

LIMITACIONES DE LA BACTERIOSIS VASCULAR DE YUCA: NUEVOS AVANCES

Limitations of Cassava Bacterial Blight: New Advances

CAMILO LÓPEZ¹, Ph. D., SILVIA RESTREPO², Ph. D.,
VALÉRIE VERDIER³, Ph. D.

¹Laboratorio de Fitopatología Molecular. Departamento de Biología,
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia,
Sede Bogotá, AA14490, Bogotá, Colombia. celopezc@unal.edu.co

²Laboratorio de Micología y Fitopatología. Departamento de Biología,
Universidad de los Andes, Carrera 1 No. 18-10, Bogotá, Colombia.
srestrep@uniandes.edu.co

³Laboratoire Génome et Développement des Plantes, IRD-CNRS-
Université de Perpignan, Centre IRD, 911Av Agropolis, BP64501,
34394 Montpellier, Francia. Valerie.Verdier@mpl.lrd.fr

Presentado 10 de marzo de 2006, aceptado 4 de octubre de 2006, correcciones 15 de octubre de 2006.

RESUMEN

La yuca (*Manihot esculenta*) constituye la base de la alimentación de más de 600 millones de personas en el mundo. Una de las principales limitaciones de este cultivo es la bacteriosis vascular, ocasionada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). Este artículo revisa el conocimiento actual acerca de la interacción *Xanthomonas*-yuca. Se presentan estudios recientes llevados a cabo sobre la diversidad y dinámica de las poblaciones de *Xam* empleando diferentes estrategias moleculares. Se describen los diferentes métodos desarrollados para la detección y diagnóstico de la bacteria en plantas y semillas de yuca y su contribución para reducir el impacto de la enfermedad. Se presentan los estudios encaminados a comprender los mecanismos moleculares y los genes responsables en la resistencia de la yuca a la bacteriosis vascular incluyendo los últimos avances obtenidos gracias a la aplicación de estrategias de genómica funcional. El conocimiento adquirido en los últimos años en este patosistema permitirá desarrollar mejores estrategias para el manejo de la enfermedad así como desarrollar a corto plazo variedades de yuca resistentes a la bacteriosis lo que contribuiría a resolver uno de los principales problemas de los productores pobres de yuca y le abriría un horizonte promisorio al cultivo de la yuca en el mundo.

Palabras clave: yuca, resistencia, bacteriosis vascular, biología molecular, genómica.

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta*), a starchy root crop, constitutes the source of alimentation for over 600 million people worldwide. Cassava Bacterial Blight (CBB) is caused by

the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). This review will focus on the current knowledge on the molecular cassava-*Xam* interaction. We will present the different molecular techniques developed to assess the genetic diversity and dynamics of *Xam* populations. We will also present different methods developed for detecting the pathogen in vegetative planting materials and true seeds and their contribution to reduce the impact of the disease. We will review different studies conducted to gain a better understanding on the molecular mechanisms and the genes involved in the cassava bacterial resistance, including the recent advances obtained using functional genomics. The acquired knowledge in the last years for this pathosystem will help to establish better disease control strategies and generate, in a short term, resistant cassava varieties contributing to solve one of the main problems of poor cassava farmers and this effort will open a new horizon to the cassava crop in the world.

Key words: cassava, resistance, cassava bacterial blight, molecular biology, genomics.

INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una planta originaria de América del sur y que pertenece a la familia *Euphorbiaceae* (Allem, 1994). La yuca es considerada un producto de seguridad alimentaria y según la FAO un aumento en la producción de yuca podría ayudar a solucionar el problema de hambre en las regiones tropicales pobres donde la yuca puede ser cultivada (<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/gcgs/GCS.htm>). Más de 600 millones de personas en el mundo dependen del consumo de la yuca como fuente de calorías, constituyéndose en este sentido en el cuarto cultivo más importante en el mundo después del arroz, el maíz y el trigo (FAO, 1998). Actualmente la yuca es cultivada en más de 90 países, particularmente en los países tropicales de América Latina y África. La mitad de los 16 millones de hectáreas dedicadas al cultivo de la yuca en el mundo se encuentran en África, un 30% en Asia y el 20% restante en América Latina (Ceballos, 2002). La producción mundial es aproximadamente de 152 millones de toneladas por año y constituye una de las dicotiledóneas con mayor producción. Para el periodo de 1995 a 1997, la producción anual de yuca en el mundo fue de 165,3 millones de toneladas, con un valor cercano a US \$8800 millones (Ceballos, 2002). La yuca es considerada como un cultivo de subsistencia, con alta capacidad de adaptación a suelos ácidos e infértiles, alta resistencia a malezas y plagas y una buena capacidad para resistir largos periodos de sequía. La yuca es cultivada en general por pequeños agricultores quienes dependen de ella como única fuente de ingresos (Cock, 1989). La yuca es empleada especialmente para consumo humano pero también es utilizada en la alimentación animal y como materia prima para el procesamiento industrial de productos basados en almidón (Cock, 1985). La raíz de la yuca es un órgano muy rico en hidratos de carbono en forma de almidón, por lo que el aporte calórico es considerable. Entre su aporte en nutrientes se destaca la presencia de vitamina C, B2, B6, magnesio y potasio. Las hojas de la yuca son consumidas en África y son fuente importante de proteínas (18-22% del peso seco), minerales y vitaminas (particularmente carotenos y vitamina C), (Buitrago, 1990). La yuca es una de las materias primas más comunes para la producción de almidón. El almidón

de yuca se utiliza en la industria de alimentos, en la fabricación de papel, como lubricante en la perforación de pozos petroleros y en la industria textil. Se emplea también para la producción de dextrinas, las cuales son empleadas en pegantes (Cock, 1989). El almidón producido por las raíces de yuca está adquiriendo nuevos usos en la industria y en el comercio de diferentes países. La utilización reciente de biocombustibles genera un nuevo incentivo para el cultivo de la yuca, pues de ella se puede extraer etanol como fuente energética.

LA BACTERIOSIS VASCULAR DE LA YUCA

El agente patógeno. El agente responsable de la bacteriosis vascular es la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam). Xam es una bacteria gram negativa, provista de un flagelo. Excepto por la falta de pigmentación, la mayoría de sus características fisiológicas y bioquímicas son típicas de las xantomonadas (Verdier, 2002). A nivel de estructura genómica es poco lo que se conoce de Xam. Se sabe que puede poseer varios plásmidos, aunque algunas cepas carecen de ellos (Canteros *et al.*, 1995).

La bacteriosis vascular de la yuca, o añublo bacteriano es responsable de grandes pérdidas en la producción de yuca. Si las condiciones del medio son favorables para su desarrollo y si no se adoptan prácticas agronómicas y fitosanitarias adecuadas para su control, las pérdidas pueden llegar hasta el 100% (Lozano, 1986). Históricamente, la bacteriosis vascular de la yuca ocasionó pérdidas importantes y fue la responsable de la hambruna en la década de los años 70 en Zaire (Maraite, 1993). La bacteriosis es una enfermedad endémica importante en Latinoamérica y África y se encuentra en todas las regiones donde la yuca es cultivada (Verdier *et al.*, 2004). En los últimos años se ha observado un incremento en su incidencia y su expansión a nuevas regiones de cultivo.

La bacteria Xam es un patógeno epífita, foliar y vascular que produce una amplia variedad de síntomas, incluyendo lesiones (manchas) angulares en las hojas, añublo (quemazón), marchitamiento, exudados y lesiones en el tallo, en casos extremos puede incluso ocasionar la muerte total de la planta (Lozano, 1986). Estos síntomas son, en la mayoría de los casos visibles únicamente en las hojas y tallos (Lozano, 1986). Las raíces solamente se ven afectadas en el caso de cultivos muy sensibles a la enfermedad. El proceso infeccioso comienza con la multiplicación epífita, la cual ocurre cerca de los estomas, por donde la bacteria puede penetrar. También puede penetrar por heridas provocadas por la lluvia, los insectos o por el ser humano (Daniel y Boher, 1985). Una vez al interior, la bacteria pasa por una fase de desarrollo intercelular en el mesófilo para posteriormente invadir el xilema en cuyo caso la infección se torna sistémica. Las células del mesófilo son degradadas por la enzima transeliminasa, una enzima pectinolítica (Maraite y Weyns, 1979). En el caso de ataques fuertes, se produce una defoliación muy rápida que deja las ramificaciones de la planta sin hojas, dándole a la planta un aspecto de candelabro. El ciclo de la bacteria se caracteriza por una alternancia entre una fase parasitaria que ocurre en especial durante la época de lluvias, seguida de una fase de supervivencia durante la estación seca. Al comienzo de la época lluviosa la bacteria se multiplica sobre la superficie de las hojas constituyéndose así en el inóculo primario (Restrepo, 1999). La bacteria no es capaz de

sobrevivir en el suelo, pero durante la época de sequía *Xam* puede sobrevivir en los tallos de yuca, en los restos vegetales o sobre malas hierbas. El principal medio de contaminación y diseminación de la enfermedad es a través de la difusión de estacas contaminadas y por la utilización de utensilios infectados (Lozano, 1986). También se ha establecido la posibilidad de transmisión de la enfermedad a través de semillas sexuales contaminadas (Lozano, 1986; Verdier *et al.*, 1998a).

Estudios de diversidad, identificación de patotipos. El conocimiento sobre la estructura y diversidad de las poblaciones del agente patógeno es un requisito importante para poder desarrollar mejores estrategias de control de la enfermedad. Los primeros estudios encaminados a evaluar la variabilidad genética en *Xam* estuvieron basados en actividades enzimáticas, crecimiento sobre diferentes medios de cultivos, respuesta a gamas de antibióticos y perfiles de ácidos grasos (Fessehaie, 1997; Grousseau *et al.*, 1990; Lozano y Sequeira, 1974). Estos primeros estudios mostraron que estas técnicas no poseían un alto poder discriminatorio. Más recientemente, con el desarrollo de técnicas en biología molecular ha sido posible realizar estudios más detallados sobre la variabilidad en *Xam* y la evolución de las poblaciones.

La variabilidad genética de *Xam* ha sido estudiada empleando RFLPs. Se han desarrollado diferentes tipos de sondas: genómicas como pBS6 y pBS8 (Verdier *et al.*, 1993), plasmídicas (pthB, ver más adelante; Assigbetsé *et al.*, 1998; Verdier *et al.*, 1993; Verdier *et al.*, 1994) o secuencias ribosomales universales 16S+23S de *E. coli* (Fessehaie, 1997; Verdier *et al.*, 1993). La técnica de RFLP empleando la sonda pthB permitió la mejor diferenciación entre poblaciones de *Xam*. Esta sonda es aún más discriminatoria que las sondas genómicas de secuencias repetitivas (pBS6 y pBS8) o el perfil de restricción del ADN plasmídico. De esta forma, se ha recomendado el empleo de RFLP utilizando como sonda pthB para estudios posteriores sobre diversidad y variabilidad genética en *Xam* y correlacionarla con filogenia y patogenicidad (Restrepo *et al.*, 1999a; Restrepo *et al.*, 2000a; Verdier *et al.*, 2004). Sin embargo, para ciertas poblaciones ninguno de estos marcadores permitió hacer una discriminación entre cepas de *Xam*. Por esta razón, otro tipo de estrategias tales como AFLP, Rep y Eric-PCR fueron evaluadas (Restrepo *et al.*, 1999a; Restrepo *et al.*, 2000a). Los análisis de AFLP ofrecen la posibilidad de cubrir una gran parte del genoma y su aplicabilidad al estudio de la variabilidad genética en *Xam* ha sido claramente demostrada y ha permitido caracterizar poblaciones de *Xam* genéticamente muy homogéneas (Restrepo *et al.*, 1999b; Restrepo *et al.*, 2000a). El Rep y Eric-PCR son técnicas basadas en la amplificación de secuencias repetitivas por medio de PCR, cuyas ventajas son su simplicidad, rapidez y la capacidad de evaluar un gran número de cepas de manera simultánea (Restrepo *et al.*, 1999b; Restrepo *et al.*, 2000a).

Los primeros análisis de diversidad genética en *Xam* se realizaron sobre poblaciones africanas. Estos primeros análisis sugirieron una estructura poblacional clonal (Verdier *et al.*, 1993), sin embargo, estudios recientes han permitido detectar la aparición de nuevos haplotipos (grupos genéticos definidos por el perfil de bandas obtenidas por RFLP) entre las cepas africanas aisladas a partir de genotipos de yuca introducidos

recientemente. Los estudios conducidos en los últimos años han permitido la identificación de nueve haplotipos diferentes a partir de una colección de 218 cepas africanas colectadas en Togo (Verdier *et al.*, 2004). Las poblaciones de *Xam* han sido mucho mejor caracterizadas en América del Sur, particularmente en Colombia, Venezuela y Brasil. Los trabajos realizados por más de cinco años permitieron avances importantes sobre la estructura y la evolución de las poblaciones de *Xam* en Colombia (Restrepo *et al.*, 1999a; Restrepo *et al.*, 2000a; Verdier *et al.*, 2004). Dada la dificultad en cubrir toda la variación existente en las poblaciones naturales de *Xam*, los investigadores decidieron hacer el estudio basados en ecozonas o zonas edafoclimáticas (ECZ). Las ECZs han sido definidas por los fitomejoradores sobre la base de la interacción de la planta con el medio fisiológico y biológico. Los resultados obtenidos durante varios años han conducido a la caracterización de siete ECZs adaptadas al cultivo de yuca, cinco de las cuales se presentan en Colombia (CIAT, 1983). Para evaluar la diversidad de *Xam* en Colombia, Restrepo *et al.* (2000a) muestrearon y colectaron cepas de *Xam* en tres ecozonas colombianas: ECZ1 (Costa Atlántica), ECZ2 (Llanos orientales) y ECZ5 (Zona andina). En total se visitaron 15 localidades y se colectaron 189 cepas de *Xam* en este primer muestreo. Las cepas fueron evaluadas mediante RFLP/pthB, lo cual permitió la identificación de 26 haplotipos diferentes (Restrepo *et al.*, 1997; Restrepo *et al.*, 2000a). Prospecciones realizadas más recientemente han permitido identificar 45 haplotipos dentro de una colección total de 736 cepas (Restrepo *et al.*, 2004). Estos estudios han permitido, además, establecer una correlación entre haplotipos y ciertas características biológicas del patógeno, tales como su adaptación a condiciones ecológicas particulares a cada ECZ y a los genotipos de yuca presentes en esas condiciones. También se logró poner en evidencia la migración de cepas entre diferentes localidades dentro de una misma ECZ producto del transporte de estacas contaminadas (Restrepo *et al.*, 2000a). Estudios similares se han llevado a cabo en Brasil y Venezuela. En Brasil se han identificado 38 haplotipos a partir de una colección de 79 cepas provenientes de tres ECZs (Restrepo *et al.*, 1999a). Una relativa alta diversidad también se observó en Venezuela, en donde de 91 aislamientos colectados se detectaron 28 haplotipos, los cuales fueron claramente diferentes a los haplotipos descritos para Colombia y Brasil (Verdier *et al.*, 1998b). Al comparar los haplotipos observados en Colombia, Venezuela y Brasil se observó que estos son específicos a cada país. Las poblaciones de *Xam* colectadas en la misma ECZ pero en países diferentes no poseen haplotipos en común, lo que sugiere la presencia de fuertes barreras geográficas que no favorecen el intercambio de material vegetal y se reduce así la probabilidad de diseminación de cepas del agente patógeno (Restrepo, 1999). Al comparar los haplotipos americanos y africanos se observó que dos de ellos son comunes a los dos continentes, lo que refuerza la hipótesis de que las cepas africanas son originarias de América (Verdier *et al.*, 1993). Comparativamente las cepas de Brasil son las más diversas y en general las poblaciones de *Xam* en América del Sur presentan una mayor variabilidad genética que las de África, lo cual puede ser explicado considerando el centro de origen suramericano de la yuca (Olsen y Shaal, 1999).

Durante cinco años las poblaciones de *Xam* fueron estudiadas en las ECZs colombianas y se pudo determinar que las poblaciones de *Xam* son inestables y los cambios

ocurren rápidamente, incluso en menos de un año (Restrepo *et al.*, 2004). Se lograron así mismo identificar los principales factores que moldean la dinámica poblacional de *Xam*. En primer lugar la introducción de genotipos resistentes acelera la selección de nuevas variantes de *Xam*. El intercambio de material contaminado contribuye a la migración de cepas y en consecuencia influye sobre la estructura genética de las poblaciones de *Xam*. Los factores ambientales tales como la lluvia y la temperatura juegan también un papel importante sobre la estructura y la diversidad genética de las poblaciones de *Xam* (Restrepo *et al.*, 2004; Verdier *et al.*, 2004). Actualmente la colección de cepas de *Xam* provenientes de Colombia, Brasil y Venezuela se encuentra constituida por 906 aislamientos molecularmente caracterizados, los cuales representan 111 haplotipos diferentes (Restrepo y Verdier 1997; Restrepo *et al.*, 2000a; Restrepo *et al.*, 2004). Esta colección se encuentra disponible en la Unidad de Biotecnología del CIAT (Cali, Colombia).

Uno de los aspectos de mayor relevancia para los productores y los mejoradores con miras a seleccionar cultivos que presenten una resistencia durable frente a un patógeno es la caracterización del espectro de virulencia de las cepas sobre una gama diferencial de cultivos, lo que recibe el nombre de patotipos (es decir, la búsqueda de interacciones diferenciales entre cepas y cultivos). La identificación de patotipos en la interacción yuca-*Xam* también ha sido objeto de estudio. Para tal fin, en un primer estudio, 93 cultivos de yuca, pertenecientes a la colección central del CIAT fueron caracterizados molecularmente mediante la técnica de AFLP (Sánchez *et al.*, 1999), al mismo tiempo que se evaluó su resistencia/susceptibilidad a la bacteriosis vascular (Sánchez *et al.*, 1999; Restrepo *et al.*, 2000b). Los análisis de estos resultados permitieron identificar 17 cultivos de yuca contrastantes y que representan la diversidad genética de yuca. Estos cultivos de yuca fueron inoculados con una cepa característica de los 26 haplotipos de *Xam* previamente identificados en Colombia (representativos de las ECZ 1, 2 y 5) y fueron evaluados en condiciones de campo en dos ECZs durante dos ciclos de cultivo (Restrepo *et al.*, 2000c). Se evaluaron dos técnicas de inoculación: sobre hojas y tallos. La inoculación foliar presenta ventajas tales como la facilidad técnica, economía en material vegetal y su semejanza con las condiciones de contaminación naturales. Sin embargo, empleando esta técnica no se logró detectar una interacción específica entre cepas de *Xam* y cultivos de yuca (Restrepo *et al.*, 2000c). A nivel del mesófilo y durante los primeros estados de infección no se presenta un reconocimiento rápido del patógeno y los mecanismos de defensa intervienen solo tardíamente (Restrepo *et al.*, 2000c). La inoculación por punción en tallos permite superar el problema de penetración de la bacteria en los tejidos, que en condiciones naturales ocurre por heridas. Este sistema permite poner a la bacteria en contacto directo con el sistema vascular donde las reacciones de defensa se manifiestan tempranamente. Empleando esta estrategia de inoculación sí se logró establecer una interacción altamente significativa cultivo x cepa razón por la cual se ha recomendado esta técnica de inoculación para el estudio del patosistema *Xam*-yuca (Restrepo *et al.*, 2000c). Las 26 cepas de *Xam* fueron agrupadas en distintos patotipos. Se identificaron nueve patotipos en la ECZ1, 13 en la ECZ2, tres patotipos en la ECZ2-4 y cuatro en la ECZ5 (Restrepo *et al.*, 2000c; Restrepo *et al.*, 2004). Siguiendo la misma estrategia, se han identificado patotipos en Brasil, Venezuela

(Verdier *et al.*, 1998a; Verdier *et al.*, 1998b) y África (Wydra *et al.*, 2004). Los resultados generados han permitido recomendar ciertos cultivos resistentes para realizar nuevos cruces dentro de los programas de mejoramiento genético. Dentro de éstos cabe destacar los cultivos MBRA685, MNGA2, y MBRA12 los cuales mostraron un nivel de resistencia alto a la mayoría de patotipos de la ECZ1. Los cultivos CM6438-14 y CM523-7 mostraron ser altamente resistentes a cuatro de los patotipos presentes en la ECZ2 (Restrepo *et al.*, 2000c). El conjunto de los trabajos realizados sobre la variabilidad, caracterización y evolución de la estructura de las poblaciones de *Xam* ha generado información valiosa para el control de la enfermedad y para el desarrollo de programas de mejoramiento. Estos estudios han puesto en evidencia la necesidad de realizar un seguimiento continuo y detallado de la evolución de las poblaciones de *Xam*. Con miras a desarrollar programas de evaluación de riesgos de la enfermedad será necesario identificar los campos de cultivo de yuca y localizarlos en mapas y sobre ellos establecer los factores que tienen influencia sobre la incidencia de la enfermedad tales como el número de cultivos de yuca presentes, las características climáticas (precipitaciones y temperatura) y la presencia y diversidad de *Xam*. Esta información permitirá generar mapas de previsión de la presencia de la bacteriosis y poder así desarrollar las estrategias de control adecuadas (Restrepo, 1999).

Factores de patogenicidad en *Xam*. Es relativamente poco lo que se conoce sobre los factores implicados en la patogenicidad de *Xam* en comparación con otras bacterias fitopatógenas. Se sabe que el proceso infeccioso inicial necesita de una matriz fibrilar compuesta por expopolisacáridos (EPS; Boher *et al.*, 1995) cuya composición monomérica es similar al xantano. Se piensa que una de las funciones de los EPS es actuar como una barrera física protectora. Los EPS pueden igualmente estar implicados en la importación o movilización de moléculas cargadas (Canteros *et al.*, 1995). Otros tipos de lipopolisacáridos (LPS) producidos por *Xam* han sido detectados en las células de yuca infectadas aunque su papel en patogenicidad aún no se conoce (Boher, 1996). Mucho menos es lo que se conoce sobre los genes de patogenicidad en *Xam*.

Las bacterias fitopatógenas emplean un sistema de secreción altamente conservado para inyectar proteínas al interior de la célula del hospedero, llamado sistema de secreción tipo III (TTSS por las siglas del inglés *Type Three Secretion System*). Hasta el momento un TTSS no ha sido identificado en *Xam*, pero se ha demostrado su presencia y su importancia en otras especies de *Xanthomonas* y otras bacterias fitopatógenas, razón por la cual es obvio pensar que *Xam* también utilice este sistema de secreción para inyectar proteínas dentro de las células de yuca. Las proteínas que son translocadas dentro de la célula vegetal se llaman efectores. Estas proteínas modifican o alteran la fisiología de las células de un hospedero susceptible (Alfano y Collmer, 2004). Cuando los efectores son reconocidos por proteínas de resistencia presentes en las plantas son llamados proteínas de avirulencia. Cuando los genes de resistencia están ausentes, el patógeno puede invadir libremente el hospedero ya que los efectores poseen actividad de virulencia (Mudget, 2005). Los efectores o Avr de diferentes patógenos no muestran una fuerte similitud a nivel de secuencia. Sin embargo, una familia de genes Avr que ha sido identificada en particular en bacterias del

género *Xanthomonas* muestran una similitud importante y ha sido denominada familia avrBs3 por el primer miembro de la familia en ser caracterizado (Buttner y Bonas, 2003). En *Xam* un gen de patogenicidad llamado pthB ha sido identificado. Por su similitud a nivel de secuencia, este gen se considera como un miembro adicional de la familia avrBs3. El gen pthB posee 12,5 repeticiones internas de un motivo de 102 pb, un dominio de localización nuclear (NLS) y un dominio ácido de activación transcripcional (Verdier *et al.*, 1996). El gen se encuentra flanqueado por repeticiones directas y los análisis de secuencia sugieren que una serie de rearrreglos génicos han tenido lugar, los cuales han jugado un papel importante en la evolución de la patogenicidad en algunas cepas de *Xam* (Verdier *et al.*, 2004); mientras que otras que contienen mutaciones en el gen pthB muestran una pérdida en su patogenicidad, la cual es restablecida cuando se introduce el gen de tipo silvestre. Estas observaciones sustentan la idea que pthB es un determinante importante en la patogenicidad en *Xam*.

En un intento por caracterizar otros genes putativamente implicados en patogenicidad, cepas patogénicas y no patogénicas de *Xam* han sido caracterizadas empleando estrategias basadas en PCR. Utilizando combinaciones de *primers* específicos al gen pthB y *primers* de RAPDs y de AFLP ha sido posible identificar fragmentos de ADN específicos a las cepas patogénicas. Los análisis de secuencia de estos fragmentos permitieron identificar algunos reguladores transcripcionales, factores de virulencia, genes implicados en la adaptación patogénica y algunos genes similares a proteínas efectoras previamente identificados en otras bacterias fitopatógenas (González *et al.*, 2002). Mutaciones dirigidas de estos genes permitirán determinar más claramente el papel de estos genes candidatos en la patogenicidad de *Xam*.

Medidas de control de la enfermedad. Las pérdidas ocasionadas por *Xam* pueden ser reducidas significativamente combinando prácticas culturales, tomando medidas fitosanitarias y empleando la resistencia varietal. Dentro de las prácticas culturales más eficaces se encuentran la rotación de cultivos, la fertilización del suelo, la eliminación de malas hierbas y la eliminación de restos vegetales y de plantas afectadas (Jorge, 2000). La calidad del material destinado a la propagación puede ser mejorada a través de controles sanitarios o por la producción de estacas sanas en regiones indemnes a la enfermedad. La multiplicación de plantas bajo la forma *in vitro* es también un método seguro para obtener material de plantación sano. Las medidas de cuarentena son indispensables para evitar la introducción de la enfermedad en regiones no afectadas (Lozano, 1986). Un protocolo adecuado de diagnóstico es una herramienta importante para el control de la enfermedad. Una serie de métodos de diagnóstico han sido desarrollados específicamente para *Xam*. A partir de la secuencia del gen pthB se han desarrollado una serie de *primers* que permiten la detección específica de *Xam* y la discriminación con otras especies de *Xanthomonas*. Este procedimiento de detección por PCR es rápido y puede ser fácilmente adaptado para identificar la presencia de la bacteria sobre plantas posiblemente infectadas. Los niveles de detección llegan a ser de hasta tres células viables por reacción de PCR. Una versión optimizada, empleando PCR anidado, ha sido desarrollada mejorando la sensibilidad y ha permitido la identificación del patógeno sobre semillas (Ojeda y Verdier, 2000). Otra estrategia de

detección basada en *dot-blot* también ha sido desarrollada, la cual emplea como sonda un fragmento del gen *pthB*. Aunque esta técnica es 10-100 veces menos sensible que los métodos basados en PCR es lo suficientemente sensible y rápida para realizar un *screening* de un alto número de estacas (Verdier y Mosquera, 1999). Aunque se han evaluado métodos de lucha biológica, utilizando por ejemplo *Pseudomonas* spp., los resultados obtenidos no han sido claramente convincentes (Lozano, 1986). Hasta el momento no existen métodos químicos para el control de la bacteriosis, sin embargo, aunque hubiera bactericidas disponibles, esto aumentaría los costos de producción del cultivo, lo cual no sería rentable teniendo en cuenta que los productores de yuca son, en su mayoría, campesinos de pocos recursos.

Hasta el momento el método de control más apropiado para el control de la bacteriosis vascular es la utilización de cultivos resistentes. La búsqueda de fuentes de resistencia se ha llevado a cabo a través de cruzamientos entre *M. esculenta* y un pariente silvestre, *M. glaziovii*. Uno de los clones generados a través de este tipo de cruzamientos interespecíficos es el clon 58308 generado en el IITA. Este clon mostró una resistencia elevada a la bacteriosis durante varios años. Sin embargo, presenta un bajo rendimiento y ha sido empleado en particular como fuente de resistencia en otros cruzamientos (Hahn, 1978; Hahn y Theberge, 1987). En el CIAT más de 2.000 cultivos han sido evaluados en condiciones de invernadero y campo frente a la bacteriosis (CIAT, 1974; CIAT, 1977; CIAT, 1980). Ninguno de los cultivos ha mostrado una resistencia completa a la bacteriosis. Recientemente, la colección central de yuca presente en el CIAT fue evaluada en campo en los Llanos Orientales de Colombia donde la enfermedad es endémica. Aproximadamente 16% de los cultivos evaluados mostraron un buen nivel de resistencia (CIAT, 1993). A pesar de que existen algunas variedades de yuca relativamente resistentes a la bacteriosis, éstas no poseen buenas cualidades culinarias y por esta razón no han sido adoptadas por los productores. La alternativa es poder desarrollar variedades resistentes que posean propiedades culinarias adecuadas para su comercialización. Las estrategias de mejoramiento hasta ahora llevadas a cabo en yuca se han basado en métodos tradicionales, es decir, selección de materiales resistentes a partir de la evaluación de colecciones o de poblaciones obtenidas a través de cruzamientos intra e inter específicos. El desarrollo de variedades resistentes mediante estrategias de mejoramiento convencional ha permitido elevar los niveles de resistencia en ciertos casos (Jorge, 2000), sin embargo, las características propias de la yuca, tales como su largo ciclo reproductivo, su naturaleza tetraploide y su alta heterocigocidad han dificultado la obtención de mejores resultados. Los avances recientes en el conocimiento del genoma y la biología molecular de la yuca (ver más adelante) abren perspectivas de desarrollar nuevas estrategias de mejoramiento para el control de la bacteriosis.

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Diferentes estudios bioquímicos e histoquímicos han puesto en evidencia los mecanismos de defensa que limitan la colonización y desarrollo de *Xam* en plantas de yuca. Se han observado pequeñas diferencias entre cultivos resistentes y sensibles en cuanto a la colonización del parénquima foliar por *Xam* (Sánchez, comunicación personal; Restrepo, 2000b). Aunque no ha podido observarse una respuesta hipersensible (HR)

en las hojas de yuca infectadas por *Xam*, ciertos datos sugieren que la respuesta vascular de cultivos resistentes pueden ser similares a un tipo de HR vascular (Verdier *et al.*, 1994; Kpémoua *et al.*, 1996). Los estudios de microscopía electrónica de transmisión han puesto en evidencia que el principal sitio donde se desencadenan las reacciones de defensa son los tejidos vasculares (Boher *et al.*, 1995; Kpémoua *et al.*, 1996). Dentro de las respuestas de defensa se encuentra la producción de compuestos fenólicos, refuerzo de barreras estructurales (deposición de lignina, callosa o suberina) y la oclusión de vasos del xilema por compuestos pécticos y de tipo lignina (Boher *et al.*, 1995; Kpémoua *et al.*, 1996). También se ha observado la formación de tilosas, un tipo de invaginación al interior de los vasos del xilema, que aportan no solo una resistencia mecánica a la progresión de la bacteria sino que además producen sustancias bactericidas. Las respuestas tardías están caracterizadas por la síntesis de suberina asociada al refuerzo de la pared celular que se va lignificando y bloquean de esta forma la formación de un inoculo secundario. La fuerte interacción entre los LPS producidos por *Xam* con las paredes de las células de yuca sugiere que algunos de ellos pueden ser translocados al interior de las células donde pueden elicitar algunos de los mecanismos de defensa (Boher *et al.*, 1997).

MAPEO E IDENTIFICACIÓN DE REGIONES GENÓMICAS IMPLICADAS EN RESISTENCIA

Como se mencionó anteriormente, programas de mejoramiento a partir de cruza-mientos entre *M. glaziovii* y *M. esculenta* han sido desarrollados (Hahn 1978; CIAT, 1980) y han establecido que las dos especies constituyen una fuente de resistencia a la bacteriosis vascular. Se ha considerado que la resistencia a la bacteriosis es poligénica y aditivamente heredada, con una variabilidad que varía entre 25 y 65% (CIAT, 1980). La diferencia entre cultivos resistentes y susceptibles es expresada como una variación en la tasa de colonización de *Xam* y la penetración de tejidos vasculares, por esta razón se considera que la resistencia es de tipo cuantitativo (Kpémoua, 1995). La genética de la resistencia ha sido empezada a ser estudiada y entendida hasta ahora.

LA IMPORTANCIA DE UN MAPA

Los mapas genéticos constituyen una herramienta fundamental para la identificación y clonación de genes implicados en diferentes características de interés agronómico. Un mapa genético de yuca ha sido construido en el CIAT basado en diferentes marcadores moleculares tales como RFLPs, RAPDs, microsatélites e isoenzimas (Fregene *et al.*, 1997). Para la construcción del mapa genético se desarrolló un cruce intraespecífico entre TMS30572 (un cultivo mejorado desarrollado en el IITA, Ibadan, Nigeria) y CM2177-2 (un cultivo élite del CIAT). La población F1 resultante de este cruce está formada por 150 individuos. Este primer mapa genético consistió de 20 grupos de ligamiento que cubrían 931 cM, lo que representa aproximadamente el 60% del genoma total de la yuca (Fregene *et al.*, 1997). Recientemente este mapa genético ha incorporado 36 nuevos marcadores de tipo microsatélite (Mba *et al.*, 2001). La disponibilidad de este mapa genético de yuca ha permitido la identificación de regiones genómicas implicadas en la productividad y arquitectura de la planta (Okogbenin y Fregene, 2003) así como también la identificación de un loci de resistencia al virus del mosaico africano (Akano *et al.*, 2002).

MAPEO DE LA RESISTENCIA A LA BACTERIOSIS:

IDENTIFICACIÓN DE QTLs (*Quantitative Trait Loci*)

El mapa genético de yuca ha sido la base para el estudio de la genética de la resistencia a la bacteriosis vascular en yuca. Dado que la resistencia a la bacteriosis ha sido considerada de tipo cuantitativa, una estrategia basada en el análisis de QTL (*Quantitative Trait Loci*) ha sido empleada para identificar las regiones genómicas de la yuca implicadas en la resistencia (Jorge *et al.*, 2000). Para el estudio de la resistencia a *Xam* se emplearon cinco cepas (CIO84, CIO1, CIO136, CIO295 et ORSTX27) correspondientes a diferentes haplotipos provenientes de distintas ECZs. La resistencia fue evaluada en la población F1 sobre condiciones controladas en invernadero y se evaluó sobre una escala cuantitativa de 0 a 5 (siendo 0 plantas completamente sanas y 5 plantas severamente afectadas). La evaluación se realizó a 7, 15 y 30 días post-inoculación y el área bajo la curva de progresión de la enfermedad (AUDPC) fue calculada para evaluar la resistencia. El análisis de la resistencia se realizó por el método de regresión lineal por un solo marcador. En total se detectaron doce QTLs localizados en los grupos de ligamiento B, C, D, G, L, N y X, los cuales explicaron entre el 9-27% de la resistencia (Jorge *et al.*, 2000). Ciertos QTLs mostraron ser específicos para ciertas cepas de *Xam* y otros, en especial los del grupo de ligamiento D, mostraron ser comunes a diferentes cepas de *Xam* (Jorge *et al.*, 2000). De manera similar, la resistencia a la bacteriosis fue evaluada en campo sobre una alta presión de la enfermedad y durante tres ciclos consecutivos de producción (Jorge *et al.*, 2000). De manera simultánea se evaluó la dinámica de la población de *Xam*. Varios QTLs fueron detectados, pero se observó un cambio en los QTLs durante los dos años de estudio. Estos cambios se correlacionaron con la dinámica en las poblaciones de *Xam* (Jorge *et al.*, 2000). Un hecho interesante es que los QTLs detectados en el grupo de ligamiento D, sí se mantuvieron constantes durante los dos ciclos de producción. En este mismo grupo de ligamiento se identificaron algunos QTLs en invernadero. Ciertos análisis sugieren que esta región pudo ser introgresada de *M. glaziovii* (Jorge, 2000). A partir de una población de 243 individuos resultantes de un retrocruce entre cinco genotipos de la F1 con el parental femenino se evaluó la resistencia a la bacteriosis contra cepas de origen africano (Wydra *et al.*, 2004). Muchos de los QTLs detectados en este estudio fueron diferentes a los identificados con las cepas de origen colombiano, confirmando la especificidad de los QTLs a cepas particulares de *Xam*, lo cual tiene repercusiones importantes para los programas de mejoramiento genético. La alta especificidad de la resistencia y el alto nivel de diversidad del patógeno en Colombia comparado con el relativo bajo nivel presente en África hacen que se deban considerar estrategias de mejoramiento particulares en cada caso.

HACIA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN YUCA

Para limitar la multiplicación de los patógenos y protegerse de ellos, las plantas han desarrollado un rango amplio de mecanismos de defensa. El reconocimiento del patógeno se constituye en el primer paso hacia el proceso de encender los mecanismos de resistencia propios de la planta. En el mejor de los casos conocidos y estudiados, este reconocimiento está mediado por la interacción específica entre el producto de un gen dominante de resistencia presente en la planta y el producto de los genes de

avirulencia (Avr) del patógeno (Dangl y Jones, 2001). Dicha interacción es descrita por el modelo gen por gen. En los últimos diez años se han aislado y caracterizado molecularmente en diferentes especies vegetales más de 48 genes de resistencia frente a diversos patógenos (virus, bacterias, hongos, nemátodos). Estos estudios han revelado que a pesar de conferir resistencia a patógenos tan diferentes, las proteínas de resistencia poseen dominios conservados (Hammond-Kosack y Parker, 2003). El grupo de proteínas de resistencia más común presenta un dominio de unión a nucleótidos (NBS, *Nucleotide-Binding Site*) y una región de repeticiones ricas en leucinas (LRR, *Leucine Rich Repeat*), los cuales pueden estar acompañados de un dominio TIR (*Toll Interleukin protein*) en su extremo N-terminal (Dangl y Jones, 2001). Aprovechando la presencia de dominios conservados en las proteínas de resistencia, ha sido posible diseñar *primers* degenerados complementarios a las secuencias de ADN correspondientes a estos dominios y de esta forma aislar Genes Candidatos de Resistencia (GRC; Meyers *et al.*, 1999). Esta estrategia ha revelado ser muy útil como un primer paso hacia la identificación de genes de resistencia. Muchos de estos GRCs se encuentran agrupados en el genoma tal y como ocurre con los genes de resistencia y colocan con loci de resistencia o con QTLs asociados a la resistencia a diferentes patógenos. Este último hecho sugiere que los genes de resistencia de tipo cuantitativo y cualitativo pueden mostrar características estructurales comunes (López *et al.*, 2003a). Una estrategia similar ha sido empleada en yuca para identificar GRCs en yuca (López *et al.*, 2003b). *Primers* degenerados complementarios a los dominios TIR y NBS presentes en varias proteínas de resistencia fueron diseñados. Dos GRCs de tipo TIR y 10 de tipo NBS fueron de esta forma identificados. Análisis de secuencia de los 10 GRCs de tipo NBS permitieron agruparlos en dos clases. Análisis de *southern-blot* y de *screening* sobre una librería BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) permitieron entender de una forma más detallada la organización estructural de los GRCs en el genoma de la yuca (López *et al.*, 2003b). Estos análisis mostraron que todos los GRCs en yuca son genes de baja copia o de copia única, excepto uno de ellos (RCa6) que representa una familia multigénica grande y diversa. La secuenciación parcial de un clon BAC (B11E5) obtenido con el RCa6 y el cual posee cinco copias de NBS, permitió la identificación de dos GRCs completos (López *et al.*, 2003b). Los análisis de mapeo permitieron ubicar dos BACs que poseen NBS en el grupo de ligamiento E y cuatro en el grupo de ligamiento J. En el grupo de ligamiento J se pudo establecer la presencia de una región que posee al menos 15 secuencias de tipo NBS. Desafortunadamente hasta el momento ningún QTL asociado a la resistencia ha sido identificado en esta región (López *et al.*, 2003b). Estos estudios han puesto en evidencia la necesidad de obtener más datos fenotípicos de resistencia, a otras cepas de *Xam* o a otros patógenos, para poder establecer asociaciones entre genes candidatos y regiones genómicas implicadas en resistencia. Si bien los QTLs detectados por Jorge *et al.* (2000; 2001), empleando cinco cepas de *Xam*, representan un paso importante en la identificación de regiones genómicas implicadas en la resistencia, dada la gran diversidad observada en las poblaciones de *Xam*, estas regiones genómicas detectadas solo cubren una parte parcial del genoma de la yuca implicado en la resistencia a la bacteriosis. Más recientemente, datos adicionales de QTLs asociados a dos cepas de *Xam*, permitieron la identificación de un nuevo QTL asociado a la resistencia a la cepa CIO151 en el grupo de ligamiento U. El marcador

responsable de este QTL corresponde a un BAC que contiene un GRC de tipo NBS (B39P22). La resistencia explicada por este QTL es de 62%, lo que sugiere la presencia de un gen mayor en este clon BAC. Adicionalmente pone de manifiesto que el aumento de datos fenotípicos permitirá establecer asociaciones entre los genes candidatos previamente aislados y regiones genómicas de yuca asociadas a la resistencia.

Utilizando *primers* generados a partir del gen de resistencia *Xa21* de arroz, el cual confiere resistencia a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, ha sido posible la identificación de un fragmento de yuca que presenta un grado de similitud alto con dicho gen. Este fragmento se encuentra ligado a un QTL y que explica 13% de la resistencia a la cepa CIO136 de *Xam* (Jorge *et al.*, 2000). A partir de un clon BAC obtenido empleando este fragmento como sonda, el gen completo ha sido secuenciado y ha sido llamado *RXam1* (*Resistance to Xam 1*). Los análisis de secuencia y estudios de expresión de *RXam1* entre un cultivo sensible y uno resistente ha permitido identificar: i) la presencia de codones de parada en el gen procedente del cultivo sensible; ii) un marco abierto de lectura en el gen proveniente del cultivo resistente; iii) la expresión de *RXam1* es inducida 72 horas post-inoculación con la cepa CIO136 en el cultivo resistente y iv) el gen no es expresado en el cultivar sensible. Todos estos datos sugieren que la proteína codificada por el gen *RXam1* está implicada en la resistencia a la cepa CIO136 de *Xam*. La validación funcional mediante silenciamiento génico o por transformación permitirá definir el rol de este gen en la resistencia a la bacteriosis.

La identificación de GRCs provee una herramienta valiosa en los programas de selección asistida por marcadores. Se constituye, además, en el primer paso hacia la identificación de genes de resistencia que podrán ser transferidos a cultivos de yuca sensibles. La posibilidad de poseer un repertorio importante de genes de resistencia permite pensar en desarrollar programas de piramidaje de genes y la introducción simultánea de varios de ellos mediante transformación con miras a generar una resistencia durable y de amplio espectro.

OTROS GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA DE DEFENSA:

LA GENÓMICA DE YUCA HACE SU APARICIÓN

Después del reconocimiento del patógeno, mediado directa o indirectamente por las proteínas de resistencia, otros genes involucrados en la respuesta de defensa son activados (Dixon y Harrison, 1990). Dentro de los eventos que tienen lugar posterior a dicho reconocimiento se encuentra la HR, que es un tipo de muerte celular programada cuyo objetivo es restringir la multiplicación del patógeno (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Otra serie de eventos tienen lugar, tales como el estallido oxidativo mediado por especies de oxígeno reactivas, la activación de varias proteínas quinasas, el flujo de iones y la activación de genes que codifican proteínas con actividad antimicrobiana (Martin *et al.*, 2003). Dado el repertorio amplio de genes con funciones tan diversas, estrategias como el empleo de *primers* degenerados no son adecuadas para identificar este tipo de genes en especies vegetales poco estudiadas. Los desarrollos recientes hechos en el área de la genómica (secuenciación de genomas enteros, desarrollo de colecciones de ESTs, (*Expressed Sequence Tags*), análisis de transcriptoma) hacen posible la

identificación de este tipo de genes en plantas como la yuca. Hace seis años comenzó un programa de investigación que ha permitido el inicio de la genómica en yuca, el cual incluye el desarrollo de una colección de ESTs y la explotación de esta información a través de la construcción de un microarreglo de yuca.

Los ESTs son fragmentos cortos de ADN generados a partir de la secuenciación de uno o ambos extremos de los clones de una librería de ADNc (ADN complementario). Los ESTs representan fragmentos de un gen expresado bajo ciertas condiciones particulares (Rudd, 2003). Para el desarrollo de la colección de ESTs en yuca, se emplearon cinco cultivos contrastantes en cuanto a características de resistencia a la bacteriosis (cultivos sensibles, tolerantes y resistentes) e igualmente en cuanto a su contenido de materia seca (almidón). En total se desarrollaron 12 librerías de ADNc. Cuatro de estas librerías se obtuvieron por procedimientos estándar. Las ocho librerías restantes fueron sustractivas (López *et al.*, 2004). Un total de 11.954 secuencias de alta calidad fueron generadas y varios análisis bioinformáticos se desarrollaron. Las secuencias generadas han sido depositadas en la base de datos de genes de disposición pública (*GenBank*) y representan el 90% de las secuencias disponibles en yuca. El total de 11.954 ESTs generados fueron ensamblados en un *set* unigen de 5.700 secuencias únicas, comprendiendo un total de 1.875 *contigs* (secuencias sobrelapantes y/o repetidas, -9.218 ESTs-) y 3.825 *singletons* (López *et al.*, 2004). Los ESTs fueron agrupados en categorías funcionales según el esquema del consorcio *Gene Ontology* (*The Gene Ontology Consortium*, 2000). Dentro de las funciones moleculares, las categorías más representadas fueron las de unión a ácidos nucleicos (10%) y de actividades hidrolasa y transferasa (9 y 6% respectivamente). En la categoría de metabolismo se agruparon 977 secuencias y en la de crecimiento/mantenimiento celular 406 ESTs (López *et al.*, 2004). Un total de 16% de las secuencias de yuca no presentaron similitud con ninguno de los productos proteicos predichos de otras especies vegetales tales como *Arabidopsis*, soya, tomate, papa y *Medicago* y pueden representar genes potenciales específicos de yuca. De la colección total de ESTs, se identificaron 1.613 secuencias presentes solamente en las librerías inoculadas con *Xam*, y pueden representar genes potencialmente implicados en la respuesta de defensa a la bacteriosis. Dentro de estos ESTs se encontraron similitudes con genes previamente implicados en la respuesta de defensa tales como genes de resistencia, factores de transcripción de tipo WRKY, quitinasas, peroxidasa y quinasas entre otros (López *et al.*, 2004). Estos análisis muestran la importancia de la colección de ESTs como un medio para identificar genes candidatos implicados en resistencia a enfermedades, así como también en otras características biológicas de interés.

Las colecciones de ESTs son también una fuente importante de marcadores moleculares que pueden ser empleados por ejemplo en estudios de mapeo. La ventaja de los ESTs como marcadores moleculares es que permiten establecer una asociación directa entre el marcador y una característica dada, cosa que no ocurre con la mayoría de marcadores moleculares que son de tipo "anónimo", es decir no se conoce su secuencia o si se conoce, ella no corresponde, en la mayoría de los casos, a una región codificante. La colección de ESTs ha sido explotada para buscar microsatélites o

repeticiones simples (SSR). Este tipo de marcador es altamente polimórfico y ha sido extensamente empleado en estudios de diversidad, filogenia y en mapeo genético. La dificultad con los microsatélites es que su identificación requiere la construcción de librerías enriquecidas en SSR. Sin embargo, con el desarrollo de colecciones de ESTs ha sido posible identificar microsatélites en algunos ESTs. Dentro de la colección de ESTs de yuca se encontraron 530 ESTs que poseían SSRs, de estos fue posible diseñar *primers* para 51 de ellos y 22 mostraron ser polimórficos entre los parentales de yuca y pudieron así ser mapeados. En total se detectaron 21 loci de SSRs distribuidos en 15 grupos de ligamiento. De esta forma el mapa genético de yuca se ha enriquecido con microsatélites de tipo ESTs que representan secuencias codificantes. Lo interesante es que algunos de los ESTs que poseen SSRs presentan similitudes con proteínas implicadas en respuestas de defensa, tales como factores de transcripción de tipo WRKY, dedos de zinc y con la proteína MLO que está implicada en la defensa de cebada al hongo *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*.

La interacción entre plantas y patógenos produce la activación de una cascada de señalización que implica la expresión/represión de muchos genes. En los últimos años se han desarrollado tecnologías nuevas para el estudio de cambios en la expresión génica durante la infección. En particular, la técnica de cDNA-AFLP ha sido empleada para la identificación de secuencias inducidas durante la infección y una estrategia similar ha sido empleada para identificar genes expresados diferencialmente en plantas de yuca infectadas con *Xam* (Santaella *et al.*, 2004). Siguiendo esta estrategia, se obtuvieron aproximadamente 3.600 fragmentos diferenciales a lo largo del periodo de infección (de 12 horas a 30 días post-inoculación). De estos 3.600 fragmentos, 340 fueron aislados, clonados y secuenciados. Estas secuenciadas fueron agrupadas en 26 *contigs* y 194 *singletons*, representando un *set* de 220 secuencias únicas. Las secuencias obtenidas se agruparon en categorías funcionales dentro de las cuales las más representadas fueron metabolismo, transducción de señales, defensa a enfermedades y regulación de la transcripción. Dentro de la categoría defensa a enfermedades se encontraron genes con similitud a proteínas de choque térmico, proteínas de resistencia de tipo NBS, proteínas de defensa o proteínas implicadas en el estallido oxidativo (dioxigenasa y glutatión-S-transferasa). La expresión diferencial de estos genes fue confirmada mediante análisis de QRT-PCR (Santaella *et al.*, 2004). Este trabajo ha permitido demostrar una vez más la complejidad de la respuesta de defensa en el patosistema yuca-*Xam*, representado por cambios importantes en la expresión de varios genes. Falta determinar si los cambios en la expresión de estos genes es consecuencia directa del proceso infectivo o corresponde a efectos pleiotrópicos producto de la presencia del agente patógeno. La técnica de cDNA-AFLP es bastante sensible y permite la detección de cambios en la expresión de genes aunque sus niveles de expresión sean muy bajos, por lo cual representa una fuente novedosa de ESTs.

DESARROLLO DEL PRIMER MICROARREGLO DE YUCA

El desarrollo de una colección de ESTs constituye un gran recurso para el estudio de expresión global de genes. En particular, ESTs que son impresos sobre láminas de vidrio (microarreglos) han sido empleados para examinar la respuesta de cientos o

miles de genes de manera simultánea. En plantas, los microarreglos de ADNc han sido usados para estudiar las respuestas frente al estrés abiótico (Thimm *et al.*, 2001) y han mostrado ser de gran utilidad para revelar nuevos mecanismos en el estudio de interacciones plantas-microorganismos (Ramonell y Somerville, 2002).

A partir de la información generada a través de la colección de ESTs ha sido posible la construcción del primer microarreglo en yuca. Este microarreglo fue utilizado para estudiar los cambios en la expresión de los genes a diferentes tiempos en el caso de una interacción incompatible (resistencia), para lo cual se empleó el cultivar MBra685 y la cepa de *Xam* CIO151 (López *et al.*, 2005a). Para la construcción del microarreglo, los insertos amplificados por PCR de cada uno de los 5.700 clones representativos del *set unigen* fueron impresos en láminas de vidrio. Para evaluar la cinética de expresión el material vegetal fue colectado a 12, 24 y 48 horas post-inoculación (hpi) y 7 y 15 días post-inoculación (dpi). Un total de 199 genes fueron identificados cuya expresión varió significativamente entre plantas inoculadas con el patógeno y plantas sanas. De estos 199 genes 123 mostraron una inducción en su nivel de expresión y 73 de ellos fueron reprimidos. La proporción de genes diferencialmente expresados es baja y constante durante las primeras 48 hpi pero incrementa considerablemente a 7 dpi antes de disminuir a los 15 dpi (López *et al.*, 2005). De los 199 genes expresados diferencialmente, 155 mostraron similitud con las proteínas presentes en las bases de datos (*GenBank*). Algunos de estos codifican para proteínas que han sido reportadas previamente como importantes en los mecanismos de defensa. Dentro de estos se encuentran proteínas implicadas en el refuerzo de la pared celular, asociados con el estrés oxidativo (peroxidasas, peroxidasas catiónicas y glutatión-S-transferasa), con la degradación proteica (proteasas, ubiquitina) y factores de transcripción de respuesta al etileno, entre otros. Dentro de los genes que se encontraron reprimidos, están básicamente genes que codifican para proteínas relacionadas con procesos fotosintéticos (proteína de unión a la clorofila a/b; López *et al.*, 2005). Reportes previos han puesto igualmente en evidencia la desregulación de genes implicados en la fotosíntesis. Muy probablemente en presencia del patógeno las plantas dirigen los recursos energéticos hacia la expresión de la defensa en detrimento de la fotosíntesis. Los resultados globales obtenidos por microarreglos fueron confirmados mediante RT-PCR en tiempo real. El patrón de expresión (inducción o represión) fue conservado para todos los genes usando los dos métodos, aunque el nivel de expresión fue siempre mayor mediante RT-PCR.

Ocho de los genes que mostraron ser expresados diferencialmente por microarreglos en el caso de la reacción incompatible fueron estudiados por RT-PCR en el caso de una reacción compatible (enfermedad). Para esto se utilizó el cultivar MCol1522 el cual es sensible a la cepa de *Xam* CIO151. La mayoría de ellos (seis) fueron igualmente inducidos pero a un tiempo más tardío, en la mayoría de los casos solo 15 dpi. Los dos restantes mostraron una inducción similar tanto en el cultivar resistente como en el sensible pero solo a 7 dpi (López *et al.*, 2005). Estos resultados confirman las observaciones previas obtenidas por análisis de citoquímica que indican que los mecanismos de defensa son similares entre cultivos sensibles y resistentes de yuca. La

diferencia entre ellos es que en el caso de los cultivos resistentes estos mecanismos tienen lugar a etapas más tempranas y se desencadenan más rápidamente. De manera similar se ha sugerido que los genes implicados en las interacciones compatibles, incompatibles o de tipo no hospedero son los mismos y que las diferencias en estos tipos de interacción esta determinada por la velocidad y magnitud a la cual estos genes son expresados (Tao *et al.*, 2003).

Los análisis de microarreglos generan una cantidad importante de información, dentro de la cual se pueden identificar cientos o miles de genes candidatos. El siguiente paso es la validación de estos genes mediante estrategias de genómica funcional. Actualmente una de las mejores vías para la validación de cientos de genes es mediante silenciamiento génico mediado por infección viral (VIGS, *Virus Induced Gene Silencing*; Lu *et al.*, 2003). En esta estrategia un vector viral es construido conteniendo el gen cuya función quiere ser estudiada. La inoculación de la planta con el virus produce una "reacción de defensa" que induce el silenciamiento del gen que ha sido introducido en el virus. Esta estrategia ha sido recientemente adaptada en yuca (Fofana *et al.*, 2004), sin embargo la validación de los cerca de 200 genes obtenidos por análisis de microarreglos es aún bastante dispendiosa y toma tiempo. Por esta razón es necesario reducir el número de genes candidatos que serán estudiados en profundidad. La pregunta que surge, es ¿qué estrategia emplear para reducir el número de genes candidatos? ¿cuáles de ellos deben privilegiarse para estudios posteriores? La respuesta parcial a estas preguntas puede estar en un primer análisis de mapeo. Los genes candidatos pueden ser mapeados buscando establecer asociación con regiones genómicas (QTLs) implicadas en la resistencia. De esta forma se seleccionarían únicamente aquellos que colocalicen con QTLs. Adicionalmente, la colocalización daría un argumento adicional que apoyaría el papel de estos genes en la respuesta de defensa. Siguiendo este plan estratégico se evaluó la posibilidad de mapear varios de los ESTs considerados como genes candidatos y que muestran similitud con genes previamente implicados en la respuesta de defensa y algunos que mostraron expresión diferencial por análisis de microarreglos. Se emplearon diferentes estrategias para detectar polimorfismos entre los dos parentales empleados en la construcción del mapa genético de yuca (RFLPs, SNP-CAPs y *primers* alelo específicos). El nivel de polimorfismo observado no fue muy alto, y de un total de 111 ESTs que pudieron ser mapeados 11 de ellos. Desafortunadamente ninguno de ellos colocalizó con los QTLs previamente identificados. Sin embargo, es necesario tener en cuenta la relativa poca información de datos fenotípicos, como ya se ha mencionado anteriormente. Esta estrategia es una vía importante para reducir el número de genes a validar y permite además un enriquecimiento de marcadores codificantes en el mapa genético de yuca. Se ha establecido que la frecuencia de SNPs en las regiones 3'UTR de los ESTs es mucho mayor que en las secuencias codificantes, por esta razón, se ha recomendado secuenciar las extremidades 3'UTR de estos ESTs como una vía para obtener un mayor nivel de polimorfismo y así mayor éxito en los estudios de mapeo.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En los últimos 15 años se han llevado a cabo importantes esfuerzos encaminados a

una mejor comprensión del cultivo de la yuca y en particular sobre los mecanismos de defensa de la yuca frente a la bacteriosis vascular, una enfermedad que reduce significativamente su producción. Diferentes estudios se han realizado sobre los dos protagonistas del patosistema yuca-*Xam*. Del lado del patógeno, se ha podido estudiar la diversidad poblacional, los cambios en la estructura de las poblaciones, se han identificado haplotipos y patotipos. Igualmente se han desarrollado herramientas que permiten un adecuado diagnóstico y detección de la bacteria con miras a asegurar la liberación de plantas sanas. Genes de patogenicidad como *pthB* y otros genes candidatos han sido identificados en *Xam*. Los recursos genómicos desarrollados en otras especies de *Xanthomonas* permitirán la identificación de nuevos genes candidatos de patogenicidad en *Xam*. Actualmente se posee información de la secuencia del genoma completo de otras especies de *Xanthomonas*: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (da Silva et al., 2002; Lee et al., 2005). A pesar de ocasionar distintas enfermedades y poseer rangos de hospedero diferentes (cítricos, pimentón y arroz respectivamente), las tres bacterias poseen un alto grado de similitud, compartiendo casi el 80% de los genes. Además el orden de los genes en el genoma es altamente conservado dentro de cada uno de los respectivos cromosomas (da Silva et al., 2002; Lee et al., 2005). Dentro de los genes conservados se encuentran aquellos implicados con el sistema de secreción y algunos genes implicados en patogenicidad (da Silva et al., 2002; Lee et al., 2005). El alto grado de similitud a nivel de genes y genomas entre estas tres especies de bacterias, permitirá desarrollar estrategias basadas en bioinformática y diseño de *primers* conservados para identificar genes candidatos de patogenicidad en *Xam*. De igual manera los estudios de mutaciones mediadas por transposones permitirán esclarecer la función de estos genes (Holeva et al., 2004). Será importante también determinar si las proteínas de patogenicidad candidatas dependen del TTSS para ser liberadas al interior de la célula vegetal. La construcción de proteínas efectoras candidatas en fusión traducional con el dominio adenilato ciclasa dependiente de calmodulina (CyA) permitirá estudiar su secreción y sugerir así un rol en patogenicidad (Sory et al., 1995). De igual manera análisis de expresión de genes mediante microarreglos de *Xam* facilitarán la identificación de genes que son importantes en la interacción de la bacteria con la planta. Actualmente existe una "primera generación" de microarreglos de *Xam* y se espera contar en poco tiempo con nuevos genes candidatos para así evaluar la expresión de estos genes durante la infección. Esfuerzos están siendo dirigidos para crear un consorcio que permita establecer la secuencia completa del genoma de *Xam* a través de un proyecto colaborativo entre investigadores e institutos de Colombia y Francia, a partir de los recursos e información obtenida de la secuencia de otras especies de *Xanthomonas*. La secuenciación del genoma completo permitirá identificar genes implicados en patogenicidad, así como efectores candidatos que podrán ser validados por estrategia de genómica funcional.

Del lado de la planta, son varios los progresos que se han realizado encaminados a conocer los mecanismos de resistencia de la yuca frente a la bacteriosis vascular. Los primeros estudios citotóxicos revelaron los mecanismos implicados en la resistencia. En los últimos años los recursos generados a través de la biología molecular y más re-

cientemente de la genómica y la bioinformática han permitido identificar varios de los genes implicados en este proceso. Se ha podido establecer así cuales son los genes que pueden estar actuando como respuesta a los fenómenos observados a través de los estudios de microscopía. Actualmente se cuenta con un número importante de genes candidatos. Aunque hasta el momento no ha sido identificado, clonado y caracterizado el primer gen de resistencia en yuca, los análisis de QTLs han permitido la identificación de varias regiones genómicas implicadas en la resistencia, y también se cuenta con un número importante de genes de resistencia candidatos. La validación de estos genes a través de estrategias como VIGS permitirá establecer claramente su papel en la resistencia. Posteriormente los estudios de transformación permitirán generar variedades de yuca resistentes a cepas específicas de *Xam* o de amplio espectro, las cuales podrán ser adaptadas por los productores y consumidores. Actualmente una propuesta liderada por Claude Fauquet del ILTAB/Donald Danforth Plant Science Center (St. Louis, Estados Unidos) y de Joe Tohme del CIAT ha sido aceptada por el Departamento de Energía de Estados Unidos para iniciar la secuenciación del genoma de la yuca, que fue anunciada en julio de 2006 (<http://www.jgi.doe.gov/sequencing/cspseqplans2007.html>). La disposición de la secuencia del genoma entero de yuca prevista para dos años, generará una cantidad de información valiosa que podrá ser usada para la identificación de otros genes así como en estudios sobre expresión global (a través de microarreglos) y la identificación de las regiones reguladoras de estos genes. Una alternativa para identificar genes implicados en la resistencia y para profundizar sobre los mecanismos de resistencia de la yuca, al mismo tiempo que entender los mecanismos de patogenicidad de *Xam*, es el empleo de la tecnología de doble híbrido. Es claro que la interacción entre una planta y un patógeno implica interacciones entre las proteínas de los dos protagonistas. Dichas interacciones pueden ser estudiadas a través del sistema doble híbrido. De esta forma, utilizando por ejemplo el gen *pthB* como “presa” se podrán identificar las proteínas de yuca que interactúan con la proteína PthB. De manera similar empleando proteínas de resistencia candidatas (el dominio LRR o la proteína entera) como “presa”, se podrán identificar otras proteínas de la planta o del patógeno que interactúan con ellas. Este tipo de estudios darán grandes luces sobre los complejos proteicos y su función durante las interacciones planta-patógeno.

A pesar de la importancia de la yuca como cultivo de “seguridad” alimentaria, son relativamente pocos los esfuerzos dirigidos a entender mejor su biología con miras a aumentar su producción. Por esta razón, la yuca ha sido considerada como un cultivo huérfano. Avances importantes se han realizado en otros cultivos como arroz, papa, tomate, maíz o trigo en donde los grupos de investigación son abundantes y los recursos financieros para el desarrollo de la investigación son considerables. Para los países desarrollados la yuca no representa un cultivo de interés, dado que la yuca no es producida ni consumida en dichos países. Muchos de los avances hechos en el estudio de la bacteriosis vascular de la yuca descritos en esta revisión fueron desarrollados en colaboración entre el CIAT (Cali, Colombia) y el IRD (*Institut de Recherche pour le Développement*) de Francia. Desafortunadamente hace cinco años el IRD decidió concluir con el programa de investigación en yuca. En este contexto, los desarrollos tecnológicos en yuca deben ahora venir de los países que la producen y para los cuales

la yuca representa potencialmente una entrada económica importante. Colombia hace parte de dichos países. Desafortunadamente en Colombia, como en la mayoría de los países productores de yuca, el cultivo es de subsistencia, es desarrollado por pequeños productores latifundistas y estos no se encuentran organizados en asociaciones o federaciones, lo que dificulta conseguir financiación para adelantar proyectos de investigación que conduzcan a mejorar la producción de yuca. El primer esfuerzo encaminado a organizar los productores de yuca en un consorcio es CLAYUCA (Consortio Latinoamericano y del Caribe de apoyo a la investigación y al desarrollo de la yuca). Quizás con la posibilidad de producir etanol como biocombustible a partir de la yuca se impulse el cultivo de la yuca y los productores se organicen, lo que promovería no solo la producción sino también el desarrollo de la investigación y la transferencia de tecnología para este cultivo. Actualmente la yuca se encuentra en una posición privilegiada para el desarrollo de investigación. Se cuenta con la suficiente información y las herramientas necesarias (incluyendo varias de tipo genómica) para poder desarrollar en un relativo corto periodo de tiempo nuevas variedades de yuca resistentes a la bacteriosis vascular, lo que redundaría en últimas en mayores niveles de producción. Una mayor inversión del estado, al mismo tiempo en proyectos colaborativos entre la empresa privada y la academia, acompañado de un diálogo más cercano entre científicos y productores permitirá cumplir este objetivo. El campo de las interacciones plantas-patógenos continúa en una dinámica de desarrollo científico y tecnológico importante, lo que nutrirá de manera permanente el estudio del patosistema yuca-*Xam* y por qué no pensar que el conocimiento generado en este patosistema contribuya de igual manera a desarrollar nuevos modelos en patología vegetal. Esperemos que en los años que vienen la yuca se imponga como un producto vital para el desarrollo económico de los países productores y que los proyectos investigativos logren aplicar sus excitantes innovaciones para resolver los problemas de los productores de yuca en el mundo.

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimientos a Joe Thome, Michel Delseny, Richard Cooke por su continuo apoyo a lo largo de la elaboración de los diferentes proyectos. Gracias a Benoit Piegu, Veronique Jorge, Paola Zuluaga, Gloria Mosquera, Sandra Ojeda, Carolina González, Myriam Cristina Duque, Lina Quesada, Marcela Santaella, por sus significativas contribuciones durante la realización de los diferentes proyectos. La elaboración de estas investigaciones fueron posibles gracias a la ayuda financiera de la Comunidad Europea (INCODC contrato No. IC 18CT 980306), del Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas" (COLCIENCIAS; contrato No. 344-98, código 2236-12-051-98), ECOS-Nord (Action C03A02), IRD y CIAT.

BIBLIOGRAFÍA

ALFANO JR, COLLMER A. Type III Secretion System Effector Proteins: Double Agents in Bacterial Disease and Plant Defense. *Annu Rev Phytopathol.* 2004;42:385-414.

- ALLEM AC. The Origin of *Manihot Esculenta* Crantz (*Euphorbiaceae*). Genet Res Crop. 1994;41:133-150
- AKANO O, DIXON O, MBA C, BARRERA E, FREGENE E. Genetic Mapping of a Dominant Gene Conferring Resistance to Cassava Mosaic Disease. Theor Appl Genet. 2002;105:521-525.
- ASSIGBÉTSÉ K, VERDIER V, WYDRA K, RUDOLPH K, GEIGER JP. Genetic Variation of the Cassava Bacterial Blight Pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, Originating from Different Ecoregions I Africa. IX Int Conf Plant Path Bacteria ed., Madras, India; 1998. p. 223-229.
- BOHER B, KPEMOUA K, NICOLE M, LUISETTI J, GEIGER JP. Ultrastructure of Interactions Between Cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*; Cytochemistry of Cellulose and Pectin Degradation in a Susceptible Cultivar. Phytopathology. 1995;85:777-788.
- BOHER B. Etude des relations entre le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) et deux parasites bactériens: *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* et *Xanthomonas campestris* pv. *cassavae*. Th. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes; 1996. p. 110.
- BOHER B, NICOLE M, POTIN M, GEIGER JP. Extracellular Polysaccharides from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Interact with Cassava Cell Walls During Pathogenesis. Mol Plant Microbe Interact. 1997;10:803-811.
- BUITRAGO AJA. La yuca en la alimentación animal. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia; 1990.
- BUTTNER D, BONAS U. Common Infection Strategies of Plant and Animal Pathogenic Bacteria. Curr Opin Plant Biol. 2003;6:312-9.
- CANTEROS BI, MINSAVAGE GV, JONES JB, STALL RE. Diversity of Plasmids in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathology. 1995;85:1482-1486.
- CEBALLOS H. La yuca en Colombia y el mundo: nuevas perspectivas para un cultivo milenario. In: CIAT (ed.) La yuca en el tercer milenio. CIAT, Cali; 2002. p 586.
- CIAT. 1974. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report.
- CIAT. 1977. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report.
- CIAT. 1980. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report.
- CIAT. 1983. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report.
- CIAT. 1993. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Annual Report.
- COCK JH. Cassava: New Potential for a Neglected Crop. Westview Press, Boulder, CO, USA; 1985. p. 191.
- COCK JH. La yuca, nuevo potencial para un cultivo tradicional. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia; 1989.
- DANGL JL, JONES JDG. Plant Pathogens and Integrated Defense Response to Infection. Nature. 2001;411:826-833.
- DANIEL JF, BOHER B. Etude des modes de survie de l'agent causal de la bacterie vasculaire vasculaire du manioc, *Xanthomonas campestris* pathovar *manihotis*. Agronomie. 1985;5:339-246.
- DA SILVA ACR, FERRO JA, REINACH FC, FARAH CS, FURLAN LR, QUAGGIO RB, MONTEIRO-VITORELLO CB, van SLUYS MA, ALMEIDA NF, et al. Comparison of Genomes of Two *Xanthomonas* Pathogens with Differing Host Specificities. Nature. 2002;417:459-463.

- DIXON RA, HARRISON MJ. Activation, Structure, and Organization of Genes Involved in Microbial Defense in Plants. *Adv Genet.* 1990;28:165-234.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Agricultural commodity Projections, FAO, Rome; 1998.
- FESSEHAIE A. Biochemical/Physiological Characterization and Detection Methods of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. (Berthet-Bondar) Dye 1978, the Causal Organism of Cassava Bacterial Blight [tesis]. Göttingen: University of Göttingen, Alemania. 1997. p. 1-135.
- FOFANA IBF, SANGARE A, COLLIER R, TAYLOR CH, FAUQUET CM. A Geminivirus-Induced Gene Silencing System for Gene Function Validation in Cassava. *Plant Mol Biol.* 2004;56:613-624.
- FREGENE M, ANGEL F, GOMEZ R, RODRIGUEZ F, CHAVARRIAGA P, ROCA W, TOHME J, BONIERBALE M. A Molecular Genetic Map of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet.* 1997;95:431-441.
- GONZÁLEZ C, RESTREPO S, TOHME J, VERDIER V. Characterization of Pathogenic and Nonpathogenic Strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by PCR-Based DNA Fingerprinting Techniques. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;215: 23-31.
- GROUSSON F, PAGES J, BOHER B. Etude de la variabilité d'un agent pathogène, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, par l'analyse factorielle multiple. *Agronomie.* 1990;4:627-640.
- HAHN SK. Breeding of Cassava for Resistance to Cassava Mosaic Virus and Bacterial Blight in Africa. In: Maraite H, Meyer YA (eds.) *Diseases of Tropical Food Crops, Proceedings of an International Symposium.* Louvain-la-Neuve, Belgium: Université Catholique de Louvain; 1978. p. 211-219.
- HAHN SK, THEBERGE RL. Techniques and Advances in Breeding Cassava for Disease Resistance in Africa In. *Cassava Breeding: A Multidisciplinary Review.* CIAT; 1987.
- HAMMOND-KOSACK KE, JONES JD. Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. *Plant Cell.* 1996;8:1773-91.
- HAMMOND-KOSACK KE, PARKER JE. Deciphering Plant-Pathogen Communication: Fresh Perspectives for Molecular Resistance Breeding. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14:177-93.
- HOLEVA MC, BELL KS, HYMAN LJ, AVROVA AO, WHISSON SH, BIRCH PR, TOTHIK. Use of a Pooled Transposon Mutation Grid to Demonstrate Roles in Disease Development for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* Putative Type III Secreted Effector (DspE/A) and Helper (HrpN) Proteins. *Mol Plant Microbe Interact.* 2004;17:943-50.
- JORGE V. Cartographie de la resistance du manioc a la bactériose vasculaire causée par *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* [tesis de doctorado]. París: UFR Des Sciences D'Orsay. Université Paris XI; 2000. p. 1-112.
- JORGE V, FREGENE MA, DUQUE MC, BONIERBALE MW, TOHME J, VERDIER V. Genetic Mapping of Resistance to Bacterial Blight Disease in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet.* 2000;101:865-872.
- JORGE V, FREGENE M, VELEZ C, DUQUE MC, TOHME J, VERDIER V. QTL Analysis of Field Resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Cassava. *Theor Appl Genet.* 2001;102:564-571.

- KPÉMOUA KE. Etude comparative du développement de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* chez des variétés de manioc sensibles et résistantes. Approches histologique, ultrastructurale et cytochimique des mécanismes de la pathogénèse. Th. Faculté des sciences et techniques [tesis]. Nantes: Université de Nantes; 1995. p. 1-95.
- KPÉMOUA K, BOHER B, NICOLE M, CALATAYUD P, GEIGER JP. Cytochemistry of Defense Responses in Cassava Infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Can J Microbiol. 1996;42:1131-1143.
- LEE BM, PARK YJ, PARK DS, KANG HW, KIM JG, SONG ES, *et al.* The Genome Sequence of *Xanthomonas oryzae pathovar oryzae* KACC10331, the Bacterial Blight Pathogen of Rice. Nucleic Acids Res. 2005;33:577-86.
- LÓPEZ C, ACOSTA IF, JARA C, PEDRAZA F, GAITÁN-SOLÍS E, GALLEGU G, *et al.* Identifying Resistance Gene Analogs Associated with Resistances to Different Pathogens in Common Bean. Phytopathology. 2003a;93:88-95.
- LÓPEZ C, ZULUAGA A, COOKE R, DELSENY M, TOHME J, VERDIER V. Isolation of Resistance Gene Candidates (RGCs) and Characterization of an RGC Cluster in Cassava. Mol Genet Genom. 2003b;269:658-671.
- LÓPEZ C, JORGE V, PIEGU B, MBA C, CORTÉS D, RESTREPO S, *et al.* A Unigene Catalogue of 5700 Expressed Genes in Cassava. Plant Mol Biol. 2004;56:541-554.
- LÓPEZ C, SOTO M, RESTREPO S, PIEGU B, COOKE R, DELSENY M, *et al.* Gene Expression Profile in Response to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Infection in Cassava Using a cDNA Microarray. Plant Mol Biol. 2005;57:393-410.
- LOZANO JC, SEQUEIRA L. Bacterial Blight of Cassava in Colombia: Epidemiology and Control. Phytopathology. 1974;64:83-88.
- LOZANO JC. Cassava Bacterial Blight: A Manageable Disease. Plant Dis. 1986;70:1089-1093.
- LU R, MARTIN-HERNANDEZ AM, PEART JR, MALCUIT I, BAULCOMBE DC. Virus-Induced Gene Silencing in Plants. Methods. 2003;30:296-303.
- MARAITE H, WEYNS J. Distinctive Physiological, Biochemical and Pathogenic Characteristics of *Xanthomonas manihotis* and *X. cassavae*. In: Diseases of Tropical Food Crops ed. Louvain-la-Neuve, Belgique, Université Catholique de Louvain; 1979. p. 358-368.
- MARAITE H. *Xanthomonas campestris* pathovars on Cassava, Cause of Bacterial Blight and Bacterial Necrosis. In: J.G. Swings and E.L. Civerolo (Eds.), *Xanthomonas*. London: Chapman and Hall Ltd.; 1993. p. 18-24.
- MARTIN GB, BOGDANOVE AJ, SESSA G. Understanding the Functions of Plant Disease Resistance Proteins. Annu Rev Plant Biol. 2003;54:23-61.
- MBA REC., STEPHENSON P, EDWARDS K, MELZER S, NKUMBIRA J, GULLBERG U, *et al.* Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Survey of the Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Genome: Towards an SSR-Based Molecular Genetic Map of Cassava. Theor Appl Genet. 2001;102:21-31.
- MEYERS BC, DICKERMAN AW, MICHELMORE RW, SIVARAMAKRISHNAN S, SOBRAL BW, YOUNG ND. Plant Disease Resistance Genes Encode Members of an Ancient and Diverse Protein Family within the Nucleotide-Binding Superfamily. Plant J. 1999;20:317-332.

- MUDGETT BM. New Insights to the Function of Phytopathogenic Bacterial Type III Effectors in Plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2005;56:509-31.
- OJEDA S, VERDIER V. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Cassava True Seeds by Nested-Polymerase Chain Reaction Assay (N-PCR). *Can J Phytopathol.* 2000;22:1-7.
- OKOGBENIN E, FREGENE M. Genetic Mapping of QTLs Affecting Productivity and Plant Architecture in a Full-Sib Cross from Non-Inbred Parents in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet.* 2003;107:1452-62.
- OLSEN KM, SCHAAL BA. Evidence on the Origin of Cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:5586-5591.
- RAMONELL KM, SOMERVILLE S. The Genomics Parade of Defense Responses: To Infinity and Beyond. *Curr Opin Plant Biol.* 2002;5:291-294.
- RESTREPO S. Etude de la structure des populations de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* en Colombie [tesis de doctorado]. Paris, Francia: Université Paris VI; 1999.
- RESTREPO S, VERDIER V. Geographical Differentiation of the Population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:4427-2234.
- RESTREPO S, VALLE T, DUQUE MC, VERDIER V. Assessing Genetic Variability Among Brazilian Strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Through RFLP and AFLP Analyses. *Can J Microbiol.* 1999a;45:754-763.
- RESTREPO S, DUQUE MC, TOHME J, VERDIER V. AFLP Fingerprinting: An Efficient Technique for Detecting Genetic Variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Microbiology.* 1999b;145:107-114.
- RESTREPO S, VÉLEZ CM, VERDIER V. Measuring the Genetic Diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within Different Fields in Colombia. *Phytopathology.* 2000a;90:683-690.
- RESTREPO S, DUQUE MC, VERDIER V. Resistance Spectrum of Selected *Manihot esculenta* Genotypes under Field Conditions. *Field Crops Res.* 2000b;65:69-77.
- RESTREPO S, DUQUE MC, VERDIER V. Characterization of Pathotypes Among Isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Plant Pathol.* 2000c;49:680-687.
- RESTREPO S, VELEZ CM, DUQUE MC, VERDIER V. Genetic Structure and Population Dynamics of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Populations in Colombia from 1995-1999. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:255-261.
- RUDD S. Expressed Sequence Tags: Alternative or Complement to Whole Genome Sequences? *Trends Plant Sci.* 2003;8:321-329.
- SÁNCHEZ G, RESTREPO S, DUQUE M, FREGENE M, BONIERBALE M, et al. AFLP Assessment of Genetic Variability in Cassava Accessions (*Manihot esculenta*) Resistant and Susceptible to the Cassava Bacterial Blight (CBB). *Genome.* 1999;42:163-172.
- SANTAELLA M, SUÁREZ E, LÓPEZ C, GONZÁLEZ C, MOSQUERA G, RESTREPO S, et al. Identification of Genes in Cassava that are Differentially Expressed During Infection with *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Mol Plant Pathol.* 2004;5:549-558

- SORY MP, BOLAND A, LAMBERMONT I, CORNELIS GR. Identification of the YopE and YopH Domains Required for Secretion and Internalization into the Cytosol of Macrophages, Using the *cyaA* Gene Fusion Approach. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:11998-12002.
- TAO Y, XIE Z, CHEN W, GLAZEBROOK J, CHANG HS, HAN B, *et al.* Quantitative Nature of *Arabidopsis* Responses During Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*. 2003;15:317-30.
- THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. *Nat Genet*. 2000;25:25-29.
- THIMM O, ESSIGMANN B, KLOSKA S, ALTMANN T, BUCKHOUT TJ. Response of *Arabidopsis* to Iron Deficiency Stress as Revealed by Microarray Analysis. *Plant Physiol*. 2001;127:1030-1043.
- VERDIER V, DONGO P, BOHER B. Assessment of Genetic Diversity Among Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *J Gen Microbiol*. 1993;139:2591-2601.
- VERDIER V, BOHER B, MARAITE H, GEIGER JP. Pathological and Molecular Characterization of *Xanthomonas campestris* Strains Causing Diseases of Cassava (*Manihot esculenta*). *Appl Environ Microbiol*. 1994;60:4478-4486.
- VERDIER V, CUNY G, ASSIGBETE K, GEIGER JP, BOUCHER C. Characterization of Pathogenicity Gene *pthB* in *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Edited by Stacey G, Mullin B, Gresshoff P: University of Tennessee, Knoxville, TN; 1996.
- VERDIER V, MOSQUERA G, ASSIGBETSE K. Detection of the Cassava Bacterial Blight Pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by Polymerase Chain Reaction. *Plant Dis*. 1998a;82:79-83.
- VERDIER V, RESTREPO S, MOSQUERA G, DUQUE MC, GERSTL A, LABERRY R. Genetic and Pathogenic Variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Venezuela. *Plant Pathol*. 1998b;47:601-608.
- VERDIER V, MOSQUERA G. Specific Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* with a DNA Hybridization Probe. *J. Phytopathol*. 1999;147:417-423.
- VERDIER V. Bacteriosis vascular (o añublo bacteriano) de la yuca causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia; 2002.
- VERDIER V, RESTREPO S, MOSQUERA G, JORGE V, LÓPEZ C. Recent Progress in the Characterization of Molecular Determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*-Cassava Interaction. *Plant Mol Biol*. 2004;56:573-584.
- WYDRA K, ZINSOU V, JORGE V, VERDIER V. 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*. 2004;94:1084-1093.