

Expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* para el estudio de proteínas de resistencia de yuca

Agrobacterium-mediated transient expression for studying cassava resistance proteins

Carlos Romero

Facultad de Ciencias, Universidad Antonio Nariño

Wendy Fernández

Camilo López

Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia

Paula Diaz

Facultad de Ciencias
Universidad Antonio Nariño
p Diazta@uan.edu.co

Esta habilidad de *Agrobacterium* ha sido explotada en biotecnología

Resumen

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria fitopatógena que causa enfermedad por la introducción de genes en las células vegetales. Esta habilidad de *Agrobacterium* ha sido explotada en biotecnología para introducir genes de interés en esta bacteria y expresarlos en células vegetales. La expresión de genes de interés se puede lograr de manera transitoria o de manera estable. La implementación de la expresión transitoria ha permitido entender, entre muchas otras cosas, las estrategias moleculares que utilizan las células vegetales para reconocer patógenos invasores. Por esta razón, los grupos de investigación de Ciencias Biológicas y Químicas de la Universidad Antonio Nariño

Palabras clave

Bacteriosis vascular, expresión transitoria, genes de resistencia, Inmunidad vegetal, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*

En este artículo se aborda el principio de la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y su contribución en el estudio interacciones proteína-proteína en el campo de la fitopatología molecular. Adicionalmente, se expone el estado actual sobre la implementación de ensayos de expresión transitoria para el estudio de proteínas de resistencia de la yuca a la bacteriosis vascular.

y Manihot Biotec de la Universidad Nacional de Colombia se han enfocado en expresar proteínas de resistencia de yuca que confieren resistencia a la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* con el fin de dilucidar los mecanismos moleculares que utilizan las células de yuca para reconocer a este patógeno.

Abstract

Agrobacterium tumefaciens is a plant pathogenic bacterium that causes disease by introducing genes into plant cells. This ability of *Agrobacterium* has been exploited in biotechnology to introduce genes of interest and express them in plant cells. Gene expression in plant cells can be either transient or stable. The implementation of transient gene expression has made it

possible to understand, among many other things, the molecular strategies used by plant cells to recognize invading pathogens. For this reason, the research groups Ciencias Biológicas y Químicas at Universidad Antonio Nariño and Manihot Biotec at Universidad Nacional de Colombia have focused on expressing disease resistance proteins of cassava that confer resistance to the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in order to study the molecular mechanisms employed by cassava cells to recognize this bacterial pathogen.

¿Se defienden las plantas de sus patógenos?

Al igual que los animales las plantas también son atacadas por diversos patógenos que pueden causarles enfermedades y así mismo disponen de una inmunidad innata para defenderse. La inmunidad innata que tienen las células vegetales se ha dividido de acuerdo al tipo de moléculas del patógeno que son reconocidas y al tipo de respuesta de defensa que se genera. La primera rama de la inmunidad vegetal depende de la presencia de proteínas receptoras de membrana las cuales permiten reconocer patrones proteicos conservados en microorganismos. Cuando se activan estos receptores de membrana logran desencadenar una respuesta de defensa que es efectiva para controlar la multiplicación y colonización de microorganismos no adaptados a un hospedero (Bigeard, Colcombet & Hirt, 2015). Sin embargo, los patógenos adaptados a una planta logran enviar proteínas efectoras al interior de la célula vegetal que tienen como función bloquear las vías de defensa que se activan en la primera rama de la inmunidad vegetal. Los efectores actúan, por ende, como factores de virulencia, ya que le permiten al patógeno que los presenta favorecer su crecimiento en el hospedero. La segunda rama de la inmunidad vegetal se basa en el reconocimiento de los



Sansieria
T. fasciata

Las proteínas VirA y VirG de *A. tumefaciens* funcionan como un sistema de dos componentes

efectores por parte de proteínas de resistencia intracelulares (llamadas proteínas R). Este es un reconocimiento altamente específico y una vez se produce se desencadena una respuesta de defensa mucho más robusta que la respuesta generada por el reconocimiento de patrones conservados (Cui, Tsuda & Parker, 2015).

El conocimiento que se tiene sobre los mecanismos moleculares que utilizan las células vegetales para reconocer y defenderse de patógenos se ha logrado, en gran medida, gracias a herramientas experimentales basadas en la bacteria productora de tumores *Agrobacterium tumefaciens*.

***Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria que transforma genéticamente las plantas**

Si bien muchas bacterias son capaces de enviar proteínas al medio extracelular y a otras células a través de distintos tipos de sistemas de secreción, muy pocas son capaces de inyectar ADN a células vegetales. *A. tumefaciens* es una de estas bacterias. Esta especie, así como otras del mismo género, tiene la capacidad de formar un sistema de secreción, llamado sistema de secreción tipo IV, el cual permite que ingrese ADN proveniente de la bacteria al citosol de las células vegetales (Chen, Chen, Wood & Nester, 2002).

En la naturaleza, *A. tumefaciens* es capaz de producir tumores porque presenta una molécula de ADN plasmídico de gran tamaño denominado plásmido Ti, que significa inductor de tumor. En el plásmido Ti se encuentra una

región de ADN que se transfiere al núcleo de la célula vegetal hospedera y se inserta en su genoma a partir del cual se transcribe y se traduce. Esta región se denomina T-ADN o ADN de transferencia. Otra característica del plásmido Ti es que contiene genes de virulencia (abreviados *vir*) que son los que median la transformación genética en plantas, es decir, la integración del T-DNA en el genoma de la célula vegetal (Gelvin, 2017).

Las proteínas VirA y VirG de *A. tumefaciens* funcionan como un sistema de dos componentes, el primer componente (VirA) se activa en la membrana por el reconocimiento de compuestos fenólicos producidos por las plantas, principalmente por heridas (Stachel, Messens, Montagu & Zambryski, 1985). Esto lleva a la transducción de la señal al interior de la bacteria donde activa el segundo componente (VirG) que actúa como regulador de la expresión de genes (Winans, 1992). Una vez se activa este sistema, se induce de manera concertada la expresión de los genes del operón *vir* los cuales codifican para diversas proteínas que en conjunto van a procesar e integrar el T-ADN en el genoma de la célula vegetal. Si bien aún no se conoce con exactitud todo el mecanismo molecular que explica la integración del

T-ADN en el genoma de la célula vegetal, la función de algunas proteínas codificadas en el operón *vir* ha sido bien caracterizada. Entre las primeras proteínas *Vir* que actúan en este proceso de transferencia son *VirD1* y *VirD2*, las cuales se encargan de generar un corte en una de las hebras del ADN en las regiones adyacentes a los bordes izquierdo y derecho del T-ADN (Herrera-estrella, Chen, Montagu & Wang, 1988). Una vez esto ocurre, la hebra de cadena sencilla del T-ADN, la cual tiene unida en uno de sus extremos a *VirD2*, viaja a través del sistema de secreción tipo IV hacia el citosol de la célula vegetal, donde es protegida y direccionada al núcleo de la célula vegetal por *VirE2* (Gelvin, 2017). Una vez en el núcleo, la cadena sencilla del T-ADN se integra, al parecer aleatoriamente, en uno de los cromosomas de la célula vegetal.

Además de las proteínas *Vir* que ayudan a insertar el T-ADN en el genoma de la célula vegetal, en el plásmido *Ti* también se encuentran otros genes que inducen la formación de los tumores en las células vegetales. Estos genes están involucrados en la producción de enzimas que catalizan la síntesis de hormonas de la planta y moléculas que sirven como fuente de carbono y nitrógeno para las cepas de *A. tumefaciens*.

Expresión transitoria en plantas mediada por *A. tumefaciens*

Como es de esperarse, la habilidad de *A. tumefaciens* de enviar material genético hacia células vegetales ha sido aprovechada desde hace ya varias décadas en el campo de la biotecnología vegetal para expresar genes de interés en plantas ya sea de manera transitoria o estable. En la expresión transitoria, se busca expresar genes de interés en células adultas diferenciadas, como las células de las hojas (Kapila,

De Rycke, Van Montagu & Angenon, 1997). Como el pico de expresión de los genes ocurre entre 2 y 4 días después de la infección por *A. tumefaciens*, se debe evaluar su función en este tiempo, ya que la expresión empieza a declinar después de varios días (Krenek *et al.*, 2015). En contraste, la expresión estable se realiza en células no diferenciadas y totipotentes, de tal forma que, al permitir la diferenciación de estas células transformadas, se logran regenerar plantas transgénicas completas con cada una de sus células genéticamente transformadas.

La expresión transitoria se ha descrito en varias especies de plantas, siendo *Nicotiana benthamiana* la especie modelo para este tipo de ensayos (Bally *et al.*, 2018). *N. benthamiana* es una planta de uso común que se maneja y crece con facilidad en los laboratorios de investigación de plantas. Debido a las características de las hojas de *N. benthamiana*, el proceso de

**Una vez en el
núcleo, la cadena
sencilla del T-ADN
se integra, al parecer
aleatoriamente,
en uno de los
cromosomas de la
célula vegetal**

infiltración con *Agrobacterium*, también llamado agro-infiltración, se realiza con gran facilidad. Por otro lado, las proteínas pueden expresarse fácilmente a niveles altos en *N. benthamiana* a través de la agro-infiltración de la hoja utilizando una jeringa sin aguja (Imagen 1). Sin embargo, en algunas plantas también se ha usado infiltración por vacío. Mientras que el uso de vacío tiene la ventaja de que hojas enteras, e incluso plantas enteras, pueden infiltrarse a la vez (Simmons, Vandergheynst & Upadhyaya, 2009); la infiltración con jeringa es más fácil de realizar y se utiliza más frecuentemente para la producción de proteínas a pequeña escala (Ma, Lukasik, Gawehns & Takken, 2012). Dado que los genes del plásmido Ti son imprescindibles para la transferencia del T-ADN, para la construcción de vectores de expresión en plantas, se usa el principio del plásmido Ti, se insertan genes de interés entre los bordes del T-ADN para ser transferidos al genoma de la célula vegetal (Krenek et al., 2015). A estos plásmidos se les ha eliminado los genes que inducen los tumores y solo se usa el principio de transferencia de material genético. Muchos de estos plásmidos utilizados para expresar genes por agro-infiltración utilizan promotores derivados de virus que infectan

plantas por lo que generan una fuerte expresión de los genes de interés en las células vegetales (Peyret & Lomonosoff, 2015). Adicionalmente, los plásmidos de expresión en plantas deben contener genes marcadores de resistencia a antibióticos o herbicidas, los cuales permiten seleccionar por un lado las bacterias que presentan el plásmido, y por otro, seleccionar células vegetales transformadas.

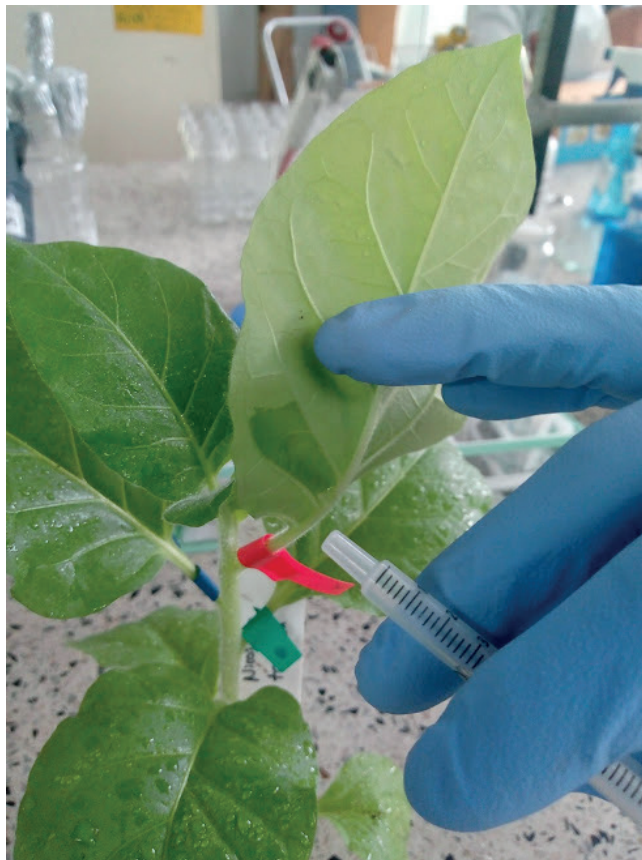


Imagen 1. Agro-infiltración por jeringa en hojas de *N. tabacum*.

El uso de la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* ha permitido el estudio de la función de genes de diversas especies vegetales y de sus patógenos. Esto se ha logrado principalmente mediante estrategias experimentales que conducen a la sobre-expresión y silenciamiento de genes. Además, la expresión de proteínas recombinantes fluorescentes en células vegetales ha permitido estudiar la localización celular de proteínas, así como las interacciones proteína-proteína (Bhat, Lahaye & Panstruga, 2006; Yamamoto et al., 2018).

En el campo de la fitopatología molecular, la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* ha sido explotada para estudiar los mecanismos de reconocimiento y activación de proteínas resistencia de plantas, así como las interacciones moleculares entre proteínas efectoras de los patógenos y proteínas del hospedero (Krenek *et al.*, 2015). De esta forma, se han podido estudiar las interacciones entre proteínas del hospedero y del patógeno y cómo este reconocimiento lleva a desencadenar una respuesta de resistencia. De manera particular, la activación de proteínas de resistencia se ha evaluado principalmente a través de la visualización de una muerte celular programada rápida, llamada respuesta hipersensible y abreviada como HR, entre dos y tres días después de la infiltración (Ma *et al.*, 2012). Esta respuesta generalmente se desencadena cuando las proteínas de resistencia se activan tras el reconocimiento de efectores de los patógenos a nivel intracelular.

La yuca: un cultivo multipropósito con algunas problemáticas

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una planta originaria de la Amazonía que produce una raíz tuberosa que representa una de las principales fuentes de energía para las personas

que viven en países tropicales. Aunque recibe diferentes nombres locales, la palabra yuca tiene su origen en la lengua de los indios caribes, los cuales la llamaban “yogca” que significa “que se amasa molida” (FAO, 2017). Sus raíces engrosadas son ricas en carbohidratos y sus hojas contienen proteínas, algunas vitaminas y minerales, por esta razón son usadas tanto para alimentación humana como animal (Aguilera, 2012). Existen otros productos derivados de esta planta que son utilizados en la industria textil, en la fabricación de papeles y bolsas. Adicionalmente, el tallo es la fuente de estacas o esquejes que son utilizados para la propagación vegetativa de la planta. A pesar de todos los usos de este cultivo multifuncional, existen muchos factores que limitan su producción.

Tradicionalmente, para el desarrollo de nuevas variedades de plantas se cruzan dos plantas con características deseables, para esto se utiliza el polen de una planta para polinizar una flor femenina de la otra planta. Este proceso de polinización depende, por lo tanto, de la floración de las dos plantas que se deseen usar como parentales de la nueva variedad. Lamentablemente, las plantas de yuca toman mucho tiempo en florecer, normalmente la cosecha se realiza antes de la floración y a algunas variedades no se les ha visto florecer (Ceballos, Kawuki, Gracen, Yencho & Hershey, 2015). Por otro lado, la semilla demora en madurar y se producen solo cuatro semillas por flor polinizada. Todo lo anterior hace que, para esta planta, el mejoramiento genético por cruces sea una labor que consumen mucho tiempo. A esto se le suma el hecho de que los campesinos tienden a emplear las mismas variedades en sus cosechas, por lo que se observado poca variabilidad genética en las variedades cultivadas. Otra de las limitantes de este cultivo es la susceptibilidad, de variedades comercialmente usadas, a pestes producidas por insectos y enfermedades producidas por bacterias, hongos y virus (McCallum, Anjanappa & Gruissem, 2017)..

La bacteriosis vascular de la yuca

La bacteriosis vascular de la yuca, también conocida como añublo bacteriano, es una enfermedad presente en todas las regiones donde la yuca es cultivada (López & Bernal, 2012). En los últimos años se ha observado un incremento en su incidencia y su expansión a nuevas regiones de cultivo. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, abreviada *Xam*, es la bacteria Gramnegativa que causa la bacteriosis vascular de la yuca (Lozano & Sequeira, 1974). Esta bacteria vive comúnmente como epífita sobre la superficie de las hojas y tallo y su ingreso a la planta ocurre a través de heridas y aperturas naturales como estomas. Los síntomas que se producen en plantas enfermas son manchas angulares, exudados en hojas y tallo, quemazón, marchitez y muerte descendente (Imagen 2). Como la bacteria se puede mantener durante tiempos prolongados en la xilema de la planta, los métodos químicos no son muy eficientes para su control. Es por esto que la mejor manera de controlar esta enfermedad es por la siembra de variedades resistentes (Alvarez, Llano & Mejía, 2012), no obstante, es poco lo que se conoce acerca de genes de resistencia a esta enfermedad.



Imagen 2. Bacteriosis vascular de la yuca. A la izquierda se observa un cultivo de yuca con síntomas de bacteriosis vascular y a la derecha se observa un cultivo de yuca sano.

Fuente: Rubén Eduardo Mora.

¿Cómo hace *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* para causar enfermedad a la yuca?

Las bacterias fitopatógenas cuentan con un sistema de secreción tipo tres que funciona como una jeringa que inyecta proteínas efectoras que entran al citoplasma de las células vegetales hospederas. La función de estos efectores es interrumpir la inmunidad de la planta y generar un ambiente favorable dentro de la célula vegetal para su proliferación. Los análisis de la secuencia del genoma de *Xam* han encontrado que esta bacteria patógena tiene la capacidad de inyectar cerca de 20 proteínas efectoras (Arrieta-Ortiz *et al.*, 2013; Rebecca Bart *et al.*, 2012; Medina *et al.*, 2017). Estudios recientes han mostrado que algunos de estos efectores son claves para la virulencia de *Xam* ya que suprimen distintas ramas de la inmunidad de la yuca (Medina *et al.*, 2017). Sin embargo, aún hay mucho por conocer sobre cómo estas proteínas modulan la vía de señalización de la inmunidad innata de la yuca.

¿Qué conocemos sobre genes de resistencia de la yuca a *Xam*?

Estudios recientes en el grupo de investigación Manihot Biotec de la Universidad Nacional de Colombia, sugieren la existencia de dos genes involucrados en la resistencia de yuca a la bacteriosis vascular, llamados *RXam1* y *RXam2* (Díaz Tatis, 2016). El gen *RXam1* codifica para una proteína que funciona como receptor de membrana y confiere resistencia a la cepa *XamC10136* (Díaz Tatis *et al.*, 2018). Mientras que *RXam2* codifica para una proteína de resistencia intracelular que parece estar involucrada en resistencia a varias cepas de *Xam* (Díaz Tatis, 2016).

Por otro lado, en trabajos previos con efectores de *Xam* que fueron identificados a partir del genoma de la cepa *XamC10151* (Arrieta-Ortiz *et al.*, 2013), se encontraron seis efectores como candidatos a ser reconocidos por la proteína de resistencia de yuca RXAM2 (Román, 2012b). La interacción de los efectores de *Xam* con RXAM2 se evaluó mediante ensayos de doble híbrido en levadura con los dominios de la proteína RXAM2 por separado y con la proteína completa. Los resultados muestran que los efectores XopAK, XopE4, XopR, XopC2, XopE1 y XopV interactúan con la proteína de resistencia RXAM2 (Román, 2012a). Estos resultados sugieren que el reconocimiento de estos efectores por la proteína RXAM2 estaría ocurriendo por asociación directa explicando la resistencia a diversas cepas de *Xam* (Román, 2012a). De manera interesante, los efectores XopAK, XopE1, XopN y XopV se encuentran conservados en 65 cepas de *Xam* (R. Bart *et al.*, 2012). Sin embargo, para comprobar estos resultados es necesario expresar al tiempo, es decir co-expresar, la proteína de yuca RXAM2 junto con los efectores de *Xam* de manera independiente, para luego, mediante ensayos de interacción proteína-proteína tales como BiFC (del inglés, *BiMolecular Fluorescence Complementation*), o

de CoIP (del inglés, *Co-Immunoprecipitation*), poder detectar la interacción entre proteínas.

Hacia la identificación de los efectores de *Xam* reconocidos por la proteína de resistencia de yuca RXAM2

Trabajos previos han mostrado que si bien es posible expresar proteínas reporteras en hojas de yuca, su nivel de expresión es bajo en comparación con las especies modelo de expresión transitoria como *N. benthamiana* y *N. tabacum* (Díaz Tatis, Bernal & López, 2014; Ramírez, Szurek & López, 2018). Por esta razón, se han utilizado principalmente las especies *N. benthamiana* y *N. tabacum* para la co-expresión transitoria de la proteína de resistencia RXAM2 junto con los efectores de *Xam* XopC2 y XopAK. Resultados preliminares en nuestros grupos de investigación muestran que cuando XopAK se co-expresa con RXAM2 se produce una respuesta hipersensible, lo mismo se ha observado con el efector XopC2 (datos no publicados). Dado que la aparición de una respuesta hipersensible tras la co-expresión de una proteína de resistencia y un efector, se ha asociado con activación de las vías de

señalización que conducen a una respuesta inmune; los resultados sugieren que la proteína RXAM2 se activa por el reconocimiento de XopAK y XopC2, desencadenando la respuesta hipersensible y por lo tanto una respuesta de inmunidad disparada por

efectores. Estos estudios constituyen un punto de partida para futuros ensayos que permitan dilucidar las dinámicas de la interacción de RXAM2 con los efectores XopAK y XopC2. A futuro se espera que estos resultados permitan contribuir con el entendimiento del mecanismo molecular que explica la resistencia a la bacteriosis vascular de la yuca mediada por la proteína de resistencia RXAM2.

Fichas biográficas de los autores.



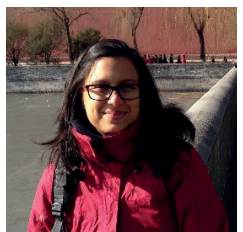
Carlos Eduardo Romero Vásquez, estudiante de noveno semestre de Bioquímica en la Universidad Antonio Nariño, actualmente se encuentra realizando su trabajo de grado en la Universidad Antonio Nariño, bajo la dirección de la profesora Paula Alejandra Díaz Tatis y la codirección del profesor Camilo Ernesto López Carrascal.



Wendy Daniela Fernandez Bohorquez, Bióloga, estudiante de primer semestre de la Maestría en Ciencias -Biología, de la Universidad Nacional de Colombia.



Camilo Ernesto López Carrascal, Biólogo con Maestría en Biología Celular y Molecular y Doctorado en Ciencias de la Vida. Profesor titular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá y líder del grupo de investigación Manihot Biotec.



Paula Alejandra Díaz Tatis, Bióloga con Maestría en Ciencias -Microbiología, y Doctorado en Ciencias -Biología. Su área de investigación es la interacción molecular planta-patógeno. Profesora asistente de la Universidad Antonio Nariño, sede Bogotá (Circunvalar), pertenece a los grupos de investigación en Ciencias Biológicas y Químicas y a Manihot Biotec.

Referencias

- Aguilera, M. (2012). *La yuca en el caribe colombiano: de cultivo ancestral a agroindustrial* (Documentos de Aguilera, M. (2012). *La yuca en el caribe colombiano: de cultivo ancestral a agroindustrial*. Documentos de Trabajo sobre Economía Regional y Urbana No. 158. Cartagena. Tomado de: [<http://www.banrep.gov.co/en/node/25497>].
- Álvarez, E., Llano, G. A., & Mejía, J. F. (2012). Cassava diseases in Latin America, Africa and Asia. En: Howeler, R. (Ed.). *The cassava handbook – A reference manual based on the asian regional cassava training course, held in Thailand*. (pp. 258–304). Cali: CIAT.
- Arrieta-Ortiz, M. L., Rodríguez-R, L. M., Pérez-Quintero, Á. L., Poulin, L., Díaz, A. C., Arias Rojas, N. & Bernal, A. (2013). Genomic Survey of Pathogenicity Determinants and VNTR Markers in the Cassava Bacterial Pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* Strain CIO151. *PLoS ONE*, 8(11), e79704. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0079704>
- Bally, J., Jung, H., Mortimer, C., Naim, F., Philips, J. G., Hellens, R. & Waterhouse, P. M. (2018). The Rise and Rise of *Nicotiana benthamiana*: A Plant for All Reasons. *Annu. Rev. Phytopathol*, 56, 405–426.
- Bart, R., Cohn, M., Kassen, A., McCallum, E. J., Shybut, M., Petriello, A. & Staskawicz, B. J. (2012). High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), pp. E1972–E1979. [doi.org/10.1073/pnas.1208003109].
- Bhat, R. A., Lahaye, T. & Panstruga, R. (2006). Interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods*, 2(12), pp. 1–14 [doi.org/10.1186/1746-4811-2-12].
- Bigeard, J., Colcombet, J. & Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8(4), pp. 521–539. [doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022].
- Ceballos, H., Kawuki, R. S., Gracen, V. E., Yencho, G. C. & Hershey, C. H. (2015). Conventional breeding, marker-assisted selection, genomic selection and inbreeding in clonally propagated crops: a case study for cassava. TAG. Theoretical and Applied Genetics. *Theoretische Und Angewandte Genetik*, 128(9), pp. 1647–1667. [doi.org/10.1007/s00122-015-2555-4].
- Chen, L., Chen, Y., Wood, D. W. & Nester, E. W. (2002). A New Type IV Secretion System Promotes Conjugal Transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 184(17), pp. 4838–4845 [doi.org/10.1128/JB.184.17.4838].
- Cui, H., Tsuda, K. & Parker, J. E. (2015). Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66 (October 2015), pp. 487–511 [doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040012].
- Díaz Tatis, P. A. (2016). *Transference of RXam2 and Bs2 genes to confer resistance against cassava bacterial blight (CBB)*. Universidad Nacional de Colombia.
- Díaz Tatis, P. A., Herrera Corzo, M., Ochoa Cabezas, J. C., Medina Cipagauta, A., Prías, M. A., Verdier, V. & López Carrascal, C. E. (2018). The overexpression of RXam1, a cassava gene coding for an RLK, confers disease resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Planta*, 247(4), pp. 1031–1042 [doi.org/10.1007/s00425-018-2863-4].
- Díaz Tatis, P., Bernal, A. J. & López, C. E. (2014). Transient GUS gene expression in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using *Agrobacterium tumefaciens* leaf infiltration. *Revista MVZ Córdoba*, 19(3), pp. 4338–4349.
- Gelvin, S. B. (2017). Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the Plant Genome. *Annual Review of Genetics*, 51 (August), pp. 195–217.

- Herrera-Estrella, A., Chen, Z., Montagu, M. & Wang, K. (1988). VirD proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are required for the formation of a covalent DNA-protein complex at the 5' terminus of T-strand molecules. *The EMBO Journal*, 7(13), pp. 4055-4062.
- Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M. & Angenon, G. (1997). An *Agrobacterium*-mediated transient gene expressionsystem for intact leaves. *Plant Science*, 122(1), pp. 101-108 [doi.org/10.1016/S0168-9452(96)04541-4].
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Duskocilova, A., Komis, G., & Samaj, J. (2015). Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances*, 33(6), pp. 1024-1042. [doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012].
- López, C. E. & Bernal, A. J. (2012). Cassava Bacterial Blight: Using Genomics for the Elucidation and Management of an Old Problem. *Tropical Plant Biology*, 5(1), pp. 117-126 [doi.org/10.1007/s12042-011-9092-3].
- Lozano, J. & Sequeira, L. (1974). Bacterial blight of cassava in Colombia. *Etiology. Phytopathology*, 64, pp. 74-82.
- Ma, L., Lukasik, E., Gawehns, F. & Takken, F. L. W. (2012). The Use of Agroinfiltration for Transient Expression of Plant Resistance and Fungal Effector Proteins in *Nicotiana benthamiana* Leaves. In M. D. Bolton & B. P. H. J. Thomma (Eds.). *Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols* (Vol. 835, pp. 61-74). Amsterdam: SpringerLink [doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5_4].
- McCallum, E. J., Anjanappa, R. B. & Gruissem, W. (2017). Tackling agriculturally relevant diseases in the staple crop cassava (*Manihot esculenta*). *Current Opinion in Plant Biology*, 38, pp. 50-58 [doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.008].
- Medina, C. A., Reyes, P. A., Trujillo, C. A., Gonzalez, J. L., Bejarano, D. A., Montenegro, N. A. & Bernal, A. J. (2017). The role of type three effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in virulence and suppression of plant immunity. *Molecular Plant Pathology*, pp. 1-14.
- Peyret, H. & Lomonosoff, G. P. (2015). When plant virology met *Agrobacterium*: the rise of the deconstructed clones. *Plant Biotechnology Journal*, 13, pp. 1121-1135. [doi.org/10.1111/pbi.12412].
- Ramírez, E., Szurek, B. & López, C. E. (2018). Factores que afectan la expresión transitoria del gen GUS en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Colombiana de Biotecnología*, XX(2), pp. 57-67 [doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77063].
- Román, V. (2012). *Identificación de interactores proteicos de RXam2, una proteína candidata de resistencia, implicados en la ruta de señalización de defensa contra la bacteriosis vascular de la yuca*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Simmons, C. W., Vanderghyest, J. S. & Upadhyaya, S. K. (2009). A model of *agrobacterium tumefaciens* vacuum infiltration into harvested leaf tissue and subsequent in planta transgene transient expression. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(3), pp. 965-970 [doi.org/10.1002/bit.22118].
- Stachel, S. E., Messens, E., Montagu, M. & Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318(19).
- Winans, S. C. (1992). Two-Way Chemical Signaling in *Agrobacterium*-Plant Interactions. *Microbiological Reviews*, 56(1), pp. 12-31.
- Yamamoto, T., Hoshikawa, K., Ezura, K., Okazawa, R., Fujita, S., Takaoka, M. & Miura, K. (2018) Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants. *Scientific Reports*, 8, pp. 1-10 [doi.org/10.1038/s41598-018-23024-y].