementación de primers degenerados diseñados a partir de secuencias codificantes de los dominios TIR y NBS presentes en genes *R* (López & Bernal, 2012; López et al., 2003). Este primer análisis exploratorio permitió la identificación y clonación de RGCs en cromosomas artificiales bacterianos (BACs) (López et al., 2003). El mapeo de los BACs resultó en la colocalización del RGC "RCa7" con un QTL que explica el 61.4% de la resistencia a la cepa de *Xam* CIO151 (López et al., 2007). El gen candidato posteriormente llamado *RXam2* mostró ser codificante para un NLR sin dominio TIR, con una expresión constitutiva y de baja actividad (Contreras & López, 2008; Díaz, 2016; López et al., 2003). El silenciamiento de *RXam2* ha permitido evidenciar una mayor susceptibilidad a las cepas CIO151, *Xam306*, *Xam232*, *Xam571* y *Xam686*. Por otro lado, la sobreexpresión de *RXam2* ha mostrado conferir resistencia a las cepas CIO151, *Xam226*, *Xam232* y CFBP1851, indicando que esta proteína puede generar resistencia de amplio espectro (Díaz, 2016). La comparación de las secuencias de *RXam2* en variedades de yuca reveló un alto número de polimorfismos en la región promotora de este gen, lo que sugiere cambios en el control de la expresión entre genotipos resistentes y susceptibles (Contreras & López, 2011).

Estudios sobre el perfil de expresión génica en respuesta a *Xam* han revelado genes asociados a la señalización intracelular, regulación transcripcional, percepción de patógenos, producción de especies reactivas de oxígeno, proteólisis, síntesis de metabolitos secundarios y proteínas inducidas relacionadas a la defensa (PR, *Pathogenesis Related*) como posibles elementos implicados en la activación del sistema

inmune y la limitación en la invasión del patógeno (López et al., 2004, 2005; Santaella et al., 2004). La respuesta temprana a *Xam* está caracterizada por la activación de genes relacionados con el anabolismo de metabolitos primarios y la represión de genes involucrados con el catabolismo de carbohidratos, hidrólisis de ATP y fotosíntesis (Gómez et al., 2018). Lo que indica una rápida activación de mecanismos de defensa que llevan a la síntesis de macromoléculas con un alto costo energético, viéndose afectado el crecimiento de la planta (López et al., 2005). En la respuesta tardía, son activados genes de la síntesis de lípidos para la producción de membrana y genes implicados en la regulación hormonal (Gómez et al., 2018)

Las redes de interacción de genes expresados en el contexto de resistencia a *Xam* han mostrado ser muy similares a las construidas en plantas modelo para la interacción planta patógeno, indicando vías conservadas de respuesta inmune (Gómez et al., 2018; Leal et al., 2013). Recientemente, se ha evidenciado que las respuestas inmunes de una variedad de yuca confrontada a una cepa virulenta y otra avirulenta de *Xam* presenta un patrón de expresión similar variando esencialmente en la intensidad y la rapidez de la activación génica (Ramírez, 2019). En la respuesta de resistencia los principales protagonistas parecen ser genes de regulación transcripcional, lo que podría indicar que la acción de relativamente pocos genes funcionando como centros de actividad (*hub*) están determinando en gran medida el destino celular en la interacción (Gómez et al., 2018; Ramírez, 2019).

1.4. El género *Xanthomonas* y sus mecanismos de patogénesis

***Xanthomonas* y su ciclo de infección**

La interacción planta-patógeno es una relación coevolutiva descrita desde las perspectivas del hospedero y del invasor, es así como la resistencia o la susceptibilidad de una planta son el resultado del *fitness* de un patógeno en el interior de la misma (Sacristán & García-Arenal, 2008). En el contexto de susceptibilidad, la planta presenta un estado fisiológico alterado por la proliferación del invasor, que en consecuencia puede generar la muerte del hospedero (Toruño et al., 2016). Desde la perspectiva del patógeno el desarrollo de la enfermedad comprende un conjunto de mecanismos que subyacen al ciclo infeccioso y que son considerados clave en su patogenicidad y virulencia (Pfeilmeier et al., 2016;

Sacristán & García-Arenal, 2008). De este modo, al igual que la búsqueda de genes de resistencia, la exploración de los factores determinantes en la patogénesis es necesaria para una comprensión más completa de la interacción planta-patógeno (Sacristán & García-Arenal, 2008). En el caso de la interacción entre la yuca y *Xam*, análisis comparativos a gran escala de las especies del género *Xanthomonas* han cimentado las bases del conocimiento sobre la patogénesis molecular de la bacteriosis vascular (An et al., 2019; Ryan et al., 2011).

El género *Xanthomonas* es un conjunto de patógenos bacterianos que invaden los haces vasculares o el mesófilo de cerca de 400 especies de angiospermas en el mundo, entre ellas la yuca (Ryan et al., 2011). La totalidad de las especies del género presentan un ciclo infectivo con una fase epifítica en la que se establecen en la superficie vegetal y una fase endofítica en la que parasitan las células del hospedero y proliferan en el interior de la planta, como consecuencia el estado fisiológico del hospedero se ve alterado resultando en el desarrollo de la enfermedad (Jacques et al., 2016; Pfeilmeier et al., 2016).

Durante la fase epifítica del ciclo, colonias individuales se establecen en la superficie foliar secretando adhesinas fimbriales y no fimbriales que les permiten anclarse a la cutícula (Jacques et al., 2016; Pfeilmeier et al., 2016). Las bacterias activan la señalización de cdG (*Cyclic di-Guanosine monophosphate*) que promueve la secreción de exopolisacáridos llegando a formar un *biofilm* que les sirve para el almacenamiento de nutrientes y como protección contra factores ambientales (Jacques et al., 2016). La formación del *biofilm* fomenta la proliferación del patógeno y la secreción de factores difusibles (DSF, *Diffusible Signal Factor*) que estimulan la movilidad hacia aberturas en la superficie vegetal (An et al., 2019).

En la fase endofítica, las bacterias se establecen en el parénquima esponjoso del tejido vegetal formando una capa protectora de exopolisacáridos (An et al., 2019). La secreción de DSFs y la disminución de oxígeno regulan negativamente la señalización de cdG estimulando el ensamblaje de sistemas de secreción de proteínas y la migración a otros tejidos (An et al., 2019; Büttner & Bonas, 2010). El sistema de secreción tipo II (T2SS, *Type II Secretion System*) se encarga de liberar en el apoplasto celulasas, pectinasas y proteasas que descomponen la pared celular (Büttner & Bonas, 2010). Por otro lado, las células vegetales reconocen las enzimas líticas como PAMPs y los segmentos de pared

celular lisados como DAMPs (*Damage Associated Molecular Pattern*) por medio de PRRs en la membrana plasmática. No obstante, el patógeno emplea un sistema inyector de proteínas conocido como sistema de secreción tipo III (T3SS, *Type III Secretion System*), encargado de liberar efectores tipo III (T3E, *Type III Effectors*) en el citosol de la célula hospedero, que suprimen la PTI manipulando la dinámica bioquímica de las células vegetales (Büttner, 2016; Büttner & Bonas, 2010).

Determinantes de la patogenicidad

A partir de análisis de genómica funcional, genómica comparativa, estudios transcriptómicos y proteómicos de varias especies de *Xanthomonas*, han sido identificadas familias génicas que son elementos clave en diferentes etapas del ciclo infeccioso (Ryan et al., 2011). En la fase epifítica los genes *phaB*, *xadA* y *yapH* participan en la síntesis de adhesinas, los genes *gum* en la producción de exopolisacáridos, y los genes *rpf* (*regulation of pathogenicity factors*) en la síntesis y secreción de DSFs, siendo vitales para la supervivencia de las bacterias en la superficie vegetal (Cesbron et al., 2015; Ryan et al., 2011). Durante la fase endofítica, son expresados los genes *xps* (*Xanthomonas protein secretion*), *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*) y *hpa* (*hrp associated*). Los genes *xps* codifican los elementos proteicos que conforman el T2SS encargado de liberar una plétora de enzimas degradadoras de la pared celular que permiten la toma de nutrientes del hospedero (Büttner & Bonas, 2010; Jacques et al., 2016). Por otro lado, los genes *hrp* y *hpa* participan en la síntesis y liberación de los T3E en el citosol de las células del hospedero, codificando para los componentes del T3SS, los T3E y proteínas que coordinan la traslocación de los efectores (Ryan et al., 2011).

Los T3E son elementos moleculares que han mostrado ser determinantes en la patogenicidad, adaptación y especificidad de las especies del género *Xanthomonas* (Büttner, 2016; White, Potnis, Jones, & Koebnik, 2009). Análisis genómicos de las cepas patogénicas de *Xanthomonas* han mostrado un gran número de secuencias de inserción y elementos genéticos móviles en comparación a las cepas no patogénicas, las cuales se encuentran asociadas con los genes *hrp* codificantes para los T3E (Cesbron et al., 2015; Ryan et al., 2011). Esto indica que la patogenicidad se relaciona estrechamente con la transferencia horizontal de estos genes entre diferentes cepas (Cesbron et al., 2015; Jacobs, Pesce, Lefeuvre, & Koebnik, 2015; Schwartz et al., 2015). Por otro lado, evaluaciones *in planta* han evidenciado que el repertorio de efectores en el genoma de una

cepa establece el rango de hospederos que puede invadir, lo cual sugiere que el estado de compatibilidad o incompatibilidad de la interacción se encuentra dado por la composición del repertorio de T3E (Barak et al., 2016; Jacques et al., 2016; Schwartz et al., 2015).

Diversidad funcional de los T3E

Los T3E son proteínas que actúan de forma sinérgica o antagónica en diferentes rutas de las células vegetales, alterando el estado fisiológico del hospedero para generar un ambiente óptimo que permita la proliferación del patógeno (Jacques et al., 2016). Desde el punto de vista funcional, los T3E se comportan como potenciadores de la susceptibilidad del hospedero, jugando un rol central en la interacción al suprimir la inmunidad basal de la planta (White et al., 2009). En *Xanthomonas* se han identificado diversas clases de efectores de acuerdo con la similitud de su secuencia codificante, de las cuales 12 clases presentan una posible actividad enzimática (White et al., 2009). Estudios funcionales han permitido caracterizar la actividad de algunos efectores que se encuentran involucrados en la vía ubiquitina-proteosoma, la modulación de las cascadas de señalización y la manipulación del transcriptoma del hospedero (Büttner, 2016; Üstün & Börnke, 2014; White et al., 2009).

Dentro del grupo de efectores involucrados en la vía de ubiquitina-proteosoma destacan las cistein-proteasas de las clases XopJ y XopD (Büttner, 2016; Üstün & Börnke, 2014; White et al., 2009). En el primer caso, los efectores actúan a nivel de membrana desubiquitinizando proteínas clave en el tráfico de vesículas y la regulación de ácido salicílico, lo que altera el recambio de estos actores moleculares e interfiere con la actividad proteosomal (Üstün & Börnke, 2014). Por otro lado, los efectores de la clase XopD actúan al nivel del núcleo como enzimas proteolíticas de factores de transcripción, además de ser represores transcripcionales mediante la interacción directa con el ADN del hospedero, lo cual lleva a una supresión de las respuestas mediadas por ácido salicílico, etileno y jasmonato (Büttner, 2016; Üstün & Börnke, 2014).

Otro de los mecanismos empleados por *Xanthomonas* para evadir la inmunidad basal es por medio de la modulación de las cascadas de señalización (An et al., 2019). Los efectores de las clases XopAC y XopAH se han caracterizado por presentar una actividad nucleotidiltransferasa que interviene en las cascadas de señalización de RLCKs

desencadenadas en respuesta a la percepción de PAMPs o DAMPs (Büttner, 2016; White et al., 2009). Los efectores XopAC son uridiltransferasas que modifican con grupos uridil residuos fosforilables relevantes en la activación de las RLCKs, lo cual impide la transferencia de un grupo fosfato y trunca la cascada de señalización (Büttner, 2016). En el caso de XopAH, el mecanismo molecular es similar, pero la actividad de esta enzima corresponde con la de una adeniltransferasa, modificando las RLCKs con grupos adenil (White et al., 2009). Adicionalmente, los efectores de la clase XopJ tienen una actividad de acetiltransferasa que les permite modificar residuos importantes para la activación de MAPKs por medio de la unión covalente de grupos acilo que impiden la fosforilación de las proteínas (White et al., 2009).

En la mayoría de las especies del género *Xanthomonas* se ha identificado un grupo particular de T3E sin actividad enzimática denominados TALEs (*Transcription Activator-Like Effectors*), que manipulan el transcriptoma de las células hospedero (ver mas detalles en la sección 1.5) (Jacques et al., 2016). Debido a su particular arquitectura, los TALEs interactúan de una manera directa y específica con secuencias del promotoroma vegetal actuando como factores de transcripción eucariotas que activan genes blanco, los cuales potencian la virulencia del patógeno y promueven la susceptibilidad del hospedero, reconocidos como genes de susceptibilidad (S) (Pérez-Quintero & Szurek, 2019). Análisis transcriptómicos han permitido la identificación de genes S que codifican para transportadores de azúcares que posiblemente proveen de nutrientes al patógeno, transportadores de sulfato que modulan el pH a favor de la proliferación bacteriana, y factores de transcripción que favorecen la invasión al generar cambios morfológicos en las células del hospedero (Hutin, Pérez-Quintero, López, & Szurek, 2015; Pérez-Quintero & Szurek, 2019).

Repertorio de T3E en *Xam*

Las cepas de *Xam* presentan un repertorio de T3E conformado por 14 a 22 genes, que está constituido por efectores altamente conservados entre distintas cepas y por efectores que de forma variable se presentan entre los diferentes haplotipos (Arrieta-Ortiz et al., 2013; Bart et al., 2012). La secuenciación del genoma de 65 cepas de *Xam* colectadas en 11 países de tres continentes diferentes a lo largo de 70 años, llevo a la identificación del repertorio de T3E en el patógeno. Los efectores Hpa2, HpaA, HrpF, XopAE, XopL, XopE, XopN, XopAK, XopV y efectores de la familia AvrBs3 (TALEs) son elementos altamente

conservados entre las distintas cepas de *Xam*, indicando ser relevantes para el *fitness* de la especie y sugiriendo un origen común en el ancestro del género *Xanthomonas* (Bart et al., 2012). Por otro lado, los efectores variables en el repertorio de T3E de *Xam* se han asociado con posibles eventos de transferencia horizontal de genes, indicando variados orígenes (Arrieta-Ortiz et al., 2013). No obstante, se desconoce la importancia de los T3E variables en la mayoría de las cepas.

La evaluación funcional del repertorio de T3E identificados en la cepa CIO151, ha permitido demostrar que la progresión de la enfermedad y la supervivencia del patógeno están correlacionadas con la presencia de algunos de los efectores variables del patógeno (Arrieta-Ortiz et al., 2013; Medina, Reyes, Trujillo, Gonzalez, & Bejarano, 2017). Esto se observa con la inactivación génica de *XopZ*, *XopX*, *XopAO1* y *AvrBs2* en CIO151, la cual lleva a una disminución en la severidad de las lesiones y a efectos negativos en la proliferación de *Xam* demostrando ser relevantes para la virulencia completa del patógeno (Medina et al., 2017). A pesar de que se desconoce su mecanismo de acción, se ha evidenciado la supresión de las dos ramas de inmunidad vegetal por T3E identificados en CIO151. Los efectores *AvrBs2*, *XopR* y *XopAO1* llegan a interferir con la PTI, mientras que *XopE4* y *XopAO1* suprimen la ETI (Medina et al., 2017).

En general, las cepas de *Xam* tienen entre 2 y 5 genes *tal* en su genoma, presentando una baja diversidad en comparación con el amplio abanico de cepas que presenta la especie (Bart et al., 2012; Zárate, 2015). Estos efectores se presentan como otro grupo de T3E altamente frecuente en las cepas de *Xam*, encontrándose en variantes poco o muy virulentas del patógeno, sugiriendo que la inducción de genes *S* es un mecanismo ampliamente utilizado por *Xam* para promover su crecimiento en los hospederos e indica un importante rol de estos efectores en la relación yuca-*Xam* (Bart et al., 2012; Gonzalez, Restrepo, Tohme, & Verdier, 2002). Hasta el momento no se ha evidenciado una fuerte correlación entre la progresión de los síntomas y el número de TALEs en el repertorio de las cepas, lo que ha sugerido una contribución diferencial de los distintos TALEs a la virulencia total de *Xam* (Bart et al., 2012; Zárate, 2015).

Los TALEs de *Xam* han sido categorizados en función de su longitud como TAL13, TAL14, TAL15, TAL20, TAL22 y TAL26, siendo los más recurrentes en cepas provenientes de distintas zonas edafoclimáticas de Colombia y del mundo los TALEs 14, 20 y 22 (Bart et

al., 2012; Zárate, 2015). Experimentos de complementación con el TAL14 de la cepa CFBP1851 ha mostrado la relevancia de este efector en la progresión de la enfermedad, la virulencia y la proliferación de las cepas del patógeno (Castiblanco et al., 2013). Mas recientemente, estudios de inactivación génica de los TALEs 14 y 20 de *Xam668* han evidenciado la importancia de este par de efectores en el crecimiento del patógeno y la progresión de los síntomas de la bacteriosis vascular (Cohn et al., 2014; Cohn, Morbitzer, Lahaye, & Staskawicz, 2016). Por otro lado, se ha reportado que la agresividad de las cepas de *Xam* se correlaciona moderadamente con la presencia del TAL22 (Zárate, 2015). La expresión de TAL15 en la cepa altamente agresiva *Xam318*, que naturalmente contiene los TALEs 13, 14, 20 y 22, conduce a la disminución de la proliferación de la bacteria y los síntomas la enfermedad (Ramírez, 2019). De este modo, el repertorio de TALEs en una cepa puede generar efectos contrarios en el hospedero, llegando a funcionar como factores de virulencia o avirulencia.

El efector TALE1_{*Xam*} ha sido previamente identificado como un importante factor en la patogenicidad de *Xam*, la posible unión de este efector a diferentes blancos en el genoma de la yuca ha sugerido que los TALEs pueden estar causando más de un efecto fenotípico por la inducción de diferentes genes blanco en el genoma del hospedero (Castiblanco et al., 2013). El efector TAL14_{*Xam668*} ha mostrado activar varios genes de yuca involucrados en causar la susceptibilidad del hospedero, demostrando ser importante para la virulencia de *Xam* (Cohn et al., 2016). Por otro lado, la evaluación funcional del efector TAL20_{*Xam668*} ha permitido determinar que este TALE induce la activación de un gen perteneciente a la familia de transportadores de carbohidratos SWEET (Cohn et al., 2014). La inducción de *MeSWEET10a* en yuca se ha asociado con el desarrollo de manchas angulares pequeñas y de aspecto acuoso en las hojas con la infección de *Xam*, mostrándose importante para la expansión de los síntomas pero no para el crecimiento bacteriano (Cohn et al., 2014). Adicionalmente, se ha correlacionado moderadamente la presencia de TAL22 con la agresividad de le cepas de *Xam* (Zárate, 2015)

En las cepas colombianas de *Xam* caracterizadas a lo largo de los años, los TALEs 14, 20 y 22 se presentan en el 77.8%, 83.3% y 94.4% de los casos, respectivamente (Zárate, 2015). La recurrencia de estos efectores en las cepas de distintas zonas edafoclimáticas de Colombia indica una fuerte relación entre su presencia con la supervivencia y el modo de vida del patógeno. En comparación, los TALEs 13, 15 y 26 se encuentran en 66.7%,

50.0% y 27.8% de las cepas, sugiriendo una menor importancia para el *fitness* de *Xam* en Colombia (Zárate, 2015). A nivel global no se conoce con exactitud la frecuencia de los TALEs 14, 20 y 22 en las cepas de *Xam*. Sin embargo, a partir de resultados de *southern blot* empleando sondas para dichos efectores en una gran diversidad de cepas aisladas en todo el planeta presentados por Bart et al (2012) sumado a los resultados de Zárate (2015), es posible estimar la frecuencia de los tres efectores en 83.3% para el TAL14, 63.9% para el TAL20 y 75% para el TAL22, mostrando ser un elemento clave no solo para las cepas Colombianas si no en general para la especie, dada su conservación en diferentes haplotipos con distintas presiones de selección a lo largo del planeta, perfilando a estos efectores como blancos idóneos para la construcción de promotores trampa contra *Xam*.

1.5. TALEs: De la susceptibilidad a la resistencia

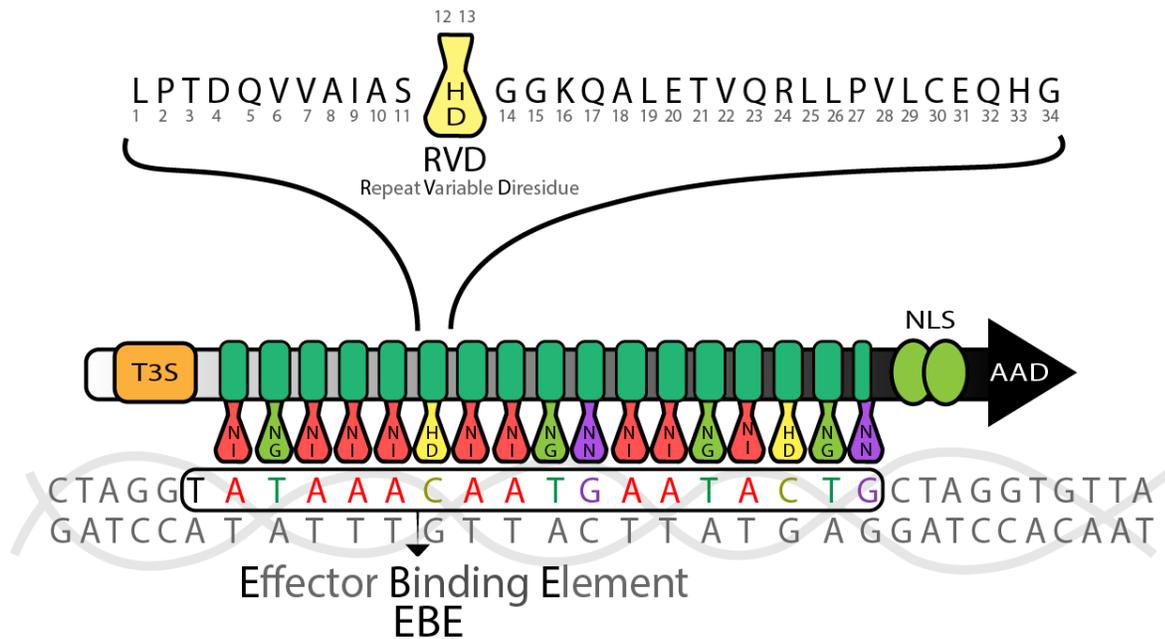
Estructura proteica de los TALEs

La arquitectura de los TALEs está constituida de un extremo N-terminal que contiene una señal tipo III (T3S) necesaria para la secreción del efector a través del T3SS y un extremo C-terminal que presenta dos señales de localización nuclear (NLS, *Nuclear Localization Signal*) y un dominio de activación transcripcional (AAD, *Acidic Activation Domain*) (**Figura 1-1**), que permiten el transporte al núcleo y el reclutamiento de la maquinaria transcripcional del hospedero (Hui et al., 2019; Wenxiu Ma et al., 2018; Pérez-Quintero & Szurek, 2019). En medio de ambos extremos de la proteína, los TALEs presentan una región central de repeticiones (CRR, *Central Region Repeats*) (**Figura 1-1**), la cual se compone de secuencias de 33 a 35 aminoácidos casi idénticas, únicamente variando en las posiciones 12 y 13 conocidas como diresiduo variable de repetición (RVD, *Repeat Variable Diresidue*) (Boch et al., 2009; Moscou & Bogdanove, 2009).

La estructura proteica de los TALEs se comporta espacialmente como una superhélice dextrógira que se envuelve sobre el surco mayor de la molécula de ADN con la que interactúa (Pérez-Quintero & Szurek, 2019). Cada repetición forma una estructura compuesta de dos hélices α que son unidas por un bucle constituido de los residuos 12 y 13, este bucle se proyecta hacia el lado interno de la superhélice. El residuo de la posición 12 estabiliza la interacción entre el bucle de la repetición y las bases nitrogenadas del ADN, mientras que el residuo de la posición 13 establece la interacción directa con dicha

molécula (Deng et al., 2012; Mak, Bradley, Cernadas, Bogdanove, & Stoddard, 2012). De este modo, la secuencia de RVDs de la CRR interactúa con secuencias nucleotídicas específicas dentro de los promotores de los genes blanco denominadas elementos de unión al efector (*EBE*, *Effector Binding Element*) (**Figura 1-1**) (Pérez-Quintero & Szurek, 2019).

Figura 1-1. Arquitectura de los TALEs. Representación esquemática de la estructura y los dominios de un TALE. En la parte inferior del esquema se ilustra la estructura proteica dividida en los extremos N-terminal, CRR y C-terminal. El extremo N-terminal presenta una T3S, el extremo C-terminal tiene dos dominios NLS y un dominio AAD. En medio de ambos extremos la CRR está compuesta de repeticiones en tándem de aminoácidos casi idénticos que interactúan directamente con las bases nitrogenadas de los *EBEs* mediante los residuos 12 y 13 de cada repetición. En la parte superior se ilustra la secuencia de aminoácidos que componen cada repetición de la CRR, únicamente variando en los residuos de las posiciones 12 y 13, conocidos como RVD.



El mecanismo de reconocimiento de un EBE por un TALE parece ocurrir en dos pasos. Luego de la unión entre el efector y la molécula de DNA, el TALE presentando una configuración espacial relajada se desplaza sin movimientos rotacionales sobre la doble hélice. Una vez reconoce el EBE, la configuración espacial del efector pasa a comprimirse y formar una estructura rígida (Cuculis, Abil, Zhao, & Schroeder, 2016). La especificidad de la interacción entre ambas moléculas está determinada por la secuencia de los RVDs en el efector (Pérez-Quintero & Szurek, 2019). A partir de la construcción del consenso de las secuencias de unión en diferentes promotores de genes inducidos por TALEs de diversas especies de *Xanthomonas*, se ha observado la correlación entre la frecuencia de

RVDs en una posición en particular y la frecuencia de nucleótidos específicos en la misma posición de las secuencias de nucleótidos con las que interactúa (Boch et al., 2009; Moscou & Bogdanove, 2009). Dicha correlación representa la afinidad de un RVD por un nucleótido en particular, mostrando una alta especificidad en la interacción que es descrita en lo que se conoce como el código de los TALEs (**Figura 1-1**) (Boch et al., 2009; Moscou & Bogdanove, 2009).

Cuando un EBE es reconocido por su respectivo TALE, el efector recluta la maquinaria transcripcional del hospedero culminando en la activación de genes *S* que promueven la virulencia del patógeno, genes Ejecutores (*E*) que activan los mecanismos de defensa de la planta o genes cuya expresión no tienen ningún efecto sobre la interacción entre el hospedero y el patógeno (**Figura 1-2a y c**) (Pérez-Quintero & Szurek, 2019). El código de TALEs ha permitido el descubrimiento de genes *S* y *E* por medio del desarrollo de algoritmos que permiten la predicción de genes blanco en función de la secuencia de repeticiones de los TALEs y del promotoroma vegetal (Doyle et al., 2012; Grau et al., 2013; Pérez-Quintero et al., 2013). No obstante, la interacción entre los efectores parece ser tolerante a emparejamientos imperfectos en un máximo del 11% de las posiciones (Mücke et al., 2019), así como también la afinidad parecer ser afectada por la longitud del efector (Rinaldi, Doyle, Stoddard, & Bogdanove, 2017; Rogers et al., 2015), la interacción entre RVDs adyacentes y el contexto genético en el que se encuentra el EBE, lo que ha llevado al planteamiento de nuevos algoritmos que integren algunas de estas variables en la predicción para reducir el número de falsos positivos que se pueden llegar a observar (Erkes, Mücke, Reschke, Boch, & Grau, 2019).

Estrategias de virulencia asociadas a TALEs

A partir de estudios que emplean datos de expresión diferencial en plantas inoculadas con bacterias del género *Xanthomonas* y predicciones bioinformáticas de los genes blanco de sus respectivos TALEs, se han reportado una amplia gama de genes *S* que convergen en estrategias comunes que promueven la virulencia del patógeno y la susceptibilidad del hospedero en varios modelos vegetales (Cohn et al., 2014, 2016; Mora, 2017; Mücke et al., 2019; Pérez-Quintero et al., 2013; Pérez-Quintero & Szurek, 2019).

Los transportadores de carbohidratos de la familia SWEET son unos de los genes *S* más ampliamente empleados por los patógenos del género *Xanthomonas*, siendo activado por una gran diversidad de cepas de diferentes especies y presentando TALEs con estructuras

no relacionadas que los activan, llegando a presentar una alta redundancia funcional que tiene como blanco a esta familia de genes (Erkes et al., 2019; Hutin et al., 2015; Pérez-Quintero & Szurek, 2019). Se ha propuesto que estos transportadores permiten el eflujo de glucosa y sacarosa al apoplasto, en donde sirve de fuente de carbono y energía para el invasor (Chen et al., 2010). Otros transportadores han sido documentados como blancos putativos que han sido validados, como lo son el transportador de fosfato *OsPHO1:3*, el transportador de silicio *OsLsi1* y el transportador de nitrato y auxinas *OsNPF6.3* (Mücke et al., 2019), lo que muestra al secuestro de nutrientes como una estrategia que emplean los patógenos del género *Xanthomonas* para asegurar su supervivencia y promover su proliferación.

La activación o la represión de procesos celulares básicos es otra de las estrategias que emplea *Xanthomonas* para desbalancear la interacción planta-patógeno a su favor. En variedades de arroz inoculadas con *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) y *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*), los genes que codifican para los factores de transcripción *OsTFIIAγ1* y *OsTFX1* son blancos comunes mostrándose como *hubs* de susceptibilidad (Hutin et al., 2015; Mücke et al., 2019; Pérez-Quintero & Szurek, 2019). Por otro lado, el gen *OsHEN1* es otro de los blancos validados. Este gen posiblemente codifica para una ARN-metiltransferasa que se encuentra involucrada en el procesamiento de ARNs de doble cadena y la biogénesis de microARNs (Hutin et al., 2015; Mücke et al., 2019; Pérez-Quintero & Szurek, 2019).

Otras tácticas han sido propuestas, entre las que destacan la manipulación de la regulación hormonal, la remodelación de la pared celular y la activación del sistema proteosomal de degradación de proteínas (Mücke et al., 2019; Schwartz, Morbitzer, Lahaye, & Staskawicz, 2017). Los genes *FNS* y *HLS1* son genes que están involucrados en la regulación negativa de las rutas activadas por ácido salicílico, particularmente *HLS1* se ha mostrado como una acetiltransferasa de histonas capaz de descomprimir el ADN y activar las vías en respuesta a ácido abscísico que suprimen los mecanismos de defensa del ácido salicílico (Mücke et al., 2019). Por otro lado, la inducción de la pectato liasa, una proteína degradadora de la pared celular se ha documentado en respuesta a TALEs de *Xoo*, *Xoc*, *X. gardneri* y *Xam*. La expresión de esta proteína genera el eflujo de agua de las células del hospedero al apoplasto, promoviendo la dispersión del patógeno y la progresión de los síntomas (Cohn et al., 2016; Mücke et al., 2019; Schwartz et al., 2017). Finalmente, el sistema proteosomal de degradación de proteínas es un mecanismo bastante explotado por el género *Xanthomonas* para bloquear los elementos de defensa del hospedero, recientemente se

ha reportado al gen *OsFBX109* como un posible gen *S* involucrado en la proteólisis de elementos proteicos de rutas de defensa (Mücke et al., 2019).

Resistencia vegetal a los TALEs

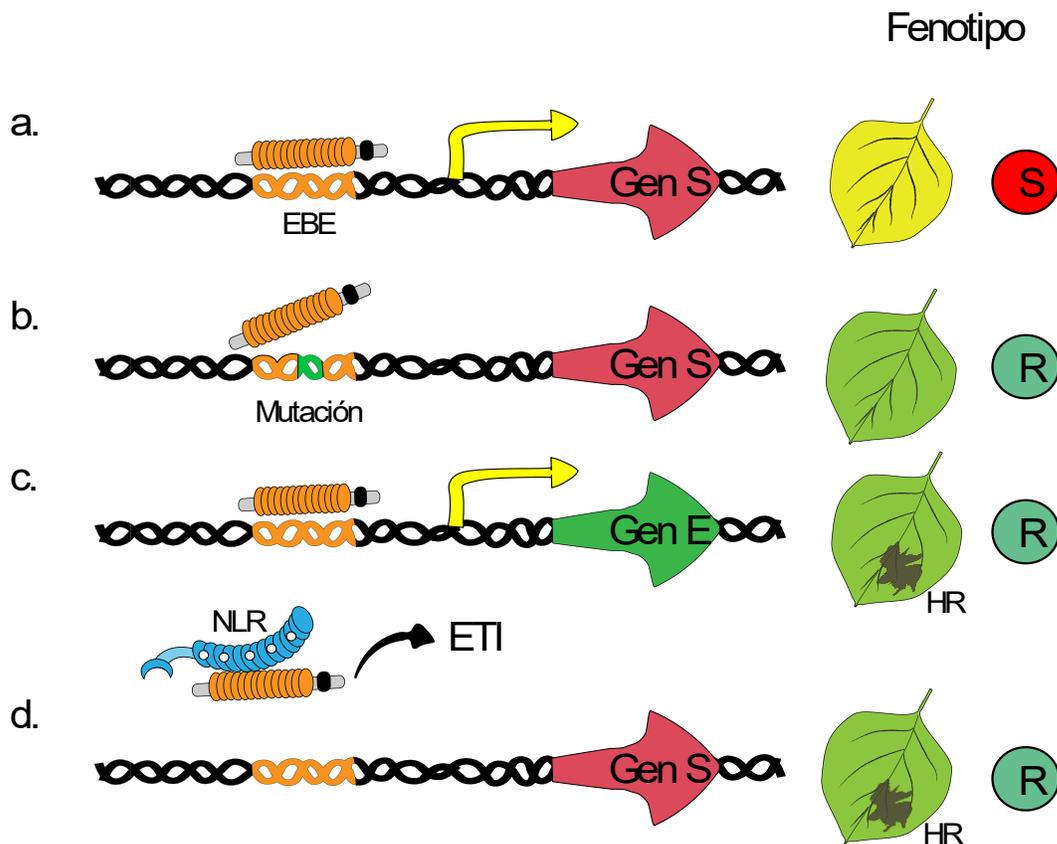
Las plantas han desarrollado a través del curso de la evolución sistemas que le permiten evadir o contrarrestar la acción de los TALEs en las células blanco, generando mecanismos de resistencia a *Xanthomonas* (Boch et al., 2014; Erkes, Reschke, Boch, & Grau, 2017). Se han identificado tres tipos de resistencia asociada a TALEs: recesiva, dominante no transcripcional y dominante dependiente de la actividad transcripcional de TALEs (**Figura 1-2**) (J. Zhang et al., 2015).

La resistencia recesiva dependiente de TALEs consiste en polimorfismos en los promotores de genes *S* que llevan a la evasión del reconocimiento de los blancos por los TALEs, funcionando como una estrategia basada en la pérdida de susceptibilidad (**Figura 1-2b**) (J. Zhang et al., 2015). En el genoma del arroz se han identificado los alelos recesivos de resistencia *xa13*, *xa25* y *xa41(t)* que evaden la unión de los efectores PthXo1 y PthXo2 de *Xoo* a promotores de los genes *S* *OsSWEET11*, *OsSWEET13* y *OsSWEET14* (Hutin et al., 2015; Xu et al., 2017). Adicionalmente la mutación de factores de transcripción es otra de las estrategias de resistencia frente a los TALEs adoptados por las plantas, para evitar su actividad transcripcional y la expresión de genes *S* (Boch et al., 2014; Xu et al., 2017). La subunidad TFIIA γ 5 codificada por el gen *Xa5* es la encargada de estabilizar la interacción con los TALEs y de reclutar a los factores de transcripción basales, siendo indispensable para la función de la ARN polimerasa II (Hui et al., 2019; Xu et al., 2017). La variante recesiva de este gen impide el reclutamiento del complejo de preiniciación transcripcional, por lo cual plantas con el alelo *xa5* presentan un fenotipo de resistencia (Boch et al., 2014; Xu et al., 2017)

La resistencia de tipo dominante no transcripcional está basada en el conocimiento de la resistencia mediada por la proteína Bs4 de tomate. Bs4 es una proteína de tipo NLR que reconoce el efector AvrBsP/AvrBs4 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) (J. Zhang et al., 2015). Bs4 actúa como un gen *R* que puede activar las respuestas de defensa en ausencia de la actividad transcripcional de AvrBs4 y que además es expresada en respuesta a TALEs con RVD de distinta composición (**Figura 1-2d**) (Romer, Recht, et al., 2009; Triplett, Leach, & Gold, 2016). Este mismo mecanismo ha sido observado en arroz

con el gen *Xa1/Xo1*, el cual codifica una proteína que es capaz de reconocer TALEs liberados por *Xoo* y *Xoc* (Ji et al., 2016).

Figura 1-2. Mecanismos de resistencia asociados a los TALEs. En el contexto de susceptibilidad, los TALEs interactúan con EBEs en el promotor de genes *S*, activándolos y promoviendo la enfermedad (a). Con la resistencia recesiva, las plantas presentan mutaciones en los EBEs de los promotores de los genes *S*, impidiendo su activación (b). La resistencia dominante dependiente de la actividad transcripcional de los TALEs, emplea su mecanismo de acción para activar genes *E* que ejecutan los mecanismos de defensa de la planta (c). En plantas que presentan la resistencia dominante no transcripcional, los TALEs son directamente reconocidos por NLRs que desencadenan la ETI (d).



Por último, la resistencia dominante dependiente de la actividad transcripcional de TALEs es el tipo más frecuente en la naturaleza (Boch et al., 2014; J. Zhang et al., 2015). Este mecanismo depende de la presencia de genes ejecutores de la resistencia (*E*) corriente abajo de un promotor que contiene elementos de unión a TALEs (Figura 1-2c). La expresión del gen de resistencia *E* es exclusivamente controlada por la actividad transcripcional de los TALEs con un RVD que reconozca el *EBE* en el promotor, un conjunto de elementos conocido como activador trampa (Boch et al., 2014; J. Zhang et al., 2015). Se ha determinado que los genes *Bs3*, *Bs4C*, *Xa10*, *Xa23* y *Xa27* funcionan como

genes *E*, contrarrestando la función de sus respectivos TALEs en un proceso dependiente de la actividad transcripcional mediada por los efectores (Xu et al., 2017; J. Zhang et al., 2015).

A pesar de que todos los mecanismos de resistencia a TALEs descritos arriba son capaces de generar resistencia de amplio espectro, evidencia reciente muestra que las cepas de las especies de *Xanthomonas* bajo la presión de selección que ejercen la resistencia recesiva, dominante no transcripcional y los activadores trampa, pueden llegar a desarrollar variantes de TALEs con la capacidad de evadirlos y promover la susceptibilidad del hospedero (Doucouré et al., 2018; Ji et al., 2016). La implementación de plantas de arroz con alelos recesivos en los genes blanco de TALF y TALC en África mostró que las cepas locales de *Xoo* presentan variantes estructurales de ese par de efectores, llegando a superar la resistencia recesiva de las plantas de arroz (Doucouré et al., 2018). Adicionalmente, el desarrollo de variantes estructurales lo suficientemente diferentes como para activar otros blancos, también pone de manifiesto que *Xanthomonas* puede superar la resistencia dominante dependiente de la actividad transcripcional de los TALEs. Por otro lado, variantes truncadas del efector PthXo1 sin el dominio AAD denominadas iTALES antes consideradas pseudogenes han mostrado evadir el reconocimiento directo de *Xa1* (Ji et al., 2016), lo cual demuestra la capacidad de estos patógenos de superar la resistencia dominante no transcripcional y sugiere la posibilidad de evadir la resistencia dominante dependiente de la actividad transcripcional de los TALEs.

Para desarrollar una resistencia durable y de amplio espectro de cepas de *Xanthomonas* tal vez sea necesario combinar varias de estas estrategias de resistencia empleadas por las plantas (Boch et al., 2014). Hasta el momento se ha propuesto la edición genética de los promotores de genes *S* con el fin de generar pérdida de susceptibilidad frente a los TALEs (Blanvillain-Baufumé et al., 2017), la implementación de TALEs artificiales para inducir la expresión de genes *R*, genes *E* o genes *Avr* que ejecuten los mecanismos de defensa (T. Li, Huang, Zhou, & Yang, 2013), y la construcción sistema de activadores sintéticos de TALEs que permitan el reconocimiento de múltiples cepas y la ejecución de la defensa (Díaz, 2016; Hummel et al., 2012; Shantharaj et al., 2016). No obstante, las estrategias deben combinarse para aportar más durabilidad a la resistencia de amplio espectro (Boch et al., 2014).

Ganancia de resistencia empleando promotores trampa

El sistema de activadores sintéticos consiste en un cassette de expresión constituido de un módulo sensor capaz de interactuar con los TALEs y un módulo ejecutor encargado de activar los mecanismos de defensa del hospedero, por su similitud con los activadores trampa esta estrategia ha sido denominada promotor trampa (Boch et al., 2014; Díaz, 2016). Los promotores trampa son constructos sintéticos basados en la resistencia dominante dependiente de la actividad transcripcional de TALEs. La naturaleza artificial de los promotores trampa hace posible el construir cassettes de expresión con múltiples EBEs permitiendo un amplio reconocimiento de TALEs presentes en distintos patovares y especies sin interferir con su función transcripcional (Hummel et al., 2012; Romer, Recht, et al., 2009; Shantharaj et al., 2016).

Experimentos de expresión transitoria y estable han demostrado la funcionalidad de los promotores trampa en especies vegetales distantes, lo que sugiere una gran versatilidad que puede ser empleada para generar ganancia de resistencia activada por TALEs en diversos patosistemas (Díaz, 2016; Hummel et al., 2012; Romer, Recht, et al., 2009; Shantharaj et al., 2016). Alternativamente, se ha propuesto el uso de promotores completos de genes *S* como módulos sensores para obtener resistencia de amplio espectro ante diferentes TALEs que reconocen el mismo promotor. No obstante, los elementos regulatorios endógenos presentes en estos promotores generan expresión no inducida por TALEs, lo que sugiere que los módulos sensores deben ser procesados para disminuir esta inducción indeseada (Shantharaj et al., 2016).

El desarrollo de los promotores trampa inició con la modificación del cassette de expresión del gen *Bs3*. En este estudio se utilizó un sistema heterólogo de reconocimiento con inducibilidad del gen *Bs3* dependiente de *AvrXa27* en *N. benthamiana* (Romer, Recht, et al., 2009). Al promotor de dicho gen *E* le fue insertada caja UPT_{AvrXa27} presente en el promotor del gen *E Xa27* de arroz, reconocida por el efector *AvrXa27*. Adicionalmente, este mismo promotor trampa fue modificado insertando una tercera secuencia de reconocimiento, la caja UPT_{AvrBs3Δrep16} reconocida por una variante estructural del efector *AvrBs3* (Romer, Recht, et al., 2009). Esta situación planteó la posibilidad de emplear sistemas heterólogos de genes *R* inducibles por múltiples TALEs para conferir resistencia de amplio espectro en diferentes especies de plantas de interés agrícola que son afectadas por especies del género *Xanthomonas* (Romer, Recht, et al., 2009), así como también se perfila como una estrategia que podría combatir en contra de las variantes estructurales que presentan los TALEs bajo fuertes presiones de selección.

Estudios posteriores al de Romer et al (2009) plantearon que la resistencia de amplio espectro a patógenos adaptados puede ser inducida a partir de genes *E* modificados para ser activados en respuesta a múltiples efectores TAL relevantes en la virulencia y conservados a través de las poblaciones de los patógenos, lo cual fue evaluado en arroz (Hummel et al., 2012) y en cítricos (Shantharaj et al., 2016) generando resistencia a diferentes cepas de *Xam*. También se ha demostrado que un gen *E* puede responder a múltiples TALEs de diferentes especies por medio de este sistema, logrando un gran espectro de reconocimiento con fenotipos de resistencia similares alcanzados por medio del fitomejoramiento convencional (Hummel et al., 2012).

Con miras a implementar esta novedosa estrategia de resistencia a la bacteriosis vascular en yuca, Díaz (2016) empleó un sistema de activadores sintéticos inducidos por efectores de *Xam*, para lo cual empleo al gen de resistencia *RXam2* auto-activo (*Rxam2*_[D492V]) como modulo ejecutor en un promotor trampa activado por TALE1_{xam}. La expresión transitoria de este constructo en *N. benthamiana*, mostró un fenotipo de HR cuando fueron coinfiltradas con TALE1_{xam}, lo cual corroboró el funcionamiento del sistema. Líneas transgénicas de yuca presentado el promotor trampa *EBE*_{TALE1_{xam}::*Rxam2*_[D492V] fueron inoculadas con diversas cepas de *Xam*. El crecimiento de las bacterias con TALE1_{xam} fue reducido indicando que el sistema puede ser empleado como una herramienta biotecnológica para el desarrollo de resistencia de amplio espectro a *Xam* en yuca (Díaz, 2016).}

2. Objetivos

Objetivo general

Construir y evaluar promotores sintéticos con *EBEs* que sean reconocidos por efectores TAL de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* como una aproximación al desarrollo de una herramienta biotecnológica para el control de la bacteriosis vascular de la yuca.

Objetivos específicos

1. Desarrollar promotores con elementos de unión a TAL14, TAL20 y TAL22 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*
2. Evaluar independientemente la actividad de los promotores diseñados en respuesta a los TAL14, TAL20 y TAL22 en *Nicotiana tabacum*
3. Determinar el efecto de múltiples TALEs sobre la actividad de los promotores trampa

3. Materiales y métodos

La metodología empleada para el desarrollo de este estudio fue dividida en cuatro fases: *i*) diseño y construcción de los promotores trampa, *ii*) clonación de los efectores TAL, *iii*) evaluación funcional de los promotores sintéticos y *iv*) aproximación teórica a la obtención de *EBEs* genéricos. La primera de estas fases reúne el diseño de las secuencias de los promotores sintéticos, el desarrollo de una estrategia de clonación y la obtención de las construcciones con los promotores. En la segunda fase se realizó la transferencia de las secuencias de RVDs de los TALEs 14B, 20C y 22B de *Xam* a partir de un vector de expresión en *Xanthomonas* a un vector de expresión en planta. La tercera fase de este estudio corresponde a la validación experimental de la actividad de los promotores sintéticos por medio de expresión transitoria. Finalmente, la última fase recopila una aproximación teórica para la búsqueda de *EBEs* con la capacidad de reconocimiento de varios subtipos de TALEs de una misma longitud con ligeras diferencias en su secuencia de RVDs.

3.1. ***Diseño y construcción de los promotores trampa***

Diseño de promotores trampa para los TALEs 14, 20 y 22 de *Xam*

El diseño de los constructos se basó en promotores trampa previamente desarrollados en *Nicotiana benthamiana*, cítricos, arroz y particularmente en yuca (Díaz, 2016; Hummel et al., 2012; Romer, Recht, et al., 2009; Shantharaj et al., 2016). Como promotor base para las construcciones se empleó el promotor mínimo de Bs3 (desde ahora pBs3min), sobre el cual se diseñaron constructos con los sitios de unión a los TALEs 14, 20 y 22 (*EBE_{TAL14Xam}*, *EBE_{TAL20Xam}* y *EBE_{TAL22Xam}*). Para llevar a cabo el diseño y la construcción se partió del vector pENTR/D-TOPO UPT1(2X), el cual es una construcción que previamente ha sido empleada en el desarrollo de plantas transgénicas de yuca con expresión inducible

del gen reportero *GUSplus* y el gen de resistencia *RXam2* modulada por la interacción de $TAL1_{xam}$ con UPT1 (*Up-regulated by TALE1*), su secuencia de unión (Díaz, 2016).

La secuencia de $EBE_{TAL14Xam}$ fue tomada a partir de la secuencia de UPT1 de pENTR/D-TOPO UPT1(2X), la cual es idéntica al EBE de TAL14A. Por otro lado, las secuencias de los $EBE_{TAL20Xam}$ y $EBE_{TAL22Xam}$ se seleccionaron de un estudio previo en el que se determinó el conceso de las secuencias de unión predichas en promotores de genes de yuca para los TALEs 20 y 22, cuya predicción fue validada por la sobreexpresión de dichos genes asociada a la presencia de los TALEs 20 y 22 de *Xam* 668 (Cohn, 2015). Las secuencias TAT en el extremo 5' y CCC en el extremo 3' de cada *EBE* fueron añadidas generando un contexto adecuado para el funcionamiento de los efectores (Hummel et al., 2012; Moscou & Bogdanove, 2009).

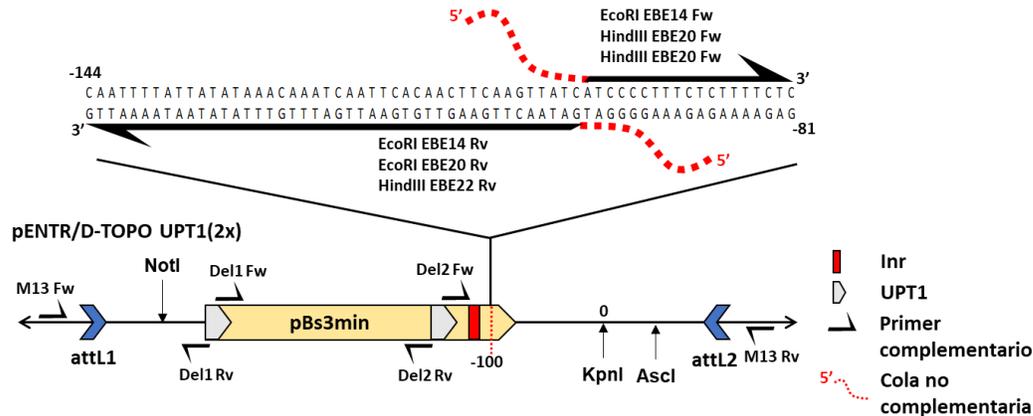
A partir del vector pENTR/D-TOPO UPT1(2X) y los *EBEs* seleccionados se planteó un diseño compatible con la inserción independiente de cada *EBE* (*UniEBEs*) en el pBs3min y el ensamblaje de un cuarto promotor con los tres *EBEs* (*TriEBE*), siguiendo una estrategia de clonación en la que primero los *EBEs* son insertados en el pBs3min por medio de mutagénesis dirigida, para luego ensamblarse en un arreglo triple a través de la liberación de los *EBEs* de los promotores *UniEBE* con enzimas de restricción y la ligación de estos en el arreglo del promotor *TriEBE* (**Figura S 7-1**). De este modo, los promotores *UniEBE* fueron diseñados con sitios de corte flanqueantes a $EBE_{TAL14Xam}$, $EBE_{TAL20Xam}$ e $EBE_{TAL22Xam}$ para favorecer el ensamblaje de promotor *TriEBE*. Dos sitios de corte de EcoRI y HindIII se diseñaron flanqueando a $EBE_{TAL14Xam}$ e $EBE_{TAL22Xam}$, respectivamente. El $EBE_{TAL20Xam}$ se planteó flanqueado por dos sitios de corte de XhoI que a su vez posee un sitio de corte de EcoRI corriente arriba y un sitio de corte de HindIII corriente abajo (**Figura 4-1**).

Mutagénesis del promotor mínimo de Bs3

Con base en el diseño de los promotores trampa se generaron primers cola con cola para luego ser empleados en la delección de las secuencias UPT1 y la inserción de los tres *EBEs*, junto con sus respectivos sitios de corte, dentro del pBs3min en el vector pENTR/D-TOPO UPT1(2X) por medio de mutagénesis dirigida, en la cual se amplifica la totalidad del vector y se incluye la secuencia no complementaria correspondiente a los *EBEs* dentro del pBs3min (**Figura S 7-1**). El diseño de los primers fue realizado con la herramienta online

NEBaseChanger (<https://nebasechanger.neb.com/>) de la casa comercial New England Biolabs, teniendo un mínimo de 10 nucleótidos complementarios con el ADN plantilla. Los primers que se emplearon para la delección de las secuencias UPT1 fueron diseñados como secuencias totalmente complementarias a las regiones flanqueantes de las dos UPT1. Por otro lado, los primers empleados para la inserción de los *EBEs* fueron diseñados como secuencias parcialmente complementarias al ADN plantilla (plásmido parental) a una distancia de 81 a 144pb del sitio de corte de KpnI. Las colas no complementarias de dichos primers, contienen la secuencia de los *EBEs*, el contexto y los sitios de corte de acuerdo con lo descrito anteriormente (**Figura 3-1**).

Figura 3-1. Mutagénesis dirigida de pBs3min. La construcción pENTR/D-TOPO UPT1(2X) fue empleada como plásmido de partida para llevar a cabo la mutación de pBs3min (pentágono amarillo). Cada uno de los *EBEs* fue insertado a 100pb corriente arriba del sitio de corte de la enzima de restricción KpnI por medio de la amplificación con primers parcialmente complementarios diseñados cola con cola (↔). Las colas no complementarias (líneas rojas discontinuas) incluyeron las secuencias de cada uno de los *EBEs* y los sitios de corte flanqueantes de las enzimas correspondientes. Las secuencias UPT1 fueron delecionadas con primers totalmente complementarios a las regiones flanqueantes de UPT1. La secuencia Inr (recuadro rojo) y los sitios de corte de las enzimas de restricción NotI, KpnI y Ascl (↓) se conservaron intactos. La secuencia de los primers empleados para las inserciones de los *EBEs* y la delección de UPT1 se muestran en la tabla, la región complementaria a pENTR/D-TOPO UPT1(2X) se presenta en negro, mientras que las colas no complementarias se ilustran en rojo.



Primer	Secuencia 3'-5'
Del 1 Fw	CAAAGCAATCGAACTGATA
Del 1 Rv	GGGGGAAGTGGATATTTG
Del 2 Fw	CTATTGAACTTCAACACTTA
Del 2 Rv	CAAACGGACTGGTAAAATA
EcoRI EBE 14 Fw	CTCTTTTCTCTTTCCCTTACTTAAGCCCTAACTAAAC
HindIII EBE 20 Fw	CTCTTTTCTCTTTCCCTTATTCTGAAGAGCTCCCTTACCCACAC
HindIII EBE 22 Fw	CTCTTTTCTCTTTCCCTTATTCTGAACCCCTTCTCTCT
EcoRI EBE 14 Rv	GTTAAAATAAGTGTGGAAGTTCAATAGCTCCTTAAGATAATATT
EcoRI EBE 20 Rv	GTTAAAATAAGTGTGGAAGTTCAATAGCTTAAGGAGCTCATAATATTTGTTA
HindIII EBE 22 Rv	GTTAAAATAAGTGTGGAAGTTCAATAGTTCGAAATAATAGAAAGGAAG

Todas las mutagénesis fueron llevadas a cabo mediante la amplificación completa del constructo parental con la enzima Phusion™ Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.) en un volumen final de 12,5µL: 1-5ng de ADN plantilla, 2.5µL de Buffer 5X GC, dNTPs, 1µM de cada primer, DMSO 3% y 0.5U de Phusion™ Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase. Una desnaturalización inicial a 98°C fue realizada por 30 segundos, seguido de 25 ciclos de amplificación (desnaturalización a 98°C por 10 segundos, hibridación a 58°C por 30 segundos en el caso de las inserciones o a 55°C por 30 segundos en el caso de las deleciones, extensión a 72°C por 1.5 minutos) y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Luego de la amplificación de las secuencias mutagénicas, el ADN parental fue degradado con la enzima de restricción DpnI (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, U.S.), los extremos 5' fueron fosforilados con T4 Polynucleotide Kinase (Promega, Madison, Wisconsin, U.S.) y el ADN mutado fue ligado con T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.). Los productos de ligación fueron transformados en *Escherichia coli* cepa DH10B, las colonias positivas fueron seleccionadas 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) y el antibiótico Kanamicina (50µg/mL). Las bacterias fueron incubadas durante 16 horas a 37°C.

Para la confirmación de todos los clones, colonias tomadas al azar fueron picadas con un palillo estéril y suspendidas en 10µL de agua, todas las suspensiones fueron incubadas a 95°C durante 5 minutos. Las PCRs fueron realizadas a un volumen final de 10 µL: 1µL de suspensión, 5µL DreamTaq Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.), 0.5µM primer M13Fw (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') y 0.5µM primer M13Rv (5'-CAGGAAACAGCTATGACCATG-3'). Una desnaturalización inicial a 95°C fue hecha por 5 minutos, seguido de 34 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. Las colonias positivas fueron recreadas en LB líquido y colectadas en su fase estacionaria de crecimiento, parte del cultivo fue almacenado en glicerol al 15% a una temperatura de -80°C y otra parte fue empleada para la extracción de ADN plasmídico con el kit de extracción GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.).

Construcción de promotores trampa

Las digestiones con enzimas de restricción para liberar los *EBEs* se realizaron a 37°C durante 3 horas en un volumen de 20µL: 2µL de Buffer 10X para la actividad de cada enzima, 1µg de plásmido y 10U de Enzima de restricción. Los *EBEs* liberados fueron purificados con el Kit The Wizard™ SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, U.S.). Las ligaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 22°C durante 2 horas 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 (aproximadamente 240ng), 11µL de inserto (aproximadamente 165ng) y 5U de Ligasa. El gen *GUSplus* fue purificado con el Kit The Wizard™ SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, U.S.) a partir del vector pENTR/D-TOPO UPT1(2X)::*GUSplus* y luego fue ligado en constructos digeridos corriente abajo del pBs3min entre los sitios de corte de KpnI y AclI siguiendo el mismo protocolo que para los *EBEs* (**Figura S 7-1**). Se confirmó la clonación del gen por PCR directa sobre colonias siguiendo el protocolo antes mencionado con los primers GusKpnI Fw (5'-GCAGGTACCATGGCTACTACTAAGCATTTG-3') y Gusplusint Rv (5'-GGTCACAACCGA GATGTCCT-3').

El Terminador 35s (35sT) fue liberado del vector pENTR/D-TOPO UPT1(2X)::*GUSplus* mediante la digestión con la enzima de restricción NotI siguiendo el protocolo antes mencionado (**Figura S 7-1**), este fue purificado con el Kit The Wizard™ SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, U.S.) a partir del vector pENTR/D-TOPO UPT1(2X)::*GUSplus*. La ligación se llevó a cabo como se describió previamente. La clonación y direccionalidad del terminador se confirmó por PCR convencional sobre las colonias con los primers M13 Fw y 35STermNotI Rv (5'-TGCGGCCGCGGGGATCTGGA TTTTAGTAC-3').

La presencia y direccionalidad de los tres *EBEs* fue verificada sobre los plásmidos de cada construcción realizando PCRs con primers específicos para cada *EBE*. La PCR del *EBE_{TAL14Xam}* fue llevada a cabo con los primers M13 Fw e EBE14 Rv (5'-GCGGGATTGATTTGTTTATAATAG-3'), la del *EBE_{TAL20Xam}* con los primers EBE20 Fw (5'-GAATTCCTCGAGTATTATAAACAATCAC-3') y Gusplusint Rv (5'-GGTCACAACCGAGA TGTCCT-3'), y la del *EBE_{TAL22Xam}* con la pareja de primers EBE22 Fw (5'-TATCTTTCCTTCTCCTTCTTC-3') y Gusplusint Rv. En cada caso las PCRs fueron

realizadas siguiendo los parámetros descritos con anterioridad, excepto que el anillamiento de los primers se realizó a 50°C.

Recombinación de los promotores en pMDC32

Los promotores trampa fueron clonados en el vector binario de expresión en planta pMDC32. Debido a que el antibiótico de selección de ambos vectores es Kanamicina, los plásmidos pENTR/D-TOPO 35sT *EBE₀*::GUS, pENTR/D-TOPO 35sT *EBE_{TAL14Xam}*::GUS, pENTR/D-TOPO 35sT *EBE_{TAL20Xam}*::GUS, pENTR/D-TOPO 35sT *EBE_{TAL22Xam}*::GUS y pENTR/D-TOPO 35sT *TriEBE*::GUS fueron linearizados empleando la enzima de corte como EcoRV antes de llevar a cabo la reacción, para ser usados como vectores de entrada. Las secuencias attL de los constructos en pENTR/D-TOPO fueron recombinadas con las secuencias attR del vector pMDC32 ccdB, resultando en los vectores pMDC32 35sT *EBE₀*::GUS, pMDC32 35sT *EBE_{TAL14Xam}*::GUS, pMDC32 35sT *EBE_{TAL20Xam}*::GUS, pMDC32 35sT *EBE_{TAL22Xam}*::GUS y pMDC32 35sT *TriEBE*::GUS.

Cada recombinación fue realizada mediante el uso de Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.) a una temperatura de 25°C durante 1 hora en un volumen final de 5µL empleando: 1µL de pMDC32 ccdB (150ng/µL), 3µL de vector de entrada y 1µL de clonasa LR. Los productos de recombinación fueron transformados en *E. coli* cepa DH10B, las colonias positivas fueron seleccionadas en medio LB (Tripton 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, Cloruro de Sodio 5 g/L), con agar bacteriológico (15 g/L) y Kanamicina (50µg/mL). Se confirmó la identidad de los constructos por PCR directa sobre las colonias del promotor 35s (p35s) localizado en pMDC32 corriente arriba del gen de resistencia al antibiótico Higromicina, y el gen *GUS* presente en la construcción. En el caso de p35s la reacción de PCR fue como se describió anteriormente, pero con una temperatura de hibridación de 58°C, se emplearon los primers p35s Fw y p35sRv (5'-TGCGAGCTCGTCCCCGGTGTCTCTCC-3'). Para la PCR del gen *GUS* se usó el protocolo estándar con los primers GusKpnIFw y GusplusintRv.

3.2. Clonación de los efectores TAL

Digestión y ligación de los TALEs en pE/D-TOPO

Para la clonación de los TALEs en pENTR/D-TOPO se empleó el constructo pENTR/D-TOPO TAL NLS y los vectores pSKX1-pNC que contienen de manera individual los RVDs de los TALEs 14B, 20C y 22B, los cuales fueron donados amablemente por la profesora Adriana Bernal y Carlos Zárate (Laboratorio de Interacciones Moleculares de Microorganismos en Agricultura, Universidad de los Andes, Bogotá D.C., Colombia).

Con el objetivo de evaluar la actividad de los promotores trampa se clonaron los TALEs 14, 20 y 22 partiendo de los efectores en el vector de expresión en *Xanthomonas* pSKX1. Las repeticiones de los TALEs fueron introducidas en el vector de clonación pENTR/D-TOPO con la enzima de restricción BamHI. Luego se clonó en el vector de expresión en planta pBAV139. Tanto los constructos pSKX1 como el de pENTR/D-TOPO fueron digeridos con la enzima de restricción BamHI, se liberaron las repeticiones de TAL14, TAL20 y TAL22, y se desfosforiló el vector vacío pENTR/D-TOPO (**Figura S 7-1**). Se llevó a cabo la ligación de las repeticiones de los TALEs en el vector de clonación y se confirmó la direccionalidad del inserto por amplificación de la secuencia codificante para el extremo C-terminal de los TALEs.

Las digestiones se realizaron siguiendo los protocolos estándar. Los *EBEs* liberados fueron purificados con el Kit The Wizard™ SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, U.S.) y las ligaciones como se describió previamente. Los productos de ligación fueron transformados en *E. coli* cepa DH10B, las colonias positivas se seleccionaron en medio LB suplementado con Kanamicina (50µg/mL).

La correcta direccionalidad de las secuencias clonadas fue confirmada por PCR directa del extremo C-terminal de los efectores sobre las colonias con los primers ABUA4 Fw (5'-TCTAGATTTGATGAAGCCATGACG-3') y M13Rv, la temperatura de hibridación se fijó a 50°C. La identidad de los clones fue verificada por medio de la PCR de las repeticiones con los primers RepFw (5'-GAGTTGAGAGGTCCACCGTTAC-3') y RepRv (5'-GGGAAGACGGCGATTGGTTC-3'), se siguió el protocolo estándar en un volumen final de 10µL con una temperatura de hibridación de 60°C (**Figura S 7-2**).

Recombinación de los efectores en pBAV139

Se utilizó el sistema Gateway para clonar los TALEs en el vector de expresión en planta pBAV139. Al igual que pENTR/D-TOPO, el vector pBAV139 presenta un gen de resistencia a Kanamicina, por lo cual los constructos pENTR/D-TOPO TAL14, pENTR/D-TOPO TAL20 y pENTR/D-TOPO TAL22 fueron linearizados con la enzima de restricción NruI en el caso

de TAL14 y TAL20, mientras que TAL22 fue escindido con HpaI, teniendo cuidado de dejar intactos los sitios de recombinación attL y la secuencia entre estos (inserto).

La recombinación entre los sitios attL de pENTR/D-TOPO y attR del vector de expresión en planta pBAV139 fue llevada a cabo mediante el uso de Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.) a una temperatura de 25°C durante 1 hora en un volumen final de 5µL utilizando: 1µL de pMDC32 (150ng/µL), 3µL de vector de entrada (50-90ng) y 1µL de clonasa LR. Las digestiones se realizaron a 37°C durante 3 horas en un volumen de 20µL con los mismos parámetros descritos con anterioridad. Los productos de recombinación fueron transformados en *E. coli* cepa DH10B, las colonias positivas fueron seleccionadas en medio LB y Kanamicina (50µg/mL).

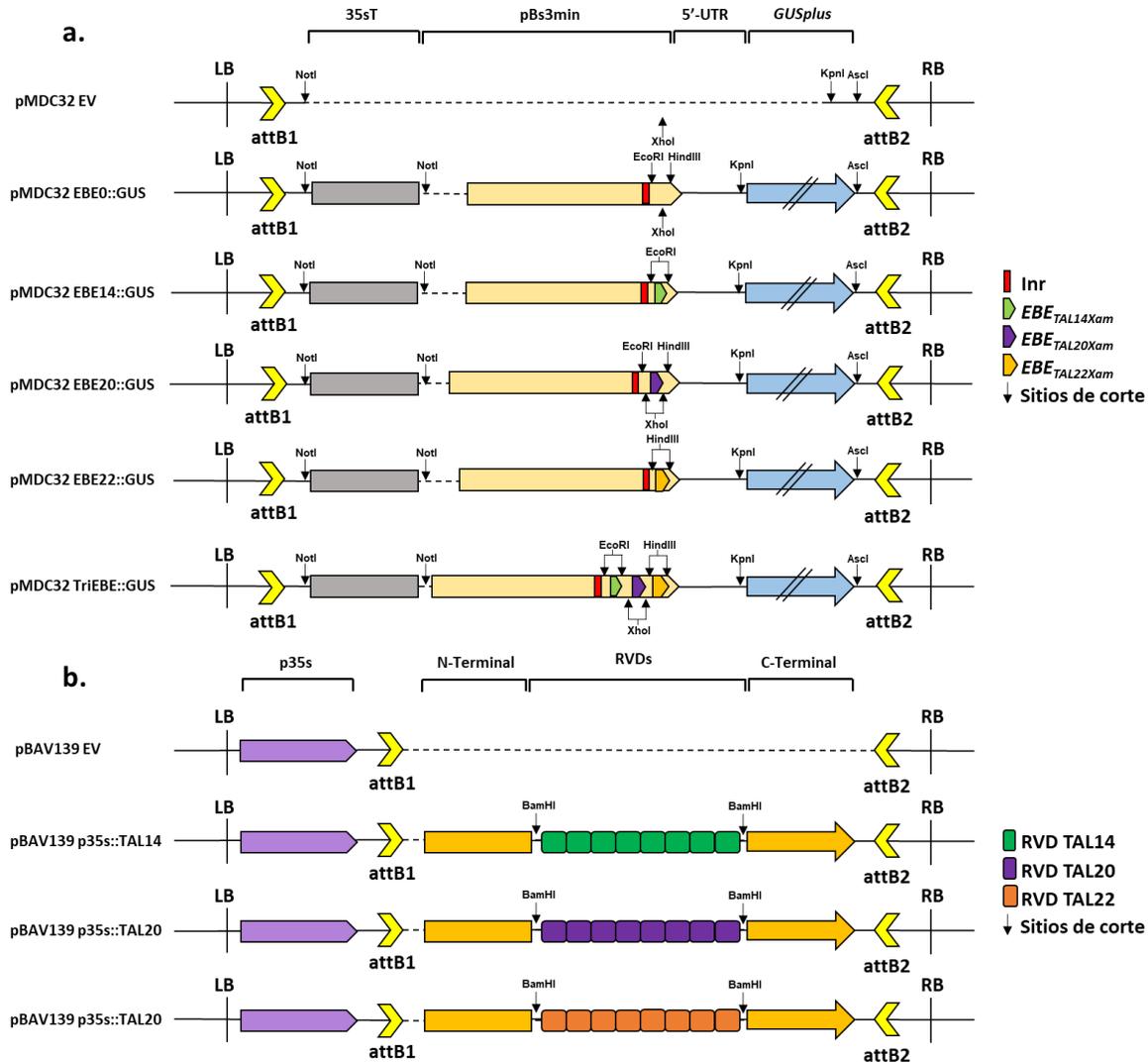
La identidad de los constructos fue confirmada por PCR directa sobre las colonias del promotor 35s (p35s) localizado en pBAV139 y la secuencia codificante del extremo C-terminal de los TALEs. En el caso de p35s la reacción fue llevada a cabo con una temperatura de hibridación de 58°C, se emplearon los primers p35s Fw y p35s Rv. Para la PCR de C-terminal se usó el protocolo estándar con los primers ABUA4 Fw y ABUA727 Rv (5'-TCACTGAGGAAATAGC TCCATC-3'). Los clones positivos para ambas reacciones fueron almacenados en glicerol al 15% a -80°C y los plásmidos fueron extraídos de las bacterias siguiendo la metodología empleada previamente (**Figura S 7-2**).

3.3. Evaluación funcional por expresión transitoria

Transformación de los constructos en *Agrobacterium tumefaciens*

Los plásmidos pMDC32 *EBE::GUS* y pBAV139 p35s::*TALE* fueron transformados en células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 por medio de electroporación (**Figura 3-2**). Las bacterias fueron plaqueadas en medio LB suplementado con Rifampicina (100µg/mL) y Kanamicina (50µg/mL), se incubaron durante 2 días a 28°C. Para verificar que los clones presentasen los constructos en los vectores de expresión en planta, se realizaron las PCRs de p35s, C-terminal de los efectores TAL y el gen GUS directo sobre las colonias, como se describió anteriormente. En el caso de los clones pBAV139 p35s::*TALE* las bacterias seleccionadas fueron aquellas positivas para tanto p35s como para C-terminal de los efectores TAL, mientras que en el caso de los clones pMDC32 *EBE::GUS* se escogieron las colonias positivas para p35s y el gen GUS.

Figura 3-2. Representación esquemática de los T-ADNs empleados en los experimentos de expresión transitoria. Los constructos de los promotores trampa (a) y los TALEs (b) fueron transformados en *A. tumefaciens* para luego ser infiltrados en *N. tabacum*.



Germinación y mantenimiento de plantas de *Nicotiana tabacum*

Las semillas de *Nicotiana tabacum* fueron germinadas en Turba Especial Mejorada de suelo (Anasac) a una temperatura de 28°C y una humedad relativa de 30-50%, bajo una intensidad lumínica de 70 μmol/s/m² con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Una vez germinadas las semillas, las plántulas fueron mantenidas en la turba durante dos o tres semanas hasta evidenciar el crecimiento de las primeras hojas verdaderas, tras lo cual se realizó el trasplante de *N. tabacum* a un sustrato de turba-tierra en una proporción

1:1. Para el crecimiento de las plántulas, el fotoperiodo fue mantenido en 16:8 a una temperatura de 28°C, humedad relativa de 50-70% y una intensidad lumínica de 150 $\mu\text{mol/s/m}^2$ durante tres semanas. Entre la quinta y sexta semana de crecimiento, 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 por una semana, lo que permitió el engrosamiento de las hojas.

Las plantas de siete semanas de edad con un aspecto similar fueron empleadas en los experimentos de expresión transitoria. Un día antes de la infiltración se humedeció el sustrato con abundante agua para favorecer la apertura estomática y la porosidad de las hojas.

Los constructos pMDC32 conteniendo los promotores trampa y los plásmidos pBAV139 con los TALEs fueron transformados en *A. tumefaciens* para llevar a cabo la evaluación funcional de los promotores sintéticos. Los experimentos de expresión transitoria fueron divididos en dos: i) actividad y especificidad de los promotores trampa, y ii) efecto de múltiples EBEs en la actividad del promotor *TriEBE*.

Actividad y especificidad de los promotores trampa

Con el fin de evaluar la actividad y especificidad de cada uno de los promotores trampa, se infiltraron hojas de *N. tabacum* con los clones de *A. tumefaciens* conteniendo los T-ADNs de los TALEs controlados por el p35s y las construcciones del gen *GUSplus* cuya expresión es modulada por los promotores sintéticos construidos. En cada hoja evaluada fueron infiltrados los promotores trampa pMDC32 35sT *EBE₀::GUS*, pMDC32 35sT *EBE_{TAL14Xam}::GUS*, pMDC32 35sT *EBE_{TAL20Xam}::GUS*, pMDC32 35sT *EBE_{TAL22Xam}::GUS* y pMDC32 35sT *TriEBE::GUS*. Para determinar el efecto de activación con los efectores, cada una de las hojas fue coinfiltrada con un TAL diferente. Los T-ADNs de los vectores vacíos (EV) fueron utilizados como controles negativos de pBAV139 y pMDC32. La expresión de *GUSplus* fue determinada indirectamente por la coloración azul de la zona infiltrada en hojas incubadas con el sustrato X-Gluc. El experimento fue repetido cinco veces en intervalos de 15 días, con diferentes plantas de tabaco y distintas colonias de los clones de *Agrobacterium*.

Efecto de múltiples EBEs en la actividad del promotor TriEBE

A fin de determinar un posible efecto en la activación del promotor *TriEBE* debido a la interacción simultánea con más de un efector, hojas de *N. tabacum* fueron infiltradas con los TALEs 14, 20 y 22, y sus distintas combinatorias en grupos de dos y tres. Sobre estas, fue infiltrada la construcción *TriEBE::GUS* combinando las suspensiones en una misma zona de las hojas. La expresión de *GUSplus* fue determinada indirectamente por la coloración azul de la zona infiltrada en hojas incubadas con el sustrato X-Gluc. El experimento fue repetido cinco veces en el tiempo en intervalos de 15 días, con diferentes plantas de tabaco y con distintas colonias de los clones de *Agrobacterium*. El promotor *EBE₀::GUS* fue empleado como punto de referencia para relativizar los valores de SM (Saturación Media, **Ecuación 3-1**). Debido a la variación *per se* de los tabacos en cuanto al nivel de expresión basal, los datos fueron normalizados respecto a la media y la desviación estándar de cada repetición (**Ecuación 3-2**).

Infiltración de *Agrobacterium* en hojas de *Nicotiana tabacum*

Los clones pMDC32 *EBE::GUS* y pBAV139 p35s::TALE en *A. tumefaciens* fueron activados en mediante una siembra por agotamiento en medio LB con Rifampicina (100µg/mL) y Kanamicina (50µg/mL), las bacterias fueron incubadas a 28°C. Al tercer día una colonia por vector fue seleccionada y repicada con un palillo estéril en medio LB con las mismas características e incubada a 28°C durante 2 días. Las bacterias fueron nuevamente crecidas en medio LB liquido fresco e incubadas a 250rpm con una temperatura de 28°C.

Una vez los cultivos alcanzaron una OD_{600nm}= 0.8-1.0, las bacterias 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 MgCl₂, 150 µM acetosiringona, pH 5.6). Las suspensiones bacterianas con los clones pBAV139 p35s::TALE fueron ajustadas inicialmente a una OD_{600nm} de 0.9, las bacterias conteniendo los tres clones de los TALEs fueron reunidos en una solución en una proporción 1:1:1, obteniendo una OD_{600nm} final de 0.3 por cada clon. Luego de esto, la densidad óptica de las suspensiones bacterianas de los clones pMDC32 *EBE::GUS* y pBAV139 p35s::TALE fueron ajustadas a 0.6. Por otro lado, se mezclaron en una proporción 1:1 entre sí los clones pBAV139 p35s::TALE formando tres posibles combinatorias. Los clones pBAV139 EV, pBAV139 p35s::TAL14, pBAV139 p35s::TAL20 y pBAV139 p35s::TAL22 fueron mezclados con cada uno de los clones pMDC32 *EBE::GUS* y pMDC32 EV, en una

proporción 1:1 obteniendo una OD_{600nm} final de 0.3 de cada clon. Todas las suspensiones producto de las combinatorias fueron incubadas durante tres horas a 21°C.

Para llevar a cabo los experimentos de la actividad y especificidad de los promotores, las suspensiones bacterianas con las combinatorias de los clones pMDC32 *EBE::GUS* y pBAV139 p35s::*TALE* se infiltraron en hojas de *N. tabacum* empleando jeringas estériles de 1mL con aguja removible en el envés de la tercera hoja de cada planta. Por otro lado, los experimentos de actividad del promotor *TriEBE* con varios TALEs fueron realizados sobreponiendo las infiltraciones que contienen el promotor y las combinatorias de los clones de los TALEs. Para esto, primero las combinatorias de los TALEs fueron infiltradas y una hora después sobre estas se ingresó la solución correspondiente a las bacterias que poseen el vector con el promotor *TriEBE* a una OD_{600nm} ajustada a 0.3.

Ensayo histoquímico de GUS

Las hojas infiltradas con las suspensiones bacterianas fueron colectadas dos días post-infiltración. La validación funcional de los constructos con el promotor trampa se realizó por medio de la expresión de *GUSplus* inducida en respuesta a los efectores, para lo cual se tomaron las hojas coinfiltradas frescas y se sumergieron en buffer X-Gluc (NaH_2PO_4 0.02 M, Na_2HPO_4 0.03 M, K_4FeCN_6 0.25 mM, K_3FeCN_6 0.25 mM, DMSO 10 % (p/v), triton X-100 0.5 % (v/v) y X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucuronida) 1 mg/mL (Sigma, St. Louis, MO, USA). El sustrato y el buffer fueron introducidos al tejido vegetal mediante tres pulsos de presión negativa durante 5 minutos cada uno. Las hojas fueron incubadas a 37°C durante 16 horas en condiciones de oscuridad.

Posterior a la incubación, la clorofila fue removida del tejido vegetal con lavados de Etanol al 70% a una temperatura de 80°C hasta retirar el pigmento por completo, se registraron los resultados de la prueba histoquímica tomando fotografías de las hojas. Cada fotografía fue tomada con una cámara Lumix DMC FZ70 a una distancia de 9 cm del sensor, Zoom de 1X, ISO 100, Balance de blancos "Cloudy day", apertura de 2.8 y velocidad de obturación de 50ms.

Análisis de Imágenes

La intensidad de la coloración de cada una de las unidades experimentales fue determinada como la saturación media (SM) de toda el área infiltrada, las mediciones digitales se hicieron con el programa ImageJ (Schneider, Rasband, &

Eliceiri, 2012). Las fotografías fueron transformadas de un modelo de color RGB a HSB (en escala de grises), se formaron polígonos rodeando el área infiltrada en particular y se procedió a medir la SM de la totalidad de los píxeles que componen el área, teniendo un valor mínimo de 0 (negro) y un máximo de 255 (blanco). Las medidas de SM de las infiltraciones fueron relativizadas respecto a la SM obtenida con el vector pMDC32 *EBE₀::GUS* de cada hoja (**Ecuación 3-1**), asumiendo esta última como una medida indirecta de la actividad basal del pBs3min.

Ecuación 3-1. Ajuste de los datos de Saturación Media (SM). Los valores de Saturación Media obtenidos con cada uno de los tratamientos fueron relativizados respecto a la actividad basal del pBs3min en cada hoja, por lo cual se calculó la medida de Saturación Media Relativa (SMR) como la razón entre el valor de SM del área infiltrada (tratamiento) y la SM de pMDC32 *EBE₀::GUS*.

$$\text{Saturación Media Relativa (SMR)} = \frac{\text{Saturación Media del área infiltrada}}{\text{Saturación Media de pMDC32 EBE}_0 \text{ :: GUS}}$$

Todos los datos de SMR fueron estandarizados respecto a la media y la desviación estándar de cada réplica biológica, para obtener la variación estándar de todas las mediciones minimizando la dispersión debida a la desviación entre individuos (

Ecuación 3-2). Los datos estandarizados de SMR fueron ajustados adicionándoles el valor estimado a partir de la diferencia entre el valor medio de SMR de todas las observaciones (N) y el error medio de las réplicas.

Ecuación 3-2. Normalización de los datos de SMR. Cada valor x_{ij} de la j -ésima unidad experimental de la i -ésima réplica biológica fue estandarizado respecto a la media y la desviación estándar de la i -ésima replica biológica.

$$y_{ij} = \frac{(x_{ij} - \bar{x}_i)}{\sigma_i} + \sqrt{\frac{1}{N} \sum_1^i \sum_1^j x_{ij}^2 - \frac{1}{N} \sum_1^i \sum_1^j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}$$

La normalidad de los datos fue evaluada con la prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnoff y la homocedasticidad se probó con la prueba de Bartlett. Los resultados del experimento de actividad y especificidad de los promotores fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) a dos vías. Los datos del experimento de actividad del promotor *TriEBE* fueron analizados con un

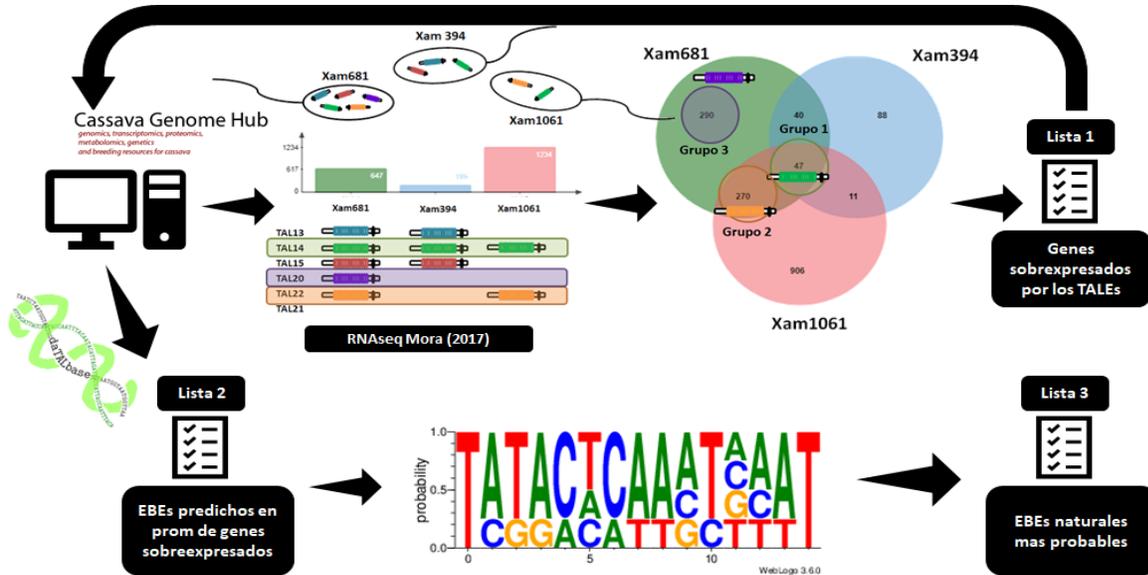
ANOVA simple. En ambos casos se realizaron pruebas de comparaciones múltiples. Todas las pruebas y análisis estadísticos se llevaron a cabo con un nivel de significancia de 0.05.

3.4. Aproximación teórica a la obtención de EBEs genéricos

Búsqueda y selección de EBEs genéricos

Con el objetivo de obtener secuencias de unión más genéricas que permitan aumentar la probabilidad de unión de TALEs con secuencias de RVDs distintas a las de TAL14B, TAL20C y TAL22B, las secuencias consenso de los $EBE_{TAL14Xam}$, $EBE_{TAL20Xam}$ e $EBE_{TAL20Xam}$ fueron obtenidas de partir de resultados de expresión diferencial de yuca en respuesta a las cepas *Xam681*, *Xam1061* y *Xam394* reportados por Mora (2017), almacenados en la plataforma virtual Cassava Genome Hub (<https://www.cassavagenome.org/diffexdb-cgi-bin/diffexdb.cgi>). La información de la expresión diferencial de las tres cepas se relacionó con el contenido de TALEs determinado por cada una de ella según lo reportado por Zárate (2015). En total se obtuvieron tres conjuntos de genes de yuca cuya expresión diferencial se asocia con la presencia de cada uno de los TALEs (TAL14, TAL20 o TAL22) (**Figura 3-3.**).

Figura 3-3. Representación gráfica de la metodología para la obtención de las secuencias de unión para TAL14, TAL20 y TAL22. Los EBEs más probables fueron obtenidos a partir de datos de expresión diferencial de genes de yuca y la correlación con la presencia de TALEs junto con la predicción de EBEs en promotores de genes sobreexpresados



Para cada uno de estos tres grupos de genes se seleccionaron los que fueran sobreexpresados, para lo cual se tomó como criterio el $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ mayor o igual a dos. Los *EBEs* fueron predichos sobre los promotores de los genes sobreexpresados de cada grupo, estableciendo como promotor la secuencia de 500pb inmediatamente corriente arriba de la anotación de cada gen. La herramienta virtual daTALbase (<https://www.cassavagenome.org/datalbase-cgi-bin/index.cgi>) que reúne los algoritmos de TALE-NT 2.0 (Doyle et al. 2012), TALgetterLong (Grau et al. 2013) y TALvez (Pérez-Quintero et al., 2013) fue empleada para la predicción de los *EBEs*. El genoma de *M. esculenta* v6 disponible en la base de datos del GenBank (GCA_001659605.1) fue utilizado como entrada para las predicciones.

Para la construcción de las secuencias consenso se determinó la probabilidad (λ_{ij}) de que cada *EBE* predicho en un gen sobreexpresado fuese verdadero teniendo en cuenta la posición (*Rank*) en el que fue ubicado de acuerdo al algoritmo utilizado y los datos de expresión diferencial de Mora (2017) (**Ecuación 3-3**). Para aplicar el cálculo de λ_{ij} adecuadamente, en el segundo término de la ecuación se varió el número de cepas dependiendo del conjunto de datos sobre el cual se aplicaría. Por ejemplo, en el caso de los datos de expresión diferencial asociados a TAL14, las tres cepas influyen en la estimación de la probabilidad debido a que las tres presentan TAL14, mientras que en el caso de los *EBEs* asociados a TAL20 solo se emplearon los datos de expresión diferencial de *Xam681* dado a que es la única cepa de las tres que contiene el TAL20 (**Figura 3-3**).

Ecuación 3-3. Estimación de la probabilidad de los *EBEs* predichos. La probabilidad del *i*-ésimo *EBE* predicho en el *j*-ésimo gen sobreexpresado fue basada en la posición (*Rank*) del *i*-ésimo *EBE* respecto a posición más baja (*Rank_{min}*) con el algoritmo empleado para la predicción, y el promedio de los cocientes de *Log₂FoldChange* del *j*-ésimo gen respecto al *Log₂FoldChange* máximo alcanzado al ser inoculado con las cepas *n*. Siendo cepa 1 = *Xam681*, cepa 2 = *Xam1061*, cepa 3 = *Xam394*.

$$\lambda_{ij} = \frac{1}{2} \left(\frac{Rank_{min} - Rank_i}{Rank_{min}} \right) + \frac{1}{2} \left[\frac{1}{n} \left(\frac{LogFC_{1gen_j}}{LogFC_{1max}} + \frac{LogFC_{2gen_j}}{LogFC_{2max}} + \dots + \frac{LogFC_{ngen_j}}{LogFC_{nmax}} \right) \right]$$

Las probabilidades fueron calculadas para todos los *EBEs* predichos con cada uno de los algoritmos empleados y los valores de λ_{ij} se promediaron en el caso de que una secuencia estuviera predicha más de una vez en el promotor de un mismo gen para TALEs de una misma longitud de diferentes cepas. El consenso de los *EBEs* fue obtenido a partir del alineamiento de las secuencias predichas, se calculó el peso de cada *EBE* predicho en el alineamiento como el número de veces que sería repetida cada secuencia (N_{ij}). El valor de cada N_{ij} fue calculado a partir de la probabilidad de cada *EBE* (**Ecuación 3-4**) multiplicado por 100, lo que quiere decir, de cada 100 secuencias alineadas para formar el consenso, N_{ij} cantidad corresponderán al *i*-ésimo *EBE* predicho en el promotor del *j*-ésimo gen.

Ecuación 3-4. Número de secuencias por *EBE* para la construcción del Logo. Los logos de cada *EBE* fueron generados a partir del alineamiento de los *EBEs* predichos en promotores de los genes sobreexpresados. De acuerdo con la probabilidad (λ_{ij}) del *i*-ésimo *EBE* del *j*-ésimo gen, se estimó el peso de la secuencia en particular para la construcción del logo como el número de veces que esta se repetiría en 100 *EBEs* que conformaran dicho alineamiento (N_{ij}).

$$N_{ij} = 100 * \lambda_{ij}$$

Con base en los N_{ij} de cada *EBE* se generaron los alineamientos y se construyó un logo de cada *EBE* con cada uno de los tres algoritmos de predicción con la herramienta WebLogo 3.6.0 (<http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>) (**Figura 3-3.**). Finalmente, las secuencias consenso obtenidas de los logos construidos con las predicciones de TALE-NT 2.0, TALgetterLong y TALvez fueron alineadas asumiendo un mismo peso formando un nuevo consenso para cada *EBE*, estableciendo a estas secuencias como las más genéricas encontradas por esta metodología.

Determinación de la probabilidad de unión a los TALEs

Las probabilidades de interacción de las distintas versiones de TAL14, TAL20 y TAL22 secuenciadas en cepas colombianas de *Xam* fueron comparadas entre los *EBEs* genéricos y los empleados en las construcciones evaluadas. Asumiendo la probabilidad acumulada del Máximo teórico como el máximo valor de capacidad de unión que puede alcanzar un *EBE* para una variante de un TAL en particular, se estimaron los coeficientes de probabilidad para los *EBEs* experimentales (CP_e) y los *EBEs* genéricos (CP_g) (**Ecuación 3-5 y Figura 4-14a**). Para llevar a cabo el cálculo en el cambio de probabilidad se asumió la probabilidad de unión de cada RVD a las bases nitrogenadas de acuerdo con datos reportados previamente (Boch et al., 2009). Las secuencias teóricas más probables de cada *EBE* para las diferentes versiones de los TALEs 14, 20 y 22 fueron construidas de acuerdo con la **Tabla 3-1**. A partir de dicha secuencia se estimó la probabilidad teórica máxima de interacción con los efectores, como la sumatoria de las probabilidades individuales en cada posición ($pEBE_{max}$).

Tabla 3-1. Probabilidad de unión de los RVDs a las bases nitrogenadas. Se muestran las probabilidades estimadas a partir de la frecuencia de relativa de interacción predicha entre las duplas de aminoácidos con las bases nitrogenadas (Boch et al., 2009).

	HD	NG	NI	NS	NN
A	0,2	0,1	0,9	0,5	0,4
C	0,7	0,2	0,1	0,3	0,1
G	0,0	0,0	0,0	0,1	0,4
T	0,1	0,7	0,0	0,1	0,1

Ecuación 3-5. Coeficiente de probabilidad de los EBEs (CP). La probabilidad de unión de los *EBEs* máximos teóricos ($pEBE_{max}$), los *EBEs* genéricos construidos a partir de los logos ($pEBE_g$) y los *EBEs* empleados en los experimentos de expresión transitoria ($pEBE_e$) fueron estimadas a partir de la sumatoria de las probabilidades de unión individuales (p_n) desde la primera posición hasta el n -ésimo nucleótido con n -ésimo RVD del TAL en particular(a). Para comparar las $pEBE$ de los *EBEs* genéricos y experimentales, los valores se relativizaron respecto al valor máximo de probabilidad de unión que puede alcanzar un *EBE* con un TAL en particular ($pEBE_{max}$) (b).

$$a. pEBE = \sum_1^n p_n \quad b. CP_g = \frac{pEBE_g}{pEBE_{max}} \times 100 \quad CP_e = \frac{pEBE_e}{pEBE_{max}} \times 100$$

La probabilidad individual de interacción de cada una de las bases nitrogenadas de las secuencias genéricas (EBE_g) y de las secuencias experimentales (EBE_e) con las versiones de los TALEs 14, 20 y 22 fueron determinadas a partir de la **Tabla 3-1**. La probabilidad

total de interacción de cada secuencia con los correspondientes RVDs se estimó como la sumatoria de las probabilidades individuales. Cada uno de los valores resultantes $pEBE_g$ y $pEBE_e$ fueron relativizados respecto la probabilidad teórica máxima de interacción para cada uno de los efectores (**Ecuación 3-5.**).

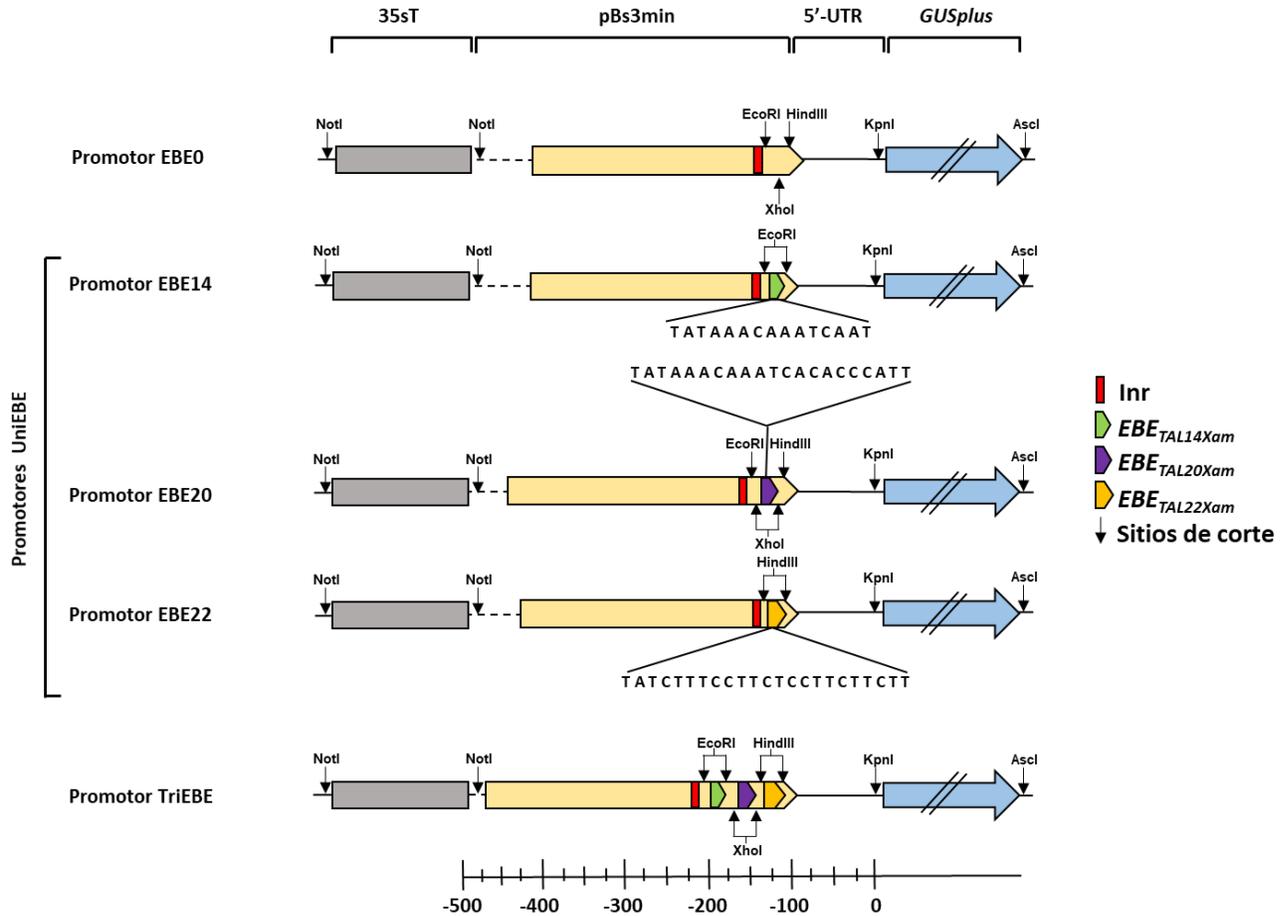
4. Resultados

4.1. *Diseño y construcción de los promotores trampa*

Diseño de promotores trampa para los TALEs 14, 20 y 22 de Xam

Las construcciones de los promotores trampa se diseñaron conservando la estructura original básica del pBs3min (**Figura S 7-1**). Se mantuvo una distancia de 100-120pb entre los *EBEs* y el sitio de iniciación (sitio de corte de KpnI). Por otro lado, el motivo Inr y la secuencia del 5'-UTR presentes en el vector parental, también fueron conservados en el diseño de las construcciones, modificando la posición del primero, en el caso de los constructos *UniEBE* el motivo Inr se localizó a 14pb corriente arriba de *EBE_{TAL14Xam}* y *EBE_{TAL22Xam}*, pero a 20 pb corriente arriba de *EBE_{TAL20Xam}*. En el diseño del promotor *TriEBE* dicha secuencia se ubicó a 14pb, 47pb y 85pb corriente arriba de los *EBE_{TAL14Xam}*, *EBE_{TAL20Xam}* y *EBE_{TAL22Xam}*, respectivamente (**Figura S 7-1**). Para finalizar, en el diseño de las construcciones se introdujo la secuencia del 35sT corriente arriba del pBs3min, con el fin de evitar la actividad de otros promotores dentro del contexto del genoma de *Nicotiana tabacum* que pudiesen llegar a enmascarar la actividad del promotor trampa *per se* durante los experimentos de expresión transitoria (**Figura 4-1**).

Figura 4-1. Diseño de promotores trampa *UniEBE* y *TriEBE*. En el esquema se muestra el diseño de los promotores trampa, cada uno presentando el pBs3min como promotor base (pentágono amarillo), la secuencia Inr (recuadro rojo), el terminador 35sT (recuadro gris) y el gen reportero *GUSplus* (flecha azul). Las secuencias de los tres *EBEs* empleadas para el diseño fueron esquematizadas dentro del pBs3min en cada promotor *UniEBE*. Los sitios de corte de las enzimas de restricción que flanquean el 35sT, *GUSplus* y los *EBEs* son ilustrados como flechas negras (↓). La escala indica la distancia en pares de bases (pb) corriente arriba desde el lugar de inserción del gen *GUSplus*, correspondiente con el sitio de corte de la enzima de restricción KpnI.



Mutagénesis del promotor mínimo de *Bs3*

Los EBEs fueron insertados en la secuencia del pBs3min del vector pENTR/D-TOPO UPT1(2X). Como resultado se obtuvieron los vectores mutados pENTR/D-TOPO UPT1(2X) $EBE_{TAL14Xam}$, pENTR/D-TOPO UPT1(2X) $EBE_{TAL20Xam}$ y pENTR/D-TOPO UPT1(2X) $EBE_{TAL22Xam}$ (**Figura S 7-1**). La identidad de los clones fue confirmada por PCR convencional con los primers universales M13Fw y M13Rv, cuyas secuencias se encuentran flanqueando a las construcciones (**Figura 3-1**). La diferencia de tamaño de los amplicones respecto a pENTR/D-TOPO UPT1(2X) permitió confirmar la inserción de los EBEs en los promotores UniEBE. En concordancia con el diseño planteado (**Figura 4-1**), se observa un aumento en el tamaño de los amplicones correspondiente a 36pb adicionales en el $UniEBE_{TAL14xam}$, 51pb en el $UniEBE_{TAL20xam}$ y 41pb en el $UniEBE_{TAL22xam}$ (**Figura 4-2a**).

El promotor *TriEBE* fue ensamblado a partir de las construcciones *UniEBE* generadas previamente. Para ello, se digirieron los promotores UPT1(2X) $EBE_{TAL14Xam}$ y $EBE_{TAL22Xam}$ con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII con el fin de liberar los *EBEs* 14 y 22. El plásmido pENTR/D-TOPO UPT1(2X) $EBE_{TAL20Xam}$ fue escindido en el sitio de corte único de HindIII y fue ligado el *EBE22* liberado previamente formando el vector pENTR/D-TOPO UPT1(2X) $EBE_{TAL20;22Xam}$. Dicho constructo se digirió con EcoRI y se empleó para clonar el $EBE_{TAL14Xam}$, generando el promotor UPT1(2X) *TriEBE* (**Figura S 7-1**). La inserción de los tres *EBEs* fue confirmada por PCR permitiendo diferenciarlos por un aumento de tamaño de aproximadamente 117pb en el amplicón respecto a pENTR/D-TOPO UPT1(2X) (**Figura 4-2a**), concordando con el diseño del promotor *TriEBE* (**Figura 3-1**).

Las secuencias UPT1 fueron eliminadas de las construcciones *UniEBE* y *TriEBE* mediante mutagénesis dirigida para evitar cambios en la expresión causados por la presencia de las secuencias de unión a TALE_{1_{xam}} (**Figura S 7-1**). Las deleciones de las secuencias UPT1 fueron verificadas por PCR directa sobre colonias, teniendo en cuenta que la amplificación cubre una región que incluye a las dos UPT1. En la **Figura 4-2 (b-d)** se evidenció la disminución en el tamaño del amplicón de todas las muestras mutadas en relación con el tamaño del amplicón de UPT1(2X) *TriEBE*, siendo una diferencia aproximada de 105pb con el promotor $EBE_{TAL14Xam}$, 90pb con el promotor $EBE_{TAL20Xam}$, 100pb con el promotor $EBE_{TAL22Xam}$ y 24pb con la construcción *TriEBE*, (**Figura 4-2b-d**). Las diferencias en el tamaño de los amplicones son concordantes con el diseño y la estrategia planteada para la mutación de pBs3min, de esta manera se pudo obtener el vector pENTR/D-TOPO *TriEBE* y los vectores *UniEBE*, pENTR/D-TOPO $EBE_{TAL14Xam}$, pENTR/D-TOPO $EBE_{TAL20Xam}$ y pENTR/D-TOPO $EBE_{TAL22Xam}$.

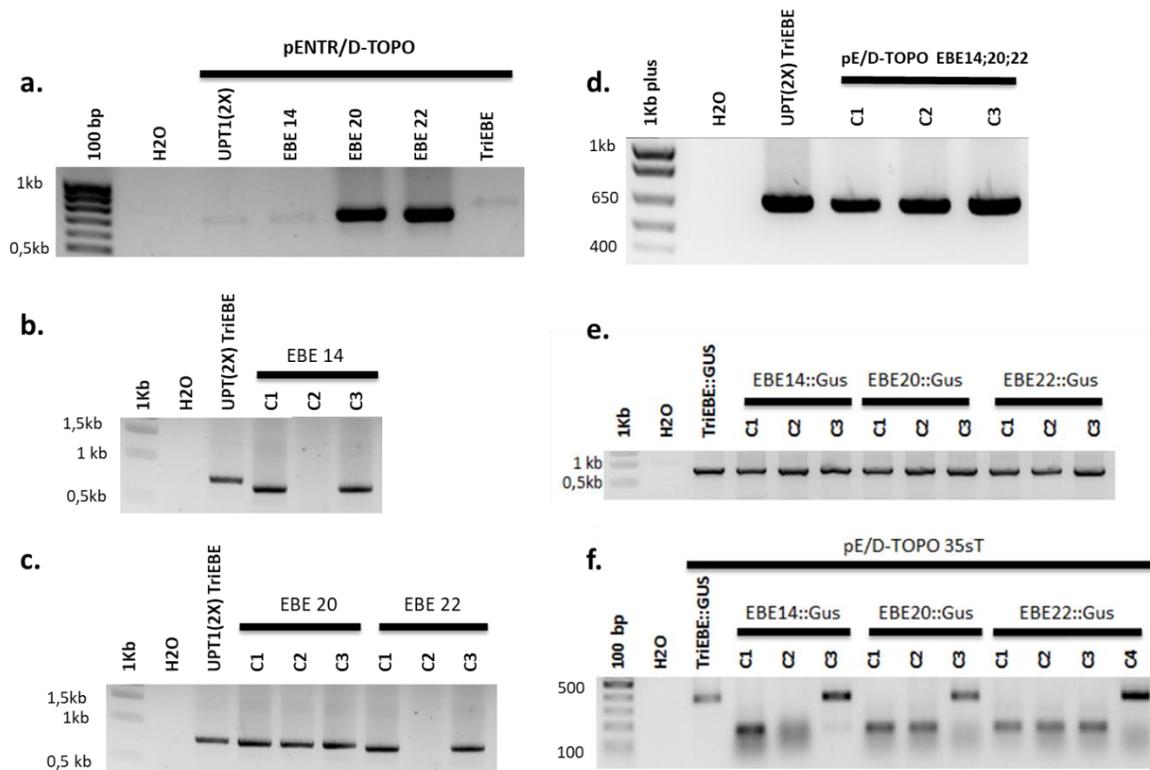
Construcción de promotores trampa

A fin de insertar el gen reportero *GUSplus* en cada uno de los vectores *UniEBE* y el constructo *TriEBE*, se liberó la secuencia del gen del plásmido pENTR/D-TOPO UPT1(2X)::GUS mediante la doble digestión con las enzimas KpnI y AscI (**Figura S 7-1**) e introducido en los constructos previamente obtenidos mediante la digestión con las mismas enzimas. La clonación del gen reportero fue corroborada por PCR directa sobre colonias. La presencia de un amplicón de 877pb fue observada en todos los clones confirmando la inserción del gen (**Figura 4-2c**), obteniendo de esta forma cuatro vectores: pENTR/D-

TOPO *EBE_{TAL14Xam}::GUS*, pENTR/D-TOPO *EBE_{TAL20Xam}::GUS*, pENTR/D-TOPO *EBE_{TAL22Xam}::GUS* y pENTR/D-TOPO *TriEBE::GUS*.

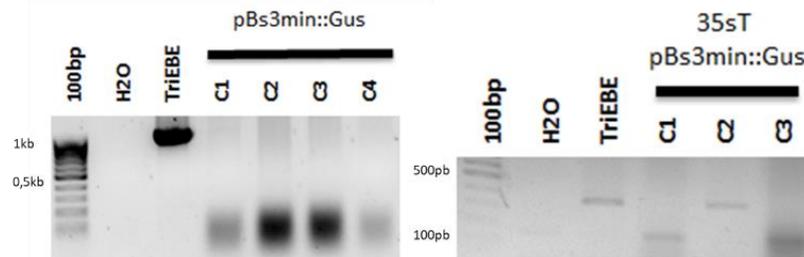
Por otro lado, con el objetivo de generar un constructo sin *EBEs* pero que contuviera las modificaciones del promotor *TriEBE* (sitios de corte) y pudiese ser empleado como control negativo, se deletionó *EBE_{TAL20Xam}* del vector pENTR/D-TOPO *EBE_{TAL20Xam}::GUS* mediante digestión enzimática con *XhoI*, obteniendo el constructo pENTR/D-TOPO *EBE₀::GUS* (**Figura 4-3**). Todas las colonias evaluadas fueron negativas por PCR para *EBE_{TAL20Xam}*, la ausencia de amplificación con los primers EBE20 Fw y Gusplusint Rv sobre las colonias transformadas con esta construcción, pero la amplificación en el vector de inicio permitió corroborar la deletión del *EBE_{TAL20Xam}*.

Figura 4-2. Construcción de promotores trampa. La inserción de los *EBEs* fue corroborada por PCR convencional con los primers M13Fw y M13Rv (a). La deletión de *UPT1* fue evidenciada por PCR directa con los primers M13Fw y M13Rv sobre colonias de los promotores *EBE_{TAL14Xam}* (b), *EBE_{TAL20Xam}*, *EBE_{TAL22Xam}* (c) y *TriEBE* (d). La inserción del gen *GUSplus* (e) y del 35sT (f) fue confirmada en los constructos por PCR directa sobre las colonias con los primers GusKpnI Fw y Gusplusint Rv, y los primers M13 Fw y 35STermNotI Rv, respectivamente. Las colonias evaluadas se denotan como C1, C2, C3 y C4.



Para terminar la construcción de los promotores trampa, el 35sT fue introducido corriente arriba del pBs3min en el sitio de corte de NotI en los plásmidos pENTR/D-TOPO $EBE_0::GUS$, pENTR/D-TOPO $EBE_{TAL14Xam}::GUS$, pENTR/D-TOPO $EBE_{TAL20Xam}::GUS$, pENTR/D-TOPO $EBE_{TAL22Xam}::GUS$ y pENTR/D-TOPO $TriEBE::GUS$ (**Figura S 7-1**). La inserción del terminador fue confirmada por PCR directa sobre colonias. Para todos los casos fue posible encontrar una colonia positiva caracterizada por la presencia de un amplicón de 370pb, representando una diferencia positiva de tamaño de los amplicones cercana a las 200pb en estos clones positivos frente a los clones en los que no parece haber una inserción, lo cual es concordante con el tamaño de 215pb que tiene el 35sT. Estos resultados muestran la correcta clonación del terminador en los vectores parentales dando lugar a los constructos pENTR/D-TOPO 35sT $EBE_0::GUS$ (**Figura 4-3**), pENTR/D-TOPO 35sT $EBE_{TAL14Xam}::GUS$, pENTR/D-TOPO 35sT $EBE_{TAL20Xam}::GUS$, pENTR/D-TOPO 35sT $EBE_{TAL22Xam}::GUS$ y pENTR/D-TOPO 35sT $TriEBE::GUS$ (**Figura 4-2b**).

Figura 4-3. Desarrollo de promotor sin $EBEs$. La delección de $EBE_{TAL20Xam}$ fue evidenciada mediante la PCR convencional directa sobre colonias con los primers EBE20 Fw y Gusplusint Rv. La correcta clonación del terminador se evidenció por PCR directa sobre colonias con los primers M13 Fw y 35STermNotI Rv. Las colonias evaluadas se denotan como C1, C2, C3 y C4.

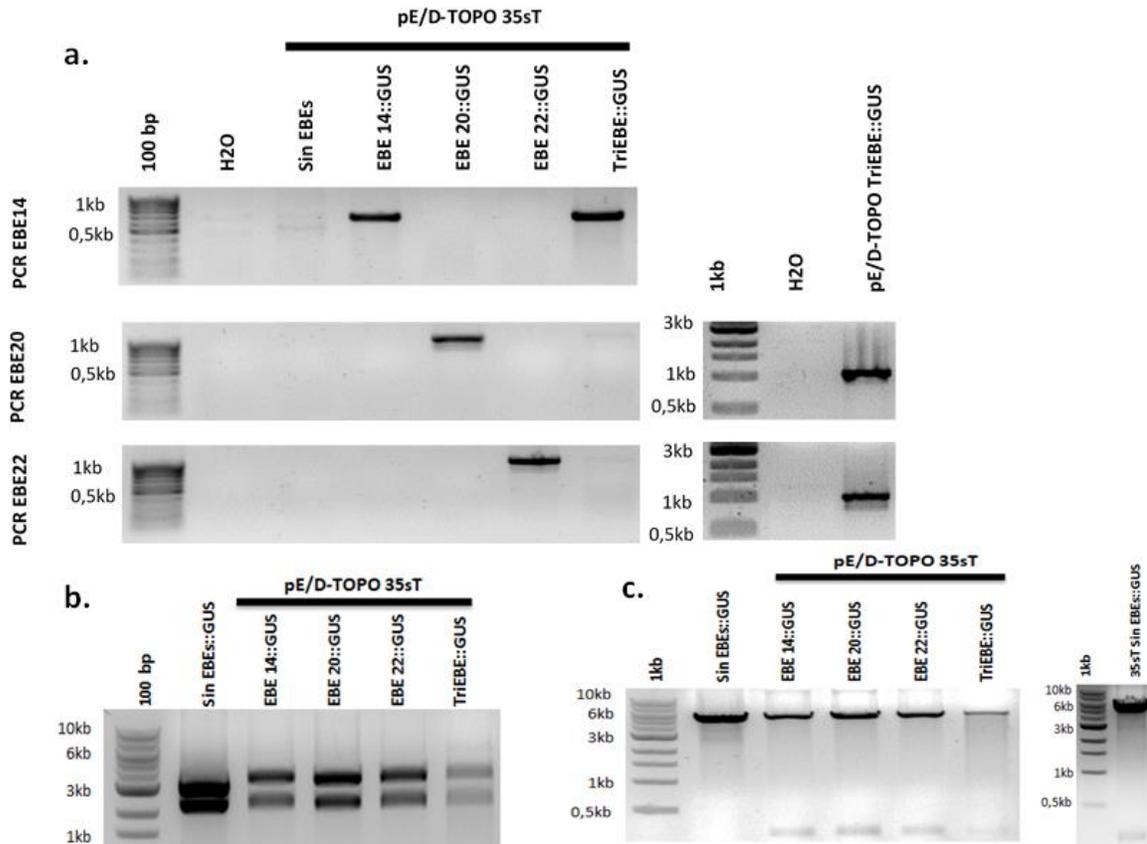


Con el objetivo de comprobar la identidad de los plásmidos extraídos a partir de los clones seleccionados por PCR directa sobre colonia, se evaluó la presencia de los $EBEs$, de GUS y del 35sT en las construcciones. La presencia de los $EBEs$ fue corroborada por PCR convencional específica para cada secuencia de unión (**Figura 4-4a**). En concordancia con el diseño de los promotores y los resultados obtenidos por PCR directa sobre colonias, la PCR de $EBE_{TAL14Xam}$ fue positiva para pENTR/D-TOPO 35sT $EBE_{14}::GUS$ y pENTR/D-TOPO 35sT $TriEBE::GUS$ presentando amplicones de aproximadamente de 660pb, la PCR de $EBE_{TAL20Xam}$ fue positiva para pENTR/D-TOPO 35sT $EBE_{20}::GUS$ y pENTR/D-TOPO 35sT $TriEBE::GUS$ con amplicones de aproximadamente 1070pb, y la PCR de $EBE_{TAL22Xam}$ fue positiva para pENTR/D-TOPO 35sT $EBE_{22}::GUS$ y pENTR/D-TOPO 35sT

TriEBE::GUS con amplicones de un tamaño cercano a 1000pb. En conjunto, estos resultados permiten confirmar la ausencia de EBEs en pENTR/D-TOPO 35sT *EBE₀::GUS*, la presencia de cada uno de los EBEs en sus correspondientes constructos *UniEBE* y la presencia de todos los EBEs en el promotor *TriEBE*.

Por otro lado, se obtuvo un amplicón de 660pb para el promotor *EBE₁₄::GUS* cuando se emplearon los primers específicos para esta construcción y no en las construcciones con el *EBE₂₀::GUS* o *EBE₂₂::GUS* (**Figura 4-4a** gel superior). La misma situación se presentó empleando los primers específicos para *EBE_{TAL20Xam}* y *EBE_{TAL22Xam}* en las construcciones correspondientes, presentando amplicones de 1070 y 1000pb, respectivamente (**Figura 4-4a** geles medio e inferior). En cuanto a la construcción *TriEBE::GUS*, si bien inicialmente no se logró amplificación de *EBE_{TAL20Xam}* y *EBE_{TAL22Xam}* (**Figura 4-4a** geles medio e inferior), al repetir la PCR se pudo demostrar la presencia de cada uno de los EBEs en el vector (**Figura 4-4a** geles a la derecha).

Figura 4-4. Evaluación de la identidad de los constructos. La correcta construcción fue comprobada sobre los plásmidos extraídos de clones positivos. La presencia de los EBEs en su correspondiente constructo fue verificada por PCR con los primers M13 Fw y EBE14 Rv para *EBE_{TAL14Xam}*, EBE20 Fw y Gusplusint Rv para *EBE_{TAL20Xam}*, y EBE22 Fw y Gusplusint Rv para *EBE_{TAL22Xam}* (a). La inserción de *GUSplus* (a) y 35sT (c) fue corroborada por digestión enzimática con KpnI y Ascl, y NotI, respectivamente.

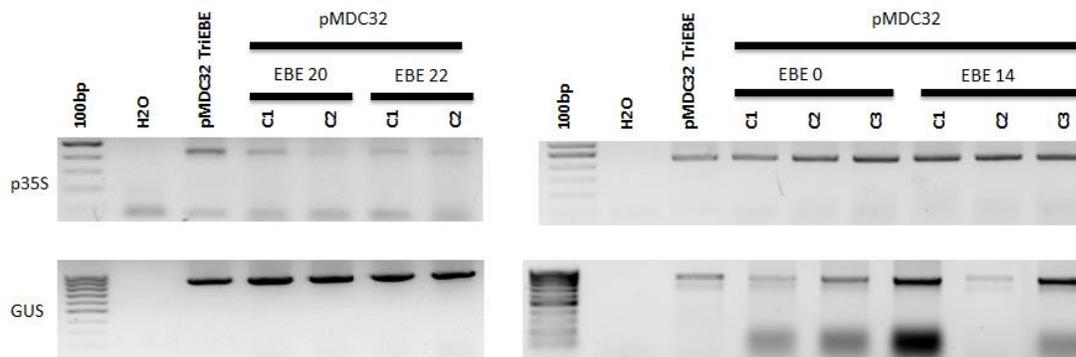


En cuanto a la presencia del gen *GUSplus* y el 35sT, se determinó el patrón de digestión de los plásmidos con las enzimas *KpnI* y *AscI* en el caso del gen reportero, y con *NotI* en el caso del terminador (**Figura 4-4b-c**). La doble digestión de los constructos con *KpnI* y *AscI* mostró un patrón de dos bandas de diferente tamaño, una de aproximadamente 2.5kb correspondiente al gen *GUSplus* y otra de mayor tamaño (3.5kb) que corresponde al vector sin el gen. pENTR/D-TOPO *EBE₀::GUS* presentó un tamaño sustancialmente más pequeño de la banda del vector debido a que no presenta las secuencias de 35sT (250pb) y tampoco los *EBEs* (**Figura 4-4b**). Por otro lado, la digestión con *NotI* en cada uno de los vectores generó un patrón de dos bandas, una pequeña con un tamaño de 250pb que representa el 35sT liberado de los constructos y otra de 6kb correspondiendo al vector sin el terminador (**Figura 4-4c**). En todos los constructos fueron observados ambos patrones de digestión indicando que todas las construcciones desarrolladas presentan el gen *GUSplus* y el 35sT. Lo anterior permitió corroborar la correcta construcción de cada uno de los plásmidos conteniendo los promotores trampa desarrollados en el vector de clonación pENTR-D/TOPO.

Recombinación de los promotores en pMDC32

Las construcciones de los promotores *UniEBE*, *TriEBE* y sin *EBEs* en el vector de clonación pENTR/D-TOPO (vectores de entrada) fueron transferidas al vector binario pMDC32 (vector de destino) por medio de una reacción de recombinación, para la expresión en planta. Con el fin de verificar la identidad de los constructos y evidenciar la recombinación en el vector de expresión se evaluó por PCR la presencia de p35s y GUS, empleando primers específicos para cada uno de ellos. Como se observa en la **Figura 4-5**, todas las colonias evaluadas presentaron un amplicón de 540pb correspondiente al p35s (**Figura 4-5** gel superior), este elemento no se encuentra presente en pENTR/D-TOPO pero si en el vector binario, lo que indica que en todos los clones se encuentra el vector pMDC32. Al igual que con el terminador, la totalidad de las colonias presentaron un amplicón de 877pb correspondiente al gen reportero GUS (**Figura 4-5** gel inferior). La presencia de GUS confirma la correcta transferencia de las construcciones en el vector binario (**Figura 4-5**).

Figura 4-5. Verificación de la recombinación en el vector binario pMDC32. La correcta recombinación de los constructos con el vector binario se verificó por PCR del p35s presente en el vector de destino con los primers p35s Fw y p35s Rv, y del gen *GUSplus* de las construcciones con los primers GusKpnI Fw y Gusplusint Rv. Las colonias evaluadas se denotan como C1, C2 y C3



4.2. Clonación de los efectores TAL

Digestión y ligación de los TALEs en pE/D-TOPO

Con el objetivo de evaluar la actividad de los promotores trampa se clonaron los TALEs 14, 20 y 22 en el vector binario pBAV139 partiendo de los efectores previamente clonados en el vector pSKX1. Para ello fue necesario primero introducir las repeticiones de cada

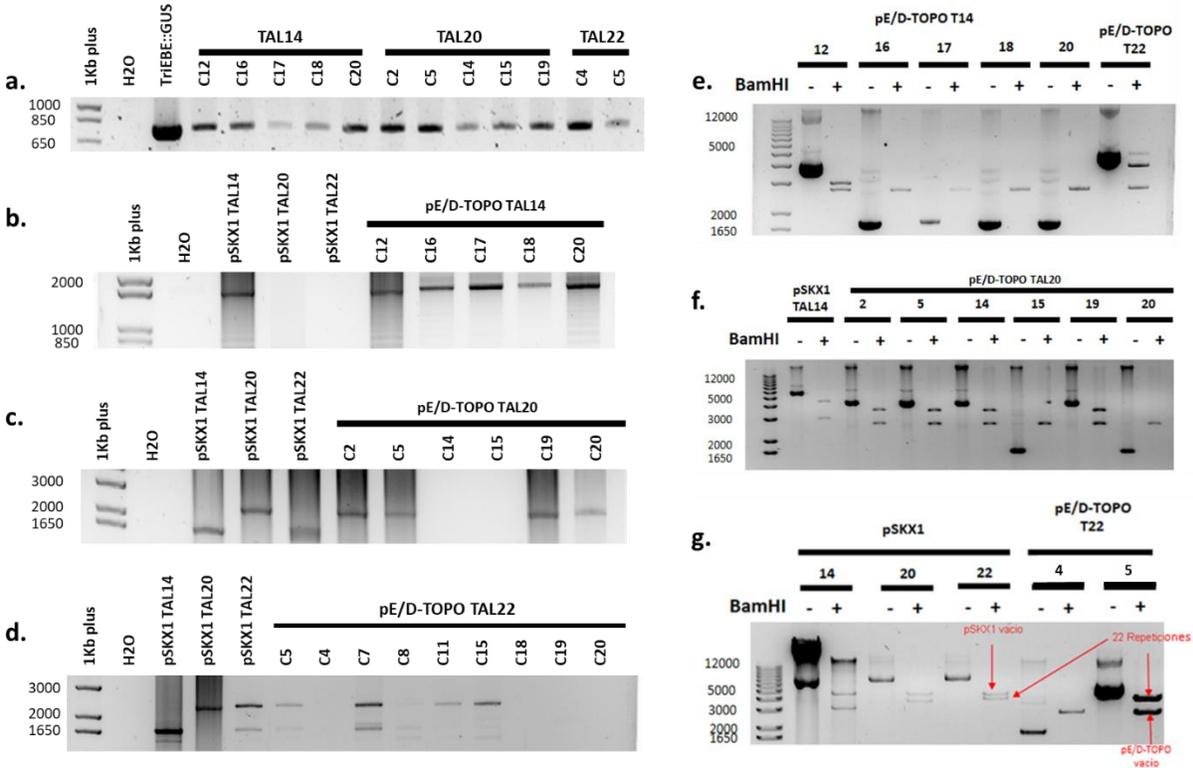
TAL en pENTR/D-TOPO y posteriormente mediante una reacción de recombinación transferirlos al vector pBAV139.

La inserción de la región central de repeticiones de los TALEs 14, 20 y 22, y su correcta ligación en el vector pENTR/D-TOPO fueron comprobadas por PCR sobre colonias del extremo C-terminal de los TALEs. En el caso de TAL14 y TAL20 se encontraron cinco y seis colonias presentando un amplicón de aproximadamente 750pb, mientras que solo se encontraron nueve colonias positivas con las repeticiones de TAL22 clonadas en pENTR/D-TOPO (**Figura 4-6a**). Estos resultados permitieron por un lado demostrar la presencia de las repeticiones y por otro la direccionalidad de la inserción corroborando que se encuentran en el sentido del marco abierto de lectura.

Por otro lado, la amplificación de las repeticiones de cada uno de los TALEs clonados permitió identificar la ausencia de bandas en algunas de las colonias que habían sido positivas en la PCR anterior. Sin embargo, en otras si se presentó el amplicón del tamaño esperado de 1.7kb, 2.3kb y 2.5kb para los TALEs 14, 20 y 22, respectivamente. En concreto, dos de los cinco clones de TAL14 mostraron el tamaño correcto de las repeticiones para este efector con un tamaño cercano a 1.6kb, cuatro de los seis clones de TAL20 fueron positivos con un tamaño de amplicón de 2.2kb y cuatro de los nueve clones de TAL22 presentaron el amplicón correspondiente de 2.4kb (**Figura 4-6b-d**). En este mismo sentido, la digestión enzimática con BamHI de los clones seleccionados permitió observar en algunos de ellos un patrón de dos bandas, una de 2.8kb que corresponde al vector pENTR/D-TOPO sin repeticiones y otra banda de 3.1kb en el caso de TAL14, 3.8kb con TAL20 y 4.0kb con TAL22. Este patrón de digestión indica una correcta clonación de la región central de repeticiones en pENTR/D-TOPO del clon 12 de TAL14, los clones 2, 5, 14 y 19 de TAL20, y el clon 5 de TAL22 (**Figura 4-6e-g**). Por otro lado, en el resto de los clones se presenta un patrón de digestión de una sola banda indicando la ausencia de las repeticiones o un error en la clonación, por lo cual estos clones fueron descartados.

Figura 4-6. Clonación de los TALEs en pENTR/D-TOPO. Se muestran los resultados de PCR sobre colonias del extremo C-terminal de los efectores con los primers ABUA4 Fw y M13Rv (a), las colonias se denotan con una C seguida de un número. PCR convencional sobre plásmidos con los primers Rep Fw y Rep Rv de la región central de repeticiones de los TALEs 14 (b), 20 (c) y 22 (d), los clones se denotan con una C seguida de un número.

Patrones de digestión con BamHI de los plásmidos extraídos de clones positivos para la inserción y direccionalidad de las repeticiones de los TALEs 14 (e), 20 (f) y 22 (g).



En conjunto, la correcta clonación de los efectores en pENTR/D-TOPO fue determinada por PCR sobre colonias. La identidad de los plásmidos extraídos a partir de las colonias positivas fue corroborada por PCR de las repeticiones y el patrón de digestión con BamHI encontrando un clon de pENTR/D-TOPO TAL14, cuatro clones de pENTR/D-TOPO TAL20 y un clon de pENTR/D-TOPO TAL22. Adicionalmente, los falsos positivos encontrados por PCR sobre colonias y PCR de las repeticiones sobre los plásmidos, indican que estos dos criterios no son suficientes para comprobar la clonación de los TALEs en pE/D-TOPO, siendo necesario evaluar el patrón de digestión de los constructos para confirmar su identidad.

Recombinación de los efectores en pBAV139

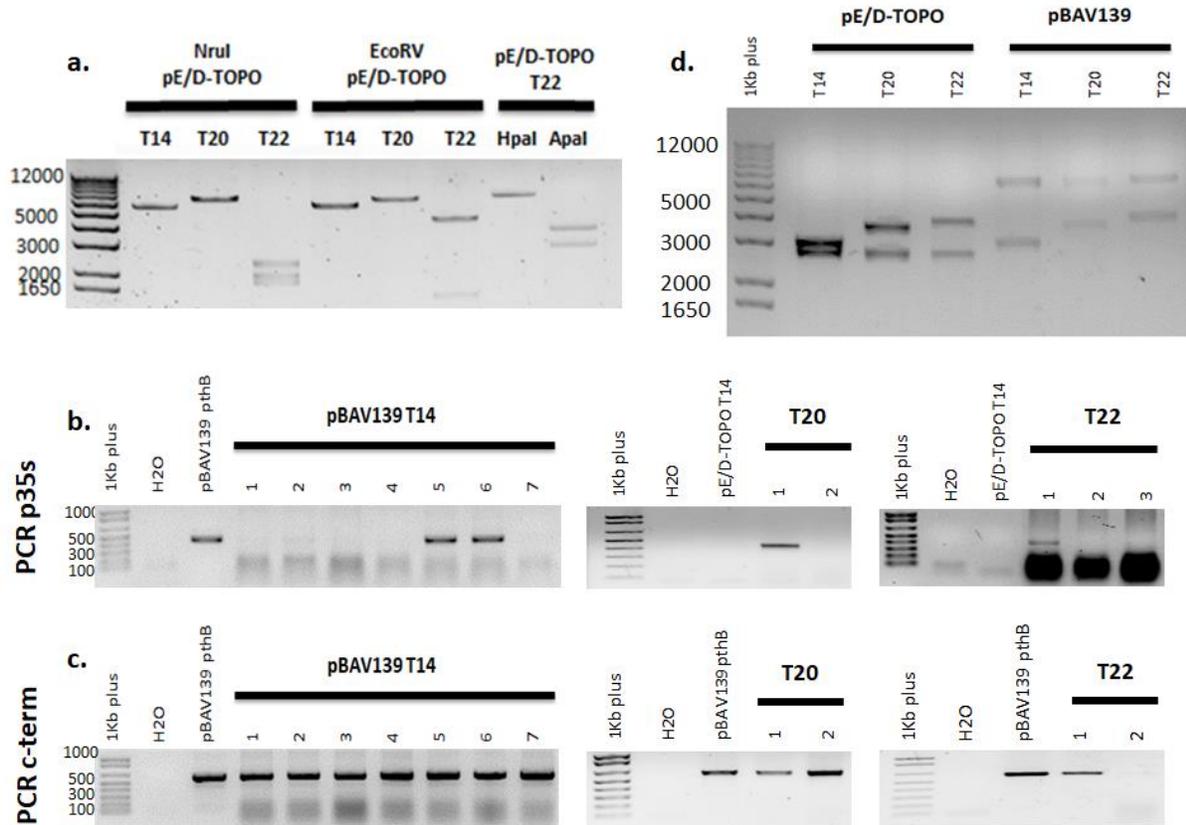
Los vectores pENTR/D-TOPO TAL14, pENTR/D-TOPO TAL20 y pENTR/D-TOPO TAL22 fueron linearizados, para lo cual se probaron enzimas de corte único en la secuencia de pENTR/D-TOPO. Las enzimas NruI y EcoRV mostraron ser de corte único para los constructos pENTR/D-TOPO TAL14 y pENTR/D-TOPO TAL20. Por otro lado, la digestión de pENTR/D-TOPO TAL22 con NruI, EcoRV y Apal muestran más de un corte en la

secuencia del vector, mientras que con la escisión de HpaI se observa un patrón de una sola banda, indicando que es de corte único en el plásmido (**Figura 4-7a**). Por lo cual, los constructos fueron linearizados con las enzimas NruI en el caso de TAL14 y TAL20, y HpaI en el caso de TAL22.

La recombinación con pBAV139 ccdB fue llevada a cabo con los productos de digestión linearizados de pENTR/D-TOPO TAL14, pENTR/D-TOPO TAL20 y pENTR/D-TOPO TAL22. A partir de las colonias obtenidas se realizó una PCR para amplificar el promotor 35S (p35s) dado a que este se encuentra en el vector de expresión, pero no en el vector de clonación. Como se muestra en la **Figura 4-7b** se observó un amplicón de 450pb en al menos una de las colonias evaluadas para cada uno de los TALEs. Al mismo tiempo en algunas de estas colonias también se comprobó la amplificación de un fragmento de 500pb con los primers que permiten amplificar la secuencia codificante del extremo C-terminal de los TALEs (**Figura 4-7c**).

Para confirmar la presencia de los TALEs en los plásmidos de los clones positivos para la recombinación, se realizó una digestión con BamHI. Como se muestra en la **Figura 4-7d**, los vectores de clonación muestran una banda de aproximadamente 2.8kb que corresponde al vector vacío de pENTR/D-TOPO, dicha banda desaparece en los vectores de expresión y en cambio de esta se observa otra con un tamaño cercano a 6.5kb, concordante con el tamaño del vector binario pBAV139 vacío. Por otro lado, al ser digeridos tanto los vectores de clonación como los de expresión muestran bandas de 3.1kb, 3.8kb y 4.0kb que corresponden a la región central de repeticiones de TAL14, TAL20 y TAL22, respectivamente. Estos resultados confirman la presencia de tres diferentes TALEs en los vectores parentales (pENTR/D-TOPO) y en el vector de destino (pBAV139). Estos resultados demuestran la correcta clonación de los efectores TAL14, TAL20 y TAL22 en pBAV139.

Figura 4-7. Recombinación de los efectores en pBAV139. Digestión enzimática de los vectores de clonación con los TALEs 14, 20 y 22 clonados (a). PCR de p35s con los primers p35s Fw y p35s Rv sobre colonias de bacterias transformadas con el producto de recombinación de los plásmidos linearizados en pBAV139 (b). PCR del gen *GUSplus* con los primers ABUA4 Fw y ABUA727 sobre colonias de bacterias transformadas con el producto de recombinación de los plásmidos linearizados en pBAV139 (c). Patrones de digestión con BamHI de los plásmidos extraídos de clones positivos para la recombinación en pBAV139, se compara con sus respectivos parentales en el vector pENTR/D-TOPO.



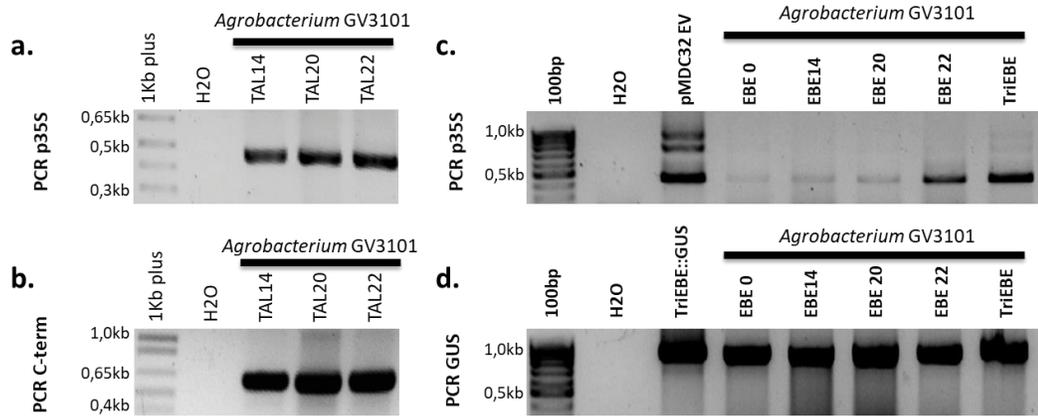
4.3. Evaluación funcional por expresión transitoria

Transformación de los constructos en *Agrobacterium tumefaciens*

Una vez la identidad de los plásmidos pMDC32 con los promotores sintéticos y de los plásmidos pBAV139 con los efectores fueron corroboradas (**Figura 4-5** y **Figura 4-7**), los constructos fueron transformados en *A. tumefaciens* para llevar a cabo experimentos de expresión transitoria en *N. tabacum*. Se verificó por PCR que las colonias obtenidas presentasen los vectores de los TALEs y de los promotores trampa. Las colonias transformadas con pBAV139 TAL14, pBAV139 TAL20 y pBAV139 TAL22 mostraron ser positivas para el p35s con un amplicón de 450pb y para el extremo C-terminal con un amplicón de 600pb (**Figura 4-8a-b**), siendo coherente con resultados previos (**Figura 4-7**). Por su lado, las colonias transformadas con los vectores pMDC32 35sT *EBE₀*::GUS, pMDC32 35sT *EBE_{TAL14Xam}*::GUS, pMDC32 35sT *EBE_{TAL20Xam}*::GUS, pMDC32 35sT *EBE_{TAL22Xam}*::GUS y pMDC32 35sT *TriEBE*::GUS presentaron la amplificación correspondiente al p35s con 450pb y al gen *GUSplus* de aproximadamente 850pb (**Figura**

4-8c-d), lo que es congruente con la identidad de los constructos la cual fue caracterizada previamente (**Figura 4-5**). Los resultados demuestran que las transformaciones de los constructos de expresión en planta tanto de los efectores como de los promotores fueron llevadas a cabo con éxito en *A. tumefaciens* cepa GV3101.

Figura 4-8. Confirmación de la transformación en *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación de los efectores y los promotores trampa fueron confirmadas sobre colonias de *A. tumefaciens* cepa GV3101. En (a) y (b) se muestran las amplificaciones sobre colonias de p35s con los primers p35s Fw y p35s Rv, y el extremo C-terminal de los TALEs con los primers ABUA4 Fw y ABUA727, respectivamente. La presencia de los promotores trampa clonados en pMDC32 fue confirmada por la PCR directa sobre colonias de p35s (c) con los primers p35s Fw y p35s Rv, y la amplificación del gen reportero GUS (d), con los primers GusKpnl Fw y Gusplusint Rv.



Actividad y especificidad de los promotores trampa

Con el fin de evaluar la actividad y especificidad de cada uno de los promotores trampa, se coinfiltraron hojas de *N. tabacum* con los clones de *A. tumefaciens* conteniendo los T-ADNs de los TALEs controlados por el p35s y las construcciones del gen *GUS* cuya expresión es modulada por los promotores trampa construidos (**Figura 3-2 y Figura 4-9**).

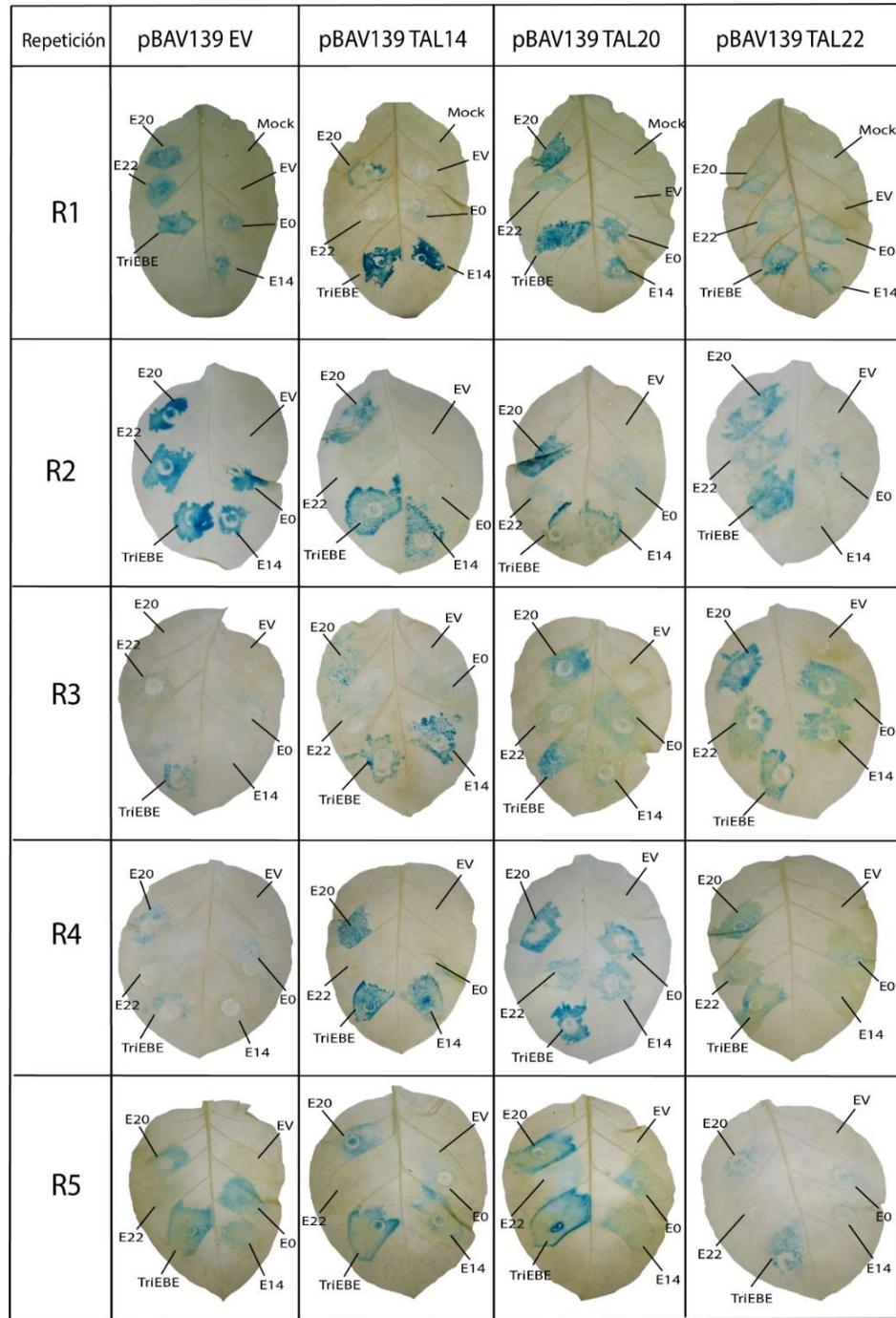
En todas las réplicas biológicas de hojas coinfiltradas con bacterias conteniendo el vector pBAV139 EV se evidenció la actividad transcripcional de los promotores trampa, cuya intensidad varió en función de la repetición (**Figura 4-9**). Esto sugiere que las construcciones generadas presentan una actividad basal de la expresión del gen *GUSplus* en ausencia de un TALE. En las hojas coinfiltradas con bacterias que poseen la construcción conteniendo el TAL14 se observa un patrón en el que destaca la alta intensidad del color azul cuando se coinfiltró con *Agrobacterium* presentando los promotores *EBE₁₄::GUS*, *EBE₂₀::GUS* y *TriEBE::GUS* en comparación al resto de

construcciones, lo cual indica una mayor actividad transcripcional mediada por la interacción específica de TAL14 con $EBE_{TAL14Xam}$ y de manera inesperada con $EBE_{TAL20Xam}$ (**Figura 4-9**). En este mismo sentido, la coinfiltración con bacterias conteniendo el efector TAL20 muestra una mayor intensidad de la coloración con los promotores $EBE_{20}::GUS$ y $TriEBE::GUS$ respecto al resto, sugiriendo que la actividad transcripcional de las construcciones $EBE_{20}::GUS$ y $TriEBE::GUS$ es potenciada por la interacción entre TAL20 y $EBE_{TAL20Xam}$ (**Figura 4-9**). Al contrario que con los otros efectores, el TAL22 no parece generar una actividad potenciada sobre ninguno de los promotores, mostrando un patrón de coloración similar al de hojas infiltradas con bacterias conteniendo el vector pBAV139 EV (**Figura 4-9**).

En general, una alta variación en la intensidad del color azul fue observada entre repeticiones de un mismo tratamiento, a pesar de que se conserva el patrón (**Figura 4-9**). Esto sugiere que los tabacos presentaron distintas intensidades en la expresión génica, pero que conservaron las proporciones de la actividad de los promotores entre sí, manteniendo un mismo patrón. Para cuantificar la actividad de los promotores trampa mediante un método indirecto fue necesario tener en cuenta esta variación, por lo cual la actividad de los promotores como medida indirecta de la intensidad de la coloración se determinó a partir de datos de saturación media relativizados respecto al valor de $EBE_0::GUS$ de cada hoja (**Ecuación 3-1**) y normalizados respecto a la media y la desviación estándar de cada repetición (**Ecuación 3-2**).

Figura 4-9. Evaluación funcional de la actividad de los promotores trampa. Se muestran las fotografías de hojas infiltradas con los promotores $EBE_0::GUS$ (E0), $EBE_{TAL14Xam}::GUS$ (E14), $EBE_{TAL20Xam}::GUS$ (E20), $EBE_{TAL22Xam}::GUS$ (E22) y $TriEBE::GUS$ (TriEBE). Como control negativo de actividad se empleó a pMDC32 EV(EV). En la primera columna se presentan los resultados de las hojas coinfiltradas con pBAV139 EV, en la segunda, tercera y cuarta columna se muestran los resultados de hojas coinfiltradas con los TALEs 14, 20 y 22, respectivamente. El experimento fue repetido cinco veces en el tiempo, con diferentes plantas de tabaco y distintas colonias de los clones de

Agrobacterium, en cada fila se presentan los resultados de cada repetición las cuales se designan como R1, R2, R3, R4 y R5.



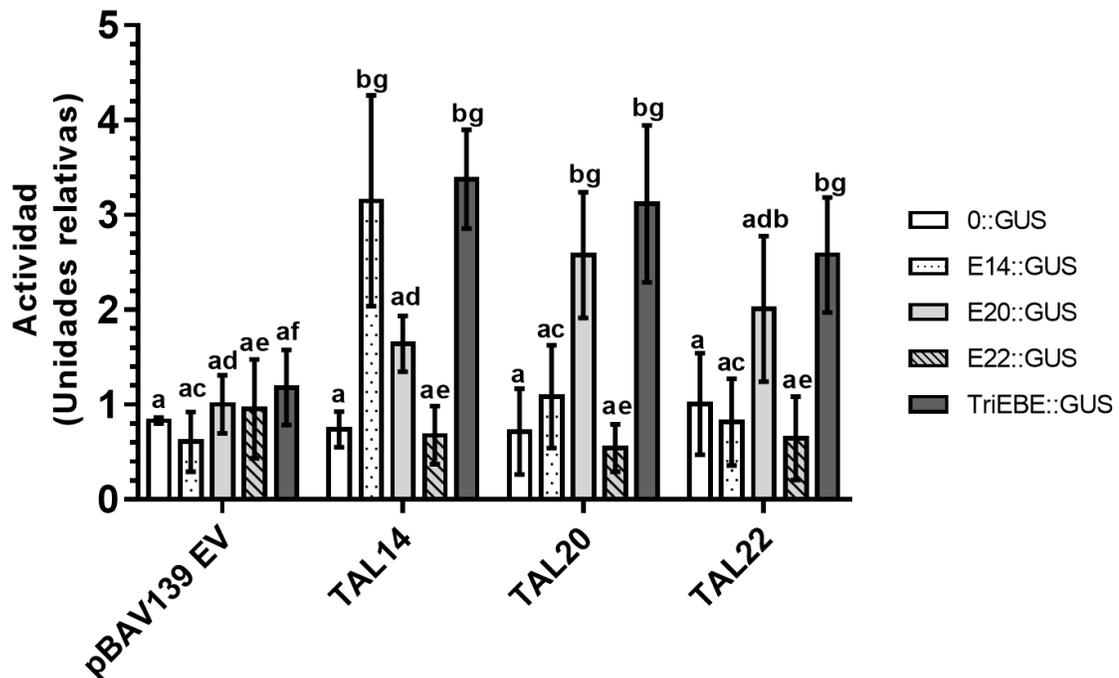
Las hojas coinfiltradas con *Agrobacterium* que poseen la construcción conteniendo el TAL14 presentaron una mayor actividad transcripcional cuando se coinfiltró con bacterias presentando las construcciones de los promotores *EBE₁₄::GUS*, *EBE₂₀::GUS* y *TriEBE::GUS* llegando a ser 3.1, 1.6 y 3.4 veces mayor que *EBE₀::GUS* en promedio,

respectivamente (**Figura 4-10**). No obstante, para el caso de *EBE₂₀::GUS* no se observaron diferencias significativas respecto a *EBE₀::GUS* (valor-*p* = 0.4165). A su vez, la actividad transcripcional controlada por los promotores *EBE₁₄::GUS* y *TriEBE::GUS* al ser coexpresados con TAL14 fueron significativamente mayores a la alcanzadas por estos mismos promotores tratados con pBAV139 EV. La intensidad de la actividad modulada por el promotor *EBE₂₀::GUS* no presenta diferencias apreciables entre los tratamientos con pBAV139 EV y la expresión transitoria del TAL14 (**Figura 4-10**). Estos resultados sugieren que el TAL14 es capaz de activar transcripcionalmente a los promotores *EBE₁₄::GUS* y *TriEBE::GUS*, y esta inducción es superior a la que se observa empleando el promotor pBs3min (*EBE₀::GUS*). Aunque la expresión transitoria del TAL14 logra inducir la expresión del gen *GusPlus* cuando se emplea la construcción *EBE₂₀::GUS*, ésta es menor que la descrita anteriormente.

Al ser coexpresados con el TAL20, los promotores *EBE₂₀::GUS* y *TriEBE::GUS* presentaron 2.6 y 3.1 veces mayor actividad transcripcional que la observada cuando se emplea *EBE₀::GUS*, respectivamente (**Figura 4-10**). Lo anterior permite inferir que el TAL20 es capaz de activar la transcripción específicamente en presencia de los promotores *EBE₂₀::GUS* y *TriEBE::GUS*, lo cual se ve reflejado en el aumento de la intensidad del color azul en comparación al resto de promotores tratados con el mismo TAL y de esos mismos tratamientos cuando son coinfiltrados con pBAV139 EV.

El TAL22 a diferencia de los otros efectores no muestra una activación transcripcional específica del promotor trampa *UniEBE* que contiene su sitio de unión (*EBE₂₂::GUS*). La mayor expresión del gen reportero evidenciada por la coloración azul más intensa se obtuvo cuando se emplearon las construcciones con los promotores *EBE₂₀::GUS* y *TriEBE::GUS*, con valores de 2.0 y 2.6 veces por encima de *EBE₀::GUS* en promedio (**Figura 4-10**). No obstante, la expresión transitoria del TAL22 no fue capaz de activar la expresión del gen reportero con ninguno de los promotores indicado por una ausencia de diferencias significativas en la intensidad de la coloración al compararla con el tratamiento con pBAV139 EV (**Figura 4-10**). Estos resultados sugieren que los aumentos en intensidad cuando se emplean *EBE₂₀::GUS* y *TriEBE::GUS* coexpresados con TAL22 entran en la variación propia de la actividad basal de dichos promotores. Por lo cual, es posible afirmar que TAL22 no es capaz de activar efectivamente los promotores trampa *EBE₂₀::GUS* y *TriEBE::GUS*.

Figura 4-10. Actividad de los constructos coinfiltrados con los TALEs 14, 20 y 22. Se muestra la cuantificación de la actividad de los promotores trampa respecto a la obtenida con $EBE_0::GUS$ ($0::GUS$), las barras de error indican la desviación estándar. La letra “a” indica las comparaciones de las medias de los tratamientos con $EBE_0::GUS$ sin diferencias apreciables ($p \geq 0.05$), la letra “b” representa diferencias significativas entre las medias de los tratamientos y la de $0::GUS$ ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey. Diferencias no significativas en la media de la actividad de los promotores $EBE_{14}::GUS$ ($E14::GUS$), $EBE_{20}::GUS$ ($E20::GUS$), $EBE_{22}::GUS$ ($E22::GUS$) y $TriEBE::GUS$ coinfiltrados con pBAV139 EV y con los TALEs se denota como “c”, “d”, “e” y “f”, respectivamente. La letra “g” indica diferencias significativas ($p < 0.05$) en la media de la actividad de los promotores coinfiltrados con los TALEs en comparación a cuando son coinfiltrados con pBAV139 EV, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.



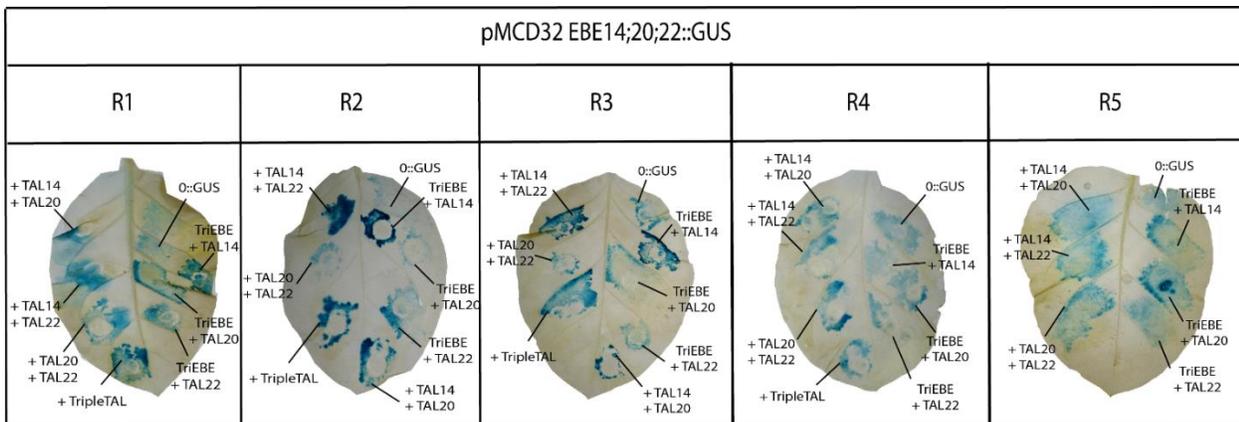
En conjunto, los resultados del experimento de actividad y especificidad de los promotores trampa muestran que la expresión transitoria de los efectores TAL14 y TAL20 es capaz de inducir la expresión del gen reportero cuando se coinfiltran con los promotores $EBE_{14}::GUS$ y $EBE_{20}::GUS$, respectivamente. La expresión de otros TALEs diferentes en algunos casos pueden inducir una leve actividad, pero es muy baja, lo que sugiere una alta especificidad en la interacción para la activación transcripcional. No fue posible evidenciar la activación de la transcripción cuando se empleó la construcción $EBE_{22}::GUS$ mediada por la expresión transitoria del TAL22. Por otro lado, cualquiera de los tres TALEs son capaces de activar la expresión en presencia del promotor $TriEBE$, aunque de manera no significativa por TAL22. Adicionalmente, la expresión del gen reportero en presencia de los

promotores UniEBE y TriEBE presenta un gradiente de intensidad, siendo más fuerte cuando se expresa el TAL14, media con TAL20 y débil o nula con el TAL22 (**Figura 4-10**).

Efecto de múltiples EBEs en la actividad del promotor TriEBE

Con el objetivo de determinar un posible efecto en la activación de la expresión empleando el promotor *TriEBE* debido a la interacción simultánea con más de un efector, hojas de *N. tabacum* fueron infiltradas con los efectores TAL14, TAL20 y TAL22, y sus distintas combinatorias en grupos de dos y tres, en estas mismas hojas se infiltró *Agrobacterium* presentando el vector con el promotor *TriEBE* (**Figura 4-11**). Concordante con los resultados obtenidos previamente, se observó actividad transcripcional del promotor *TriEBE* al ser coexpresado cada uno de los tres efectores, lo cual se evidencio en una mayor intensidad de la coloración azul en comparación con *EBE₀::GUS*. Igualmente, las combinaciones de dos y tres efectores mostraron promover la activación transcripcional de la construcción con el promotor *TriEBE*.

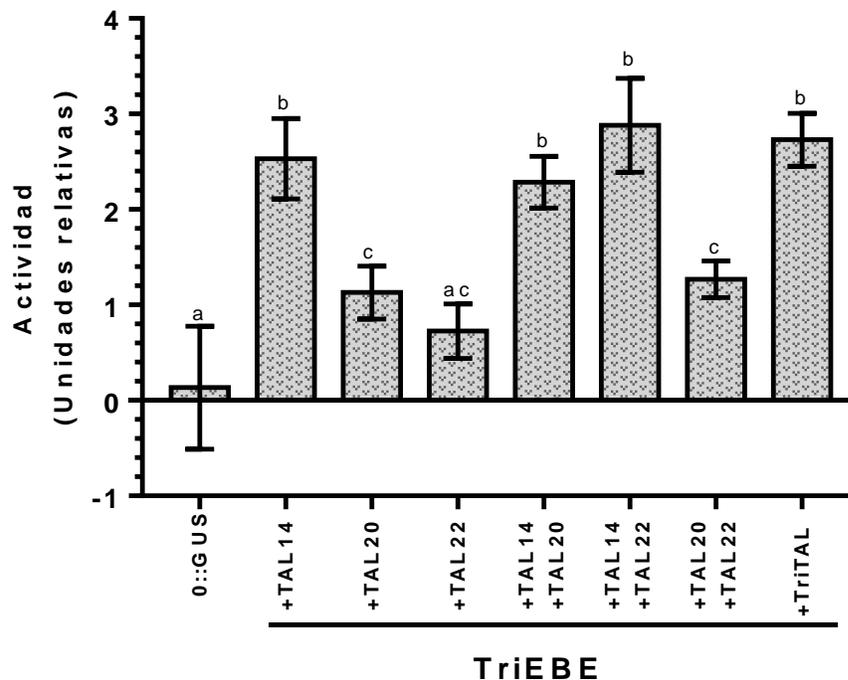
Figura 4-11. Evaluación de la actividad del promotor *TriEBE*. Hojas de *N. tabacum* fueron coinfiltradas con los TALEs 14, 20 y 22 en combinatorias de dos y tres. Sobre las infiltraciones se ingresó el promotor *TriEBE::GUS*. La actividad de *EBE₀::GUS* se tomó como la actividad basal de pBs3min en cada hoja en particular. E: EBE. T: TALE



La expresión transitoria de cada uno de los efectores junto con la infiltración de las bacterias con la construcción del promotor *TriEBE* muestra la activación de la transcripción del gen reportero en presencia de TAL14, TAL20 y en menor medida con el TAL22 (**Figura 4-11**). Como se evidenció previamente, la activación transcripcional empleando el promotor *TriEBE* es fuerte con el TAL14, media con el TAL20 y débil con el TAL22. Solo se presentaron diferencias significativas respecto a la actividad basal de pBs3min (*EBE₀::GUS*) con los TALEs 14 y 20 (**Figura 4-10** y **Figura 4-11**).

Por otro lado, la fuerte activación de la expresión del gen reportero alcanzada cuando se empleó el promotor *TriEBE::GUS* con TAL14+TAL20 y TAL14+TAL22 fue similar a la observada con la expresión transitoria de TAL14, con una leve disminución en la primera dupla y un ligero aumento con la segunda, pero sin diferencias significativas con la expresión en solitario del TAL14. En el caso de TAL20+TAL22 se presenta una intensidad muy similar a la alcanzada con la infiltración simple de TAL20, con una intensidad media (**Figura 4-11 y 12**). Finalmente, al igual que con las duplas que presentan el TAL14, la coexpresión de los tres TALEs (TriTAL) junto con la infiltración de *Agrobacterium* que contiene la construcción *TriEBE* presento una fuerte activación, de magnitud similar a la obtenida con la expresión simple de TAL14, con un ligero aumento, pero sin representar una diferencia significativa respecto a esta (**Figura 4-11 y 12**).

Figura 4-12. Efecto de múltiples TALEs en la actividad del promotor *TriEBE*. Se muestra la cuantificación de la actividad del promotor *TriEBE* coinfiltrado con diferentes combinatorias de TALEs respecto a la actividad basal del pBs3min (*EBE₀::GUS*). Las barras de error indican la desviación estándar. La letra “a” indica las comparaciones de las medias con respecto a *EBE₀::GUS* sin diferencias apreciables ($p \geq 0.05$), las letras “b” y “c” representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos y la de *EBE₀::GUS* ($p < 0.0001$ y $p < 0.05$, respectivamente) de acuerdo con la prueba de Tukey.



En general, la actividad transcripcional empleando el promotor *TriEBE::GUS* asociada a la presencia de múltiples efectores, alcanzó la misma magnitud obtenida con la expresión

individual de los TALEs 14 y 20. De esta manera, las mezclas de TALEs presentando el TAL14 no superaron de manera significativa el valor obtenido con la presencia única de TAL14, así mismo la dupla TAL20+TAL22 no superó la magnitud de la intensidad de la coloración resultante por la presencia única de TAL20 (**Figura 4-12**). Estos resultados indican que la activación transcripcional del promotor *TriEBE* no cambia por la interacción simultánea con múltiples TALEs.

4.4. Aproximación teórica a la obtención de EBEs genéricos

Búsqueda y selección de EBEs genéricos

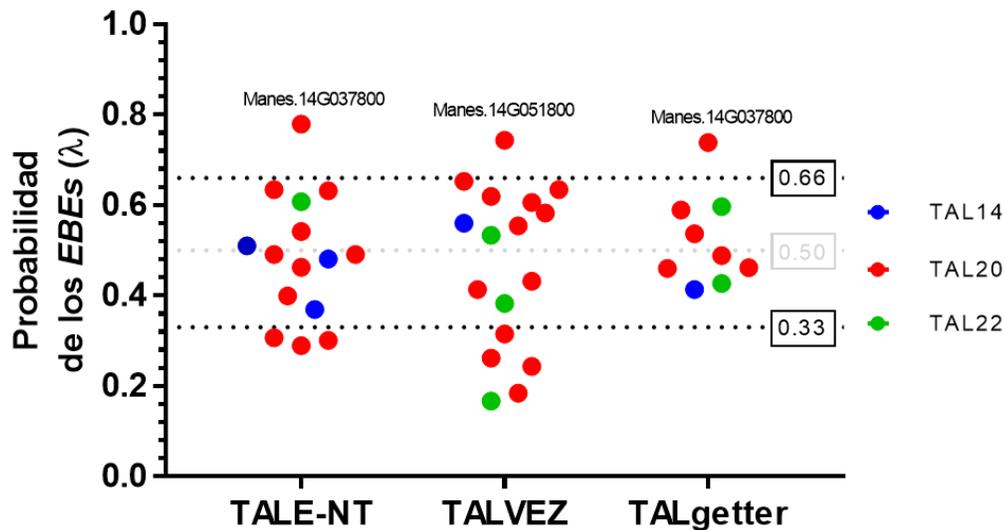
Considerando que una cepa de *Xam* puede albergar varios TALEs con diferentes variantes comportándose como familias diferentes de acuerdo con su afinidad por una secuencia de nucleótidos en particular, se llevó a cabo el planteamiento del diseño de *EBEs* genéricos que permitan la unión de diferentes variantes de las familias de los efectores TAL14, TAL20 y TAL22. Para la obtención de secuencias de unión específicas para una familia de efectores en concreto, pero con una afinidad amplia por todas las variantes de dicha familia, se desarrolló una aproximación matemática basada en datos de expresión diferencial en yuca asociados a la presencia de TAL14, TAL20 y TAL22, y la predicción bioinformática de *EBEs* para los tres efectores en promotores de genes sobreexpresados por cepas de *Xam* (Mora, 2017).

El análisis transcriptómico de plantas de yuca inoculadas con las cepas *Xam681*, *Xam1061* y *Xam394* permitió la identificación de alrededor de 607 genes expresados diferencialmente en común (Mora, Cassava Genome Hub). De este conjunto de genes, 349 son sobreexpresados en respuesta a estas cepas y de los cuales, 31 se pueden asociar con la presencia del TAL14 en las tres cepas; 106 genes con el TAL22 en las cepas *Xam681* y *Xam1061*; y 212 genes con la presencia del TAL20 que se encuentra en la cepa *Xam681* (**Figura 3-3 y Figura 4-14**). Tan solo cuatro y seis *EBEs* fueron predichos en genes cuya sobreexpresión se asocia a la presencia de TAL14 y TAL22, respectivamente. Por otro lado, se encontraron 21 secuencias predichas en genes sobreexpresados en asociación con la presencia de TAL20 (**Tabla S 7-1**).

Los *EBEs* predichos dentro de los promotores de los genes sobreexpresados fueron utilizados para construir logos de las secuencias con mayor probabilidad de unión a los

TALES 14, 20 y 22 (Tabla S 7-1 y Figura 4-14). Para la construcción de los logos, se estimó la probabilidad (λ) de cada secuencia predicha de acuerdo con su posición según el algoritmo predictivo empleado (*Rank*) y datos de expresión diferencial de cada uno de los genes con las secuencias predichas (Mora, 2017) (Ecuación 3-3 y Tabla S 7-1). En general, de un total de 41 predicciones de los *EBEs* mediante los algoritmos TALE-NT, TALVEZ y TALgetter 30 presentaron una probabilidad dentro de un rango medio (0.33-0.66), de las cuales 14 tienen una probabilidad por debajo de 0.5 (rango medio bajo) y 16 se estima tienen una probabilidad superior a 0.5 (rango medio alto) (Figura 4-13).

Figura 4-13. Distribución de la probabilidad de *EBEs* predichos en genes sobreexpresados. Se muestra la probabilidad estimada para los *EBEs* predichos en genes sobreexpresados por cada uno de los algoritmos empleados. En la gráfica cada punto corresponde a un *EBE* predicho en el promotor de uno de los genes sobreexpresados. Los colores azul, rojo y verde de los puntos indican que la sobreexpresión de los genes se relacionó a la presencia de TAL14, TAL20 y TAL22, respectivamente. Las líneas negras punteadas demarcan los límites entre los rangos de probabilidad bajo (inferior a 0.33), medio (0.33-0.66) y alto (mayor a 0.66). La línea gris punteada se muestra como punto de referencia para la probabilidad de 0.50.

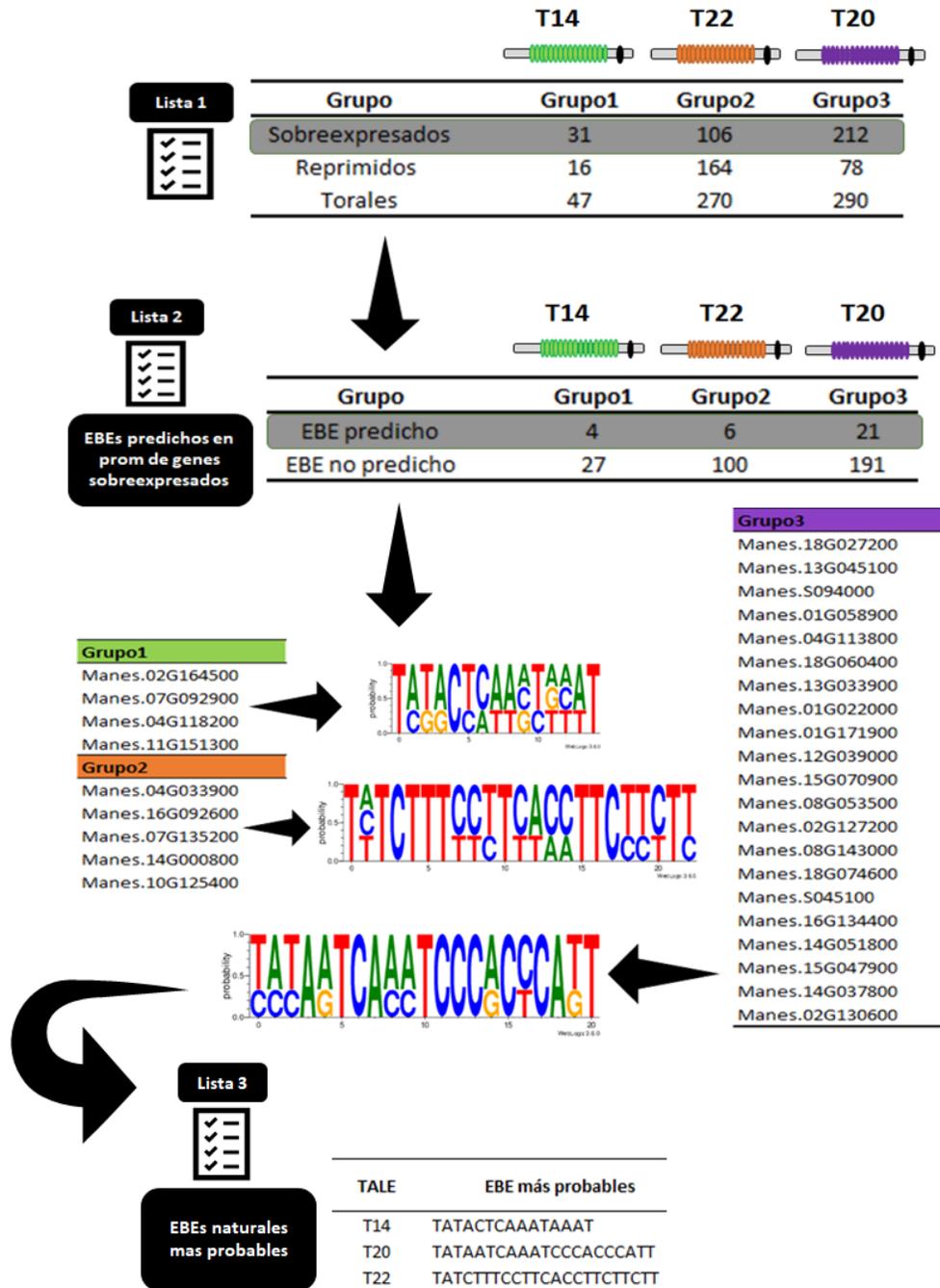


Las predicciones de los *EBEs* de TAL14 tienden a ser bajas dentro del rango medio, solo presentando una mayor probabilidad los *EBEs* predichos en los genes *Manes.07G092900* y *Manes.04G118200*. En cuanto a las predicciones de los *EBEs* de TAL20 se distribuyen en todos los rangos, tendiendo a mostrar una probabilidad dentro del rango medio. Sobre estas, destacan los *EBEs* del TAL20 presentes en los promotores de los genes *Manes.14G037800* (TALE-NT, TALgetter) y *Manes.14G051800* (TALVEZ) con una alta

probabilidad de la predicción (mayor a 0.66). Con relación a las predicciones de los *EBEs* de TAL22, tienden a presentar una baja probabilidad, pero en los genes *Manes.04G033900* y *Manes.07G135200* se muestran altas en el rango medio (mayor a 0.5) (**Figura 4-13 y Tabla S 7-1**).

A partir de los resultados de probabilidad de las predicciones de los *EBEs* se construyeron los consensos de las secuencias de unión a los efectores TAL14, TAL20 y TAL22 por cada uno de los algoritmos de predicción, teniendo en cuenta que las secuencias predichas con mayor probabilidad presentarían un mayor peso, los consensos fueron empleados para construir los logos de los *EBEs* para los TALEs 14, 20 y 22. De esta forma, los logos indicados en la **Figura 4-14** corresponden a las secuencias teóricas que se generan como resultado del consenso de los *EBEs* predichos más probables para distintas variantes de los TALEs 14, 20 y 22, adquiriendo un carácter genérico que en teoría le permitiría generar una interacción con la mayoría de los subtipos de TALEs 14, 20 y 22, favoreciendo así un reconocimiento de amplio espectro para diferentes cepas de *Xam*.

Figura 4-14. Obtención de *EBEs* genéricos para los TALEs 14, 20 y 22. Los *EBEs* más probables fueron obtenidos a partir de datos de expresión diferencial de genes de yuca y la correlación con la presencia de TALEs junto con la predicción de *EBEs* en promotores de genes sobreexpresados.



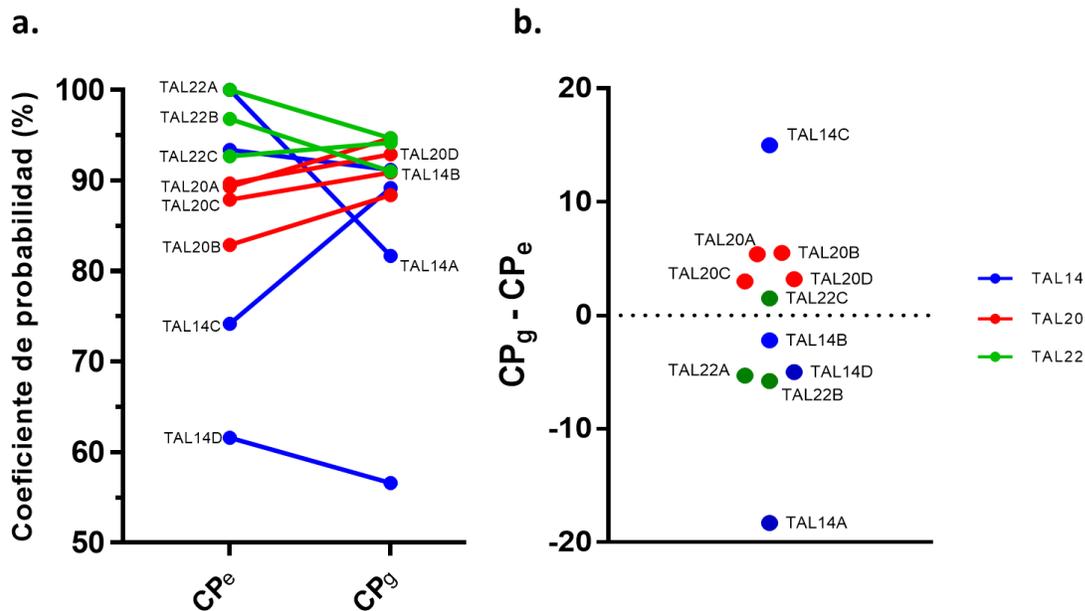
Determinación de la probabilidad de unión a los TALEs

Con el fin de determinar la capacidad de unión de los EBEs genéricos y los empleados para los experimentos de expresión transitoria, se estimó la probabilidad de unión de las diferentes variantes de los TALEs 14, 20 y 22 de los aislamientos colombianos, cuyas secuencias de RVDs fueron determinadas por Zárate (no publicado). Para esto se realizó un análisis comparativo de la capacidad de unión de los EBEs genéricos (CP_g) y los EBEs

experimentales (CP_e) respecto a la capacidad de unión de un *EBE* específico con la probabilidad máxima de unión de una variante particular de un TAL.

En general, las distintas variantes de los TALEs muestran una capacidad de unión porcentual a los *EBEs* experimentales ampliamente variable respecto al máximo teórico, alcanzando unos valores por encima de 90% con todos los subtipos de TAL22, TAL14A y TAL14B. El CP_e a los distintos *EBEs* experimentales fue estimado entre 74.1 y 100%, a excepción de la capacidad de unión de TAL14D cuya secuencia difiere mucho del resto de variantes de TAL14 (**Figura S4-1**). Particularmente, los efectores TAL14B (93.4%), TAL20C (87.9%) y TAL22B (96.8%) los cuales fueron empleados en los experimentos de expresión transitoria presentan una capacidad de unión teórica bastante alta a los *EBEs* experimentales (**Figura 4-15a**).

Figura 4-15. Coeficiente de la probabilidad de unión de los TALEs 14, 20 y 22 a los *EBEs*. La variación en los coeficientes de probabilidad de los *EBEs* genéricos (CP_g) respecto a los *EBEs* experimentales (CP_e) es mostrada con los valores netos (a) y en forma de diferencia (b).



Por otro lado, las variantes de los TALEs presentaron una menor variación en la capacidad de unión porcentual a los *EBEs* genéricos, tendiendo a centrarse alrededor del 90% y presentando un rango entre 81.7% y 94.7%, excluyendo a TAL14D (**Figura 4-15a**). A pesar de que las variantes de los efectores no alcanzan la máxima capacidad de unión a sus respectivos *EBEs* genéricos, en general presentan un coeficiente de probabilidad que favorece la unión de las distintas versiones de los TALEs, aumentando la capacidad de

unión a todas las versiones de TAL20, TAL14C y TAL22C (**Figura 4-16b**). Por lo cual, los *EBEs* genéricos obtenidos se plantean como secuencias de unión teóricas más adecuadas para el reconocimiento de múltiples versiones de los TALEs 14, 20 y 22.

5. Discusión

Los TALEs son factores de patogenicidad que se han asociado ampliamente con la especificidad a los hospederos y la virulencia de las especies del género *Xanthomonas* (Boch et al., 2014; Xu et al., 2017). La alta frecuencia de los genes *tal* en una gran diversidad de cepas de bacterias del género ha puesto de manifiesto la importancia de estos efectores para el *fitness* de los patógenos, perfilándose como un posible blanco para el control de enfermedades causadas por especies de *Xanthomonas* (Pérez-Quintero & Szurek, 2019). Los promotores trampa han sido desarrollados como una herramienta biotecnológica basada en la interacción entre los TALEs y sus correspondientes EBEs presentes en los genes blanco del hospedero, para ejecutar los mecanismos de defensa vegetal en presencia del patógeno (Díaz, 2016; Hummel et al., 2012; Romer, Recht, et al., 2009; Shantharaj et al., 2016). En este estudio se llevó a cabo la construcción y la prueba de concepto de un promotor trampa para generar resistencia a cepas de *Xam* conteniendo los TALEs 14, 20 o 22.

Construcción de los promotores trampa

El desarrollo del promotor trampa se llevó a cabo utilizando como promotor base al pBs3min, el cual fue modificado mediante una serie de clonaciones y mutagénesis para insertar los EBEs, el 35sT y el gen reportero *Gusplus* (**Figura 4-2** y **Figura 4-3**). Con anterioridad se ha empleado el sistema de mutagénesis dirigida para modificar promotores base con el fin de insertar secuencias de unión reconocidas por TALEs (Romer, Recht, et al., 2009; Shantharaj et al., 2016). Este sistema ha mostrado ser útil pero poco versátil en comparación a sistemas de clonación tradicional que permiten introducir o eliminar secuencias en el promotor sintético por medio de digestiones enzimáticas (Hummel et al., 2012). En este estudio, el pBs3min fue modificado al usar un sistema combinado empleando la mutagénesis dirigida para introducir los EBEs y la clonación con enzimas de restricción para posteriormente insertar o eliminar EBEs en la construcción (**Figura S 7-1**), lo que hace de esta estrategia de clonación un sistema más flexible que permite el

intercambio e incorporación de nuevos EBEs al promotor trampa sin necesidad de amplificar todo el constructo, minimizando el tiempo necesario para llevar a cabo el protocolo.

Actividad transcripcional no específica

El pBs3min se ha empleado previamente para la construcción de promotores trampa en sistemas heterólogos, demostrando ser funcional en *N. benthamiana* (L. Li et al., 2013; Romer, Recht, et al., 2009), cítricos (Shantharaj et al., 2016) y yuca (Díaz, 2016). A partir de las pruebas realizadas en este trabajo, por medio de expresión transitoria se corroboró el funcionamiento del promotor trampa en *N. tabacum*, evidenciando que el pBs3min presenta una leve, pero notoria actividad basal en ausencia de los TALEs evaluados. Este tipo de situación se ha reportado para *N. benthamiana* por medio de expresión transitoria, en yuca a través de la expresión transitoria y estable de la construcción, y en cítricos en experimentos que combinan la expresión transitoria de un promotor trampa con la inoculación de cepas de *X. citri* que presentan un variado repertorio de TALEs (Castiblanco et al., 2013; Díaz, 2016; Shantharaj et al., 2016). En cítricos se atribuyó la actividad basal del promotor trampa a otras proteínas presentes en *X. citri* que podrían interactuar y activar el constructo (Shantharaj et al., 2016). No obstante, la evidencia presentada en este estudio, al realizarse por medio de *Agrobacterium* excluye la posibilidad de otros factores de patogenicidad, indicando que existen otros posibles escenarios en los cuales el promotor trampa puede llegar a tener una actividad basal (**Figura 4-9** y **Figura 4-11**).

La actividad transcripcional global que existe en *N. tabacum* es una de las posibles causas de la activación basal de los promotores trampa. No obstante, en los cassettes de expresión diseñados se insertó un terminador corriente arriba de cada construcción para suprimir la actividad de posibles promotores de *N. tabacum*, presentes en el contexto genómico en que fuese insertado el T-ADN correspondiente al promotor trampa (**Figura 4-1**). Por otro lado, la estructura del pBs3min podría facilitar la actividad transcripcional llegando a presentar una actividad basal no dependiente de TALEs. El pBs3min presenta un motivo Inr con una secuencia consenso YYCARRY (nomenclatura de la IUPAC), el cual es uno de los elementos más comunes en los promotores base de plantas, siendo clave en la interacción con el TFIID (*Transcription Factor II D*) y el reclutamiento de la ARN polimerasa II (Biłas, Szafran, Hnatuszko-Konka, & Kononowicz, 2016; Kumari & Ware, 2013; Yamamoto et al., 2007). Esta secuencia es frecuente en los promotores base de

genes de expresión constitutiva en eucariotas (Porto et al., 2014; Roy & Singer, 2015). Esta situación abre la posibilidad de que en conjunción con parches de pirimidinas como el que se encuentra presente en la región 5'-UTR de la construcción empleada en los promotores trampa basados en el pBs3min (Romer, Hahn, et al., 2009; Romer, Recht, et al., 2009), podrían llegar a causar la actividad transcripcional basal de los cassettes de expresión (**Figura 4-9** y **Figura 4-11**).

Dada la situación observada en este estudio y la reportada para el pBs3min es necesario evaluar la posibilidad de emplear diferentes promotores base. Se han reportado otros promotores base en la construcción de promotores trampa en donde se utilizan las secuencias promotoras de genes *S* de arroz, y genes *E* de arroz y pimentón sin presentar una actividad transcripcional basal no dependiente de TALEs (Hummel et al., 2012; Streubel, Baum, Grau, Stuttman, & Boch, 2017; L. Wang et al., 2017). Esta puede ser una alternativa que hace de estos promotores base óptimos para futuros diseños de un promotor trampa.

Actividad y especificidad de los promotores trampa

La actividad transcripcional mediada por la interacción específica entre los EBEs y los TALEs es una característica propia de los activadores y los promotores trampa que es la base funcional del mecanismo de acción de estos cassettes de expresión (Boch et al., 2009; Hummel et al., 2012; Moscou & Bogdanove, 2009; Romer, Recht, et al., 2009; Shantharaj et al., 2016). De acuerdo con Zárata (2015), los TALEs de *Xam* con un mismo número de repeticiones tienen variaciones estructurales en sus RVDs que interactúan de diferente manera con los EBEs, presentándose subtipos de TALEs que son más o menos afines por un EBE para un TAL con una longitud en particular. Los TALEs empleados en los experimentos de expresión transitoria categorizados como TAL14B, TAL20C y TAL22B (Zárata, 2015), presentan unas capacidades de unión a sus EBEs específicos en los promotores trampa estimadas en 93.4%, 87.9% y 96.8% en comparación al máximo teórico, respectivamente (**Figura 4-15a**).

Experimentalmente fue posible evidenciar la activación específica de los promotores trampa dependiente de los TALEs 14 y 20 de *Xam* por encima de la actividad basal del promotor base en construcciones UniEBE y TriEBE (**Figura 4-9** y **Figura 4-10**), mostrando que el sistema desarrollado funciona adecuadamente por medio de expresión transitoria y confirmando lo reportado con anterioridad (Díaz, 2016). Los datos experimentales

concuerdan con la estimación de la capacidad de unión para los TALEs 14 y 20, presentando una alta probabilidad de interacción entre las secuencias de RVDs y sus respectivos EBEs. No obstante, a pesar de que el TAL22 presenta la más alta capacidad de unión teórica a su respectivo EBE, esto no es coherente con la baja o nula inducción del gen reportero de los constructos UniEBE y TriEBE en presencia del TAL22 (**Figura 4-9**, **Figura 4-10** y **Figura 4-15a**).

Considerando únicamente el promotor TriEBE, es posible que la distancia entre el motivo Inr y los EBEs sea una razón por la cual la actividad transcripcional se vea disminuida progresivamente desde la interacción con el TAL14 (más cercano) hasta el TAL22 (más lejano). Previamente se ha documentado como la actividad transcripcional en promotores sintéticos disminuye en función de la distancia entre el EBE y la caja TATA (Streubel et al., 2017; L. Wang et al., 2017). No obstante, al presentar este mismo comportamiento con los promotores UniEBE en donde la distancia entre el motivo Inr y las secuencias de unión se mantiene entre 14 y 20pb para los tres constructos (**Figura 4-1**), no es posible afirmar que las diferencias en la expresión del gen reportero se deban a esto. Otro de los posibles factores que podría estar afectando la actividad transcripcional de los promotores al interactuar con TAL22 es su longitud. Estudios *in vitro* han demostrado que TALEs con un número de RVDs superior a 18 tienden a decaer exponencialmente en su afinidad debido a un exceso de energía de unión (Rinaldi et al., 2017; Rogers et al., 2015). Esto es, cada repetición contribuye a la interacción con el genoma del hospedero, en donde los residuos cargados generan una interacción electrostática con las moléculas de DNA. Entre mayor la longitud del TAL, mayor será la interacción electrostática no específica, impidiendo la unión y la inducción de blancos específicos.

Efecto de múltiples EBEs en la actividad del promotor TriEBE

La activación de los promotores no fue potenciada o disminuida en ninguna manera respecto a la magnitud alcanzada con TAL14 o TAL20 cuando se emplearon múltiples TALEs, indicando que no hay un efecto adicional frente a la interacción simultánea de varios efectores con el cassette de expresión (**Figura 4-11** y **Figura 4-12**). En promotores sintéticos que regulan la expresión de genes de humanos se ha evidenciado que la actividad transcripcional puede llegar a presentar un efecto sinérgico mediado por la interacción con varios de estos efectores (Maeder et al., 2013; Pérez-Pinera et al., 2013). En promotores trampa empleados en cítricos para reconocimiento de cepas de *X. citri*, la presencia de múltiples TALEs presenta un efecto ambivalente dependiendo de los EBEs

que se encuentren en el cassette de expresión, logrando un efecto antagónico entre TALEs en promotores que solo son reconocidos por uno de los efectores y un efecto sinérgico en promotores con múltiples EBEs (Shantharaj et al., 2016).

A pesar de que con anterioridad se han reportado efectos sinérgicos y antagónicos en otros estudios, las bases moleculares que subyacen el mecanismo por el cual múltiples TALEs causan diferentes efectos en la actividad transcripcional permanecen sin ser comprendidas (Maeder et al., 2013; Pérez-Pinera et al., 2013; Streubel et al., 2017; L. Wang et al., 2017). De esta manera, se desconoce qué efecto podría llegar a tener la presencia de múltiples TALEs liberados por *Xam* en el contexto genómico de yuca, manteniéndose como una incógnita por ser resuelta.

Interacción con las variantes estructurales de los TALEs

Constantemente las poblaciones de *Xam* están experimentando presiones de selección a nivel molecular que generan una rápida tasa de mutación y veloces cambios a nivel genético, que se reflejan en un continuo cambio en la diversidad de cepas en una zona geográfica (Trujillo, Arias, et al., 2014; Trujillo, Ochoa, et al., 2014). Como resultado las bacterias han llegado a desarrollar variantes de los TALEs de una misma longitud al recombinar, sustituir, eliminar o introducir RVDs, cambiando la afinidad de los TALEs por sus blancos (Doucouré et al., 2018; Erkes et al., 2017; Zárate, 2015). Con el fin de generar secuencias de unión genéricas para todos los subtipos de TAL14, TAL20 y TAL22 que puedan ser implementadas en el desarrollo de un promotor trampa con amplio reconocimiento de variantes de los tres tipos de efectores, se construyeron secuencias consenso de $EBE_{TAL14Xam}$, $EBE_{TAL20Xam}$ y $EBE_{TAL22Xam}$ (**Figura 4-14**).

La construcción de las secuencias consenso se basó en EBEs predichos en promotores de genes sobreexpresados en yuca luego de la inoculación con *Xam681*, *Xam1061* y *Xam394* (Mora, 2017). Las predicciones fueron realizadas con los programas TALE-NT (Doyle et al., 2012), TALgetter (Grau et al., 2013) y TALVEZ (Pérez-Quintero et al., 2013). La mayoría de los EBEs predichos presentan una probabilidad media o baja de acuerdo con los parámetros fijados en este estudio (**Figura 4-13**), los cuales incorporan a la estimación la base teórica de cada algoritmo de acuerdo con su posición (*Rank*) en la predicción y los resultados experimentales de expresión diferencial reportados por Mora (2017). Estos resultados muestran una gran discrepancia entre los datos empíricos y teóricos que reflejan vacíos en los algoritmos de predicción que aún no han sido resueltos.

El algoritmo de TALE-NT es el más básico de los tres asumiendo la contribución individual de cada RVD según los puntajes propuestos por Moscou y Bogdanove (2009), sin tener en cuenta la posición, la longitud o la fuerza de la interacción de cada repetición (Doyle et al., 2012). El algoritmo de TALgetter al igual que TALE-NT asume el aporte individual de cada RVD independientemente de su posición, pero el peso de cada interacción está basado en la eficiencia del RVD de acuerdo con Streubel (2012), dividiendo los RVDs en fuertes, intermedios y débiles (Grau et al., 2013). En el caso del algoritmo de TALVEZ, asume unos puntajes similares a los empleados en TALE-NT, pero genera una corrección teniendo en cuenta la posición de los RVDs (Pérez-Quintero et al., 2013), esta base teórica es soportada por evidencia experimental más reciente (Rinaldi et al., 2017; Rogers et al., 2015). No obstante, con los tres algoritmos se ignoran elementos que pueden jugar un importante papel en la interacción TALE-ADN como lo son el contexto genómico y la interacción entre repeticiones adyacentes llegando a presentar un gran número de falsos positivos, de verdaderos negativos y de EBEs verdaderos con puntajes bajos (Erkes et al., 2019).

A partir de las secuencias genéricas de $EBE_{TAL14Xam}$, $EBE_{TAL20Xam}$ y $EBE_{TAL22Xam}$ (**Figura 4-14**), se calculó la capacidad de unión de las diferentes variantes de los TALEs 14, 20 y 22 a las secuencias consenso y a las secuencias empleadas en la fase experimental del estudio. En general, los EBEs genéricos muestran una dispersión más restringida en los valores de capacidad de unión a las distintas versiones de los TALEs en comparación a los EBEs experimentales (**Figura 4-15**), sugiriendo que la aproximación teórica empleada puede llegar a funcionar adecuadamente para la construcción de promotores trampa con secuencias de unión reconocidas por un amplio rango de efectores. No obstante, cabe recalcar que debido a las predicciones es muy probable que la mayoría de verdaderos blancos fueran rechazados y subestimados, por lo cual es necesario emplear algoritmos más actualizados para obtener secuencias genéricas construidas a partir de un conjunto de información más amplio que permita mejorar la capacidad de unión de diferentes versiones de los TALEs. Esto permitirá desarrollar promotores trampa con un amplio reconocimiento de cepas de *Xam* debido a la alta frecuencia de los efectores TAL14, TAL20 y TAL22 en los aislamientos colombianos, con la adición del reconocimiento de la mayoría de los subtipos de los efectores lo cual amplía aún más el espectro.

Consideraciones experimentales de la actividad de los promotores trampa

En conjunto, los resultados obtenidos a partir de la expresión transitoria demuestran el funcionamiento de los promotores trampa UniEBE y TriEBE frente a los efectores TAL14B y TAL20C. Así como también se evidencio la falla en el funcionamiento del sistema con el TAL22B y la ausencia de un efecto en presencia de múltiples TALEs (**Figura 4-9** y **Figura 4-12**). No obstante, debe considerarse el hecho de que los efectores fueron expresados con el vector pBAV139, el cual presenta un promotor constitutivo de fuerte actividad (p35s) (**Figura 3-2**). En condiciones naturales la expresión de los genes de los T3E es inducida y regulada por mecanismos moleculares que se desencadenan luego del ingreso del patógeno a los tejidos del hospedero (Büttner & Bonas, 2010; Jacques et al., 2016), por lo cual la inducción de la actividad transcripcional obtenida en este estudio posiblemente está mostrando una sobreestimación de lo que se podría obtener con una interacción natural yuca-*Xam* (**Figura 4-10**).

Previamente, Díaz (2016) corroboró el funcionamiento del sistema de promotores trampa por medio de expresión transitoria y estable en yuca, mostrando resultados similares a los obtenidos en este trabajo. No obstante, la generación de plantas transgénicas para evaluar por expresión estable la construcción, puede llegar a ser un proceso laborioso, lento y costoso (Chavarriga et al., 2016). Antes de pasar a una fase de experimentación en plantas transgénicas, aproximaciones experimentales basadas en la expresión transitoria del promotor trampa en yuca, sumado a un sistema de liberación natural de TALEs empleando cepas de *Xam* con diferente contenido de efectores podrían servir como un acercamiento al comportamiento del sistema natural yuca-*Xam*. Este sistema mixto para la evaluación de promotores trampa se ha evaluado con anterioridad en cítricos, presentando un actividad inducible y específica de los constructos dependiente del contenido de TALEs (Shantharaj et al., 2016). De este modo, el sistema mixto para la evaluación de los promotores trampa es una aproximación rápida que es interesante explorar para realizar la evaluación en condiciones más cercanas a las del sistema natural yuca-*Xam*.

Promotores trampa y la bacteriosis vascular de la yuca

A futuro se espera poder implementar el sistema de promotores trampa como una alternativa para el control de la bacteriosis vascular de la yuca, funcionando como un cassette de reconocimiento de la mayoría de las cepas de *Xam* a nivel nacional. Para llegar a ser implementado, el sistema debe acoplarse a un gen *E*. El gen *RXam1* puede generar resistencia a la cepa CIO136, pero no permite desarrollar una resistencia de amplio

espectro por lo cual no es un buen candidato como módulo ejecutor (Díaz, 2016; Díaz et al., 2018). Con anterioridad, el gen *R* de yuca *RXam2* autoactivo ha sido empleado para funcionar como módulo ejecutor de promotores trampa, resultando en la ganancia de resistencia frente a múltiples cepas en plantas transgénicas en experimentos *in vitro*. Sin embargo, el sistema también llegó a presentar actividad transcripcional no dependiente de TALEs lo que llevó a la muerte de varias de las líneas, mostrando posibles efectos deletéreos de *RXam2* autoactivo en las plantas de yuca debido a su función como NLR (Díaz, 2016).

Otras posibles alternativas para ser empleadas como gen *E*, son los genes *Xa27* y *Bs3* que han sido implementados en la construcción de promotores trampa con módulos ejecutores heterólogos (Romer, Recht, et al., 2009). Por otro lado, Shantharaj et al (2016) reportó que el gen *Bs3* no potencia la resistencia a cepas *X. citri* en promotores trampa empleados en cítricos, demostrando que los genes *E* heterólogos pueden no funcionar adecuadamente dependiendo del fondo genético en el que se esté implementando el promotor trampa. También se han empleado genes *avr* para activar los mecanismos de defensa de la planta obteniendo resultados similares a los obtenidos en sistemas de promotores trampa con genes *E* (Boch et al., 2014; Shantharaj et al., 2016), lo que hace plausible la idea de evaluar el desempeño de genes *avr* en el desarrollo de promotores trampa contra *Xam*.

A pesar de los beneficios que trae consigo la ganancia de resistencia contra patógenos, es de considerar el hecho de que los mecanismos de defensa en yuca como otras plantas se activan en detrimento de rutas metabólicas importantes en procesos fotosintéticos y de crecimiento (López et al., 2005). Esto quiere decir, que en constante interacción con poblaciones de *Xam* se va a ver disminuida la producción de yuca debido a la ganancia de resistencia y la activación de los mecanismos de defensa en plantas con los promotores trampa. Por lo cual, es importante que la implementación de los promotores trampa en cultivos se acople a medidas fitosanitarias al momento de la siembra que disminuyan la interacción con el patógeno afectando en menor medida el crecimiento de la planta. De este modo, los promotores trampa actuarían como un mecanismo complementario para el control de las poblaciones de *Xam*, al disminuir la dispersión y supervivencia del patógeno en caso de fuertes brotes y previniendo el descontrol de la enfermedad dentro del cultivo.

Efecto de los promotores trampa en las poblaciones de *Xam*

Al implementar los promotores multiEBE en el manejo de la bacteriosis vascular, una de las posibles consecuencias es una fuerte presión de selección sobre las poblaciones de *Xam*, lo cual puede conducir a la aparición de nuevas cepas (Doucouré et al., 2018; Ji et al., 2016; Schandry, Jacobs, Szurek, & Pérez-Quintero, 2018). En este caso, el promotor trampa TriEBE es capaz de interactuar con los TALEs 14 y 20, lo que significa que puede ser activado por el 83.3% de las cepas colombianas de *Xam* y el 83.3% de las cepas de *Xam* colectadas en todo el planeta (Bart et al., 2012; Zárate, 2015), presentando un gran potencial como medida alternativa para el control de la bacteriosis vascular de la yuca. Esto puede generar diversos escenarios dada la plasticidad genética del género *Xanthomonas*. Bajo dichas presiones de selección las poblaciones de las bacterias generarán procesos de recombinación, duplicación, inserción, delección o mutaciones de las secuencias codificantes de las repeticiones de los TALEs, que terminarán eliminando los efectores, modificando la secuencias de RVDs u originando nuevos efectores con otros blancos (Erkes et al., 2017; Pérez-Quintero & Szurek, 2019).

Con anterioridad se ha reportado la importancia de los TALEs 14 y 20 en la progresión de los síntomas de la bacteriosis vascular y la virulencia de *Xam*, por tanto cambios significativos en la estructura de las repeticiones de estos efectores podrían conllevar efectos sobre el *fitness* del patógeno (Cohn et al., 2014, 2016). Las fuerzas de cambio evolutivo deben ser lo suficientemente potentes como para sobrepasar la resistencia de amplio espectro generada a partir de la interacción de los TALEs 14 y 20 que resultan ser vitales para el *fitness* de *Xam*, por lo cual la bacteria primero debe sacrificar su virulencia para evitar ser reconocida por el sistema de promotores trampa TriEBE.

Por otro lado, la interacción entre los TALEs y los EBEs presenta tolerancia a errores, especialmente hacia las últimas posiciones de los efectores (Rinaldi et al., 2017), por lo cual cambios menores en la estructura de los TALEs podrían evadir el sistema de promotores trampa pero conservar algunos de sus blancos en el genoma del hospedero afectando levemente a la virulencia del patógeno (Cohn et al., 2016). En este sentido, los EBEs genéricos son una herramienta útil para la construcción de promotores trampa con un amplio reconocimiento de las variantes de los TALEs con modificaciones menores, aumentando el espectro de efectores que pueden interactuar con el cassette de expresión en vista a los posibles escenarios de mutaciones en la CRR de los TALEs. Esta estrategia potencialmente podría aumentar la presión de selección sobre las cepas de *Xam*, pero al mismo tiempo al ser tan intensa el escenario más plausible para las poblaciones del

patógeno será eliminar los efectores, sopesando la supervivencia sobre la virulencia. Sin embargo, son necesarias pruebas adicionales para comprobar o falsear esta hipótesis.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones

En este estudio fue posible construir promotores trampa UniEBE y TriEBE para los TALEs 14, 20 y 22 de *Xam* empleando un diseño original basado en el pBs3min y utilizando una mezcla de metodologías en las que confluyen la mutagénesis dirigida de plásmidos enteros y la clonación de elementos clave en los cassettes de expresión.

La evaluación funcional de los promotores trampa por medio de expresión transitoria en *N. tabacum* demostró que los constructos desarrollados pueden ser empleados en un modelo vegetal a pesar de ser una secuencia heteróloga. La experimentación con los promotores mostró la activación basal de los constructos en ausencia de los TALEs, posiblemente debido al promotor base (pBs3min).

Pese a la actividad basal de los promotores se logró evidenciar la activación transcripcional de los constructos UniEBE de manera dependiente y específica por los TALEs 14 y 20, pero no por el TAL22. De igual manera, el promotor trampa con secuencias de unión a los tres efectores fue activado significativamente por los TALEs 14 y 20, por lo cual este promotor trampa se perfila como un cassette de reconocimiento para las cepas de *Xam* que presenten a TAL14 o TAL20 en su repertorio de efectores.

No se observó un efecto en la activación transcripcional del promotor TriEBE debido a la presencia de múltiples TALEs mediante la expresión transitoria en *N. tabacum*. Sin embargo, esto debe evaluarse en otros modelos debido a que puede haber efectos antagónicos sobre la actividad transcripcional.

La aproximación teórica al desarrollo de EBEs genéricos se muestra como una posible herramienta para el diseño de secuencias de unión a múltiples variantes de un mismo tipo de TAL logrando ampliar el espectro de los promotores trampa para un mayor reconocimiento de cepas de *Xam*.

6.2. Recomendaciones

Para emplear las construcciones desarrolladas en este estudio, es imperativo primero llevar a cabo experimentos funcionales en los que se involucren sistemas de liberación más cercanos a las condiciones naturales. Luego de esto es recomendable llevar a cabo experimentos con una amplia variedad de cepas de *Xam* para determinar el efecto que pueden llegar a tener otras proteínas propias del patógeno sobre los promotores trampa desarrollado.

Con el fin de disminuir la actividad basal de los promotores trampa, pueden ser desarrollados nuevos constructos basados en promotores base diferentes al pBs3min de naturaleza inducible y preferiblemente que hayan sido empleados en estudios previos en los que se reporte que no presenta actividad basal. Incluir una caja TATA en el diseño del promotor base puede incrementar la actividad transcripcional es recomendable para potenciar la actividad transcripcional conservando una distancia de 25 a 30 pb de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción.

Se recomienda emplear otros algoritmos como PrediTAL para mejorar la aproximación teórica al diseño de EBEs genéricos. Por otro lado, experimentos de expresión diferencial basados en cepas con único TAL podrían disminuir la aparición de falsos negativos en los datos.

7. Anexos: Material suplementario

Figura S 7-1. Estrategia de clonación para la construcción de los promotores trampa. Los *EBEs* fueron clonados individualmente por medio de mutagénesis sitio-dirigida (a), a continuación, el *EBE_{TAL14Xam}* y el *EBE_{TAL22Xam}* fueron liberados de sus vectores por cortes con EcoRI y HindIII, respectivamente. *EBE_{TAL14Xam}* e *EBE_{TAL22Xam}* fueron ligados a ambos lados del *EBE_{TAL20Xam}* (b). Se deletionaron las dos secuencias UPT1 por mutagénesis sitio-dirigida de los promotores *UniEBE* y el promotor *TriEBE* (c). El gen *GUSplus* fue clonado en los sitios de corte de las enzimas KpnI y SgsI (Ascl) corriente abajo del promotor mínimo de Bs3 en cada uno de los promotores (d). El terminador 35s (35sT) fue clonado corriente arriba del promotor mínimo de Bs3 en el sitio de corte de NotI (e).

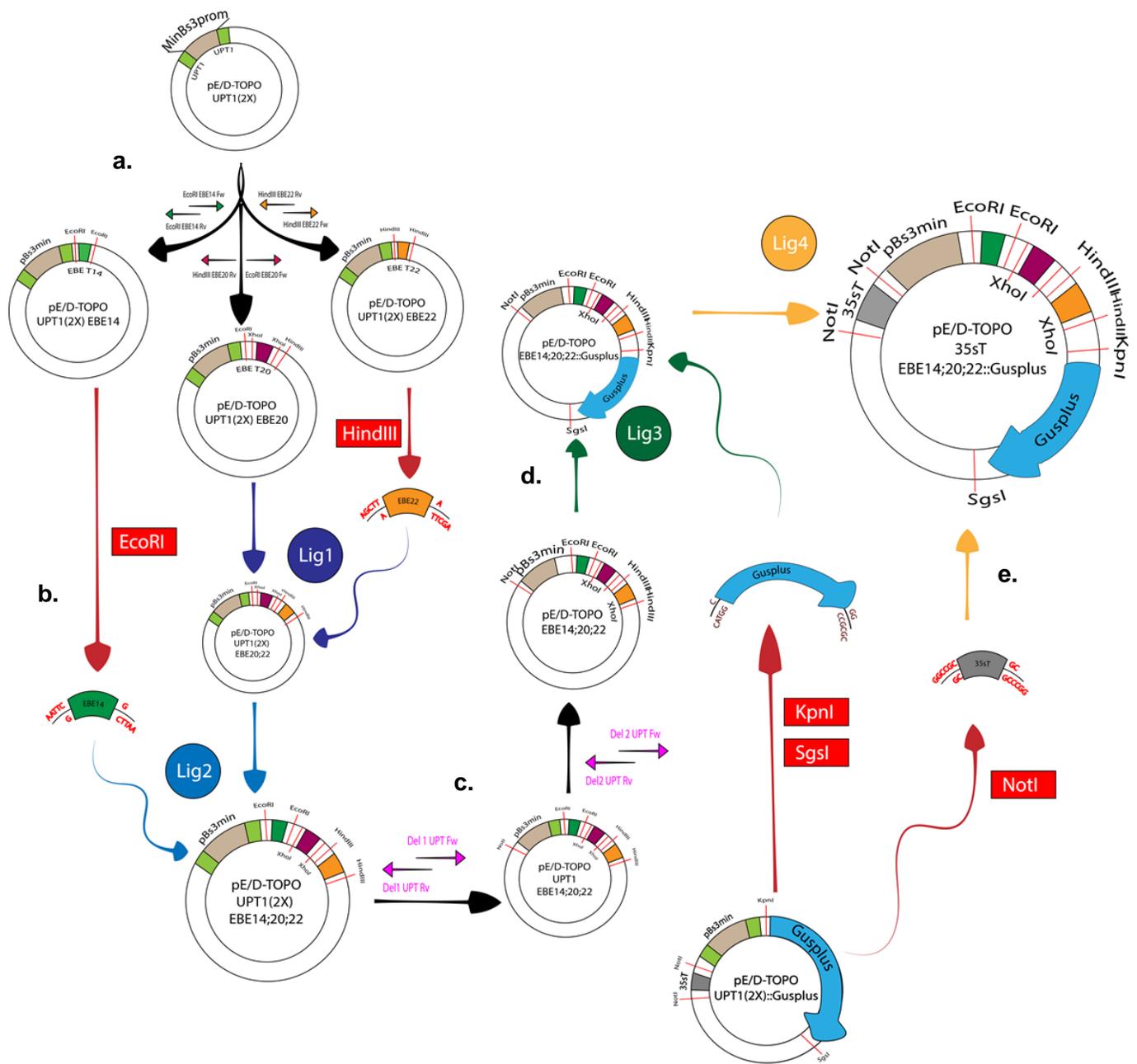


Figura S 7-2. Estrategia de clonación de los TALEs 14, 20 y 22. Los RVDs de cada TAL fueron clonados a partir de vectores de expresión en *Xanthomonas* en el vector pENTR/D-TOPO por medio de la digestión con BamHI. La correcta ligación en el vector de clonación fue evaluada por PCR, patrón de digestión y secuenciación de los plásmidos (a). Los TALEs en pENTR/D-TOPO fueron escindidos con BamHI y los RVDs liberados se ligaron en el vector binario pBAV139. La clonación fue confirmada por PCR, patrón de digestión y secuenciación de los plásmidos.

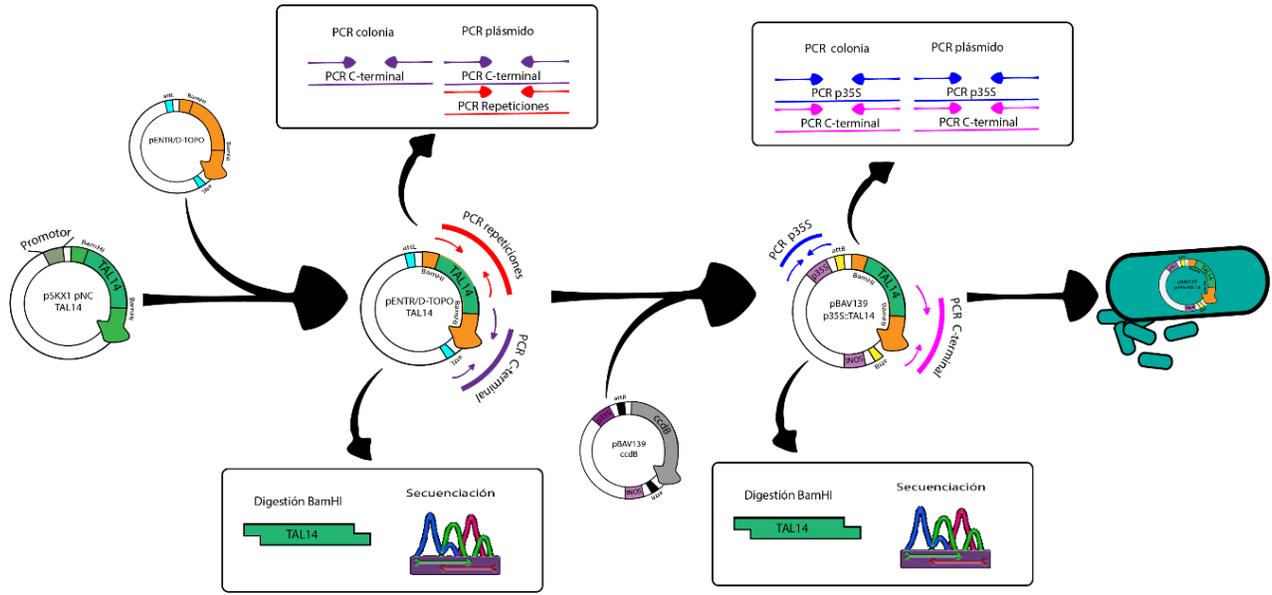


Tabla S 7-1. Probabilidad de los EBEs predichos (λ) para los TALEs 14, 20 y 22 de *Xam*. Los valores de λ de cada EBE predicho en genes sobreexpresados fue calculado para cada uno de los algoritmos de predicción de manera independiente. Para las estimaciones se incluyó el valor del *Log₂FoldChange* (Log₂FC) obtenido para cada gen con las cepas *Xam681*, *Xam1061* y *Xam394*, teniendo en cuenta los valores máximos de expresión de 11.06, 11.41 y 12.68, respectivamente.

Gen	EBE	Secuencia predicha del EBE								
		Log ₂ FC			Rank promedio			λ		
		<i>Xam681</i>	<i>Xam1061</i>	<i>Xam394</i>	TALE-NT	TALVEZ	TALgetter	TALE-NT	TALVEZ	TALgetter
Manes.02G164500	TCTACCTTCTTTTT	3,9911	3,2624	4,4800	297		253	0,3697		0,4137
Manes.07G092900	TACACTCAAATAAAT	6,6012	7,0885	5,4478	264			0,5106		
Manes.11G151300	TATAAACCAAGTCAAG	6,1947	5,7664	6,8938	287			0,4812		
Manes.04G118200	TAGGCTAAAGCGCAT	5,8299	5,0107	6,3907		185			0,5600	
Manes.01G022000	CATAGACATGTCATACCTACT	3,2804	0,0000	0,0000			216		0,4323	
Manes.01G058900	CCCCCTCCCCCTCCCTCCCA	2,8249	0,0000	0,0000			312		0,3157	
Manes.01G171900	TATAATAAAATCGCCGAAAAT	3,6503	0,0000	0,0000	202			0,4630		
Manes.02G127200	TATAATGCCATCCTGCTCACT	4,2451	0,0000	0,0000	150		155	0,5421		0,5369
Manes.02G130600	CAAACCTCAAACACGCCAATT	8,9904	0,0000	0,0000			287		0,6194	
Manes.04G113800	TGTGATCAGCCCGTGCGCAGT	2,9610	0,0000	0,0000			220		0,4139	
Manes.08G053500	TCAAATCTTCTCCCGCCAATT	4,2373	0,0000	0,0000			109	203	0,5826	0,4886
Manes.08G143000	CATACAAAAATCCAACCCATA	4,5669	0,0000	0,0000				246		0,4605
Manes.12G039000	TTTAATCAAATCCCACCAAGT	3,9425	0,0000	0,0000	44			89	0,6342	0,5897
Manes.13G033900	TGTATACACATCCCTCTCCTT	3,1043	0,0000	0,0000	351				0,2893	
Manes.13G045100	CACCACCAGTCTCCATCTTT	2,5961	0,0000	0,0000			374		0,2434	
Manes.14G037800	TCTCATCAATTCACACGCACA	7,1807	0,0000	0,0000	45			86	0,7796	0,7386
Manes.14G051800	CGTAGTAACCTCGCCCGCAGT	5,6942	0,0000	0,0000			14		0,7434	
Manes.15G047900	CCCAGCCAGCCAGCCAGC	7,1435	0,0000	0,0000			269		0,5544	
Manes.15G047900	TGCAGCCAGCCAGCCAGC	7,1435	0,0000	0,0000			217		0,6059	
Manes.15G070900	TCTCATTGCATCTCACTCACT	4,0778	0,0000	0,0000			50		0,6343	
Manes.16G134400	TATAATCTACACTTACAAT	5,5186	0,0000	0,0000	350			0,3995		
Manes.16G134400	TACATTCATCACACATATC	5,5186	0,0000	0,0000	258			0,4915		
Manes.18G027200	TATTATCCCATCCACCTCTTT	2,0803	0,0000	0,0000	287			0,3070		
Manes.18G060400	TATTCTCAATTTTCAACAATT	3,1000	0,0000	0,0000	339			178	0,3011	0,4621
Manes.18G074600	TATACTAAAATCACACTGATT	4,6395	0,0000	0,0000	77				0,6324	
Manes.S045100	TCCAGTCACATCCCACTCATT	4,9394	0,0000	0,0000			70		0,6532	
Manes.S094000	CACAATCAACTATTGCCAACT	2,8067	0,0000	0,0000			365		0,2619	
Manes.S094000	TAAAATTACGTCCCAATCACT	2,8067	0,0000	0,0000	136		442	0,4909	0,1846	
Manes.04G033900	TATCTTTCCTTCACTTCTTCTT	2,5602	2,3199	0,0000	1	2		0,6077	0,5340	
Manes.07G135200	TTTCTTTTCTTTTCTTCTTCTT	3,0862	3,4736	0,0000			49			0,5969
Manes.10G125400	TATCTGACACTCTTCTTCTTCTT	5,9098	3,2144	0,0000				277		0,4270
Manes.14G000800	TCTCTTCTCTCAAATTCCTCTC	4,1039	3,4153	0,0000			285		0,3826	
Manes.16G092600	TACCTTCTGCAATTTCTTCTT	2,7385	2,2962	0,0000			445		0,1672	

Figura S 7-3. Probabilidad de unión de TAL14 a los EBEs. La secuencia de RVDs de los TALEs 14 A, B, C y D son mostradas. Para cada versión de TAL14 se determino el EBE con mayor probabilidad de unión al efector (Max teorico), el cual fue comparado con los EBEs genericos obtenidos a partir del logo y los EBEs experimentales tomados de Díaz (2016) y Cohn (2015). En color se muestran las bases nitrogenadas variables entre las tres secuencias de unión, la tonalidad del color indica la probabilidad de unión de la base nitrogenada en particular con el RVD en la misma posición (p).

Posición	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	$\sum p \bar{p}$
TAL14A		NI	NG	NI	NN	NI	HD	NS	NS	NN	NG	HD	NN	NI	NG	
Max Teórico	T	A	T	A	A	A	C	A	A	A	T	C	A	A	T	9,3 0,66
Díaz, 2016	T	A	T	A	A	A	C	A	A	A	T	C	A	A	T	9,3 0,66
Logo	T	A	T	A	C	T	C	A	A	A	T	A	A	A	T	7,6 0,54
TAL14B		NI	NG	NI	NN	NG	HD	NS	NS	NN	NG	HD	NN	NI	NG	
Max Teórico	T	A	T	A	A	T	C	A	A	A	T	C	A	A	T	9,1 0,65
Díaz, 2016	T	A	T	A	A	A	C	A	A	A	T	C	A	A	T	8,5 0,61
Logo	T	A	T	A	C	T	C	A	A	A	T	A	A	A	T	8,3 0,59
TAL14C		NI	NS	NN	HD	NG	HD	NI	NS	NN	HD	NN	NI	NI	NG	
Max Teórico	T	A	A	A	C	T	C	A	A	A	C	A	A	A	T	9,3 0,66
Díaz, 2016	T	A	T	A	A	A	C	A	A	A	T	C	A	A	T	6,9 0,49
Logo	T	A	T	A	C	T	C	A	A	A	T	A	A	A	T	8,3 0,59
TAL14D		NI	NG	NI	NN	HD	HD	NG	NG	HD	NG	NG	HD	NG	NG	
Max Teórico	T	A	A	A	C	T	C	A	A	A	T	A	A	A	T	9,9 0,71
Díaz, 2016	T	A	T	A	A	A	C	A	A	A	T	C	A	A	T	6,1 0,44
Logo	T	A	T	A	C	T	C	A	A	A	T	A	A	A	T	5,6 0,4

Probabilidad de unión (p)

- 0,9
- 0,7
- 0,5
- 0,4
- 0,3
- 0,2
- 0,1
- 0,0

Figura S 7-4. Probabilidad de unión de TAL20 a los EBEs. La secuencia de RVDs de los TALEs 20 A, B, C y D son mostradas. Para cada versión de TAL20 se determino el EBE con mayor probabilidad de unión al efector (Max teorico), el cual fue comparado con los EBEs genericos obtenidos a partir del logo y los EBEs experimentales tomados de Díaz (2016) y Cohn (2015). En color se muestran las bases nitrogenadas variables entre las tres secuencias de unión, la tonalidad del color indica la probabilidad de unión de la base nitrogenada en particular con el RVD en la misma posición (p).

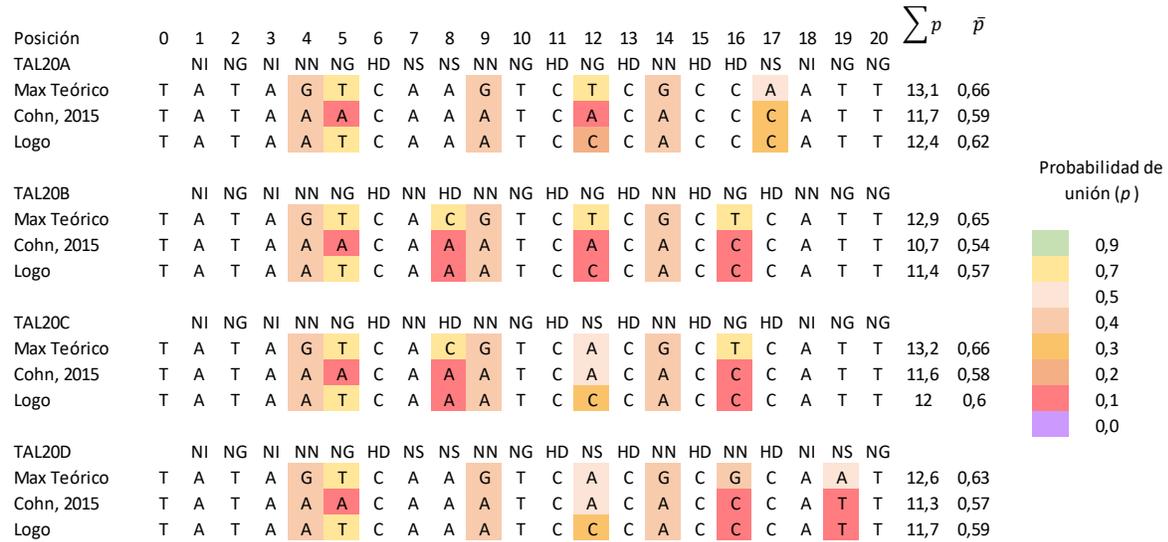
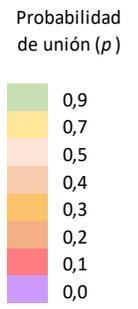


Figura S 7-5. Probabilidad de unión de TAL22 a los EBEs. La secuencia de RVDs de los TALEs 22 A, B, C y D son mostradas. Para cada versión de TAL22 se determino el EBE con mayor probabilidad de unión al efector (Max teorico), el cual fue comparado con los EBEs genericos obtenidos a partir del logo y los EBEs experimentales tomados de Díaz (2016) y Cohn (2015). En color se muestran las bases nitrogenadas variables entre las tres secuencias de unión, la tonalidad del color indica la probabilidad de unión de la base nitrogenada en particular con el RVD en la misma posición (p).

Posición	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	$\sum p$	\bar{p}
TAL22A		NI	NG	HD	NG	NG	NG	HD	HD	NG	NG	NG	NG	HD	HD	NG	NG	HD	NG	NG	HD	NG	NG		
Max Teórico	T	A	T	C	T	T	T	C	C	T	T	C	T	C	C	T	T	C	T	T	C	T	T	15,6	0,7
Cohn, 2015	T	A	T	C	T	T	T	C	C	T	T	C	T	C	C	T	T	C	T	T	C	T	T	15,6	0,7
Logo	T	A	T	C	T	T	T	C	C	T	T	C	A	C	C	T	T	C	T	T	C	T	T	14,7	0,7
TAL22B		NI	NG	HD	NG	NG	NG	HD	HD	NG	NG	NG	NN	HD	NN	NG	NG	HD	NG	NG	HD	NG	NG		
Max Teórico	T	A	T	C	T	T	T	C	C	T	T	T	A	C	A	T	T	C	T	T	C	T	T	15	0,7
Cohn, 2015	T	A	T	C	T	T	T	C	C	T	T	C	T	C	C	T	T	C	T	T	C	T	T	13,9	0,6
Logo	T	A	T	C	T	T	T	C	C	T	T	C	A	C	C	T	T	C	T	T	C	T	T	14,2	0,6
TAL22C		NI	NG	HD	NG	NG	NG	HD	HD	NG	NG	HD	NG	HD	HD	NG	NG	HD	NG	NG	HD	NG	NG		
Max Teórico	T	A	T	C	T	T	T	C	C	T	T	T	T	C	C	T	T	C	T	T	C	T	T	15,6	0,7
Cohn, 2015	T	A	T	C	T	T	T	C	C	T	T	C	T	C	C	T	T	C	T	T	C	T	T	15,1	0,7
Logo	T	A	T	C	T	T	T	C	C	T	T	C	A	C	C	T	T	C	T	T	C	T	T	14,2	0,6



Bibliografía

- Acosta, L., & Camacho, H. (2005). *Conservación de la biomasa de tuca (Manihot esculanta Crantz), en la várzea del Amazonas colombiano: Tecnología tradicional ticuna aplicada en el presente.*
- Aguilera, M. (2012). *La yuca en el Caribe colombiano: De cultivo ancestral a agroindustrial.* Documentos de trabajo sobre Economía Regional. Retrieved from http://www.banrep.gov.co/docum/Lectura_finanzas/pdf/dtser_158.pdf
- Allem, A. C. (2002). *The Origins and Taxonomy of Cassava.* Retrieved from http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/cabi_04ch1.pdf
- An, S.-Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F.-J., He, Y.-Q., Becker, A., ... Tang, J.-L. (2019). Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*, (May), 1–32. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz024>
- Antoine, F., & Wydra, K. (2015). Physical and chemical treatments for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in cassava seeds. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 3(1), 54–59.
- Arrieta-Ortiz, M. L., Rodríguez-R, L. M., Pérez-Quintero, Á. L., Poulin, L., Díaz, A. C., Rojas, N. A., ... Bernal, A. (2013). Genomic survey of pathogenicity determinants and VNTR markers in the cassava bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strain CIO151. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079704>
- Banito, A., Kpémoua, K., Bissang, B., & Wydra, K. (2010). Assessment of cassava root and stem rots in ecozones of togo and evaluation of the pathogen virulence. *Pakistan Journal of Botany*, 42(3), 2059–2068.

- Barak, J. D., Vancheva, T., Lefeuvre, P., Jones, J. B., Timilsina, S., Minsavage, G. V., ... Koebnik, R. (2016). Whole-genome sequences of *Xanthomonas euvesicatoria* strains clarify taxonomy and reveal a stepwise erosion of type 3 effectors. *Frontiers in Plant Science*, 7(Dec), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01805> Edited
- Bart, R., Cohn, M., McCallum, E. J., Shybut, M., Petriello, A., Krasileva, K., ... Chen, J. (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*, 109(32), 13130–13130. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211014109>
- Bart, R., Wilson, M. C., Mutka, A. M., Hummel, A. W., Berry, J., Chauhan, R. D., ... Bart, R. S. (2017). Rapid report Gene expression atlas for the food security crop cassava. <https://doi.org/10.1111/nph.14443>
- Bilas, R., Szafran, K., Hnatuszko-Konka, K., & Kononowicz, A. K. (2016). Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127(2), 269–287. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1057-7>
- Blanvillain-Baufumé, S., Reschke, M., Solé, M., Auguy, F., Doucoure, H., Szurek, B., ... Koebnik, R. (2017). Targeted promoter editing for rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals differential activities for SWEET14-inducing TAL effectors. *Plant Biotechnology Journal*, 15(3), 306–317. <https://doi.org/10.1111/pbi.12613>
- 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>
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., S, H., Kay, S., ... Bonas, U. (2009). Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science*, 326, 1509–1512. <https://doi.org/10.1126/science.1178811>
- Büttner, D. (2016). Behind the lines-actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(6), 894–937.

- <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw026>
- Büttner, D., & Bonas, U. (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiology Reviews*, *34*(2), 107–133.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x>
- Castiblanco, L. F., Gil, J., Rojas, A., Osorio, D., Gutiérrez, S., Muñoz-Bodnar, A., ... Bernal, A. J. (2013). TALE1 from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* acts as a transcriptional activator in plant cells and is important for pathogenicity in cassava plants. *Molecular Plant Pathology*, *14*(1), 84–95.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00830.x>
- Cesbron, S., Briand, M., Essakhi, S., Gironde, S., Boureau, T., Manceau, C., ... Jacques, M. A. (2015). Comparative genomics of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas arboricola* unveil molecular and evolutionary events linked to pathoadaptation. *Frontiers in Plant Science*, *6*(DEC). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01126>
- Chacón, J., Madriñán, S., Debouck, D., Rodríguez, F., & Tohme, J. (2008). Phylogenetic patterns in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae) inferred from analyses of nuclear and chloroplast DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *49*(1), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.07.015>
- Chavarriaga, P., Brand, A., Medina, A., Prías, M., Escobar, R., Martínez, J., ... Tohme, J. (2016). The potential of using biotechnology to improve cassava: a review. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *52*(5), 461–478.
<https://doi.org/10.1007/s11627-016-9776-3>
- Chege, M. N., Wamunyokoli, F., Kamau, J., & Nyaboga, E. N. (2017). Phenotypic and genotypic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing bacterial blight disease of cassava in Kenya. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, *5*(02), 38–44. <https://doi.org/10.7324/JABB.2017.50206>
- Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., ... Frommer, W. B. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, *468*(7323), 527–532.
<https://doi.org/10.1038/nature09606>

- Cohn, M. (2015). *Characterization of the Transcription Activator-Like Effectors of Xanthomonas axonopodis pv. manihotis and identification of susceptibility targets in the host cassava*. University of California.
- 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), 1186–1198. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-14-0161-R>
- Cohn, M., Morbitzer, R., Lahaye, T., & Staskawicz, B. J. (2016). Comparison of gene activation by two TAL effectors from Xanthomonas axonopodis pv. manihotis reveals candidate host susceptibility genes in cassava. *Molecular Plant Pathology*, 17(6), 875–889. <https://doi.org/10.1111/mpp.12337>
- Constantin, E. C., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., Van Malderghem, C., De Vos, P., & Cottyn, B. (2016). Genetic characterization of strains named as Xanthomonas axonopodis pv. dieffenbachiae leads to a taxonomic revision of the X. axonopodis species complex. *Plant Pathology*, 65(5), 792–806. <https://doi.org/10.1111/ppa.12461>
- Contreras, E., & López, C. (2008). Expresión de dos genes candidatos a resistencia contra la bacteriosis vascular en yuca. *Acta Biológica Colombiana*, 13(2), 175–187.
- Contreras, E., & López, C. (2011). Identificación de polimorfismos en RXam2, un gen candidato de resistencia a la bacteriosis vascular de yuca. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 63–69.
- Cuculis, L., Abil, Z., Zhao, H., & Schroeder, C. M. (2016). TALE proteins search DNA using a rotationally decoupled mechanism. *Nature Chemical Biology*, 12(10), 831–837. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2152>
- DANE. (2011). *Encuesta Nacional Agropecuaria*. Bogotá DC.
- DANE. (2012). *Encuesta Nacional Agropecuaria*. Bogotá DC.
- DANE. (2013). *Encuesta Nacional Agropecuaria*. Bogotá DC.
- DANE. (2014). *Encuesta Nacional Agropecuaria*. Bogotá DC.

- DANE. (2015). *Encuesta Nacional Agropecuaria*. Bogotá DC.
- DANE. (2016a). El cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Boletín Mensual INSUMOS Y FACTORES ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN AGROPECUARIA*, 46, 1–7. Retrieved from https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Bol_Insumos_abr_2016.pdf
- DANE. (2016b). *Encuesta Nacional Agropecuaria*. Bogotá DC.
- DANE. (2017). *Encuesta Nacional Agropecuaria*. Bogotá DC.
- DANE. (2018). *Pobreza multidimensional nacional*. Bogotá DC.
- Deng, D., Yan, C., Pan, X., Mahfouz, M., Wang, J., Zhu, J., & Shi, Y. (2012). Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of, 335(February), 11–14. <https://doi.org/10.1126/science.1215670>
- Díaz, P. (2016). *Transference of RXam2 and Bs2 genes to confer resistance against cassava bacterial blight (CBB) (Tesis de Doctorado)*. Bogotá: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
- Díaz, P., Herrera Corzo, M., Ochoa Cabezas, J. C., Medina Cipagauta, A., Prías, M. A., Verdier, V., ... López, C. (2018). The overexpression of RXam1, a cassava gene coding for an RLK, confers disease resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Planta*, 247(4), 1031–1042. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2863-4>
- Dixon, A., Ngeve, J., & Nukenine, E. (2002). Genotypex environment Effects on Severity of Cassava Bacterial Blight Disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *European Journal of Plant Pathology*, 108(8), 763–770.
- Doucouré, H., Pérez-Quintero, A. L., Reshetnyak, G., Tekete, C., Auguy, F., Thomas, E., ... Cunnac, S. (2018). Functional and genome sequence-driven characterization of tal effector gene repertoires reveals novel variants with altered specificities in closely related malian *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–17.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01657>

Doyle, E. L., Booher, N. J., Standage, D. S., Voytas, D. F., Brendel, V. P., Vandyk, J. K., & Bogdanove, A. J. (2012). TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALEN) 2.0: Tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Research*, *40*(W1), 117–122. <https://doi.org/10.1093/nar/gks608>

Erkes, A., Mücke, S., Reschke, M., Boch, J., & Grau, J. (2019). PrediTAL: A novel model learned from quantitative data allows for new perspectives on TALE targeting. *PLoS Computational Biology*, *15*(7), 1–28.

<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007206>

Erkes, A., Reschke, M., Boch, J., & Grau, J. (2017). Evolution of transcription activator-like effectors in *Xanthomonas oryzae*. *Genome Biology and Evolution*, *9*(6), 1599–1699. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx108>

FAO. (2013). FAOSTAT Database. Food Supply - Crops Primary Equivalent. Retrieved August 26, 2019, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/CC>

FAO. (2017). FAOSTAT Database. Crops. Retrieved August 26, 2019, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

FAO. (2018). *Food Outlook Biannual Report on Global Food Markets - November 2018*. Fao. <https://doi.org/ISSN 1560-8182>

Fregene, M., Angel, F., Gomez, R., Rodriguez, F., Chavarriaga, P., Roca, W., ... Bonierbale, M. (1997). A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, *95*(3), 431–441. <https://doi.org/10.1007/s001220050580>

Gil, J., & López, C. (2019). El dominio STK de la proteína de resistencia a la bacteriosis vascular de yuca RXAM1 interactúa con una E3 Ubiquitin Ligasa. *Acta Biológica Colombiana*, *24*(1), 139–149.

<https://doi.org/10.15446/abc.v24n1.70821>

Gómez, F., Soto, J., Restrepo, S., Bernal, A., López-Kleine, L., & López, C. (2018). Gene co-expression network for *Xanthomonas*-challenged cassava reveals key regulatory elements of immunity processes. *European Journal of Plant Pathology*, *153*(4), 1083–1104. <https://doi.org/10.1007/s10658-018->

- 01628-4
- Gonzalez, C., Restrepo, S., Tohme, J., & Verdier, V. (2002). Characterization of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by PCR-based DNA fingerprinting techniques. *FEMS Microbiology Letters*, *215*(1), 23–31. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00913-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00913-8)
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002962>
- Gust, A. A., & Felix, G. (2014). Receptor like proteins associate with SOBIR1-type of adaptors to form bimolecular receptor kinases. *Current Opinion in Plant Biology*, *21*, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.007>
- Herrera, B., Hyman, G., & Bellotti, A. (2011). Threats to cassava production: Known and potential geographic distribution of four key biotic constraints. *Food Security*, *3*(3), 329–345. <https://doi.org/10.1007/s12571-011-0141-4>
- Hillocks, R. J., & Wydra, K. (2002). Bacterial, Fungal, and nematode Disease. *Cassava: Biology, Production and Utilization*, 261–280.
- Howeler, R., Lutaladio, N., & Thomas, G. (2013). *Save and Grow: Cassava. A Guide to Sustainable Production Intensification*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Hui, S., Liu, H., Zhang, M., Chen, D., Li, Q., Tian, J., ... Yuan, M. (2019). The host basal transcription factor IIA subunits coordinate for facilitating infection of TALEs-carrying bacterial pathogens in rice. *Plant Science*, *284*(March), 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.04.004>
- 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*, 883–893.
- Hutin, M., Pérez-Quintero, A. L., López, C., & Szurek, B. (2015). MorTAL Kombat: the story of defense against TAL effectors through loss-of-susceptibility.

- Frontiers in Plant Science*, 6(July). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00535>
- Isendahl, C. (2011). The Domestication and Early Spread of Manioc (*Manihot Esculenta* Crantz): A Brief Synthesis . *Latin American Antiquity*, 22(4), 452–468. <https://doi.org/10.7183/1045-6635.22.4.452>
- Jacobs, J. M., Pesce, C., Lefeuvre, P., & Koebnik, R. (2015). Comparative genomics of a cannabis pathogen reveals insight into the evolution of pathogenicity in *Xanthomonas*. *Frontiers in Plant Science*, 6(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00431>
- Jacques, M. A., Arlat, M., Boulanger, A., Boureau, T., Cesbron, S., Chen, N. W. G., ... Verni, C. (2016). Using Ecology , Physiology , and Genomics to Understand Host Specificity in *Xanthomonas*: French Network on *Xanthomonads* (FNX). *Annu. Rev. Phytopathol*, 54(6), 1–25. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100147>
- Ji, Z., Ji, C., Liu, B., Zou, L., Chen, G., & Yang, B. (2016). Interfering TAL effectors of *Xanthomonas oryzae* neutralize R-gene-mediated plant disease resistance. *Nature Communications*, 7(May), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms13435>
- Jones, J., & Dangl, J. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 3–9. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jorge, V., Fregene, M., Duque, M., Bonierbale, M., Tohme, J., & Verdier, V. (2000). Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 101(October 2000), 865–872. <https://doi.org/10.1007/s001220051554>
- Jorge, V., Fregene, M., Velez, C. M., Duque, M. C., Tohme, J., & Verdier, V. (2001). QTL analysis of field resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in cassava. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(4), 564–571. <https://doi.org/10.1007/s001220051683>
- Kpemoua, K., Boher, B., Nicole, M., Calatayud, P., & Geiger, J. (1996). Cytochemistry of defense responses in cassava infected. *Canadian Journal of Microbiology* 42, 1143(42), 1131–1143. <https://doi.org/10.1139/m96-145>
- Kumari, S., & Ware, D. (2013). Genome-wide computational prediction and

- analysis of core promoter elements across plant monocots and dicots. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079011>
- Leal, L. G., Pérez-Quintero, Á. L., Quintero, A., Bayona, Á., Ortiz, J. F., Gangadharan, A., ... López-Kleine, L. (2013). Identification of Immunity-related Genes in Arabidopsis and Cassava Using Genomic Data. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 11(6), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2013.09.010>
- Li, L., Atef, A., Piatek, A., Ali, Z., Piatek, M., Aouida, M., ... Mahfouz, M. M. (2013). Characterization and DNA-binding specificities of Ralstonia TAL-like effectors. *Molecular Plant*, 6(4), 1318–1330. <https://doi.org/10.1093/mp/sst006>
- Li, T., Huang, S., Zhou, J., & Yang, B. (2013). Designer TAL Effectors Induce Disease Susceptibility and Resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* in Rice. *Molecular Plant*, 6(3), 781–789. <https://doi.org/10.1093/mp/sst034>
- Livi, M. (2008). One hundred thousand or ten million Taíno? In *Conquest: The Destruction of the American Indios* (pp. 96–98). Polity Press.
- Lope, J. (1981). Antillanismos en la Nueva España. *Anuario de Letras: Lingüística y Filología*, (19), 75–88. <https://doi.org/10.19130/iifl.adel.19.0.1981.445>
- López, C., & Bernal, A. (2012). Cassava Bacterial Blight: Using Genomics for the Elucidation and Management of an Old Problem. *Tropical Plant Biology*, 5(1), 117–126. <https://doi.org/10.1007/s12042-011-9092-3>
- López, C., Jorge, V., Piégu, B., Mba, C., Cortes, D., Restrepo, S., ... Verdier, V. (2004). A unigene catalogue of 5700 expressed genes in cassava. *Plant Molecular Biology*, 56(4), 541–554. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0123-4>
- López, C., Quesada, L., Bohorquez, A., Duque, M., Vargas, J., Tohme, J., & Verdier, V. (2007). Mapping EST-derived SSRs and ESTs involved in resistance to bacterial blight in *Manihot esculenta*. *Genome*, 50(12), 1078–1088. <https://doi.org/g07-087> [pii]\r10.1139/g07-087
- López, C., & Restrepo, S. (2006). Limitaciones de la bacteriosis varcular de Yuca: Nuevos avances. *Acta Biológica Colombiana*, 11, 21–45.

- López, C., Soto, M., Restrepo, S., Piégu, B., Cooke, R., Delseny, M., ... 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. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-7819-3>
- López, C., Zuluaga, A. P., Cooke, R., Delseny, M., Tohme, J., & Verdier, V. (2003). Isolation of resistance gene candidates (RGCs) and characterization of an RGC cluster in cassava. *Molecular Genetics and Genomics*, *269*(5), 658–671. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0868-5>
- Lozano, C. (1986). Cassava Bacterial Blight: A manageable disease. *Plant Dis*, *70*, 1089–1093.
- Luján, M. (2017). Spanish in the Americas. A dialogic approach to language contact. In *Language Contact and Change in Mesoamerica and Beyond* (pp. 395–402). John Benjamins Publishing Company.
- Ma, Wenbo, Dong, F. F. T., Stavrinides, J., & Guttman, D. S. (2006). Type III effector diversification via both pathoadaptation and horizontal transfer in response to a coevolutionary arms race. *PLoS Genetics*, *2*(12), 2131–2142. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020209>
- Ma, Wenxiu, Zou, L., Zhiyuan, J. I., Xiameng, X. U., Zhengyin, X. U., Yang, Y., ... Chen, G. (2018). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* TALE proteins recruit OsTFIIA γ 1 to compensate for the absence of OsTFIIA γ 5 in bacterial blight in rice. *Molecular Plant Pathology*, *19*(10), 2248–2262. <https://doi.org/10.1111/mpp.12696>
- Maeder, M. L., Linder, S. J., Reyon, D., Angstman, J. F., Fu, Y., Sander, J. D., & Joung, J. K. (2013). Robust, synergistic regulation of human gene expression using TALE activators. *Nature Methods*, *10*(3), 243–245. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2366>
- Mak, A. N. S., Bradley, P., Cernadas, R. A., Bogdanove, A. J., & Stoddard, B. L. (2012). The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science*, *335*(6069), 716–719. <https://doi.org/10.1126/science.1216211>
- 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, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.008>
- Medina, C., Reyes, P., Trujillo, C., Gonzalez, J., & Bejarano, D. (2017). The role of type three effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in virulence and suppression of plant immunity. *Molecular Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/mpp.12545>
- Mora, R. (2017). *Identificación de genes de susceptibilidad en yuca, blancos de TALEs de Xam (Tesis de Maestría)*. Bogotá: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
- Moscou, M. J., & Bogdanove, A. J. (2009). A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science (New York, N.Y.)*, 326(December), 1501. <https://doi.org/10.1126/science.1178817>
- 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>
- OECD. (2016a). Cassava (*Manihot esculenta*). In *Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment* (Volume 6, pp. 155–186). Paris: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264253421-en>
- OECD. (2016b). *Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment* (Vol. 6). <https://doi.org/10.1787/9789264253018-en>
- Ogunjobi, A., Fagade, O., & Dixon, A. (2006). Molecular variation in population structure of *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* in the south eastern Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 5(20), 1868–1872. <https://doi.org/10.4314/ajb.v5i20.55891>
- Ogunjobi, A., Fagade, O., & Dixon, A. (2007). Physiological studies on *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* (Xam) strains isolated in Nigeria.

- Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 6, 10.
- Ogunjobi, A., Fagade, O., & Dixon, A. (2010). Comparative analysis of genetic variation among *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* isolated from the western states of Nigeria using RAPD and AFLP. *Indian Journal of Microbiology*, 50(2), 132–138. <https://doi.org/10.1007/s12088-010-0037-6>
- Pérez-Pinera, P., Ousterout, D. G., Brunger, J. M., Farin, A. M., Glass, K. A., Guilak, F., ... Gersbach, C. A. (2013). Synergistic and tunable human gene activation by combinations of synthetic transcription factors. *Nature Methods*, 10(3), 239–242. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2361>
- Pérez-Quintero, A. L., Rodríguez-R, L. M., Dereeper, A., López, C., Koebnik, R., Szurek, B., & Cunnac, S. (2013). An Improved Method for TAL Effectors DNA-Binding Sites Prediction Reveals Functional Convergence in TAL Repertoires of *Xanthomonas oryzae* Strains. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068464>
- Pérez-Quintero, A. L., & Szurek, B. (2019). A Decade Decoded: Spies and Hackers in the History of TAL Effectors Research. *Annual Review of Phytopathology*, 57(1), 459–481. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100026>
- Pérez, D., Mora, R., & López, C. (2019). Conservation of the cassava diversity in the traditional cultivation systems of the Amazon. *Acta Biologica Colombiana*, 24(2), 202–212. <https://doi.org/10.15446/abc.v24n2.75428>
- 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), 1298–1313. <https://doi.org/10.1111/mpp.12427>
- Porto, M. S., Pinheiro, M. P. N., Batista, V. G. L., Dos Santos, R. C., De Albuquerque Melo Filho, P., & De Lima, L. M. (2014). Plant promoters: An approach of structure and function. *Molecular Biotechnology*, 56(1), 38–49. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9713-1>
- Quang, N., Quan, M. Van, Quang, L., Nguyen, D., & Xuan, T. (2019). Identification

- of cassava bacterial blight-causing *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* based on *rpoD* and *gyrB* genes. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 61(1), 30–35. [https://doi.org/10.31276/vjste.61\(1\).30-35](https://doi.org/10.31276/vjste.61(1).30-35)
- Rache, L., Blondin, L., Flores, C., Trujillo, C., Szurek, B., Restrepo, S., ... Vernière, C. (2019). An Optimized Microsatellite Scheme for Assessing Populations of *Xanthomonas phaseoli* pv. *Manihotis*. *Phytopathology*, 109(5), 859–869. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-18-0210-R>
- Ramírez, E. (2019). *Identificación y validación de genes ejecutores en yuca blancos de TALEs de la bacteria Xanthomonas axonopodis pv. manihotis*. Tesis de Doctorado en Ciencias - Biología UNAL. Universidad Nacional de Colombia.
- Restrepo, S., Duque, M., & Verdier, V. (2000). Characterization of pathotypes among isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Plant Pathology*, 49(6), 680–687. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00513.x>
- Restrepo, S., Valle, T., Duque, M., & Verdier, V. (1999). Assessing Genetic Variability Among Brazilian Strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Through RFLP and AFLP Analyses. *Can J Microbiol*, 45, 754–763.
- Restrepo, S., Verdier, V., Mosquera, G., Duque, M., Gerstl, A., & Laberry, L. (1998). Genetic and pathogenic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Venezuela. *Plant Pathology*, 47, 601–608.
- Rinaldi, F. C., Doyle, L. A., Stoddard, B. L., & Bogdanove, A. J. (2017). The effect of increasing numbers of repeats on TAL effector DNA binding specificity. *Nucleic Acids Research*, 45(11), 6960–6970. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx342>
- Rogers, J. M., Barrera, L. A., Reyon, D., Sander, J. D., Kellis, M., Joung, J. K., & Bulyk, M. L. (2015). Context influences on TALE-DNA binding revealed by quantitative profiling. *Nature Communications*, 6(May), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms8440>
- Romer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U., & Lahaye, T. (2009). Plant Pathogen Recognition Mediated by Promoter Activation of the Pepper

- Bs3 Resistance Gene. *Science*, 318(5850), 645–648.
<https://doi.org/10.1126/science.1144958>
- Romer, P., Recht, S., & Lahaye, T. (2009). A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(48), 20526–20531. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908812106>
- Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balagué, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., ... Raffaele, S. (2014). Resistance to phytopathogens e tutti quanti : placing plant Quantitative Disease Resistance on the map. *Molecular Plant Pathology*, 15(5), 427–432. <https://doi.org/10.1111/mpp.12138>
- Roy, A. L., & Singer, D. S. (2015). Core promoters in transcription: Old problem, new insights. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(3), 165–171.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.01.007>
- Ryan, R., Vorhölter, F., Potnis, N., & Jones, J. B. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas* : understanding bacterium – plant interactions. *Nature Publishing Group*, 9(5), 344–355. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2558>
- Sacristán, S., & García-Arenal, F. (2008). The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular Plant Pathology*, 9(3), 369–384. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00460.x>
- Saijo, Y., Loo, E. P. iian, & Yasuda, S. (2018). Pattern recognition receptors and signaling in plant–microbe interactions. *Plant Journal*, 93(4), 592–613.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13808>
- Sandoval, C. Iorena, & Chavez, J. L. (2017). Uso alimenticio de especies vegetales por las comunidades indígenas de Colombia: una revisión de literatura. *Agroecología: Ciencia y Tecnología*, 2(1), 18–24. Retrieved from <http://revistas.sena.edu.co/index.php/agroeccyt/article/view/904/994>
- Santaella, M., Suárez, E., López, C., González, C., Mosquera, G., Restrepo, S., ... Verdier, V. (2004). Identification of genes in cassava that are differentially expressed during infection with *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Molecular Plant Pathology*, 5(6), 549–558. <https://doi.org/10.1111/J.1364->

- 3703.2004.00254.X
- Schandry, N., Jacobs, J. M., Szurek, B., & Pérez-Quintero, A. L. (2018). A cautionary TALE: how plant breeding may have favoured expanded TALE repertoires in *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology*, *19*(6), 1297–1301. <https://doi.org/10.1111/mpp.12670>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012, July). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schwartz, A. R., Morbitzer, R., Lahaye, T., & Staskawicz, B. J. (2017). TALE-induced bHLH transcription factors that activate a pectate lyase contribute to water soaking in bacterial spot of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(5), E897–E903. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620407114>
- Schwartz, A. R., Potnis, N., Timilsina, S., Wilson, M., Patané, J., Martins, J., ... Staskawicz, B. J. (2015). Phylogenomics of *Xanthomonas* field strains infecting pepper and tomato reveals diversity in effector repertoires and identifies determinants of host specificity. *Frontiers in Microbiology*, *6*(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00535>
- Shantharaj, D., Römer, P., Figueiredo, J. F. L., Minsavage, G. V., Krönauer, C., Stall, R. E., ... Jones, J. B. (2016). An engineered promoter driving expression of a microbial avirulence gene confers recognition of TAL effectors and reduces growth of diverse *Xanthomonas* strains in citrus. *Molecular Plant Pathology*, *18*(7), 976–989. <https://doi.org/10.1111/mpp.12454>
- 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), 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.013>
- Song, W. Y., Wang, G. L., Chen, L. L., Kim, H. S., Pi, L. Y., Holsten, T., ... Ronald, P. (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease

- resistance gene, Xa21. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5243), 1804–1806.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.270.5243.1804>
- Soto, J., Mora, R., Calle, F., & López, C. (2017). QTL identification for cassava bacterial blight resistance under natural infection conditions. *Acta Biologica Colombiana*, 22(1), 19–26. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n1.57951>
- Soto, J., Mora, R., Mathew, B., León, J., Gomez, F. A., Ballvora, A., ... Bart, R. (2017). Major Novel QTL for Resistance to Cassava Bacterial Blight Identified through a Multi-Environmental Analysis. *Frontiers in Plant Science*, 8(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01169>
- Streubel, J., Baum, H., Grau, J., Stuttman, J., & Boch, J. (2017). Dissection of TALE-dependent gene activation reveals that they induce transcription cooperatively and in both orientations. *PLoS ONE*, 1–24.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173580> March
- Streubel, J., Blücher, C., Landgraf, A., & Boch, J. (2012). TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nature Biotechnology*, 30(7), 593–595.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2304>
- Tappiban, P., Sraphet, S., Srisawad, N., Smith, D. R., & Triwitayakorn, K. (2018). Identification and expression of genes in response to cassava bacterial blight infection. *Journal of Applied Genetics*, 59(4), 391–403.
<https://doi.org/10.1007/s13353-018-0457-2>
- Taylor, R. K., Griffin, R. L., Jones, L. M., Pease, B., Tsatsia, F., Fanai, C., ... Davis, R. I. (2017). First record of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Solomon Islands. *Australasian Plant Disease Notes*, 12(1), 49.
<https://doi.org/10.1007/s13314-017-0275-0>
- Tomkins, J., Fregene, M., Main, D., Kim, H., Wing, R., & Tohme, J. (2004). Bacterial artificial chromosome (BAC) library resource for positional cloning of pest and disease resistance genes in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Molecular Biology*, 56(4), 555–561. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-5045-7>
- Toruño, T., Stergiopoulos, I., & Coaker, G. (2016). Plant-Pathogen Effectors:

- Cellular Probes Interfering with Plant Defenses in Spatial and Temporal Manners. *Annual Review of Phytopathology*, 54(1), 419–441.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100204>
- Triplett, L., Leach, J., & Gold, C. (2016). Host mechanisms for resistance to TAL effectors : Thinking outside the. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 95, 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.02.002>
- Trujillo, C., Arias, N., Poulin, L., Medina, C., Tapiero, A., Restrepo, S., ... Bernal, A. (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), 161. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-161>
- Trujillo, C., Ochoa, J., Mideros, M., & Restrepo, S. (2014). A Complex Population Structure of the Cassava Pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv . *manihotis* in Recent Years in the Caribbean Region of Colombia, 155–167.
<https://doi.org/10.1007/s00248-014-0411-8>
- Üstün, S., & Börnke, F. (2014). Interactions of *Xanthomonas* type-III effector proteins with the plant ubiquitin and ubiquitin-like pathways. *Frontiers in Plant Science*, 5(DEC), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00736>
- Vásquez, A., Soto, J., & López, C. (2018). Descifrando las moléculas ocultas en las sombras grises de la resistencia cuantitativa a patógenos. *Acta Biologica Colombiana*, 23(1), 5–16. <https://doi.org/10.15446/abc.v23n1.66487>
- Verdier, V., & Jorge, V. (2004). Recent progress in the characterization of molecular determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*–cassava interaction. *Plant Molecular Biology*, 56(December), 573–584.
<https://doi.org/10.1007/s11103-004-5044-8>
- Verdier, V., López, C., & Bernal, A. (2011). Cassava Bacterial Blight (or Vascular Bacteriosis), Caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *La Yuca En El Tercer Milenio*, (C), 200–212.
- Waddington, S. R., Li, X., Dixon, J., Hyman, G., & de Vicente, M. C. (2010). Getting the focus right: Production constraints for six major food crops in Asian and African farming systems. *Food Security*, 2(1), 27–48.

<https://doi.org/10.1007/s12571-010-0053-8>

- 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). <https://doi.org/10.1126/science.aav5868>
- Wang, L., Rinaldi, F. C., Singh, P., Doyle, E. L., Dubrow, Z. E., Tu, T., ... Bogdanove, A. J. (2017). TAL effectors drive transcription bidirectionally in plants. *MOLECULAR PLANT*. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.12.002>
- White, F., Potnis, N., Jones, J., & Koebnik, R. (2009). The type III effectors of *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology*, 10(6), 749–766. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2009.00590.X>
- Wydra, K., Zinsou, V., Jorge, V., & Verdier, V. (2004). Identification of Pathotypes of *Xanthomonas axonopodis* pv . *manihotis* in Africa and Detection of Quantitative Trait Loci and Markers for Resistance to Bacterial Blight of Cassava. *Phytopathology*, 94(50), 1084–1093. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.10.1084>
- Xu, Z. yin, Zou, L. fang, Ma, W. xiu, Cai, L. lu, Yang, Y. yang, & Chen, G. you. (2017). Action modes of transcription activator-like effectors (TALEs) of *Xanthomonas* in plants. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(12), 2736–2745. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61750-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61750-7)
- Yamamoto, Y. Y., Ichida, H., Matsui, M., Obokata, J., Sakurai, T., Satou, M., ... Abe, T. (2007). Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. *BMC Genomics*, 8, 1–23. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-67>
- 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.

Zhang, J., Yin, Z., & White, F. (2015). TAL effectors and the executor R genes. *Frontiers in Plant Science*, 6(August), 1–9.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00641>

Zhang, X., Dodds, P. N., & Bernoux, M. (2017). What Do We Know About NOD-Like Receptors in Plant Immunity? *Annu Rev Phytopathol*, 55(9), 1–25.

<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035250>