

Caracterización de la respuesta morfológica de variedades susceptibles y resistentes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) a la bacteriosis vascular causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

Tamara Sandino¹, Liliana López-Kleine², Camilo López³, Xavier Marquínez¹

¹Grupo SISBIO (COL0024669) Laboratorio de Anatomía y Cultivo de Tejidos Vegetales, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. ²Grupo Manihot Biotec, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. ³Departamento de Estadística, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.
Autor para correspondencia: Xavier Marquínez (xmarquínez@unal.edu.co)
Data de chegada: 28/08/2014. Aceito para publicação em: 23/04/2015.

10.1590/0100-5405/2031

RESUMEN

Sandino, T.; López-Kleine, L.; López, C.; Marquínez, X.. Caracterización de la respuesta morfológica de variedades susceptibles y resistentes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) a la bacteriosis vascular causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.2, p.94-100, 2015.

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis* es una de las principales limitaciones del cultivo de yuca. En esta investigación, mediante microscopía óptica, se realizó un análisis comparativo de los cambios morfológicos e histoquímicos en tallos de una variedad de yuca susceptible (TMS60444) y una resistente (CM6438-14), 7 y 14 días después de ser inoculadas con la cepa patogénica CIO151. Se pudo detectar que la variedad resistente genera

barreras de calosa en las paredes celulares del parénquima cortical y del floema, manteniendo funcional este tejido. En tanto que los tejidos vasculares de la variedad susceptible colapsan, el floema por obstrucción total con tapones de calosa y por formación de compuestos fenólicos, y el xilema por formación de tílides y/o acumulación de compuestos fenólicos, sin poder frenar el avance sistémico de la enfermedad.

Palabras claves: Depósitos de calosa, tílides, compuestos fenólicos, epifluorescencia.

RESUMO

Sandino, T.; López-Kleine, L.; López, C.; Marquínez, X. Caracterização da resposta morfológica de variedades resistentes e suscetíveis de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) bacteriose vascular causado por *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.2, p.94-100, 2015.

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis* é uma das principais limitações no cultivo da mandioca. Nesta pesquisa, com o auxílio de microscopia optica, foi realizada uma análise comparativa de as alterações morfológicas e histoquímicas no caule de uma variedade suscetível de mandioca (TMS60444) e uma resistente (CM6438-14), 7 e 14 dias após serem inoculadas com a cepa patogênica CIO151. Detectouse que a

variedade resistente gera barreiras de calose nas paredes celulares do parênquima cortical e do floema, mantendo a funcionalidade deste tecido. Enquanto que nos tecidos vasculares da variedade suscetível há colapso, do floema por obstrução total por tampões de calose e por compostos fenólicos, e no xilema por formação do tilose e/ou por acúmulo de compostos fenólicos, sem parar a progressão da sistêmica doença.

Palavras-chave: Depósitos do calose, tilose, compostos fenólicos, epifluorescência.

ABSTRACT

Sandino, T.; López-Kleine, L.; López, C.; Marquínez, X. Characterization of the morphological response of susceptible and resistant varieties of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) to vascular bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.2, p.94-100, 2015.

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis* is one of the major limitations for cassava cultivation. In the present study, optical microscopy was used to perform a comparative analysis of the morphological and histochemical changes in the stem of a susceptible (TMS60444) and a resistant (CM6438-14) cassava variety at 7 and 14 days after inoculation with the pathogenic strain CIO151. The resistant variety was detected to generate callose barriers on the cell walls

of the cortical parenchyma and phloem, maintaining the functionality of this tissue. On the other hand, for the vascular tissues of the susceptible variety there is collapse in the phloem due to total obstruction by deposits of callose and phenolic compounds and in the xylem due to tylosis formation and/or phenolic compound accumulation, without stopping the progression of the systemic disease.

Additional keywords: Callose deposits, tylosis, phenolic compounds, epifluorescence.

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una planta tropical perenne de la familia Euphorbiaceae, extensamente cultivada en más de 90 países de Sudamérica, Asia y África (9), por su raíz almidonosa de alto valor alimentario que constituye la base de la alimentación de más de 600 millones de personas en el mundo, consolidándose como el cuarto cultivo más importante después del arroz, el maíz y el trigo (9, 10).

Una de las principales limitaciones del cultivo de yuca es la bacteriosis vascular, ocasionada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) (18). Se ha estimado que las pérdidas por esta enfermedad pueden llegar al 70-100% de la producción en tres ciclos de cultivo (19). *Xam* es una bacteria gram negativa, flagelada, que comparte la mayoría de las características tanto fisiológicas como bioquímicas de su género (18). *Xam* es un patógeno epífita, foliar y vascular, que presenta una amplia expresión de síntomas por parte de la planta durante el proceso de infección. Estos síntomas incluyen manchas foliares, marchitamiento, exudados y lesiones en el tallo. En muchos casos se presenta necrosis de los haces vasculares y en casos extremos puede incluso ocasionar la muerte total de la planta (1, 19). El proceso infeccioso comienza con la multiplicación epífita, y la consecuente penetración a la planta por los estomas o por heridas presentes en la epidermis provocadas por la lluvia, insectos o por el ser humano (1, 20). Una vez en el 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 (18). Pese a existir variedades de yuca resistentes, éstas no presentan buenas cualidades agronómicas y no son cultivadas por los productores. La comprensión de los mecanismos y estrategias que emplean las variedades resistentes permitiría transferirlas a las variedades comerciales que son, en la mayoría de los casos, susceptibles a la enfermedad, vía mejoramiento genético.

Las plantas frente a posibles infecciones por patógenos presentan barreras estructurales constitutivas y respuestas inducidas (2). Dentro de las primeras se encuentra la presencia de tricomas, paredes celulares o producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiológica (3,4,8). Por ejemplo, durante la infección algunas plantas generan modificaciones en la pared con el fin de reforzar esta barrera estructural, entre ellas la deposición de calosa en aposiciones denominadas papilas (13), además de formación de tílides (tilosas) y taponamiento de haces vasculares. Por otro lado, las respuestas inducidas se dan como producto del reconocimiento del patógeno, lo que activa vías de transducción de señales que culminan con la reprogramación de la expresión génica y la producción de estructuras de refuerzo o de moléculas con actividad bioquímica deletérea para los patógenos (11, 13, 18, 24).

La microscopía óptica y electrónica ha permitido dilucidar diversos procesos de patogénesis, permitiendo conocer en detalle tanto los procesos de penetración de los patógenos, como los cambios morfológicos provocados en la planta hospedera. En diversas interacciones planta-patógeno se han identificado respuestas histoquímicas de la planta durante la infección; entre ellas, la producción de compuestos fenólicos y el refuerzo de las barreras constitutivas en xilema y floema por lignificación, suberificación o deposición de calosa (5, 11, 13, 14). El uso de coloraciones de contraste ha permitido también detectar cambios estructurales como formación de tílides, zonas de lignificación o de división celular e hiperplasia (24).

En el caso particular de yuca, se han realizado estudios histoquímicos y citoquímicos para evaluar la respuesta de las plantas propagadas *in vitro* y aclimatadas en invernadero, a nivel de tallo principalmente, en respuesta a la infección por *Xam* (15, 16). Estos estudios, encontraron que se presentaban respuestas de defensa similares en tejidos vasculares

de plantas resistentes y susceptibles, sin embargo la intensidad de las respuestas fue mayor en las variedades resistentes. Por otro lado se encontró que, mientras el número de células productoras de fenol no presentaba diferencia en plantas sanas (susceptibles y resistentes), hubo un incremento significativo en el número de estas células en el floema y xilema de plantas resistentes infectadas. Esto se relaciona con estudios previos en los cuales se ha mostrado una posible actividad bactericida de compuestos fenólicos en plantas infectadas con *Xanthomonas* (16).

También se reportó la detección histoquímica de flavonoides dentro de vasos infectados (15). En plantas infectadas, la lignina se encontró diferencialmente acumulada en las paredes de células del floema y corticales. Se postula que esto contribuye con la prevención de fuentes secundarias de inóculo bacteriano. También se evidenció la acumulación de compuestos osmofílicos en las vacuolas y la formación rápida de tílides que obstruyen los vasos del xilema (15). Por otro lado, estudios de inmunocitoquímica han demostrado la importancia de lipopolisacáridos de *Xam* en su interacción con la pared celular de yuca (6).

Los estudios citoquímicos en yuca (15, 16), han utilizado múltiples metodologías tales como microscopía óptica (convencional y con epifluorescencia) y microscopía electrónica y el uso de anticuerpos policlonales para inmunolocalización de calosa *in situ*, entre otros. Esta aproximación múltiple, si bien ha generado evidencia muy completa del proceso, dificulta el estudio del proceso de infección en el tiempo y el espacio. Trabajos en otros patosistemas han optado por utilizar solamente cortes finos en microscopía óptica, implementando múltiples pruebas histoquímicas en secciones seriadas. Por ejemplo, Fry & Milholland (12) realizaron tinciones con Hematoxilina-Naranja G y pruebas histoquímicas para pectinas, gomas, lignina y taninos, en secciones finas seriadas para estudiar las respuestas de la uva a la infección con *Xyella fastidiosa*.

En este estudio se buscó evaluar las respuestas a nivel histológico de plantas de yuca adultas, a nivel de tallo a diferentes tiempos post inoculación y a diferentes distancias del punto de inoculación, aspecto que no ha sido tenido en cuenta en estudios previos. En este trabajo se aplicaron metodologías histoquímicas con secciones finas, seriadas y bajo microscopio óptico, para el estudio de las principales respuestas de plantas susceptibles y resistentes de yuca a la infección con *Xam*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo, inoculación y diseño experimental

Estacas de plantas de yuca de las variedades TMS60444 (susceptible) y CM6438-14 (resistente) se cultivaron bajo invernadero a 28°C y 80% de humedad relativa. Plantas de 53 días se inocularon con la cepa patogénica CIO151 de *Xam*, utilizando el método de punción (21). Para ello se aplicaron 10 µL de un cultivo bacteriano calibrado a una densidad óptica de 0.002 a 600 nm con MgCl₂. La punción se realizó a una distancia de entre 5 y 8 cm del ápice del tallo, en el punto medio del primer entrenudo grande de la planta.

Se realizaron tres réplicas biológicas de inoculación (tres plantas). La planta control, se punzó siguiendo el procedimiento descrito previamente, y se le aplicó la solución de MgCl₂ sin bacterias (ésta no se incluyó en el diseño factorial). Las muestras se colectaron a los 0, 7 y 14 días post-inoculación (dpi). En cada uno de los días se tomaron muestras a 5, 10, 15 y 20 mm del punto de inoculación; por cada muestra se realizaron cortes seriados de 8 micras de grosor y se distribuyeron al azar en láminas para 5 tinciones diferentes, en cada lámina 5 cortes (pseudoréplicas).

Fijación, inclusión en parafina y tinciones diferenciales

Las muestras a cortar fijaron en FAA (10:5:85, formol: ácido acético glacial: etanol 70%) por 48 horas. Posteriormente las muestras se deshidrataron en series ascendentes de etanol (70, 90, 95 y 100%). El etanol absoluto se reemplazó mediante pasos en diferentes soluciones de etanol 100%-HistoClear (Sigma, agente aclarante; 10-90, 30-70, 50-50, 70-30, 90-10, 100%). El HistoClear a su vez se reemplazó por paraplast plus (Sigma), que se utilizó como medio de inclusión, aplicando tres cambios.

Para la evaluación de cambios estructurales e histoquímicos se realizaron cinco tinciones diferenciales, en donde se evaluó la presencia de tílides, suberina, compuestos fenólicos y calosa en los tejidos de las plantas de las variedades resistente y susceptible.

Para la detección de cambios estructurales en parénquima, xilema y/o floema, y detección de compuestos fenólicos se utilizaron dos metodologías, *i*) tinción policromática con toluidina O para cortes en parafina (26) y *ii*) azul de astra - fucsina (25). Para la detección histoquímica de lignina y compuestos afines se aplicó la coloración de floroglucinol-HCl (25). La detección de calosa se realizó mediante tinción con azul de anilina y se observó mediante epifluorescencia (15). El colorante sudan negro B se empleó para la detección de suberina (25).

Para los análisis cuantitativos se tuvieron en cuenta las siguientes 10 variables de respuesta medidas en cada pseudoréplica: vasos obstruidos con tílides y/o compuestos fenólicos (TiI); depósitos periféricos y totales de calosa en el floema (CaIP y CaIT); depósitos de calosa en parénquima cortical (CaC); compuestos fenólicos en corteza y floema (FenC y FenF) y suberina en corteza, médula, xilema y floema (SubC, SubM, SubX, SubF). Todas las variables se expresaron como número de células afectadas por sección histológica, siguiendo la metodología de Kpemoua et al. (15). El área promedio de las secciones histológicas fue de $13.1 \pm 3,7 \text{ mm}^2$ y $14,8 \pm 3,0 \text{ mm}^2$ para las variedades TMS60444 y CM6438-14 respectivamente.

En cuanto al diseño experimental se empleó un factorial $2 \times 4 \times 3$, bajo un modelo completamente al azar, siendo los factores: Variedades (Resistente: CM6438-14 y Susceptible: TMS60444), distancia del punto de inoculación (5, 10, 15 y 20 mm) y días post-inoculación (0, 7 y 14 dpi; 0: control de tiempo). Dado que los resultados obtenidos no presentaron comportamiento estadístico ajustado a la normalidad, se realizaron pruebas estadísticas de Kruskal - Wallis (17) y pruebas de comparación pareadas realizando corrección de Bonferroni del valor P (7), utilizando el programa R (23).

RESULTADOS

Posterior a la infección con la cepa CIO151 de *Xam*, el tejido de tallo se colectó a los diferentes tiempos post-infección (0, 7 y 14 dpi) para el análisis histoquímico en las dos variedades. Las condiciones del experimento fueron exitosas por cuanto las plantas control de la variedad TMS60444 a los 21-30 dpi mostraron síntomas típicos de bacteriosis, mientras que estos síntomas estuvieron ausentes en la variedad CM6438-14 (datos no mostrados).

Estructura histológica general del tallo de yuca

Una vez colectados y procesados los tallos de las dos variedades se visualizaron por microscopía óptica. Los tallos inoculados de las dos variedades se caracterizaron por presentar una epidermis externa con cutícula delgada, corteza formada por 3 a 4 capas de parénquima, seguidos por 3-4 capas de colénquima y 2-3 capas de parénquima.

En los tejidos vasculares se formó un anillo continuo debido a un crecimiento secundario incipiente, conformados por 1 a 2 capas de fibras perifloemáticas externas, seguidas de floema (6-9 células de grosor), zona cambial (4 células de grosor aproximadamente) y xilema de grosor variable. En el xilema se observó claramente las zonas correspondientes al xilema primario, en donde este tejido está más desarrollado y las zonas interfasciculares con desarrollo incipiente secundario. La médula está conformada por grandes células parenquimáticas (Figura 1A). En el parénquima cortical y medular se presentaron ocasionalmente cristales de oxalato de calcio de tipo drusa.

Respuestas a la infección por *Xam*

En el xilema, la infección con *Xam* se manifestó como obstrucción de los vasos por conformación de tílides (Figura 1B), o de compuestos fenólicos (Figura 1C); o una combinación de las dos situaciones. Este tipo de fenómeno se presentó en las dos variedades evaluadas.

La formación de depósitos de calosa se presentó en el floema principalmente (Figura 1 D-E), pero también en la corteza (Figura 1E) y en paredes o espacios intercelulares en las fibras perifloemáticas (Figura 1F). Los depósitos encontrados fueron de dos tipos: *i*) aquellos que bloquearon totalmente el lumen de los tubos cribosos y *ii*) aquellos situados periféricamente, presentes en las paredes de los tubos cribosos o en las fibras ya nombradas.

Además, se presentaron compuestos fenólicos en floema y corteza, los cuales fueron detectados y cuantificados mediante tinciones con floroglucinol-HCl (Figura 1G) y/o azul de toluidina (Figura 1H). Estos compuestos se presentaron en la variedad resistente y susceptible, presentando diferencias significativas entre variedades solamente en el floema.

Comparación de las respuestas en las dos variedades

Con base en los cortes y las tinciones realizadas se pudo cuantificar diez tipos diferentes de respuestas conforme a la metodología. Estas variables se cuantificaron en las dos variedades tanto a los 7 y 14 dpi y a diferentes puntos del tallo, desde el punto de inoculación hasta 20 cm de distancia. Como respuesta general, las 10 variables evaluadas (TiI, CaIP, CaIT, CaC, FenC, FenF, SubC, SubM, SubX y SubF) incrementaron de manera significativa entre el día 0 (control de tiempo donde los resultados fueron invariablemente 0) y el día 14. El incremento en el número de estructuras histológicas observado se generó específicamente como producto de la infección por *Xam*, ya que en los controles de inoculación (punción con solución libre de *Xam*), no se observó la presencia de este tipo de respuesta (valores invariablemente de 0). Esto significa que las dos variedades de yuca, resistente y susceptible, responden a la presencia de *Xam* incrementando suberina, calosa, compuestos fenólicos y formando tílides en los diferentes tejidos del tallo.

Para evaluar más en detalle las respuestas diferenciales de las dos variedades a lo largo del tiempo y a las diferentes distancias del punto de inoculación se realizó una prueba de Kruskal-Wallis (17) y tests pareados con corrección de Bonferroni (7). Estos análisis permitieron identificar diferencias significativas entre las dos variedades en seis de las 10 variables histoquímicas evaluadas (Tabla 1). Con respecto a la distancia al punto de inoculación con *Xam* no se presentaron diferencias significativas tampoco para la interacción distancia por variedad (prueba de Kruskal-Wallis, datos no mostrados).

Tres de las variables que manifiestan diferencias entre variedades afectan el floema (CaIT, CaIP y FenF), dos a la corteza (CaC y SubC) y una al xilema (TiI). Solamente la variable CaIP mostró diferencias entre variedades a los 7 dpi.

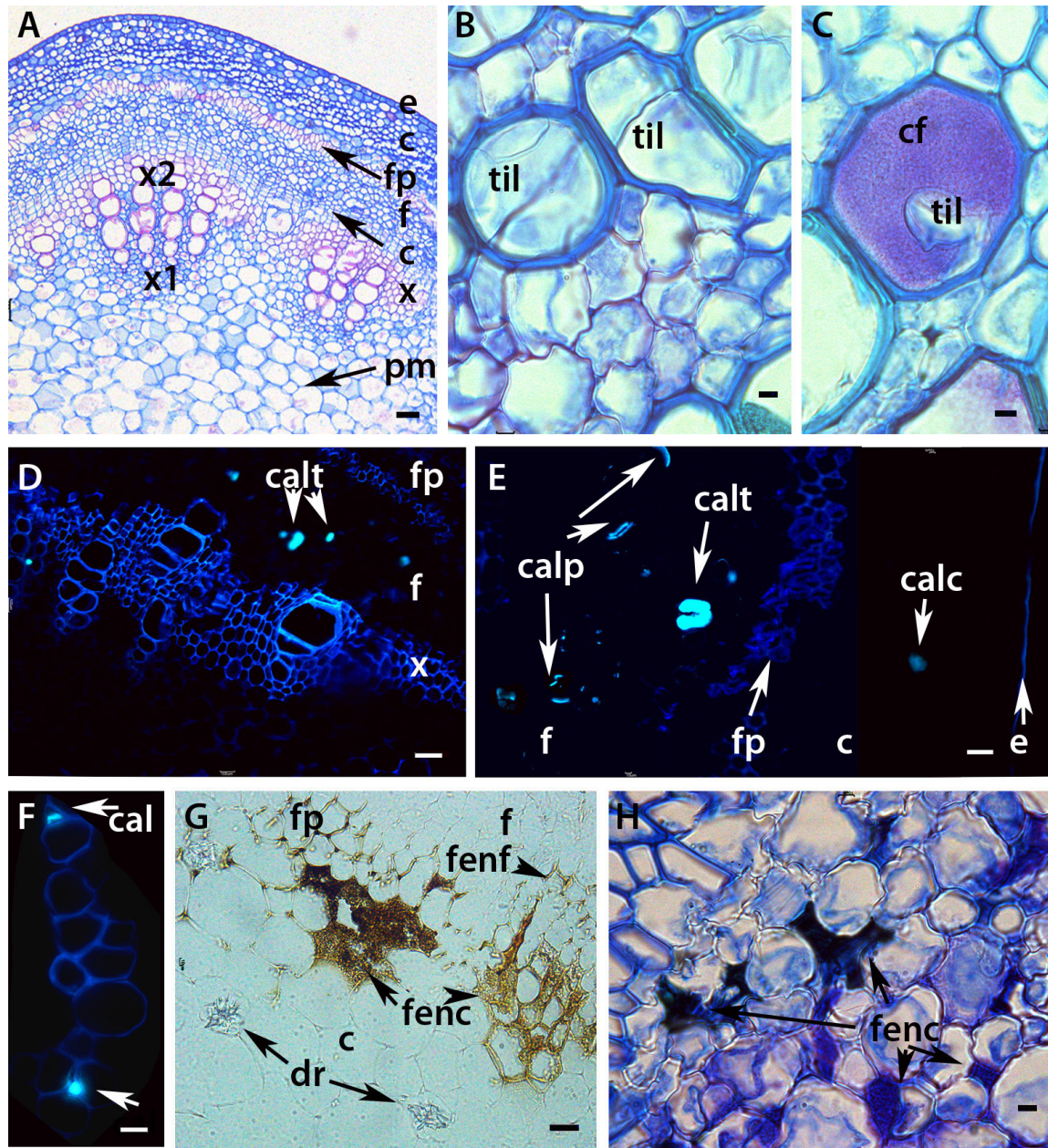


Figura 1. Tinciones diferenciales en secciones transversales de *Manihot esculenta*. A- Vista general (azul de astra-fucsina); B,C. Detalle de tilides y depósitos fenólicos en vasos de xilema a los 14 días de inoculación (azul de astra-fucsina); D,E. Vista general observada bajo fluorescencia (azul de anilina); F. Reacción positiva de calosa en fibras perifloemáticas (azul de anilina); G. Reacción positiva de algunas células corticales (Floroglucinol-HCl); H. Tinción positiva del floema (Azul de toluidina). A,B,C,D. Variedad TM60444; E,F,G,H. Variedad CM6438-14. Abreviaturas = c: corteza, cal: calosa, calc: calosa en corteza, calp: calosa periférica, calt: calosa total, cf: compuestos fenólicos, dr: drusas, e: epidermis, f: floema, fenc: compuestos fenólicos en floema, fenf: compuestos fenólicos en floema, fp: fibras perifloemáticas, pm: parénquima medular, til: tilides, x: xilema, x1: xilema primario, x2: xilema secundario. Escalas: A = 100 mm, B,C,F,H = 10 mm, D = 50 mm, E,G = 25 mm.

Como respuesta a la infección por *Xam*, los vasos del xilema de la variedad susceptible tienden a llenarse de tilides o compuestos fenólicos (Til; Figura 2A) en una proporción cuatro veces superior a la que se presenta en la variedad resistente.

La obstrucción total de los tubos cribosos por calosa (CalT; Figura 2B) es significativamente mayor en el floema de la variedad sensible; en donde además, los depósitos son más frecuentes con el aumento de la distancia al punto de inoculación. En contraste, la variedad resistente genera más depósitos periféricos de calosa (CalP; Figura 2C) que limitan el daño causado por *Xam* al floema, manteniendo los tubos

cribosos funcionales. La formación de depósitos de calosa en las paredes de las células parenquimáticas de la corteza se presentó solamente en la variedad CM6438-14 (Cal C; Figura 2D), mientras que éstas no se observaron en la variedad susceptible TMS60444.

Entre las dos variedades también se observaron diferencias contrastantes en la presencia de compuestos fenólicos en el floema. En la variedad susceptible se presentaron valores altos a todas las distancias del punto de inoculación evaluadas, mientras que en la variedad resistente se presentaron valores más bajos y confinados a la cercanía del punto de inoculación (Figura 2E).

		Til	CalT	CalP	CalC	SubC	FenF
Prueba de Kruskal Wallis	Variable x variedad	0,1775	0,002877 **	0,2695	0,002956 **	0,1241	0,01865 *
	Variable x distancia	0,9379	0,5276	0,5191	0,9998	0,9822	0,7368
Prueba de comparación de medias de Bonferroni	variedad	0,8818	0,1914	0,02821 *	NA	0,3031	NA
	día 7						
	variedad	0,0009886 **	0,0009911 **	0,02089 *	0,0009597 **	0,01531 *	0,000983 **
	día 14						
	Distancias	0,8729	0,803	0,9734	0,9913	0,2565	0,5311
	día 14						

Tabla 1. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis y test de Bonferroni para seis variables histológicas medidas a 4 distancias del punto de inoculación de *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis en la variedad resistente CM6438-14 y la variedad sensible TM60444 de yuca (*Manihot esculenta*). * diferencia significativa; ** diferencia altamente significativa.

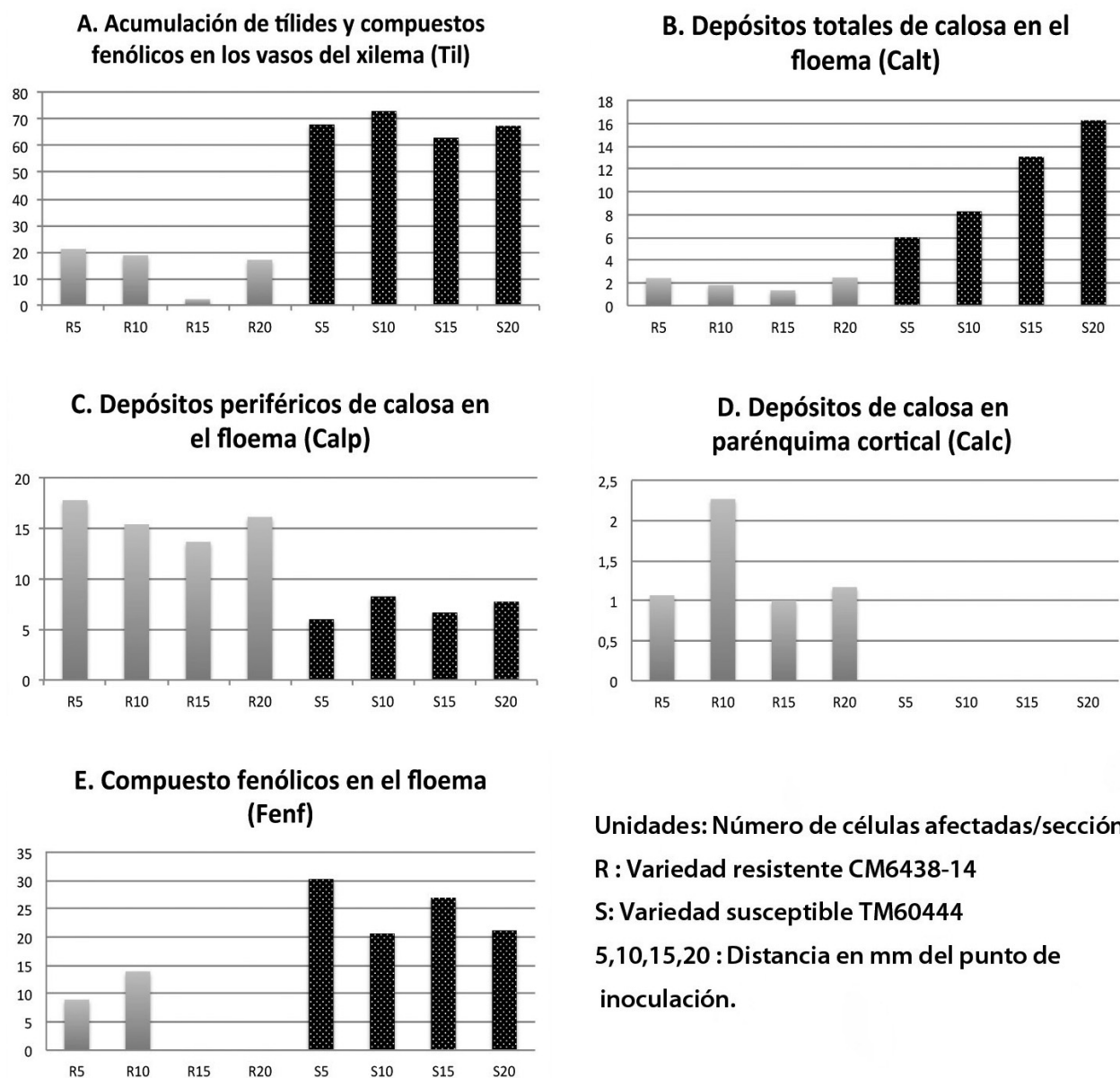


Figura 2. Variables histológicas medidas a cuatro distancias del punto de inoculación de *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis en dos variedades de yuca (*Manihot esculenta*)

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la respuesta histológica de plantas de yuca resistentes y susceptibles a *Xam* a diferentes tiempos y sitios del punto de inoculación post-infección. Mediante cortes histológicos y coloraciones diferenciales se pudo establecer que la variedad resistente genera barreras de calosa en el parénquima cortical (Figuras 1E-F, 2D) y en el floema (Figuras 1E, 2C), manteniendo así funcional este tipo de tejido. En tanto que en la variedad susceptible los tejidos vasculares colapsan, el floema por obstrucción total por tapones de calosa y por compuestos fenólicos (Figuras 1D, 2B) y el xilema por la formación de tílides y/o acumulación de compuestos fenólicos (Figuras 1B-C, 2A), sin poder frenar con ello el avance sistémico de la enfermedad.

Respuestas a nivel del xilema: tílides y compuestos fenólicos

En este estudio se pudo evidenciar la presencia de tílides y compuestos fenólicos en los vasos del xilema como respuesta a la infección en las dos variedades (Figuras 1 B-C y 2A). Las células del xilema, al igual que todas las células vegetales, son capaces de reconocer a los potenciales patógenos a través de receptores extra o intracelulares los cuales activan respuestas de defensa generando barreras físicas o químicas (8). Los mecanismos asociados a la defensa del xilema están asociados al parénquima paratraqueal y consisten frecuentemente en la secreción de compuestos fenólicos (2, 3), gomas y/o sobrecrecimiento de las propias células parenquimáticas (tílides) para contener al patógeno o inhibir su desarrollo (27). En el presente estudio se observaron tanto tílides y producción de compuestos fenólicos en las dos variedades de yuca estudiadas. Aunque se ha puesto en evidencia en otras especies que estas respuestas se dan tanto en plantas sensibles como resistentes, se ha demostrado que en las resistentes la reacción es más rápida e intensa, particularmente en las cercanías del punto de infección, logrando con ello contener al patógeno (3, 27). Para el caso particular de yuca, estudios previos de citología comparativa entre una variedad sensible (Fetonegbdogi) y otra resistente (TMS 91934) realizado en plantas jóvenes provenientes de propagación *in vitro*, no se encontraron diferencias en la formación de tílides entre las dos variedades a los 6 dpi (15, 16). Los resultados obtenidos en el presente estudio no solo concuerdan con estos reportes previos, los cuales estuvieron delimitados a un solo punto de muestreo a los 5 mm del punto de inoculación, sino que permiten hacer una expansión al realizar un análisis a cuatro puntos distantes del punto de inoculación. Sin embargo, al analizar las respuestas a los 14 dpi si se observaron diferencias entre las dos variedades de yuca. En este período de avance del patógeno, se presenta una mayor cantidad de vasos de xilema taponados con tílides y/o compuestos fenólicos en la variedad sensible, en relación con la resistente (Tabla 1 y Figura 2A). Estos resultados parecen sugerir que existen otras barreras o mecanismos que actúan tempranamente, permitiéndole a la variedad resistente mantener funcional el xilema. Mientras que en la variedad sensible el sellamiento de los vasos, sin formación de nuevos, podría estar generando estrés al impedir el flujo de agua y nutrientes hacia las hojas, tal y como ha sido propuesto por Fradin y Thoma (11).

Depósitos de calosa y compuestos fenólicos en floema y parénquima cortical

La calosa es un polisacárido que actúa como refuerzo de las paredes celulares de las plantas y es una de las respuestas inducidas más comunes que éstas presentan en respuesta a diferente tipo de patógenos (8). En tanto que los compuestos fenólicos son sustancias con actividad desinfectante. Estos dos tipos de respuestas inducidas

tienen como objetivo evitar la colonización del patógeno a células circundantes sanas. En el presente trabajo se observó un aumento de calosa, compuestos fenólicos, suberina y tílides como un tipo de respuesta específica a la infección por *Xam* a los 14 dpi (Tabla 1, Figura 2). Kpémoua et al. (15) observaron diferencias significativas entre la variedad resistente y susceptible en cuanto a número de “células fenólicas” tanto en los parénquimas del floema y xilema siendo mayores en la variedad resistente, mientras que el número de vasos infectados y la cantidad de bacterias fue mayor en la variedad susceptible. Estos resultados sugieren fuertemente que los compuestos fenólicos actúan efectivamente como una posible barrera para la expansión de la infección. En concordancia con los resultados anteriores, Pereira et al. (22) encontraron que los niveles de la enzima fenilalanina amonioliasa, involucrada en la síntesis de compuestos fenólicos de tipo fenilpropanoides, se incrementa mucho más en el caso de una respuesta de resistencia entre yuca y *X. cassavae*.

Adicionalmente, en este trabajo se observó que la variedad resistente genera barreras a la infección, conformadas principalmente por compuestos de tipo calosa en las células de parénquima cortical (Fig. 2C) y en las paredes de células del floema (depósitos periféricos, Fig. 2D). Estas barreras parecieran ser efectivas ya que disminuyen el avance de la infección al interior de los tubos cribosos, como consecuencia, en la variedad resistente la cantidad de elementos de tubo criboso totalmente taponados por calosa (Figura 2B) y por compuestos fenólicos (Figura 2E) es menor que en la variedad sensible a los 14 dpi. Una respuesta similar se ha observado en el caso de la interacción tomate - *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, raza 1, en donde la acumulación de calosa impide la infección (3, 4). Cabe señalar que aunque la presencia de compuestos fenólicos es menor en las células de floema en la variedad resistente, su presencia está asociada a la cercanía del punto de inoculación y en consecuencia pueden estar asociados a la contención de la infección, tal como ha sido propuesto por Beckman (3).

A partir de los resultados presentados en este estudio se puede concluir que la resistencia que presenta la variedad CM6438-14 frente a *Xam*, parece estar relacionada principalmente con la generación de barreras de calosa en el parénquima cortical y en las paredes del floema. En tanto que la ausencia de este tipo de respuesta (o su respuesta limitada) en la variedad sensible TMS60444, determina que a los 14 dpi se presente un mayor taponamiento del xilema por tílides y del floema por tapones totales de calosa, lo cual genera un colapso vascular de la planta, provocando su muerte.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación para la promoción de la investigación y la tecnología «Banco de la República» y a Colciencias (Contrato 1101-521-28399) por la financiación parcial del proyecto y a la Universidad Nacional de Colombia por las contrapartidas.

REFERENCIA

1. Álvarez, E.; Bellotti, A.; Calvert, L.; Arias, B.; Cadavid, L. F.; Pineda, P.; Llano, G.; Cuervo, M. **Guía para el manejo de las enfermedades, las plagas y las deficiencias nutricionales de Yuca**. Cali: CIAT, 2002. 120 p.
2. Beckman, C. H. Host responses to vascular infection. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto v.2, p. 231-252, 1964.
3. Beckman, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in general defense response in plants?. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Amsterdam, v. 57, p. 101-110, 2000.

4. Beckman, C. H.; Verdier, P. A.; Mueller, W. C. A system of defense in depth provided by vascular parenchyma cells of tomato in response to vascular infection with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, race 1. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 227-239, 1989.
5. Bestwick, Ch. S.; Bennett, M. H.; Mansfield, J. W. Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 108, p. 503-516, 1995.
6. Boher, B.; Nicole, M.; Potin, M.; Geiger, J. P. Extracellular polysaccharides from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* interacts with cassava cell walls during pathogenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 10, n. 7, p. 803-811, 1997.
7. Bonferroni, C. E. **Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità**. Pubblicazioni del Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze. Libreria internazionale Seeber, Firenze, 8. 1936. 62 p.
8. Chisholm, S. T.; Coaker, G.; Day, A. Y.; Staskawicz, B. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. **Cell**, Cambridge; v. 124, n. 4, p. 803-814, 2006.
9. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of food and agriculture**. Rome, 2008. 138 p.
10. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Save and grow: cassava: A guide to sustainable production intensification**. Roma. (Howeler, R., Lutaladio, N., & Thomas, G. eds.). 2013. 126 p.
11. Fradin, E. F.; Thoma, B. P. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt disease by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. **Molecular Plant Pathology**, Hoboken, v. 7, n. 2, p. 71-86, 2006.
12. Fry, S. M.; Milholland, R. D. Response of resistant, tolerant, and susceptible grapevine tissues to invasion by the Pierce's disease bacterium *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, n. 1, p. 66-69, 1990.
13. Hauck, P.; Thilmony, R.; He, S. Y. A. *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 100, n. 14, p. 8577-8582, 2003.
14. Keshavarzi, M.; Soyly, S.; Brown, I.; Bonas, U.; Nicole, M.; Rossiter, J.; Mansfield, J. Basal defense induced in pepper by lipopolysaccharides are suppressed by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 17, n. 7, p. 805-815, 2004.
15. Kpémoua, K.; Boher, B.; Nicole, M.; Calatayud, P.; Geiger, J. P. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, n. 11, p. 1131-1143, 1996.
16. Kpémoua, K. **Etude comparative du développement de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* chez des variétés de manioc sensibles et résistantes. Approches histologique, ultrastructurales et cytochimique des mécanismes de la pathogenèse**. 1995. 216p. These de Docteur, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Nantes.
17. Kruskal, W.H.; Wallis W.A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583-621, 1952
18. López, C.; Restrepo, S.; Verdier, V. Limitations of Cassava Bacterial Blight: New Advances. **Acta Biológica Colombiana**, Bogotá, v. 11, n. 25, p. 21-42, 2006.
19. Lozano, J. C. Cassava bacterial blight: A manageable disease. **Plant Disease**, St. Paul, v. 70, n. 12, p. 1089-1093, 1986.
20. Melotto, M.; Underwood, W.; Yang, H. S. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 101-122, 2008.
21. Muñoz, A. R.; Pérez, A. L.; Gómez, F.; Gil, J.; Michelmore, R.; Bernal, A.; Szurek, B.; López, C. RNAseq analysis of cassava reveals similar plant responses upon infection with pathogenic and non-pathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Plant Cell Reports**, Berlín, v. 33, p. 190-1912, 2014. Doi 10.1007/s00299-014-1667-7.
22. Pereira, L. F.; Goodwin, P. H.; Erickson, L. The role of phenylalanine ammonia lyase during cassava bacterial blight and cassava bacterial necrosis. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 112, p. 51-60, 1999.
23. R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
24. Römer, P.; Hahn, S.; Jordan, T.; Strauss, T.; Bonas, U.; Lahaye, T. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. **Science**, New York, v. 318, n. 5850, p. 645-648, 2007.
25. Ruzin, S.E. **Plant microtechnique and microscopy**. New York: Oxford University Press, 1999. 322 p.
26. Sakai, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.
27. Yadeta, K. A.; Thoma, B. P. H. J. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 1-12, 2013. (artículo 97; doi: 10.3389/fpls.2013.00097).