

Análisis de expresión génica durante la respuesta de defensa de la yuca a la bacteriosis vascular (Añublo Bacteriano)

Gene expression analysis during cassava defense response to bacterial blight disease

Mauricio Soto-Suárez*, Silvia Restrepo**, Gloria Mosquera***,
Valérie Verdier****, Joe Tohme*****

RESUMEN

La bacteriosis vascular de la yuca es una destructiva enfermedad en Sur América y África, causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). Produce pérdidas entre el 12% y 100% de los cultivos. Algunos estudios se han realizado a nivel bioquímico y citoquímico para conocer las respuestas de defensa de la yuca a *Xam*; sin embargo, las bases moleculares de los mecanismos de defensa no han sido aún caracterizadas. Con el propósito de identificar genes diferencialmente expresados durante la respuesta de la planta al patógeno, se ha construido una librería sustractiva, usando el método de Sustracción Diferencial en Cadena (DSC), con 1536 clones de dos variedades resistentes (MBRA 685 y SG 107-35). De esta librería fueron seleccionados al azar 110 clones para ser secuenciados y realizar búsquedas de similitud en bases de datos públicas. El análisis de secuencia mostró 14 clones con similitud a genes previamente reportados como involucrados en procesos de defensa en plantas, 70 clones con similitud a genes de plantas sin función conocida o que no presentaron similitud, representando nuevos genes potencialmente involucrados en las respuestas de defensa de la yuca. Finalmente fueron construidos microarreglos de ADNc, usando los clones seleccionados de las librerías sustractivas para confirmar su expresión diferencial durante el desarrollo de la infección.

Palabras clave: yuca, añublo bacteriano, identificación de genes, librerías sustractivas, microarreglos.

ABSTRACT

Cassava bacterial blight (CBB) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) is a destructive disease in the South America and Africa and yield losses range between 12 and 100%. Cytochemistry and biochemistry of defense response to CBB have been well studied. However, the response of the plant to pathogen attack at the molecular and cellular level remains uncharacterized. Identification of genes associated with defense responses is one of most critical steps leading to the elucidation of disease resistance mechanisms in cassava. In this study, we identified differentially expressed genes during pathogen attack by subtractive hybridization, using the Differential Subtraction Chain method (DSC). A population of cDNA obtained from infected plants was used as "treatment" and a population of cDNA obtained from healthy plants was used as "control". 1536 clones were isolated from the resistant varieties (MBRA 685 and SG 107-35). Of these, 110 randomly selected clones were sequenced and a homology search was conducted. The sequence analysis showed that 14 cDNA clones shared homology with plant genes involved in defense responses, 70 clones were either homologous to plant genes of unknown function or showed no homology, representing new genes potentially involved in cassava defense responses. A cDNA microarray was constructed by spotting the clones identified from our subtractive libraries. Other clones potentially involved in cassava defense responses were also included. The cassava defense cDNA microarray was used to confirm the differential expression of the clones.

Keywords: cassava, bacterial blight, gene expression, subtractive library, microarrays.

Recibido: octubre 22 de 2004 Aceptado: mayo 11 de 2005

* Biólogo. Asistente Investigación. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Cali-Palmira, Colombia. Correo electrónico: m.soto.suarez@gmail.com

** Ph. D Fitopatología Molecular. Profesor asociado. Universidad de los Andes.

*** MS. c Microbiología. Estudiante doctorado. Kansas State University.

**** Ph. D Fitopatología Molecular. Líder Proyecto Bacteriosis. CIAT-IRD.

***** Ph. D Genetista. Líder Proyecto Agro-biodiversidad y Biotecnología. CIAT.

INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es la especie productora de carbohidratos más eficiente por unidad de área en el trópico. Es el cuarto producto básico más importante en el mundo y hace parte de la dieta de más de 1000 millones de personas. La bacteriosis vascular de la yuca es considerada una de las enfermedades más limitantes para la producción de yuca en el trópico, las pérdidas del cultivo oscilan entre 12% y 100% (Lozano, 1986). Algunos trabajos han sido desarrollados con el ánimo de caracterizar citoquímica y bioquímicamente la interacción con el agente etiológico *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) (Boher et ál., 1997; Kpémoua et ál., 1996), identificar las variedades resistentes y susceptibles a las diferentes cepas del patógeno (Restrepo et ál., 2000) y medir su diversidad genética y diferenciación geográfica (Restrepo and Verdier, 1997), entre otros. Sin embargo, los genes que gobiernan las respuestas de defensa en contra del ataque del patógeno no han sido aún identificados.

Muchos detalles de los procesos de interacción planta-patógeno son conocidos (Baker et ál., 1997). Una vez la planta y el patógeno entran en contacto, el organismo hospedero activa una serie de respuestas de defensa. Son inducidas diferentes vías de señalización, entre ellas las mediadas por Intermediarios con Oxígeno Reactivo (ROS), ácido salicílico, óxido nítrico, etileno y ácido jasmónico. También es activada la expresión de genes Relacionados con Patogenicidad (PR) y la síntesis de compuestos antimicrobianos que son generalmente fitoalexinas, defensinas, compuestos fenólicos y flavonoides producidos para atacar directamente al patógeno (Baker et ál., 1997). La activación de todas estas vías de señalización termina en la inducción de la Respuesta Hipersensible (HR), una muerte celular programada localizada en el sitio del ataque, con el fin de impedir la dispersión del patógeno, y la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR) mediada por el ácido salicílico, que distribuye la resistencia a todos los órganos de la planta (Hammond-Kosack and Jones, 1996). En yuca no han sido aún caracterizadas las vías de respuesta a sus diferentes patógenos.

Utilizando innovadoras herramientas de genómica funcional se ha avanzado en el entendimiento de la biología molecular en los pro-

cesos de resistencia a enfermedades y condiciones de estrés en general. Con la aplicación de estas herramientas, tales como la construcción de librerías sustractivas y la tecnología de microarreglos, se pueden realizar análisis globales de expresión de cientos o miles de genes bajo condiciones ambientales y fisiológicas específicas; por ejemplo identificar genes involucrados en las respuestas de defensa en contra del ataque de patógenos. En el caso particular de la yuca, la aplicación de genómica funcional en el estudio de su interacción con *Xam* podrá contribuir en la solución de un problema que le resta interés al cultivo y lo hace menos rentable en comparación con otros productores de carbohidratos.

En este trabajo se han utilizado herramientas de la genómica funcional: construcción de librerías sustractivas y microarreglos de ADN, a fin de identificar genes expresados en las respuestas de la yuca para defenderse del ataque de *Xam*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inoculación de dos variedades resistentes de yuca con *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

Las estacas de plantas de las dos variedades resistentes a la cepa de *Xam* (CIO-151) SG 107-35 y MBRA 685 (Restrepo et ál., 2002) mantenidas en campo fueron sembradas en bolsas de plástico perforadas de 6 cm x 7 cm. con una proporción de tierra:arena (1:3) estéril, cuatro semanas después fueron transferidas a condiciones de invernadero (temperatura de 28 °C / 19 °C (temperaturas día/noche), 12 horas de fotoperíodo (luz de día) y 80% de humedad relativa, en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Se inocularon las dos variedades con la cepa CIO-151 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* por punción de tallos en la variedad SG 107-35 y de hojas en la variedad MBRA 685. Se colectaron los tallos y hojas respectivamente pasadas 6, 12, 24, 48, 72 horas y 7 días de la inoculación. Fueron utilizadas 4 plantas para inocular con *Xam* por cada tiempo. Adicionalmente, para cada conjunto de 4 plantas tratamiento (tiempos de inoculación con

Xam) se colectaron el mismo número de plantas sanas y estresadas por punción, para un total de 24 plantas inoculadas (6 tiempos, 4 réplicas por tiempo), 24 plantas sanas (4 réplicas control por cada tiempo) y 24 plantas estresadas por punción (6 tiempos, 4 réplicas por tiempo). Para la inoculación en hojas se abrieron orificios de 2 mm de diámetro y se colocaron sobre ellos 10 µL de una suspensión bacteriana (10^8 unidades formadoras de colonias/mL) (Restrepo et ál., 2000a). Inmediatamente después de colectar el tejido se introdujo en nitrógeno líquido para su preservación y luego fue almacenado a -80°C .

Extracción de ARN total, aislamiento de ARNm y síntesis de ADNc

Para cada variedad dos extracciones de ARN total fueron hechas paralelamente. En la primera se pesaron 600 mg de cada tejido perteneciente a los tiempos 6, 12, 24, 48, 72 horas y 7 días después de la inoculación, para un total de 3 gr. de tejido, cuyo ARN representa todos los tiempos del proceso de infección por *Xam*. En la segunda se pesaron 420 mg del tejido estresado por punción perteneciente a los tiempos 0, 6, 12, 24, 48, 72 horas y 7 días, para un total de 3 g de tejido, cuyo ARN representa los genes expresados por una planta sana y los expresados en respuesta al estrés por punción. De esta manera se extrajo manualmente ARN total de tallos y hojas de SG 107-35 y MBRA 685 respectivamente, siguiendo las modificaciones hechas por Rocha, P.J. (1995) al protocolo descrito por Hall et ál., (1978). Se aisló el ARNm utilizando el kit "Oligotex mRNA Midi (QIAGEN, CA)", siguiendo fielmente las indicaciones del productor, luego se sintetizó el ADNc usando el kit "SMART™ PCR cDNA synthesis (CLONTECH, CA)", siguiendo las instrucciones del productor, a partir de 400-500 ng de ARNm.

Al final de este proceso se contaba con una "Población 1" de ADNc que representa la expresión génica en todos los tiempos de la infección después de la inoculación y una "Población 2" de ADNc perteneciente a plantas sanas y estresadas. Todo esto para cada variedad.

Librería sustractiva de ADNc por el método de DSC

Con el fin de aislar únicamente los genes que se expresan en respuesta al ataque del patógeno,

fue implementada una metodología de sustracción que puede hallar rápidamente diferencias entre dos poblaciones de ADN Luo et ál. (1999). Brevemente, El ADNc de la "Población 1" proveniente de plantas inoculadas fue usado como "tratamiento" y el ADNc de la "Población 2" proveniente de plantas sanas y estresadas fue usado como "control". Ambos ("control" y "tratamiento") fueron digeridos con la enzima de restricción *DpnII*. Seguidamente, el producto de la digestión fue ligado con un adaptador/primer diferente para cada población de ADNc (Población 1: BamIa, ATGAAGTGCACCCTACGATTGAG; BamIb, pGATCCTCGAAATCGTAGGGGTGCACT. Población 2: BamIIa, ATGAGAC ATGTTTCGTAGCCTAGG, BamIIb, pGATCCC TAGGCTACGAAACATGTC).

El producto de la ligación fue sujeto a amplificación por PCR bajo las siguientes condiciones: 94°C por 2 min., 94°C por 30 seg., 68°C por 2 min. por 30 ciclos de amplificación. Para la primera ronda de hibridación del DSC, 10 µg de "control" previamente digerido con *DpnII* (para remover de nuevo los adaptadores) fue mezclado con 100 ng de "tratamiento", la mezcla fue precipitada y resuspendida en un volumen final de 32 µL de buffer de hibridación (50 mM Hepes, 1M CTAB). La mezcla fue calentada a $98-100^{\circ}\text{C}$ por 5 min y se adicionaron 8 µL de 5 M NaCl para un volumen de 40 µL. Luego se incubó a 67°C por 14-16 h. El ADN renaturado fue purificado con el kit "QIAquick PCR purification" (QIAGEN, CA) y resuspendido en 50 µL de buffer 1X para la enzima exonucleasa "mung bean" (New England Biolabs, MA) con 10U de enzima "mung bean" e incubado a 30°C por 25-30 min. Para inactivar la exonucleasa, la muestra fue purificada con el kit "QIAquick PCR purification" (QIAGEN, CA). Una alícuota de 2.5 µL del ADN purificado fue tomada para examinar la eficiencia de la sustracción por PCR bajo las siguientes condiciones: 94°C por 2 min., 94°C por 30 seg., 68°C por 2 min. por 35 ciclos de amplificación. El producto restante (+/- 55 µL) fue concentrado al vacío, resuspendido en 32 µL de buffer de hibridación y recalentado a 98°C para una segunda ronda de hibridación.

Con el producto de PCR de la segunda y tercera ronda de hibridación para SG 107-35, y la tercera y cuarta ronda de hibridación para MBRA 685, se construyó una librería de 384 clones para cada va-

riedad. Para ello se transformaron por electroporación células competentes de la cepa DH-5 α de *E. coli*. El vector utilizado fue el pGEM[®]-Teasy.

Secuenciación y análisis de secuencias

Cuarenta y ocho clones para las dos últimas rondas de hibridación en ambas variedades fueron secuenciados utilizando el secuenciador automático ABI Prism 377, disponible en el CIAT. Estas secuencias fueron editadas usando el programa Sequencher 4.1 (Gene Codes Corporation). De los 192 clones secuenciados en total (48 de cada ronda de sustracción para las dos variedades) se obtuvieron en total 110 secuencias únicas, 63 para MBRA 685 y 47 para SG 107-35. Con el fin de encontrar posibles funciones para el grupo de secuencias, se realizaron búsquedas de similitud con BLASTn y BLASTx contra la base de datos del NCBI, teniendo como valor de probabilidad límite $E = 1,0 \times 10^{-4}$.

Construcción del microarreglo, hibridación y análisis de datos

Los 110 clones seleccionados de la librería sustractiva fueron utilizados para construir un microarreglo. Cada clon fue replicado 8 veces en el microarreglo. Con el propósito de ejercer un control de calidad sobre el microarreglo, fueron organizados genes control de tomate, papa, humano y genes constitutivos de yuca. Los clones fueron organizados en láminas de poli-lisina (Telechem International, Sunnyvale, CA) usando el robot SPBIO Microarray Spotting Station (MiraiBio Inc.).

Plantas de MBRA 685 y SG 107-35 fueron inoculadas como se describió anteriormente y colectadas después de 24, 48 horas (h) de infección, el tejido fue agrupado por genotipo. La hibridación al microarreglo fue realizada con el conjunto de ADNc de plantas infectadas vs. plantas sanas. Para confirmar la reproducción del experimento cada hibridación se hizo por duplicado. El ARN fue extraído usando el kit SV total RNA isolation system (Promega Corp.). El ADNc fue sintetizado usando el kit SMART[™] PCR cDNA synthesis (CLONTECH, CA). En el marcaje con fluorescencia se incorporó Cy5-dUTP (fluorescencia roja) al ADNc de plantas

sanas y Cy5-dUTP (fluorescencia roja) al ADNc de plantas infectadas.

El arreglo fue escaneado usando el escáner Virtek Chip-Reader scanner (BIO-RAD). La obtención de valores para cada señal, eliminación de hibridación inespecífica y normalización de los datos por LOESS, fue realizada usando el programa ArrayPro 4.0. (BIO-RAD). Los genes diferencialmente expresados fueron detectados usando el programa de análisis SAM (Significance Analysis of Microarrays) (Tusher et ál., 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis funcional de las secuencias aisladas por la sustracción

Provenientes de la librería sustractiva fueron obtenidas 110 secuencias únicas, 63 para MBRA 685 y 47 para SG 107-35. En ambas variedades fueron encontrados 14 genes que hacen parte de las respuestas de defensa de la planta al ataque del patógeno, entre ellos genes que participan en vías completas de señalización, desarrollo de estrés oxidativo, que muy probablemente activa la HR y SAR, modificación de la pared celular y degradación proteica (tabla 1).

Flujo de calcio

Numerosas vías de señalización en las respuestas de defensa son activadas por el flujo de calcio (Ca^{2+}) (Kim et ál., 2002). Se ha demostrado que el calcio es esencial para la activación de la síntesis de fitoalexinas, inducción de genes PR y HR (Zimmermann et ál., 1997). Puesto que gran parte de las señales de Ca^{2+} son mediadas por proteínas de unión a calcio como calmodulinas (CaM), se ha propuesto la importancia de estas proteínas como moduladores de las señales de transducción mediadas por calcio en las respuestas de defensa (Kim et ál., 2002). La producción de ROS, compuestos que generan el estrés oxidativo, depende en gran medida de la activación del flujo de calcio y su modulación por calmodulinas (Grant and Loake, 2000). Estas proteínas de unión a calcio generalmente presentan el dominio "EF hand", al cual se une el Ca^{2+} para luego ser cargado a una vía

Tabla 1. Secuencias aisladas en la librería sustractiva para ambas variedades que están asociadas en procesos de defensa a patógenos en plantas. Se muestran los valores de probabilidad E que resultan de las búsquedas de similitud en la base de datos del NCBI usando el algoritmo BLASTx, como puede verse todas las secuencias tienen un nivel de similitud alto.

Clon	Similitud	Valor E
SUS01	Calmodulina	4E-44
SUS02	Catalasa CAT1 [<i>Manihot esculenta</i>]	3E-43
SUS03	Nucleosido Difosfato Quinasa (ndpk3) [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1E-38
SUS04	Glutaredoxina [<i>Ricinus communis</i>]	4E-38
SUS05	Proteína de la familia Bet v I	2E-14
SUS06	Proteína de Transferencia de Lípidos (LTP)	2E-14
SUS07	Proteína Ankirina [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	5E-16
SUS08	Xiloglucan Endotransglicosilasa [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	9E-47
SUS09	Factor de transcripción MYB [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	2E-08
SUS10	Proteína Dedo de Cinc (ZFP) [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	9E-57
SUS11	Poliubiquitina (UBQ10) [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	5E-36
SUS12	Ubiquitin (UBQ12) [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1E-31
SUS13	Metaloproteinasa [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	5E-13
SUS14	Proteína DnaJ [<i>Hevea brasiliensis</i>]	7E-24

NADPH quinasa dependiente y terminar en la producción de ROS (Grant and Loake, 2000).

En ambas variedades de yuca fue aislada una secuencia que codifica para la enzima calmodulina (SUS01) y presenta un dominio "EF hand". Para confirmar su posible papel en las respuestas de defensa fue alineada con siete secuencias CaM encontradas por Kim et ál. (2002) y que están asociadas con respuestas de defensa a hongos en arroz. Se encontró una similitud del 98% con estas secuencias. El resultado sugiere que la calmodulina aislada en la sustracción podría pertenecer a este grupo de genes con secuencias altamente conservadas.

Estrés oxidativo.

Todos los organismos usan el O₂ como aceptor final en la cadena de transporte de electrones de la respiración; en este proceso el O₂ puede ser reducido para formar ROS, tales como el radical superóxido (O₂⁻). Los principales componentes celulares son susceptibles al daño por radicales libres, ya que estos tienen gran efecto sobre proteínas,

lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Blokina et ál., 2003). Con el fin de prevenir daños ocasionados por ROS, los organismos aeróbicos poseen enzimas que rápidamente los degradan, una de ellas es la catalasa, esta enzima protege la célula del H₂O₂ y de otros ROS por conversión del H₂O₂ en agua y oxígeno molecular durante una reacción catalítica (Blokina et ál., 2003).

Está bien documentado que la catalasa cumple un importante papel en las respuestas de defensa en plantas en contra de un amplio rango de patógenos (Yi et ál., 1999). Una de las más rápidas respuestas de defensa seguidas al reconocimiento del patógeno la constituye la producción de ROS, se ha sugerido que el aumento de ROS representa una vía de señalización para el inicio de la HR y SAR (Grant et ál., 2000). Para que los compuestos con oxígeno reactivo se acumulen en la célula es necesaria la inhibición de la enzima catalasa. El ácido salicílico es el encargado de inhibir tanto la transcripción como la actividad enzimática de la catalasa (Yi et ál., 1999). Algunos experimentos han sido ejecutados con el fin de dilucidar el papel de la catalasa y ROS en la activación

de respuestas de defensa. Plantas transgénicas de tabaco expresando genes con orientación antisentido de dos familias de catalasa que se unen a ácido salicílico (CAT1 y CAT2) mostraron el desarrollo de HR, inducción de genes PR de la familia PR-1 y el aumento de la resistencia al virus del mosaico del tabaco (Chamnongpol et ál., 1998).

Durante la sustracción realizada en las dos variedades resistentes MBRA 685 y SG 107-35 fueron encontrados genes que codifican enzimas catalasas (SUS02) pertenecientes a la familia CAT1 que es inhibida por ácido salicílico, este resultado sugiere un papel importante de CAT1 en la interacción yuca-*Xam*. Las secuencias que codifican para catalasa CAT1 tienen una similitud del 89% (valor $E = 4e-18$) con el gen *Ngcat1* aislado por Yi et ál. (1999) durante un estudio realizado para evaluar el papel de la catalasa en respuestas de defensa en tabaco.

En la sustracción fueron aisladas otras dos secuencias que cumplen importantes papeles en el estrés oxidativo de la planta durante las respuestas de defensa. La primera de ellas es la Nucleósido Difosfato Quinasa (SUS03), capaz de inhibir la generación de ROS (Moon et ál., 2003). La segunda es la Glutarredoxina (SUS04), una pequeña óxido-reductasa que participa, entre otros, en el plegamiento y regulación de proteínas y en la reparación de proteínas que han sido afectadas por el estrés oxidativo (para una revisión, ver Grant, 2001).

Expresión de genes PR

En la librería sustractiva fue aislada, para la variedad SG 107-35, una secuencia perteneciente a la familia PR-10 que se caracteriza por presentar el dominio *Betv1* (SUS05) (81% de similitud) (Van Loon et ál., 1994). Se ha demostrado que el dominio *Betv1* tiene actividad ribonucleasa (ARNasa) (Bufe et ál., 1996). Recientemente fue aislado el gen *PPRG2* durante la infección por la planta parasítica *Cuscuta trifolii* en alfafa; este gen contiene el dominio *Betv1* y se expresa en grandes cantidades durante la infección por *Xanthomonas* (Borsics and Lados, 2002).

Otra secuencia relacionada con patogenicidad fue aislada durante la sustracción en la variedad

MBRA 685, pertenece a la familia PR-14 y codifica una proteína de transferencia de lípidos (LPT)(SUS06) que contribuye en la transferencia de lípidos, particularmente fosfolípidos, a través de membranas (Borsics and Lados, 2002); su relación con la respuesta al ataque de patógenos ya ha sido estudiada. Molina et ál. (1993) mostraron que cuatro LPTs de cebada y maíz eran potentes inhibidores de los patógenos *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Pseudomonas solanacearum* y *Fusarium solani*. Ese mismo año, Molina et ál. (1993) estudiaron el comportamiento de tres de estas LPTs durante la infección por una cepa avirulenta y otra virulenta de *Erysiphe graminis* en cebada; en ambos casos se observó comportamiento bifásico en la acumulación de LPTs con un alto incremento en las primeras horas de infección y una fuerte reducción en las siguientes. La secuencia aislada en la sustracción presenta una similitud del 58% con *Cw20*, una de las tres LPT aisladas en cebada.

Al parecer la expresión de genes PR está altamente controlada y es dependiente de SAR. Uno de los genes candidatos para controlar la expresión de algunos genes PR es el *NPR1* en *Arabidopsis*. Mutantes con *NPR1* defectuosos no activan SAR, disminuyen la expresión de genes PR y se hacen susceptibles (Cao et ál., 1997). El gen *NPR1* codifica una proteína que contiene repeticiones de ankirina, los mutantes *NPR1* presentan una interrupción en estas repeticiones, lo que sugiere que son importantes en la función de *NPR1*. Cuando se introduce el *NPR1* silvestre dentro de mutantes *NPR1* se restablece la inducción de SAR, la expresión de genes PR y la resistencia a *Pseudomonas syringae* (Cao et ál., 1997). Una proteína con repeticiones de ankirina fue encontrada en la respuesta de defensa del arroz contra el ataque del hongo patógeno *Pyricularia grisea* y en respuesta al tratamiento con Benzotiadiazol un homólogo funcional del ácido salicílico (Xiong et ál., 2001).

En la sustracción fue aislada en la variedad SG 107-35 una secuencia (SUS07) que muestra una similitud del 98% con una ankirina de *Oryza sativa* (número de accesoión AAN64471) y del 90% con una de *Arabidopsis* (número de accesoión NP_187842); probablemente la ankirina esté involucrada en procesos de interacción proteína-

proteína durante la inducción de SAR en las respuesta de defensa de yuca contra *Xam*, de la misma manera como ha sido demostrado para otros pato-sistemas (Cao et ál., 1997; Kuhlmann et ál., 2003).

Modificaciones de la pared celular

Una de las estrategias para combatir el ataque de patógenos radica en la modificación de la pared celular y sus componentes (Baker et ál., 1997). En la sustracción fue aislada para la variedad SG 107-35 una secuencia que codifica la proteína Xiloglucan endotransglucosilasa (XET) (SUS08). En la década pasada se realizaron muchos estudios sobre esta enzima por su papel determinante en los procesos de expansión de la pared celular durante el crecimiento y desarrollo de la planta Cosgrove (2000). Hacia 1994 fue reportado el BRU1, un gen regulado por Brasinosteroides (BRs) y que codifica la proteína XET (Zurek and Clouse, 1994). Los Brasinosteroides son compuestos poli-hidroxiados derivados del esterol que están presentes en todas las plantas y se encuentran ampliamente involucrados en la regulación de numerosos genes que controlan los procesos de crecimiento y desarrollo (Clouse and Sasse, 1998) y en procesos más específicos de morfogénesis y expansión de la pared celular. También están involucrados en la respuesta a estrés biótico y abiótico, incluyendo estrés por salinidad, temperaturas extremas y ataque de patógenos (Clouse and Sasse, 1998).

Recientemente se ha demostrado con evidencia experimental el importante papel de los BRs en el desarrollo de resistencia a enfermedades en plantas (Nakashita et ál., 2003). Plantas silvestres de tabaco fueron tratadas con un Brasinólido (un tipo de BRs) y mostraron alta resistencia a TMV, al patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* pv. tabaci y al hongo *Oidium* sp., también demostraron que el desarrollo de la resistencia por BRs no requiere biosíntesis de ácido salicílico y es independiente del SAR y de la resistencia inducida por heridas. También comprobaron la resistencia inducida por BRs contra *Magnaporthe grisea* y *Xanthomonas Oryzae* pv. *oryzae* en arroz.

La secuencia que codifica para XET aislada en la variedad SG 107-35 presenta una similitud del 82% con el gen regulado por BRs (BRU1) re-

portado por Zurek et ál. (1994) (número de accesión P35694). Ha sido reportada la expresión de BRU1 en tejidos vasculares y su posible papel en la formación de pared celular. También se ha confirmado su expresión en células parenquimáticas alrededor del tejido vascular en tallos de soya (Oh et ál., 1998).

Los anteriores resultados sugieren que los BRs pueden regular la expresión de XET e inducir lignificación del tejido vascular durante la interacción yuca-*Xam*. Resultados que concuerdan con previos estudios bioquímicos e histológicos que confirman el refuerzo de las paredes celulares en los tejidos vasculares de la yuca con el fin de impedir la dispersión del patógeno durante la infección por *Xam* (Kpémoua et ál., 1996).

Factores de transcripción

El papel de los factores de transcripción en las respuestas a estrés biótico y abiótico ha sido estudiado desde hace pocos años pero con resultados productivos respecto a su identificación en las respuestas de defensa (para una revisión ver Singh et ál. 2002). La inducción de la expresión génica en respuesta a un estrés ocurre inicialmente a nivel de la transcripción, regular los patrones de expresión temporal y espacial de aquellos genes es una de las principales tareas de la planta en la respuesta a un tipo determinado de estrés. El genoma de *Arabidopsis* codifica por lo menos 1500 factores de transcripción (Riechmann et ál., 2000); sin embargo, para la gran mayoría no se conocen detalles de su función.

Una de las familias de factores de transcripción identificadas en las respuestas de defensa a estrés son los genes MYB (Jin et ál., 1999). Estas proteínas participan en las vías de producción de metabolitos secundarios, proliferación y forma celular, entre otros. Algunos de ellos son expresados en respuesta al tratamiento con hormonas y al ataque de patógenos (Kranz et ál., 1998). En la sustracción fue aislado un factor de transcripción MYB (SUS09) en la variedad MBRA 685, aunque no hubo ninguna similitud con MYB1, ATR1 y otros genes MYB reportados en la literatura como expresados en las respuestas de defensa, su presencia en la librería sustractiva sugiere una posible participación en la interacción yuca-*Xam*.

Otro factor de transcripción cuya expresión es inducida en respuesta a estrés biótico y abiótico es la proteína Dedo de Cinc (ZFP, del inglés "Zinc Finger Protein") (Xiong 2001); ha sido demostrada su participación en la respuesta de defensa de *Oriza sativa* al ataque por *Pyricularia grisea* (Xiong, et ál., 2001). Recientemente se ha realizado un estudio de la expresión diferencial de factores de transcripción a gran escala, 402 factores de transcripción ubicados en un microarreglo fueron evaluados utilizando como sonda ARNm de diferentes tipos de estrés y estados de desarrollo en *Arabidopsis* (Chen et ál., 2002). La expresión diferencial tanto de genes MYB como ZFP es evidente, ambos tipos de factores de transcripción se expresan en respuesta tanto a estrés biótico (ataque de bacterias, hongos y virus) como abiótico (frío, salinidad, tratamiento con ácido jasmónico), algunos de estos genes se expresan simultáneamente durante estrés biótico o abiótico sugiriendo un cruzamiento en las vías de señalización que responden a ambos tipos de estrés.

En la librería sustractiva fue aislada una secuencia en la variedad SG 107-35 que codifica un ZFP (SUS10), el resultado sugiere una regulación transcripcional en las respuestas de defensa a *Xam* en esta variedad resistente.

Degradación de proteínas. La degradación selectiva de proteínas es un mecanismo empleado para activar una variedad de señales de transducción en plantas superiores (Callis et ál., 2000). Esta degradación de proteínas intracelulares se realiza a través del complejo de ubiquitinas presentes en los eucariotas. Las ubiquitinas se unen covalente y específicamente a las proteínas que van a ser destinadas a la degradación a través de una vía dependiente de ATP. Fuertes evidencias sugieren que muchas respuestas a estrés abiótico y resistencia a patógenos son activadas y mediadas por degradación proteica (Ellis et ál., 2002).

En la sustracción fueron aisladas dos secuencias que codifican para la poliubiquitina 10 (UBQ10) (SUS11) en ambas variedades y la poliubiquitina 12 (UBQ12)(SUS12) en la variedad SG 107-35. El resultado sugiere que el sistema ubiquitina podría estar involucrado en la activación de vías de señalización mediadas por lisis proteica para responder al ataque por *Xam*.

Literatura reciente ha mostrado el papel de las proteinasas como un activo mecanismo de defensa en contra del ataque por hongos, virus y bacterias, y la inducción de su expresión en respuesta a estrés abiótico (Liu et ál., 2001). Los mecanismos utilizados por las proteinasas para impedir el ataque del patógeno son muy diversos; por ejemplo, la activación de algunas señales de transducción para responder a la infección es trabajo de las ubiquitinas. Sin embargo, la planta puede expresar proteinasas como compuestos antimicrobianos que atacan de manera directa al patógeno, a este grupo pertenecen las proteinasas defensinas como tioninas e inhibidores de proteinasas que causan lisis a la membrana plasmática de hongos invasores impidiendo su crecimiento (Toma et ál., 2002). Además de las defensinas otras proteínas proteolíticas participan en las respuestas de defensa, entre ellas están las metaloproteinasa (Liu et ál., 2001). Se ha clonado la secuencia completa de ADNc de una metaloproteinasa (Cs1-MMP) en pepino (*Cucumis sativus*), los resultados sugirieron que Cs1-MMP estaba involucrada en el desarrollo de senescencia y muerte celular programada y que podría participar en la degradación de la matriz extracelular (Delorme et ál., 2000).

En el estudio realizado por Liu et ál. (2001) proponen que la metaloproteinasa *GmMMP2* aislada en soya está involucrada en un nuevo mecanismo de defensa de la planta en contra de la infección por patógenos. Los niveles de transcripción de *GmMMP2* incrementan rápidamente durante la interacción compatible (desarrollo de la enfermedad) o incompatible (producción de resistencia) con el hongo *Phytophthora sojae* y la bacteria *Pseudomonas syringae*; sin embargo, *GmMMP2* también se acumula durante el estrés por deshidratación y herida, además su expresión es independiente de la presencia de los ácidos salicílico y jasmónico y no está correlacionada con la inducción de HR. Varias funciones fueron sugeridas para *GmMMP2*: (1) regular indirectamente la biosíntesis de fitoalexinas; (2) liberar una serie de sustancias antimicrobianas que retardan el crecimiento del patógeno y (3) regular vías de señalización diferentes a las reguladas por ácido salicílico y jasmónico. Recientemente han sido encontradas las metaloproteinasa en la respuesta del tomate a una toxina del hongo patógeno *Fusicocum amygdali* (Frick et ál., 2002), en este estudio fue construido

un microarreglo con 235 secuencias de ADNc e interrogado con ARN proveniente de plantas tratadas con la toxina, una rápida y transitoria inducción de la expresión fue vista en la metaloproteínasa MMP1.

En la librería sustractiva fue encontrada para la variedad SG 107-35 la secuencia que codifica para la enzima metaloproteínasa (SUS13). Esta secuencia presenta una similitud del 48% (Valor $E = 1 \times 10^{-9}$) con Cs1-MMP, la secuencia relacionada con muerte celular aislada en pepino, y una similitud del 46% con MMP1, la metaloproteínasa aislada en tomate.

Eficiencia en el tráfico de proteínas

Durante las respuestas de defensa a patógenos en plantas, grandes cantidades de proteínas son sintetizadas en el Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) y dirigidas vía tráfico vesicular a compartimentos específicos intra celulares o a la matriz extracelular (Jelitto-Van Dooren et ál., 1999). Está demostrado que cuando la planta es sometida a estrés o atacada por un patógeno se acumulan una serie de proteínas residentes en RER con el fin de asistir el plegamiento, ensamblaje y formación de puentes disulfuro en las proteínas recién sintetizadas (Cunnea et ál., 2003; Jelitto-Van Dooren et ál., 1999). Entre estas proteínas se encuentran las chaperonas y las proteínas residentes en RER de la familia DnaJ (Cunnea et ál., 2003), estas proteínas están relacionadas con el apropiado plegamiento proteico y su transporte a través de RER.

En la sustracción fue aislada, para la variedad SG 107-35, una proteína de la familia DnaJ (SUS14), su presencia sugiere una posible participación durante la síntesis de proteínas que responden al ataque de *Xam* con el fin de hacer más eficiente la respuesta de defensa de la yuca en contra del patógeno.

Es importante notar que las secuencias con las que se hizo el análisis funcional pertenecen a un porcentaje inferior al 30% de las secuencias aisladas para ambas variedades, el 64% de las secuencias aisladas tanto en MBRA 685 como SG 107-35 no presentan función conocida o no tienen secuencias similares en la base de datos del GenBank. Este resultado sugiere que existe un gran

potencial de nuevas secuencias, probablemente específicas de yuca que se expresan en respuesta al ataque de *Xam*.

El análisis funcional permite elaborar un flujo hipotético (figura 1) de la respuesta de defensa de la yuca a la infección por *Xam*. Una vez el patógeno ha sido reconocido se desencadenan una serie de respuestas locales para impedir su dispersión, la primera de ellas es la síntesis de ROS que está altamente controlada durante el proceso de infección por proteínas como CAT1 y NDPKs. En algún momento de la infección, tal vez en sus etapas tempranas, la célula aumenta su metabolismo, por ejemplo el tráfico vesicular, y protege sus enzimas del estrés oxidativo induciendo la expresión de glutarredoxinas. Cuando el ataque del patógeno es más fuerte, la célula activa el proceso contrario y entonces muchas vías de señalización son activadas, entre ellas las mediadas por calcio, que resultan en la expresión de genes PR como el *Betv1* y los LPTs y la inducción (conjuntamente con ROS) de la HR. Todos estos procesos de activación de genes y control son muy probablemente regulados en gran parte por la expresión de factores de transcripción como los genes MYB y ZFP. Con el fin de inducir rápidamente la HR, complejos de ubiquitina activan vías de señalización mediadas por degradación proteica y las metaloproteínasas podrían atacar directamente al patógeno. Es importante aclarar que el flujo hipotético no pretende mostrar cómo se suceden los eventos de respuesta al patógeno en el tiempo, además, por ser hipotético, cada una de las vías que se muestran deben ser confirmadas con otros experimentos. Sin embargo, es el primer modelo hipotético de respuesta de defensa de la yuca al ataque por *Xam*, y ahí radica su valor.

Identificación de genes expresados diferencialmente usando microarreglos

Con el fin de confirmar la expresión diferencial de los genes aislados en la librería sustractiva, fue construido un microarreglo de ADNc y evaluado con plantas sanas vs. plantas infectadas y colectadas después de 24 y 48 h. El análisis de datos reveló que 9 genes (5 genes después de 24h y 4 genes después de 48h) se encuentran diferencialmente expresados durante la respuesta de defensa de la yuca contra la infección por *Xam*,

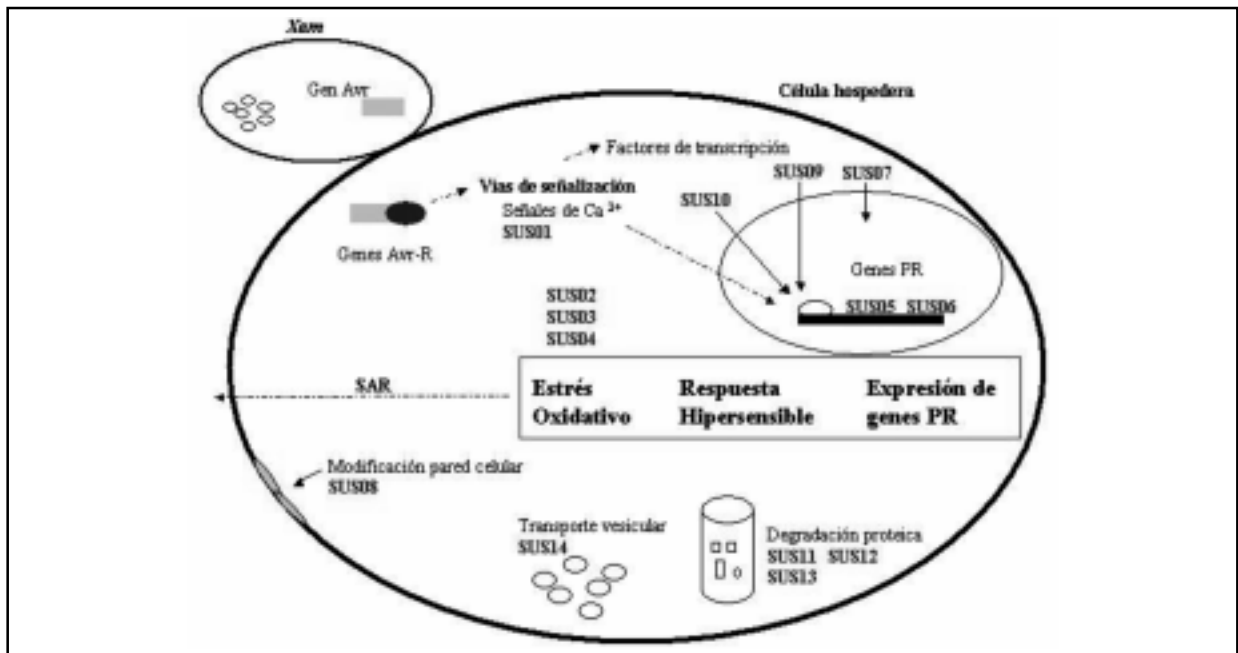


Figura 1. El modelo hipotético basado en secuencias aisladas en la sustracción muestra la posible ubicación de las secuencias aisladas en la librería sustractiva (en verde) en las vías de respuesta de defensa al ataque por *Xam*. Una vez se ha hecho el reconocimiento entre los genes *avr* del patógeno y R de la planta se inicia una serie de respuestas de defensa. Posiblemente en los estados iniciales de infección la célula aumenta su metabolismo y tráfico vesicular (expresión de SUS14) al tiempo que protege sus proteínas del estrés oxidativo (expresión de SUS04). A medida que la infección avanza se activan señales de transducción (como las mediadas por calcio, SUS01) que refuerzan la síntesis de ROS y la inducción de HR. Los factores de transcripción como MYB (SUS09) y ZFP (SUS10) inducen la expresión de genes PR (SUS05, SUS06), se activan las vías de ubiquitinación (SUS11, SUS12) y degradación proteica (SUS13), así como la modificación de la pared celular (SUS08). En tiempos específicos durante la enfermedad, la síntesis de ROS es controlada por catalasas (SUS02) y NDPKs (SUS03). Las flechas punteadas indican relación entre dos procesos que podría no ser necesariamente directa.

entre ellos la glutarredoxina (SUS04), el gen PR (SUS06), el factor de transcripción Dedo de Cinc (SUS10), la ubiquitina (SUS11), genes de *Arabidopsis* con función no conocida (*A. th*) y algunos genes que no presentan similitud en las bases de datos (NH) (tabla 2). En el futuro podría ser interesante evaluar otros tiempos de infección usando microarreglos, de forma que pueda ser caracterizada en detalle la expresión de genes en las respuestas de defensa para este importante cultivo. En orden a seleccionar fuertes genes candidatos que puedan ser utilizados en posteriores estudios de transformación genética o silenciamiento de genes, recientemente se han validado estos y otros genes diferencialmente expresados encontrados en otros experimentos, usando la tecnología de PCR en Tiempo Real (RT-PCR). La correspondencia encontrada entre los resultados de microarreglos y RT-PCR fue del 100% (López et ál., 2005).

Tabla 2. Resumen de estadísticos para el programa SAM y número de genes diferencialmente expresados a 24 y 48h durante la infección por *Xam*

Expresión	24h	48h
Delta	1.23	1.41
Tasa sobre-expresión	2	2
No. Falsos	0	0
Significativos		
Genes activado	5	4
Genes reprimidos	0	0

CONCLUSIONES

Con este estudio se ha logrado el primer acercamiento al conocimiento de los patrones de expresión génica que están asociados con las respuestas de defensa de la yuca a la bacteriosis vascular. Muchas vías de señalización dirigen respuestas como estrés oxidativo, inducción de genes PR y factores de transcripción, modificaciones de la pared celular y regulación del tráfico de proteínas. Se ha demostrado que la genómica funcional y sus tecnologías de alto alcance pueden ser de gran utilidad para avanzar hacia la solución de problemas en cultivos de alto interés económico en Colombia.

REFERENCIAS

- Baker, B.; Zambryski, P.; Staskawicz, B.; Dineshkumar S.P. 1997. Signaling in Plant-Microbe Interaction. *Science*. 276: 726-733.
- Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. 91: 179-94.
- Boher, B.; Nicole, M.; Potin, M.; Geiger, J.P. 1997. Extracellular Polysaccharides from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Interact with Cassava Cell Walls During Pathogenesis. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 10: 803-811.
- Borsics, T.; Lados, M. 2002. Dodder infection induces the expression of a pathogenesis-related gene of the family PR-10 in alfalfa. *Journal of Experimental Botany*. 53(375): 1831-1832.
- Bufe, A.; Spangfort, M.D.; Kahlert, H.; Schlaak, M.; Becker, W.M. 1996. The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta*. 199(3): 413-5.
- Callis, J.; Vierstra, R.D. 2000. Protein degradation in signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 3(5): 381-386.
- Cao, H.; Glazebrook, J.; Clarke J.D.; Volko, S.; Dong, X. 1997. The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*. 88(1): 57-63.
- Clouse, S.D.; Sasse, J.M. 1998. BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49: 427-451.
- Cosgrove, D.J. 2000. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38(1): 109-24.
- Cunnea, P.M.; Miranda-Vizueté, A.; Bertoli, G.; Simmen, T.; Damdimopoulos, A.E.; Hermann, S.; Leinonen, S.; Huikko, M.P.; Gustafsson, J.A.; Sitia, R.; Spyrou, G. 2003. ERdj5 an endoplasmic reticulum (ER)-resident protein containing DnaJ and thioredoxin domains, is expressed in secretory cells or following ER stress. *Journal in Biological Chemistry*. 278(2): 1059-1066.
- Chamnonpol, S.; Willekens, H.; Moeder, W.; Langebartels, C.; Sandermann, H.; Van Montagu, M.; Inze, D.; Van Camp, W. 1998. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 95(10): 5818-23.
- Chen, W.; Provar, N.J.; Glazebrook, J.; Katagiri, F.; Chang, H.S.; Eulgem, T.; Mauch, F.; Luan, S.; Zou, G.; Whitham, S.A. 2002. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *The Plant Cell*. 14: 559-574.
- Delorme, V.G.; McCabe, P.F.; Kim, D.J.; Leaver, C.J.; 2000. A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiology*. 123(3): 917-927.
- Ellis, C.; Turner, J.G.; Devoto, A. 2002. Protein complexes mediate signalling in plant responses to hormones, light, sucrose and pathogens. *Plant Molecular Biology*. 50(6): 971-980.
- Grant, C.M. 2001. Grant and Loake Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology*. 39(3): 533-541.
- Grant, J.J.; Loake, G.J. 2000. Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signaling in Disease Resistance. *Plant Physiology*. 124: 21-29.
- Hall, T.C.; Buchbinder, B.U.; Pyne, J.W.; Sun, S.M.; Bliss, F.A. 1978. Messenger RNA for G1 protein of french bean seeds: cell-free translation and product characterization. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 75: 3196-3200.
- Hammond-Kosack, K.E.; Jones, J.D. 1996. Resistance Gene-dependent Plant Defense Response. *Plant Cell*. 8: 1773-1791.
- Harrington, C.A.; Rosenow, C.; Retief, J. 2000. Monitoring genes expression using DNA microarrays. *Current Opinion in Microbiology*. 3: 285-291.

- Jelitto-Van Dooren, E.; Vidal, S.; Denecke, J. 1999. Anticipating Endoplasmic Reticulum Stress: A Novel Early Response before Pathogenesis-Related Gene Induction. *The Plant Cell*. 11: 1935–1943.
- Jin, H.; Martin, C. 1999. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Molecular Biology*. 41: 577-585.
- Kehoe, D. 1999. DNA microarrays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms. *Trends in Plant Science*. 4(1): 38-41.
- Kim, M.C.; Lee, S.H.; Kim, J.K.; Chun, H.J.; Choi, M.S.; Chung, W.S.; Moon, B.C.; Kang, C.H.; Park, C.Y.; Yoo, J.H.; Kang, Y.H.; Koo, S.C.; Koo, Y.D.; Jung, J.C.; Kim, S.T.; Schulze-Lefert, P.; Lee, S.Y.; Cho, M.J. 2002. Mlo, a modulator of plant defense and cell death, is a novel calmodulin-binding protein. Isolation and characterization of a rice Mlo homologue. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(22): 19304-14.
- Kpémoua, K.; Boher, B.; Nicole, M.; Calatayud, P.; Geiger, J.P. 1996. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *Manihotis*. *Can. Journal of Microbiol.* 42: 1131-1143.
- Kranz, H.D.; Denekamp, M.; Greco, R.; Jin, H.; Leyva, A.; Meissner, R.C.; Petroni, K.; Urzainqui, A.; Bevan, M.; Martin, C.; Smeeckens, S.; Tonelli, C.; Paz-Ares, J.; Weisshaar, B. 1998. Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 16(2) : 263-276.
- Kuhlmann, M.; Horvay, K.; Strathmann, A.; Heinekamp, T.; Fischer, U.; Böttner, S.; Droge-Laser, W. 2003. The alpha -Helical D1 Domain of the Tobacco bZIP Transcription Factor BZI-1 Interacts with the Ankyrin-repeat Protein ANK1 and Is Important for BZI-1 Function, Both in Auxin Signaling and Pathogen Response. *Journal Biological Chemistry*. 278(10): 8786-8794.
- Liu, Y.; Dammann, C.; Bhattacharyya, M.K. 2001. The matrix metalloproteinase gene GmMMP2 is activated in response to pathogenic infections in soybean. *Plant Physiology*. 127(4): 1788-1797.
- López, C.; Soto-Suárez, M.; Restrepo, S.; Piegu, B.; Cooke, R.; Delseny M.; Tohme, J.; Verdier, V.; 2005. Global transcriptome analysis of cassava responses to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* infection using a cassava cDNA microarray. *Plant Molecular Biology*. 57: 393–410.
- Lozano, J.C. 1986. Cassava bacterial blight: a manageable disease. *Plant Disease*. 70: 1089-1093.
- Luo, J.; Puc, J.; Slosberg, E.; Yao, Yao.; Bruce, J.; Wright, T.; Becich, M.; Parsons, R. 1999. Differential subtraction chain, a method for identifying differences in genomic DNA and mRNA. *Nucleic Acids Research*, 27(19): e24 1-8.
- Molina, A.; Garcia-Olmedo, F. 1993. Developmental and pathogen-induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. *The Plant Journal*. 4(6): 983-991.
- Molina, A.; Segura, A.; García-Olmedo, F. 1993. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS*. 316(2): 119-122.
- Moon, H.; Lee, B.; Choi, G.; Shin, D.; Prasad, T.; Lee, O.; Kwak, S-S.; Kim, D.H.; Nam, J.; Bahk, J.; Hong, J.C.; Lee, S.Y.; Cho, M.J.; Lim, L.O.; Yun, D.L. 2003. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceeding of the National Academy of Science USA*. 100(1): 358–363.
- Nakashita, H.; Yasuda, M.; Nitta, T.; Asami, T.; Fujioka, S.; Arai, Y.; Sekimata, K.; Takatsuto, S.; Yamaguchi, I.; Yoshida, S.; 2003. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant Journal*. 33(5): 887-898.
- Oh, M.H.; Romanow, W.G.; Smith, R.C.; Zamski, E.; Sasse, J.; Clouse, S.D. 1998. Soybean BRU1 encodes a functional xyloglucan endotransglycosylase that is highly expressed in inner epicotyl tissues during brassinosteroid-promoted elongation. *Plant Cell Physiology*. 39: 124-130.
- Restrepo, S.; Verdier, V. 1997. Geographical Differentiation of the Population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(11): 4427-4434.
- Restrepo, S.; Duque, M.C.; Verdier, V. 2000. Characterization of pathotypes among isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Plant Pathology*. 49: 680-687.
- Riechmann, J.L.; Ratcliffe, O.J. 2000. A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*. 3(5): 423-434.
- Rocha, P.J. 1995. Evaluación comparativa de ARN mensajero de *Phaseolus vulgaris* L. entre una variedad resistente y una susceptible *Acanthoscelides obtectus* (Say). Trabajo de Grado. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.
- Singh, K.B.; Foley, R.C.; Oñate-Sánchez, L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 430-436.

- Thomma, B.P.; Cammue, B.P.; Thevissen, K. 2002. Plant defensins. *Planta*. 216(2): 193-202.
- Tusher, V.G.; Tibshirani, R.; Chu, G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 98(9): 5116-5121.
- Van Loon, L.C.; Pierpoint, W.S.; Boller, T.; Conejero, V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*. 12: 254-264.
- Xiong, L.; Lee, M.W.; Qi, M.; Yang, Y. 2001. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 14(5): 685-692.
- Yi, S.Y.; Yu, S.H.; Choi, D. 1999. Molecular cloning of a catalase cDNA from *Nicotiana glutinosa* L. and its repression by tobacco mosaic virus infection. *Molecular Cells*. 9(3): 320-325.
- Zimmermann, S.; Nurnberger, T.; Frachisse, J.M.; Wirtz, W.; Guern, J.; Hedrich, R.; Scheel, D. 1997. Receptor-mediated activation of a plant Ca(2+)-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 94: 2751-2755.
- Zurek, D.M.; Clouse, S.D. 1994. Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. *Plant Physiology*. 104(1): 161-170.