



**Análisis de expresión génica en la respuesta de defensa de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mediada por el ácido salicílico contra el ataque del ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) y mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*)**

**ALEJANDRO VALENCIA LONDOÑO**

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
VILLAVICENCIO, COLOMBIA  
Año 2018**

**Análisis de expresión génica en la respuesta de defensa de la  
yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mediada por el ácido salicílico  
contra el ataque del ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) y  
mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*)**

**ALEJANDRO VALENCIA LONDOÑO**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

Director:

Jaime Alberto Marín Colorado, Ph.D.

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA  
PROGRAMA DE BIOLOGIA  
VILLAVICENCIO, COLOMBIA  
2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Padre y Madre por siempre inculcarme buenos modales, el deseo de estudiar, llenarme de buenos consejos y guiarme siempre por el buen camino.

A mi tía Gloria Londoño, por ayudarme a estudiar esta carrera y siempre apoyarme.

A mi director el Dr. Jaime Marín Colorado, por sus buenos consejos, y aportes en mi formación académica, por siempre enseñarme algo nuevo y hacer querer más la biotecnología y la academia.

A la profesora Dra. Deicy Villalba por su colaboración en los análisis estadísticos.

A la plataforma de transformación y edición de genomas del CIAT, por permitirme realizar las pruebas de PCR, al Dr. Paul Chavarriaga por sus buenos consejos, a Maria del Carmen por enseñarme nuevos métodos, a Mónica Prías y Sandra Valencia por sus buenos consejos y ser guía durante mi estancia en el laboratorio.

A Wilmer Alexis Vargas, Juan Camilo Sánchez y Laura Paola López, por su compañía y ayuda durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al laboratorio de Biotecnología Vegetal y Cultivo de tejidos y al grupo de investigación Biotox por su colaboración.

A todas las personas que de alguna forma contribuyeron a la realización de este proyecto

A la Universidad de Llanos y a la Dirección General de Investigaciones por financiar este proyecto.

## RESUMEN

La yuca (*Manihot esculenta*) es uno de los cultivos más importantes para la alimentación de la región tropical debido a su rico contenido de hidratos de carbono. Sin embargo, ésta se ve afectada por diferentes factores bióticos y abióticos como el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) y la mosca blanca (*Aleurotrachellus socialis*), los cuales generan pérdidas significantes en la producción de la yuca. Es por esto que las plantas han desarrollado muchas estrategias diferentes como mecanismo de defensa para hacer frente a estos tipos de estrés como la expresión de genes los cuales generan diferentes respuestas de defensa en la planta. El análisis de expresión de genes es una herramienta que permite conocer cómo se comportan los genes frente al estrés, para esto se realizó una búsqueda de genes de referencia y genes relacionados con el ácido salicílico con el programa Genevestigator (RefGenes, Perturbations) para elegir cuales presentan mejor regulación frente al ataque, luego de esto se diseñaron los primers con la herramienta Primer 3 para amplificar las regiones deseadas. Y teniendo en cuenta el conocimiento del genoma y de la capacidad que tiene los promotores para alojar diferentes motivos *cis* que activan y reprimen genes, se caracterizó los promotores de los genes BSMT1, F-BOX y cysteine proteinase inhibitor, y a su vez se evaluó la oviposición de los artrópodos plaga sobre los genotipos de yuca CMC 40 y Ecu-72. El análisis de la oviposición arrojó que el genotipo CMC 40 es el más susceptible frente al ataque del ácaro verde presentando una oviposición media de 5 huevos y que el genotipo Ecu-72 es el más resistente presentando una oviposición de 1 huevo por día. El análisis de la caracterización de los promotores arrojó que los genes tanto para la yuca como para *Arabidopsis thaliana*, comparten los mismo motivos *cis* como el G-box, Box 4, Skn-1, ARE, ABRE, circadiano, y también comparten motivos importantes que actúan en la defensa de la planta como el motivo TC-rich, Wun-motif, y otro motivos importantes relacionados con el ácido salicílico como el TCA element y SARE. Con la evaluación de los materiales de yuca en este estudio se confirmó la característica del genotipo CMC 40 como susceptible y Ecu-72 como resistente, se aprobó la hipótesis de que los motivos *cis* encontrados se comparten en los promotores de los genes de *A. thaliana* y la yuca.

**Palabras clave:** *Manihot esculenta*, ácido salicílico, promotores, oviposición, artrópodos plaga

## ABSTRAC

Cassava (*Manihot esculenta*) is one of the most important crops for feeding of the tropical region due to its rich content of carbohydrates. However this is affected by different biotic and abiotic factors as the Green mite (*Mononychellus tanajoa*) and the whitefly (*Aleurotrachellus socialis*), which generate significant losses in the production of cassava. This is why plants have developed many different strategies as a defense mechanism to deal with these types of stress as the expression of genes which generate different defense responses in the plant. Gene expression analysis is a tool that allows us to know how to behave against the stress genes, for this we conducted a search of reference genes and genes related to salicylic acid with the program Genevestigator (RefGenes, Perturbations) to choose which present better regulation against the attack, then close-ups with the first 3 tool were designed to amplify the desired regions. And taking into account the knowledge of the genome and capacity that has developers to accommodate different reasons cis that activate and repress genes, characterized the promoters of genes BSMT1, F-BOX and cysteine proteinase inhibitor, and in turn evaluated the oviposition of the arthropod pest on the genotypes of cassava CMC 40 and Ecu-72. The analysis of oviposition arrojo CMC 40 genotype is the more susceptible to the attack of the Green mite presenting an average of 5 eggs oviposition and Ecu-72 genotype is the most resistant presenting an oviposition of 1 egg per day. Analysis of the characterization of promoters threw that genes for cassava and *Arabidopsis thaliana*, they share the same reasons cis or the G-box, Box 4, Skn-1, ARE, opens, circadian, and also share important motives acting in defense of the plant as the TC-rich motif, Wun-motif, and another found important reasons is related to salicylic acid as the TCA ground element and SARE. With evaluation of materials of cassava in this study was confirmed as susceptible genotype CMC 40 feature and how resistant Ecu-72, adopted the hypothesis that cis found motifs are shared in the promoters of genes of *A. thaliana* and cassava.

**Keywords:** *Manihot esculenta*, salicylic acid, promoters, arthropod pest

## Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN .....	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	13
3. HIPÓTESIS.....	14
4. OBJETIVOS.....	15
4.1 Objetivo general .....	15
4.2 Objetivos específicos .....	15
5. JUSTIFICACIÓN .....	16
6. MARCO TEÓRICO .....	19
6.1 Los cultivos y su defensa contra las plagas.....	19
6.2 Ácido salicílico.....	19
6.3 Artrópodos plaga .....	21
6.3.1 <i>Aleurotrachelus socialis</i> .....	21
6.3.2 <i>Mononychellus tanajoa</i> .....	21
6.4 Oviposición .....	22
6.5 Regiones promotoras de los genes .....	23
7. METODOLOGÍA Y ÁREA DE ESTUDIO .....	24
7.1 Material biológico.....	24
7.2 Colecta de artrópodos plaga .....	24
7.3 Ensayos a libre y no libre escogencia.....	26
7.3.1 Bioensayo ácaro verde ( <i>M. tanajoa</i> ) .....	26
7.3.2 Bioensayo mosca blanca ( <i>A. socialis</i> ).....	27
7.4 Análisis molecular de la interacción planta-artrópodo .....	28
7.5 Extracción de ADN y ARN .....	29
7.6 Cuantificación y gel de calidad.....	29
7.7 Síntesis de cDNA.....	29
7.8 Búsqueda de Genes de referencia y genes relacionados con la vía del ácido salicílico .....	29
7.9 PCR y diseño de primers.....	30
7.10 Caracterización estructural de los promotores .....	30
7.11 Análisis estadístico .....	31
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32

<b>8.1 Oviposición <i>Mononychellus tanajoa</i></b> .....	32
<b>8.1.1 No libre escogencia</b> .....	32
<b>8.1.2 Libre escogencia</b> .....	33
<b>8.2 Caracterización estructural de los promotores</b> .....	35
<b>8.3 Genes de referencia y genes relacionados con la vía del ácido salicílico</b> .....	49
<b>8.4 PCR primers G3PDH y 18s</b> .....	51
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	54
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	56

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diseño del experimento, bioensayo ácaro verde. A, ensayo a libre escogencia, B y C, ensayo a no libre escogencia  
26
- Figura 2. Diseño del experimento, bioensayo mosca blanca. A y B ensayo a libre escogencia, C y D ensayo a no libre escogencia.  
27
- Figura 3. Modelo de cajas y bigotes, número de huevos según genotipo y día, a no libre escogencia. 32
- Figura 4. Curva de oviposición de los genotipos CMC 40 y Ecu-72, a no libre escogencia  
33
- Figura 5. Modelo de cajas y bigotes, número de huevos según el genotipo y día a libre escogencia 34
- Figura 6. Curva de oviposición de los genotipos CMC 40 y Ecu-72 a libre escogencia  
35
- Figura 7. Secuencias del gen BSMT1 encontradas en yuca  
35
- Figura 8. Árbol filogenético de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen BSMT1 36
- Figura 9. Motivos *cis* putativos encontrados en el promotor de gen BSMT1 en *A. thaliana*  
38
- Figura 10. frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen BSMT1 en *Arabidopsis thaliana* 37
- Figura 11. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen BSMT1 en *Manihot esculenta* del cromosoma 4. 39
- Figura 12. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen BSMT1 en *Manihot esculenta* del cromosoma 1. 39
- Figura 13. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen BSMT1 en *Arabidopsis thaliana*, y *Manihot esculenta* del cromosoma 1 y 4. 40
- Figura 14. Árbol filogenético de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen auxin signaling F-box 2. 41

Figura 15. Frecuencia de motivos <i>cis</i> encontrados en el promotor del gen auxin signaling F-box 2 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
Figura 16. Frecuencia de motivos <i>cis</i> encontrados en el promotor del gen auxin signaling F-box 2 de <i>Manihot esculent</i> en el cromosoma 11.	42
Figura 17. Frecuencia de motivos <i>cis</i> encontrados en el promotor del gen auxin signaling F-box 2 de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Manihot esculenta</i> en el cromosoma 11.	42
Figura 18. Árbol filogenético de las secuencias de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Manihot esculenta</i> del gen cysteine proteinase inhibitor.	43
Figura 19. Frecuencia de motivos <i>cis</i> encontrados en el promotor del gen cysteine proteinase inhibitor de <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
Figura 20. Frecuencia de motivos <i>cis</i> encontrados en el promotor del gen cysteine proteinase inhibitor de <i>Manihot esculenta</i> en el cromosoma 8.	44
Figura 21. Frecuencia de motivos <i>cis</i> encontrados en el promotor del gen cysteine proteinase inhibitor de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Manihot esculenta</i> en el cromosoma 8.	44
Figura 22. Árbol filogenético de las secuencias de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Manihot esculenta</i> del gen CA1.	45
Figura 23. Frecuencia de motivos <i>cis</i> encontrados en el promotor del gen CA1 de <i>Manihot esculenta</i> en el cromosoma 15.	46
Figura 24. Frecuencia de motivos <i>cis</i> encontrados en el promotor del gen CA1 de <i>Manihot esculenta</i> en el cromosoma 17.	46
Figura 25. Frecuencia de motivos <i>cis</i> encontrados en el promotor del gen CA1 de <i>Manihot esculenta</i> en el cromosoma 15 y 17.	47
Figura 26. Experimentos evaluados para la búsqueda de genes relacionados con la vía del ácido salicílico.	49
Figura 27. Genes de referencia encontrados utilizando como modelo <i>Arabidopsis thaliana</i> .	50
Figura 28. PCR con el primer G3PDH en muestras de ácaro, utilizando como negativo agua y RNA.	52
Figura 29. Muestras de cDNA del ensayo con <i>M. tanajoa</i> amplificadas con los primers G3PDH y 18s respectivamente. Como positivo se usó una muestra de DNA de 60444.	52

Figura 30. Muestras de cDNA del ensayo con *A. socialis* amplificadas con los primers G3PDH y 18s respectivamente. Como positivo se usó una muestra de DNA de 60444.  
53

#### **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Sitios de colecta de artrópodos plaga en los municipios de Acacias, San Martín de los Llanos, Cubarral, Castillo y El Dorado. 24

Tabla 2. Lista de empleados, que amplifican un fragmento del BSMT1 cysteine proteinase inhibitor y F-box. 30

Tabla 3. Muestras de RNA utilizadas para la síntesis de cDNA y posterior ensayo en PCR. 49

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han desarrollado diferentes estrategias de defensa para hacer frente a distintos tipos de estrés de tipo biótico y abiótico, como por ejemplo las lesiones causadas por heridas (ataque de plagas). Estas estrategias se han desarrollado probablemente por su estilo de vida inmóvil (Heyman *et al.*, 2017). El tipo de heridas mecánicas afectan la supervivencia de la planta especialmente si ocurren en el tallo el cual contiene el tejido vascular que transporta agua y nutriente por toda la planta (Melnik 2017). Este tipo de heridas también permite la entrada de posibles patógenos. Para contrarrestar el ataque la planta responde a nivel celular activando su sistema de defensa, este tipo de respuesta incluyen la reparación de la herida y el refuerzo de la pared celular, a través de la activación de vías de señalización (Savatin *et al.*, 2014). Esta activación se da por medio de la inducción de proteínas tanto locales como sistémicas, y por la activación de hormonas relacionadas con las heridas como por ejemplo el etileno, ácido jasmónico y ácido salicílico (Sasaki *et al.*, 2002). Y en adición la planta activa la división celular local para reparar las heridas causadas por el ataque (Heyman *et al.*, 2017)

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un arbusto perenne originario de Sur América que en el 2008 alcanzó una producción mundial de casi 280 millones de toneladas (FAO, 2012 Marín, 2015). Este cultivo es esencial para la dieta humana, por su rica fuente de carbohidratos. Su importancia se centra en la alimentación para personas de países tropicales en vía de desarrollo (Nhassico *et al.*, 2008, Marín, 2015) y también en la industria de productos procesados, alimentos para animales y almidón (Jansson *et al.*, 2009). A pesar de tener una gran producción esta se ve afectada por 200 especies de artrópodos plaga asociadas al cultivo, entre ellas se encuentra el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) y la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*) (Bellotti *et al.*, 2012).

El ácaro verde es considerada como una de las más importantes ya que se considera que ha coevolucionado con el cultivo, llegando al punto de adaptarse a las distintas barreras físicas y químicas que utiliza el cultivo para defenderse (Bellotti, 2008, Marín, 2015). El daño de este artrópodo se ve afectado por las condiciones ambientales, la fertilidad del suelo, la edad de la planta. A medida que infesta el cultivo, este se ve afectado negativamente en cuanto a su rango fotosintético lo que conlleva a la calidad de la producción generando pérdidas económicas.

La mosca blanca también es considerada como una de las plagas importantes para el cultivo debido a la distribución que esta posee y a su característica como vector de virus (Bellotti, 2002). De esta manera los agricultores para poder evitar la infestación de estos artrópodos en el cultivo, utilizan insecticidas los cuales tienen múltiples aplicaciones. Esto se convierte en un arma de doble filo para el control de las plagas ya que su uso continuo puede llevar a que los artrópodos plaga generen tolerancia al producto químico. Pero no solo afecta a los artrópodos, estos químicos también llegan a afectar de manera negativa a los organismos que son benéficos para el cultivo (Faria & Wraight, 2001, Marín, 2015).

El uso indiscriminado de estos insecticidas genera otro efecto que es el incremento del costo de producción y de los niveles de contaminación con un impacto negativo en la salud pública. Es por esto que el control biológico y las prácticas culturales son claves para el diseño de un mejor manejo integrado de plagas que mejore la producción del cultivo y reduzca el ataque y en su conjunto el costo de producción Faria & Wraight, 2001, Marín, 2015).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de la gran diversidad de plagas que atacan el cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) a nivel mundial, los artrópodos ocupan un lugar significativo. Entre los que más causan pérdidas en el rendimiento de la planta están la mosca blanca (*Bemisia tabaci*; *Aleurotrachelus socialis*), el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*), el chinche de encaje, chinche subterráneo, piojo harinoso, etc. (Bohórquez, 2011). La asociación de estas especies con otras puede llegar a ocasionar daños esporádicos o localizados en el cultivo, y llegan a ser consideradas como plagas menores o generalistas, las cuales atacan el cultivo de forma oportunista (Skovgard et al., 1993; Bellotti et al., 1999 Bellotti et al., 2002).

En el cultivo de yuca el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*), causa pérdidas entre un 50 a 80% con ataques de duración de tres a seis meses (CIAT, 2002). Para el caso de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) su papel como vector de virus, la constituye como un problema para la producción en África y Asia (Bellotti, 2002). El ácaro desde que se introdujo a África oriental en la década de los 60, se ha diseminado rápidamente y ha causado extensos daños desde Tanzania, en el este africano hasta la costa de Guinea, en África occidental. En el caso del ácaro rojo (*Tetranychus urticae*) logra causar problemas en la yuca ya que ataca las hojas, que posteriormente caen tras el avance de la infestación, de manera que se limita el rendimiento de la planta ocasionando finalmente problemas en el soporte económico de varios países (CIAT, 1983).

Hasta la fecha *A. socialis* se considera como una de las especies específicas para *M. esculenta* y es una de las plagas más importantes a nivel económico estando distribuida en partes de Sur América como el Ecuador, Colombia, Brasil y Venezuela, llegando a ocasionar pérdidas en las raíces del cultivo hasta en un 79% (Burbano et al., 2007); estas pérdidas se ven reflejadas por la alimentación tanto del adulto como de la ninfa ya que esta succiona la savia que circula por el floema (Bohórquez, 2011). Desde la llegada de *A. socialis* a Colombia, sus poblaciones han crecido hasta ya considerarse como endémica en lugares de Colombia como el Quindío y todo el Valle del Cauca (Carabalí et al., 2010).

Por consiguiente, el rendimiento limitado conlleva a que se generen problemas a nivel económico, ya que la raíz de la planta es rica en calorías, es una fuente primaria de almidón, y las hojas son fuente de proteínas, minerales y vitaminas (carotenos y vitamina C), (CIAT, 2002; Ceballos, 2006). De esta manera es importante tener un manejo adecuado de las diferentes plagas para establecer alternativas que mejoren su mecanismo de defensa y mantener los niveles de rendimiento. Una de las alternativas presentes, es el estudio de la genómica estructural y funcional dentro de ciertos factores, como el caso de la defensa de la planta.

### **3. HIPÓTESIS**

La expresión de los genes involucrados en la vía de señalización del ácido salicílico, se expresarán bajo el ataque de los dos artrópodos plaga ácaro verde y mosca blanca.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Analizar la expresión de los genes relacionados con la vía del ácido salicílico implicado en el mecanismo de resistencia en yuca (*Manihot esculenta*) contra los artrópodos plaga (*Mononychellus tanajoa* y *Aleurotrachelus socialis*).

### 4.2 Objetivos específicos

- Estandarizar y evaluar la expresión de los genes auxina F-box 2, BSMT1, anhídrido carbónico (CA1), inhibidor de cisteína proteinasa relacionados con la vía del ácido salicílico por medio de la técnica de PCR convencional.
- Evaluar el efecto de la oviposición de los artrópodos *Mononychellus tanajoa* y *Aleurotrachelus socialis* sobre la yuca (*Manihot esculenta*).
- Caracterización estructural del promotor de los genes F-box 2, BSMT1, anhídrido carbónico (CA1), inhibidor de cisteína proteinasa relacionados con el ácido salicílico en *Manihot esculenta*.

## 5. JUSTIFICACIÓN

La yuca pertenece a la familia Euphorbiaceae, es nativa de América del sur y es uno de los cultivos más importantes de alimento en la región tropical (FAO, 2000), esta planta crece en una amplia gama de condiciones tropicales como lo son: trópicos húmedos, cálidos de tierras bajas y de altitud media. Sus hojas y raíces son adecuadas para el consumo humano ya que estas son una fuente de hidratos de carbono y además sus raíces son fuente de proteínas y vitaminas, especialmente carotenos y vitamina C (CIAT, 2002; Ceballos, 2006). Esto la ubica en el cuarto lugar en la producción mundial y para la seguridad alimentaria, y la hace un componente básico en la dieta para más de 1000 millones de personas después del maíz, el trigo y la papa. Dentro de sus características principales se destaca su tolerancia a la sequía y suelos degradados, asimismo presenta una buena flexibilidad en la plantación y cosecha, dándole la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones de crecimiento. Varios países de África y Asia ocupan los primeros diez lugares en la producción de yuca; en cuanto a Colombia ésta ocupa el puesto 22 (FAOSTAT, 2011 FAOSTAT, 2015).

El ácaro verde (*M. tanajoa*) es originario de la región neotropical y fue introducido accidentalmente en África en 1971 (Yonow & Kriticos, 2014). Anualmente *M. tanajoa* causa una pérdida importante en el peso de la hoja de la yuca en un 50%, y una reducción en el rendimiento de la raíz en un 80% (Shukla, 1976; Gutierrez et al., 1988; Pallangyo et al., 2004). Dentro de la distribución de *M. tanajoa* se ha demostrado que posee una buena distribución tropical en la que necesita una estación seca de 2 a 6 meses con precipitaciones por debajo de 60 mm/mes. Además, surgen áreas potenciales como los rangos de valles interandinos de Colombia, lo que permite que se dé la inclusión del ácaro verde (CABI, 2015). En relación con *M. tanajoa*, el ácaro *Mononychellus mcgregori* parece estar mejor adaptado para sobrevivir en lugares que carecen de una estación seca pronunciada (Parsa et al., 2015).

La activación de genes en las plantas por el ataque de patógenos o por heridas mecánicas (Kessler & Baldwin, 2001; Fluhr, 2001; Fleisher, 2007) provoca la síntesis de sustancias de defensa y vías de señalización que actúan en la respuesta de defensa de la planta. La mayoría de estas vías son activadas por el flujo de calcio (Ca<sup>2+</sup>), este llega a ser esencial para la síntesis de fitoalexinas e inducción de genes PR y HR ya que gran parte de la señalización es medida por proteínas de unión a calcio (Soto et al., 2006).

El ácido salicílico es protagónico en la resistencia a los patógenos en las plantas, pues juega un papel esencial en la ruta de transducción de señales que conducen a una activación de genes que codifican proteínas PR (proteínas relacionadas con la patogénesis) (Bartsch et al., 2006), de igual manera activa genes para establecer una respuesta hipersensible (RH), mediando la explosión oxidativa que conduce a la muerte celular (Rangel et al., 2010). Otro factor importante en la interacción planta-patógeno es la síntesis de compuestos antimicrobianos que son por lo general flavonoides, compuestos

fenólicos fitoalexinas y defensinas, compuestos que son producidos para atacar directamente al patógeno (Soto et al., 2006).

Por lo tanto, el uso de herramientas innovadoras de la genómica van ayudar a generar un mejor conocimiento y entendimiento de la biología molecular en los procesos relacionados con la defensa de las plantas y a condiciones de estrés en general. Aplicar estas herramientas, va a ser de ayuda para entender la función y el nivel de expresión de los genes a analizar y teniendo como modelo de estudio a la yuca; la aplicación de la genómica dentro del análisis de la defensa de la planta, y su interacción con los artrópodos plaga podrá contribuir a la explicación y a buscar (Mencionar trabajos que hable de los genes en la defensa frente a factores bióticos etc.) un solución a la problemática que se está presentando, en este cultivo que es de enorme importancia alimentaria y económica en diferentes poblaciones de África y Suramérica (Kawano, 2003).

En este orden de ideas la expresión de los genes esta principalmente controlada por los factores de transcripción que regulan las secuencias. Lo que convierte la identificación de estos elementos (motivos) reguladores un reto para la biología molecular. Así pues, métodos experimentales pueden ser apoyados con enfoques bioinformáticos para identificar dichos factores de transcripción (TFs) (Hehl *et al.*, 2004, Steffens *et al.*, 2004). Gracias al proyecto de secuenciación del genoma de la yuca se puede dar la oportunidad de determinar los diferentes factores de transcripción en los sitios de bandeo de todo el genoma de la yuca. Además, la mayoría de secuencias regulatorias en los genes se encuentran aguas arriba del sitio de transcripción, lo que permite conocer más sobre los genes y su expresión (Steffens *et al.*, 2004, Prochnik *et al.*, 2012).

Asimismo, existe una característica compleja que involucra numerosos genes que interactúan unos con otros en una intrincada red regulatoria. La activación y desactivación de los genes que participan en las vías de señalización es lograda gracias a diversos mecanismos que incluyen desde los sitios de bandeo de los factores de transcripción a los motivos *cis* en las regiones promotoras de los genes afectados lo cual los convierte en genes reprimidos o activos (Lindlöf *et al.*, 2009). De esta manera cada gen contiene una combinación única de motivos *cis* que regulan la secuencia en el sentido 5' lo cual determina la expresión temporal y espacial del gen. Estos motivos son esenciales para las unidades transcripcionales regulatorias de cada gen, ya que controlan muchos procesos biológicos y respuestas a diferentes factores bióticos y abióticos (estrés, defensa) (Rani, 2007, Ibraheem, Botha and Bradley, 2010).

La regulación de transcripcional de los genes es importante para la función y desarrollo de todos los organismos, las células vivientes son el producto de la expresión intrincada de los genes que involucra la transcripción y un sinfín de genes que interactúan unos con otros. Los sitios de bandeo de los factores de transcripción en el DNA son uno de los componentes importantes para la red trabajo. La transcripción se lleva a cabo por la interacción entre los factores de transcripción y los motivos *cis* regulatorios en el gen con

algunos otros cofactores que activan y reprimen los genes (Lloyd et al., 2001, Ibraheem, Botha and Bradley, 2010).

Es por esto que un entendimiento completo de los factores de transcripción, del sistema de regulación de los genes, conllevará a un análisis exitoso de la función de los motivos *cis* y de los genes, ya que permitirá conocer como estos genes actúan frente a distintas condiciones de estrés, y así poder escoger cuales genes son los mejores para contrarrestar efectivamente por ejemplo; el estrés a la sequía, a las bajas temperaturas y el ataque de artrópodos plagas.

## 6. MARCO TEÓRICO

### 6.1 Los cultivos y su defensa contra las plagas

Las plantas y los patógenos han estado en una constante interacción molecular, las plantas a lo largo de la evolución han desarrollado un sistema de inmunidad el cual les permite interactuar con otros organismos, siendo así que cuando la planta los reconoce como extraño, esta desencadena una cascada de señalización que con lleva a una respuesta de defensa para evitar la multiplicación y propagación del organismo en cuestión (Chisholm *et al.*, 2006). Dentro de las plantas existen dos tipos de reconocimiento de patógenos, el primero se establece en la parte externa de tejido, célula afectada y la segunda se encuentra en el reconocimiento por receptores intracelulares (Dodds & Rathjen, 2010).

En general, la yuca cuenta con un sistema conservado de proteínas que actúa en la defensa contra las enfermedades, dentro de estos se reportan mecanismos contra la plaga de artrópodos tanto físicos como químicos, estas defensas (naturales) parecen afectar particularmente el establecimiento o la alimentación sostenida de la plaga sobre la planta por parte de los mecanismos de defensa físicos (Calatayud & Múnera, 2002; citado por Bohórquez, 2011). Para los mecanismos físicos de resistencia de la yuca, se ha encontrado que la pubescencia presente en sus hojas contribuye a la defensa de la planta contra el ataque en este caso de insectos (especies trips). En los mecanismos químicos, a consecuencia del daño mecánico, los tejidos de la yuca emiten ácido cianhídrico, proceso llamado cianogénesis, este permite la liberación de una toxina que constituye un sistema de protección para la yuca contra las plagas, sin embargo, esto no ha sido claramente demostrado (Bohórquez, 2011).

En *Arabidopsis thaliana*, las hojas muestran una resistencia contra patógenos, lo cual está relacionado con la presencia de compuestos aromáticos (camalexin) (Bednarek *et al.*, 2005, Poiatti, Dalmas & Astarita, 2009); tal caso es similar en las hojas de la fresa (genero *Fragaria*), que son capaces de sintetizar catequinas, involucradas en la inhibición de la penetración de las hifas de *Alaternaria alternata* (Poiatti, Dalmas, & Astarita, 2009). Esto demuestra que la resistencia natural de las plantas a los patógenos e insectos, se basa en efectos combinados de barreras preformadas (genes) y mecanismos inducibles (vías de señalización), de manera que para ambos casos las plantas llegan a utilizar defensas contra el organismo invasor (Rangel, 2010).

### 6.2 Ácido salicílico

En 1979, White reportó por primera vez la participación del ácido salicílico en la resistencia de enfermedades, esto en un experimento realizado en hojas de tabaco a las que inyectó con ácido salicílico. En este pudo observar la producción de proteínas PR y en conjunto también observó un aumento en la resistencia contra la infección por el virus del mosaico. Actualmente, se han reportado que en varias plantas el ácido salicílico o

compuestos afines a este induce la expresión de genes PR, resistencia contra virus, bacterias u hongos. (Vlot, 2009).

Siendo así se puede encontrar que el ácido salicílico juega un papel importante no solo en la ruta de transducción de señales de activación de proteínas PR, en la respuesta hipersensible, sino también en la resistencia sistémica adquirida (RSA) la cual esta mediado por el ácido salicílico. En esta, la planta crea una respuesta de defensa a nivel sistémico que conlleva a la sobrevivencia inicial a un patógeno (Rangel, 2010), distribuyendo así la resistencia a todos los órganos de la planta (Soto et al., 2006).

Uno de los resultados que sostienen una fuerte participación del ácido salicílico como una señal de defensa para plantas, se ha encontrado en estudios en los que los niveles de ácido salicílico fueron alterados. El primer estudio tuvo como planta modelo a *Arabidopsis thaliana* o líneas transgénicas de tabaco, estas plantas expresaban el gen nahG, el cual codifica una enzima que se encarga de metabolizar el ácido salicílico para convertirlo en catecol, los resultados obtenidos demostraron que las plantas no lograron desarrollar una defensa sistémica debido a que no pudieron acumular suficiente ácido salicílico, esto hizo que las plantas expresaran una mayor susceptibilidad a patógenos virulentos como también avirulentos (Gaffey et al, 1993; Delaney, 1994). En el segundo estudio se evaluó la resistencia y expresión de genes PR, los cuales se reactivaron con la adición de un compuesto análogo del ácido salicílico (Vernooij et al, 1995; Shah, 2003).

El ácido salicílico juega un papel importante como señal de defensa para las plantas dicotiledóneas, pero las plantas monocotiledóneas han sido poco estudiadas, a excepción de cultivos de importancia económica como los son el maíz, el arroz y trigo (Hwang et al., 2008). Un estudio con la cebada demostró que la inducción de la expresión de genes PR mediado por los análogos al ácido salicílico, ha generado una producción de dichos genes que dio como resultado en la resistencia de la planta contra el ataque de patógenos bacterianos como *P. syringae* (Anand et al., 2003). De esta manera se ha demostrado que el ácido salicílico es un componente esencial en la señalización contra patógenos y que muchos de sus componentes están involucrados en rutas que son análogas a los que se encuentran en plantas dicotiledóneas (Vlot et al. 2009).

Además la ruta del ácido salicílico no es la única que actúa en la defensa de las plantas, esta se relaciona con otras vías de señalización de hormonas. Estas fitohormonas generan diversas respuestas contra diversos patógenos o contra el estrés abiótico, dentro de estas se encuentra el ácido jasmónico y el etileno. Como se expresó anteriormente el ácido salicílico participa en la defensa de las plantas contra ataques de patógenos biotróficos es decir los que invaden la planta y se alimentan de células metabólicamente activas) y hemibiotrófico los que se alimentan de sus tejidos (Rangel 2010,). Contrario a esto el ácido jasmónico y el etileno se establecen en la defensa de la planta contra ataques necrotróficos es decir que se alimentan de células muertas lo que conlleva a la muerte de las mismas desde el primer día de infección (Rangel, 2010).

## 6.3 Artrópodos plaga

### 6.3.1 *Aleurotrachelus socialis*

*A. socialis* pertenece a la familia Aleyrodidae, de la cual se han encontrado más de 1500 especies herbívoras alrededor del mundo donde solo unas pocas se consideran insectos plagas (Karlsson, 2005; Evans, 2008). *A. socialis* pertenece la región Neotropical, donde se ha descubierto en Suramérica (Bellotti et al 2005), en los que se encuentran países como Ecuador, Venezuela, Brasil y Colombia, y se han reportado también en países de Centro América como El Salvador, Panamá, Nicaragua, Guatemala y Honduras; en estos países mencionados anteriormente, la mosca blanca (*A. socialis*) es considerada una plaga importante en el cultivo de la yuca principalmente Colombia y Venezuela donde se le ve mejor representada, y en adición a los registros en el continente Americano, la mosca blanca también se encuentra distribuida en países de Asia, Tailandia y Lao (Bellotti et al 2005., Vásquez-Ordóñez et al. 2015).

La mosca blanca, *A. socialis* al igual que *Bemisia tabaci*, tiene un desarrollo hemimetabolo, esto quiere decir que posee una metamorfosis incompleta, en donde pasa por cuatro estadios para llegar de huevo a adulto (Karlsson, 2005). Estos cuatro estadios se denominan estadios ninfales en donde el último estadio es llamado pupario por su apariencia a una pupa, aunque dentro de su desarrollo no pase por un estadio de pupa (Arias, 1995). Su ciclo puede durar entre 30 a 45 días, esto dependiendo de las condiciones ambientales, y la variedad del hospedero en este caso la yuca. Las condiciones en la que puede llegar a un buen desarrollo a una temperatura de 18 a 34 ±1°C, una humedad relativa de 70% (Arias, 1995., Bellotti & Vargas, 1986).

### 6.3.2 *Mononychellus tanajoa*

El ácaro verde hace parte de la familia Tetranychidae, la cual contiene aproximadamente 1200 especies. La especie *Mononychellus*, conforma un complejo de especies de las cuales 8 especies *Mononychellus tanajoa* Bondar, *M. progresivus*, Doreste, *M. manihoti* Doreste, *M. bondari* Paschoal, *M. caribbeanae* McGregor, *M. mcgregori* Fletchman y Baker y *M. estradai* Baker & Pritchard, fueron reportadas en Suramérica, y que en comparación con las diferentes especies encontradas en África, poseen características genómicas similares con las poblaciones Colombianas, y en comparación con las poblaciones de Brasil, estas llegan a tener una diferencia genómica (Gutiérrez 1987; Navajas et al. 1994, Mutisya et al. 2016). La especie *M. tanajoa* fue reportada por primera vez en los años 1970 en donde posteriormente se extendió por toda África y donde posteriormente llegó a Suramérica (Yaninek and Herren, 1988., Yonow & Kriticos, 2014).

El ácaro verde posee un tipo de reproducción denominada arrhenotokous, que es un tipo de partenogénesis en donde los huevos no fertilizados se desarrollan como machos (Gutiérrez 1987., Yonow & Kriticos, 2014). Dentro de su ciclo de vida se puede apreciar cuatro estados activos, que comprenden un estadio larval, dos estadios ninfales, y un estadio adulto, esto se lleva a cabo con periodos de quiescencia antes de cambio de

estadio. Tanto la reproducción como la fecundidad y tiempo de desarrollo, son afectados por condiciones ambientales como la temperatura, la humedad y la planta hospedera (Yaninek *et al.* 1989). Los ácaros pertenecientes a la familia Tetranychidae son conocidos por rápido desarrollo y reproducción en temporadas secas, y debido a esto diferentes autores han señalado que los ácaros incrementan su densidad poblacional en este tipo de temporada y que al contrario en temporadas de lluvias, su densidad decae, esto debido a los efectos físicos de la lluvia que tiene sobre el ácaro, es decir la lluvias fuertes y las condiciones del viento (Yaninek *et al.* 1989, Costa *et al.* 2012, Rêgo *et al.* 2013). La dispersión del ácaro verde se puede lograr, por el efecto del viento o caminando, el ser humano también juega un papel dentro de la dispersión, al igual que material vegetal contaminado con el ácaro. *M. tanajoa* puede durar en estacas de yuca sin hojas hasta aproximadamente 60 días, con lo que de esta manera es fácil observar como es la rápida dispersión de este ácaro (Yonow & Kriticos, 2014).

#### **6.4 Oviposición**

Las plantas dentro de su sistema de defensa contra las plagas, presentan mecanismos físicos de resistencia, dentro de estos se encuentran la pubescencia y los tricomas. También existen mecanismos de defensa frente las secreciones de los insectos, que son la liberación de compuestos volátiles como el etileno, el cual actúa frente a las secreciones generadas durante su alimentación, que en comparación con la defensa que se dispara por el daño mecánico, genera una respuesta más intensa (Schmelz *et al.* 2006., Bohórquez, 2011). No solo se dispara una defensa cuando el insecto se alimenta, sino también cuando estos ovipositan en la planta, estas al detectar los fluidos generados por la oviposición se anticipan a una herbívora o atraen predadores para que se alimenten de los huevos (Hilker *et al.* 2006). La planta no solo activa su defensa para atraer agentes externos para eliminar la plaga sino que ésta tiene la capacidad de disparar la expresión de genes de defensa como lo son el ácido jasmónico y el ácido salicílico (Bohórquez, 2011., Marín, 2015).

Por consiguiente, encontrar una baja preferencia en la oviposición y la alimentación de las plagas, es una característica importante para poder definir a una planta como resistente a cierta plaga (Strucker, *et al.* 2017). En el caso de la yuca, se pueden encontrar cultivos con genotipos resistentes, los cuales en la mayoría de los casos son líneas mejoradas que se esperan que tengan resistencia frente a la plaga (Bohórquez, 2011). Tanto para el ácaro verde como para la mosca blanca, se espera que ocurra la baja preferencia de oviposición y alimentación (antixenosis) para poder definir al cultivo de yuca como resistente, sin embargo, también se tienen en cuenta otros aspectos como la resistencia varietal a la pubescencia y la densidad de tricomas (Bellotti & Arias 2001., Bohórquez, 2011., Strucker, *et al.* 2017).

Es por esto que una buena elección de genotipos de yuca que presenten una resistencia frente al ácaro verde y la mosca blanca es importante, debido a que este tipo de plantas van tener un mecanismo de defensa que va a frenar el desarrollo de la plaga, siendo así una característica fundamental para el manejo integrado de plagas, debido a que este tipo

de plantas promueven un menor uso de plaguicidas, de manera que va a mejorar la productividad de la planta y a su vez reducirá los costos de producción (CHOPERENA *et al.* 2012., Strucker, *et al.* 2017).

## 6.5 Regiones promotoras de los genes

La mayoría de las regiones regulatorias de los genes en las plantas, están localizadas principalmente en la 1000 pares de base (pb) aguas arriba de codón de inicio y estas generalmente estas son llamadas como la región promotora del gen o la región 5' de regulación. La región promotora del gen consiste en secuencias específicas de DNA y responden a elementos que actúan en el reclutamiento de factores de proteína que facilitan la transcripción de la región codificadora de proteínas del gen (Hernandez and Finer, 2013). Estas secuencias regulatorias se localizan en la misma cadena de la región codificadora del gen y son llamadas motivos *cis* regulatorios o sitios de bandeo de los factores de transcripción (TFBs). Estos motivos determinan la expresión espacial y temporal de los genes, y se componen de pequeñas secuencias de DNA de aproximadamente 5 a 25 pares de bases (Rani, 2007, Ibraheem, Botha and Bradley, 2010). Las regiones promotoras se presentan arbitrariamente como un promotor próximo a las -100pb aguas arriba de la TATA box y como promotor distante de hasta 2k pb (Molina and Grotewold, 2005). La secuencia proximal contiene elementos reguladores más importantes mientras que la distante puede contener otros elementos reguladores, teniendo un control más débil sobre la regulación transcripción del gen (Burley and Roeder, 1996, Lee and Young, 2000, Ibraheem, Botha and Bradley, 2010).

La expresión de un solo gen está a menudo contralada por múltiples elementos regulatorios que pueden estar dentro de cientos de kilobases aguas arriba o abajo. En adición los elementos regulatorios que controlan un gen pueden estar dentro de los intrones de otro gen no relacionado. Estudios detallados de loci individuales han revelado algunos mecanismos de cómo estos motivos *cis* regulan la expresión de los genes (Hughes *et al.*, 2014). La interacción física entre las proteínas regulatorias y la maquinaria transcripcional básica es sencilla durante el inicio de la transcripción debido a la ubicación de los elementos proximales al promotor, los elementos distales al promotor que se encuentran lejos de codón de inicio, pueden de alguna forma generar un impacto sobre la expresión de los genes (Kowalczyk, 2012, Hernandez and Finer, 2013).

## 7. METODOLOGÍA Y ÁREA DE ESTUDIO

### 7.1 Material biológico

Se utilizaron dos genotipos de yuca identificados como CMC 40 y Ecu-72 los cuales presentan respuestas contrastantes frente al ataque ácaro verde y mosca blanca, susceptible y resistente; respectivamente. Se propagaron en cultivo *in vitro* alrededor 30 plantulas en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de los Llanos. También se utilizaron 30 estacas de cada genotipo que fueron sembradas en bolsas con tierra abonada y posteriormente trasplantadas en campo. Las plantas del cultivo *in vitro* al igual que las estacas fueron sembradas en bolsas con tierra abonada, y solo las estacas fueron utilizadas en la infestación con el ácaro verde y mosca blanca donde se evaluó su resistencia y susceptibilidad. Las condiciones de invernadero que se mantuvieron durante su crecimiento fueron: una temperatura promedio  $28 \pm 4$  °C con una humedad relativa media de  $70\% \pm 5$  % HR.

### 7.2 Colecta de artrópodos plaga

La colecta de los artrópodos plaga se realizó en cultivos de yuca ubicados en los municipios de Acacias, San Martín de los Llanos, Castillo, El Dorado y Cubarral La colecta se llevó a cabo en tres días por cada municipio y se visitaron diferentes fincas y veredas para así obtener un buen número de colecta (Tabla 1). Para la colecta de individuos de ácaro verde se realizó un corte en las hojas que tuvieran la presencia del ácaro y posteriormente se llevaron para infestar plantas de yuca preparadas para la cría del ácaro. En cuanto a la mosca blanca se realizó utilizando aspiradoras manuales y luego fueron depositadas en un frasco que contenía una hoja de yuca para así asegurar la vida de la mosca. La crianza de los artrópodos se llevó a cabo en el laboratorio de Biología molecular de la Universidad de los Llanos y el laboratorio de Biología, la crianza se hizo sobre plantas de material susceptible de yuca CMC-40 y bajo condiciones controladas  $25 \pm 5$ °C,  $70 \pm 5$ % HR y 12 h de fotoperiodo.

**Tabla 1.** Sitios de colecta de artrópodos plaga en los municipios de Acacias, San Martín de los Llanos, Cubarral, Castillo y El Dorado.

Pais	Departamento	Municipio	Localidad	Latitud decimal	Longitud decimal	Elevación (m)
Colombia	Meta	Acacias	Vereda Sardinata	04°00'55,3"	73°43'53,5"	515
Colombia	Meta	Acacias	Vereda El Rosario, Finca El Recuerdo	04°01'15,2"	73°42'33,0"	502
Colombia	Meta	Acacias	Vereda Margarita, Finca El Triunfo	04°01'14,6"	73°42'31,2"	510
Colombia	Meta	San Martín de los Llanos	San Cayetano	03°45'30,6"	73°43'29,6"	467

Colombi a	Meta	San Martín de los Llanos	Vereda Llano Grande	03°41'58,8"	73°40'36,6"	410
Colombi a	Meta	San Luis de Cubarral	Vereda Puerto Ariari	03°47'22,2"	73°50'37,9"	591
Colombi a	Meta	El Dorado	Centro poblado San Isidro del Ariari	03°44'51,2"	73°49'52,4"	524
Colombi a	Meta	El Dorado	Centro poblado Pueblo Sánchez	03°40'59,1"	73°47'48,6"	435
Colombi a	Meta	El Castillo	Corregimiento Medellín del Ariari, Vereda Caño Tigre	03°37'57,4"	73°48'16,4"	401
Colombi a	Meta	El Castillo	Corregimiento Medellín del Ariari, Vereda Caño Tigre	03°37'24,7"	73°48'08,6"	395
Colombi a	Meta	San Luis de Cubarral	Vereda Marayal, Finca La Reserva	03°47'29,2"	73°47'06,5"	507
Colombi a	Meta	San Luis de Cubarral	Vereda Puerto Ariari	03°47'22,2"	73°50'37,9"	591
Colombi a	Meta	El Castillo	Vereda Playa Rica	03°36'14"	73°47'49,4"	382
Colombi a	Meta	El Castillo	Vereda Caño Brasil, a 1.3 Km de la Vereda La Floresta	03°34'57,3"	73°37'47,4"	369
Colombi a	Meta	El Castillo	Corregimiento Medellín del Ariari, Vereda Caño Tigre	03°37'24,7"	73°48'08,6"	395
Colombi a	Meta	El Castillo	Vereda Caño Brasil, a 1.3 Km de la Vereda La Floresta	03°34'57,3"	73°37'47,4"	369
Colombi a	Meta	El Dorado	Vereda Santa Rosa Baja, Escuela	03°45'42,1"	73°50'44,5"	546
Colombi a	Meta	El Dorado	Centro poblado San Isidro del Ariari	03°44'51,2"	73°49'52,4"	524
Colombi a	Meta	El Dorado	Centro poblado San Isidro del	03°42'54,0"	73°48'31,7"	472

			Ariari			
Colombiana	Meta	El Dorado	Centro poblado San Isidro del Ariari	03°42'16,03"	73°48'14,68'	461

### 7.3 Ensayos a libre y no libre escogencia

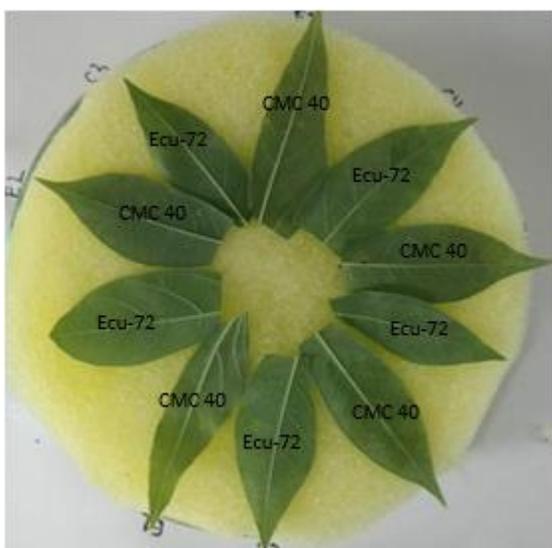
Estos experimentos se realizaron con el fin de analizar los parámetros de preferencia y oviposición del ácaro verde y mosca blanca (Mesa et al. 1987; Marín, 2015). Y fueron desarrollados en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de los Llanos.

#### 7.3.1 Bioensayo ácaro verde (*M. tanajoa*)

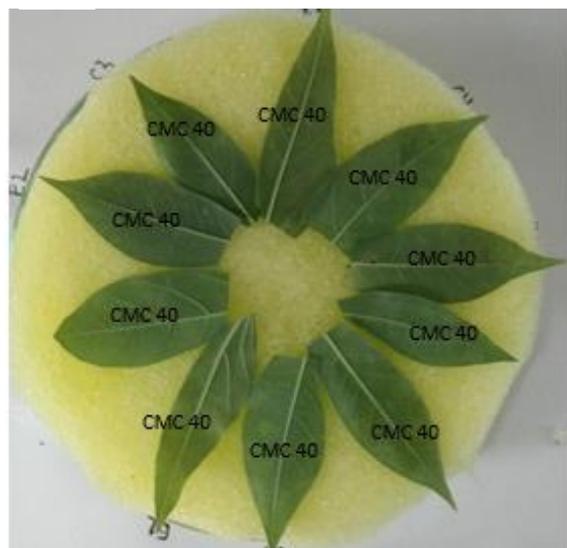
Los ensayos se realizaron en cajas Petri (150mm x 15mm) con una espuma humedecida con agua que ayudo a prolongar la vida del lóbulo utilizado.

El ensayo a **libre escogencia** se llevó a cabo en cajas Petri en las que se distribuyeron cinco lóbulos de CMC 40 y cinco lóbulos de Ecu-72 de forma intercalada para un total de diez lóbulos (figura 1a). En el centro de la caja Petri se colocaron ácaros verdes para hacer la posterior evaluación de la libre escogencia de los mismos, en este ensayo se utilizaron seis cajas Petri para obtener así un total de 30 repeticiones por genotipo. En cuanto al ensayo a **no libre escogencia** se distribuyeron diez lóbulos de un solo genotipo en la caja Petri (figura 1b, c), por un lado CMC 40 y por aparte Ecu-72, al igual que en el ensayo a libre escogencia los ácaros se ubicaran en el centro de la caja Petri, este ensayo se constituyó de 6 cajas Petri para tener así un total de 30 repeticiones por genotipo. Ambos ensayos se llevaron a cabo durante un periodo de cinco días en los que realizaron dos observaciones (conteos de huevos) por día.

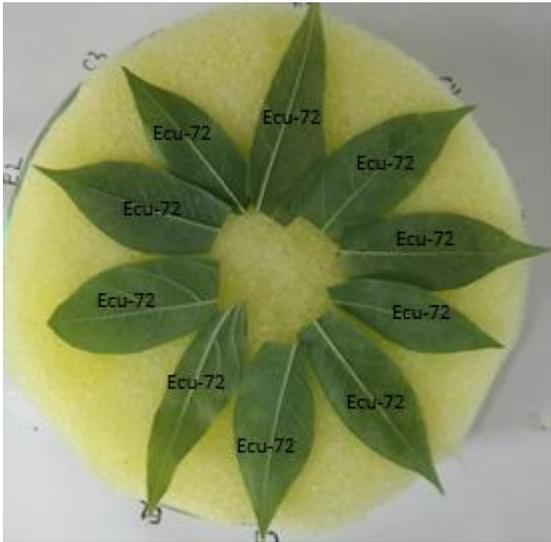
A,



B,



C,



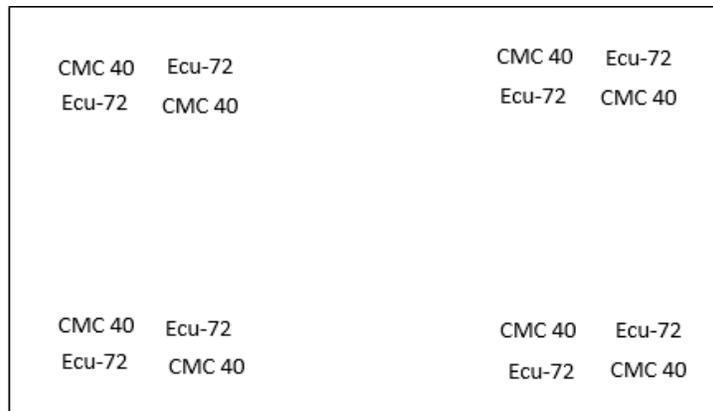
**Figura 1.** Diseño del experimento, bioensayo ácaro verde. A, ensayo a libre escogencia, B y C, ensayo a no libre escogencia

### 7.3.2 Bioensayo mosca blanca (A. socialis)

Los ensayos se realizaron en jaulas recubiertas con una malla para evitar que las moscas escaparan.

El ensayo a **libre escogencia** se desarrolló en una jaula de 2m de largo por 2m de ancho y 1m de alto, dentro de esta jaula se distribuyeron cuatro grupos cada uno de cuatro plantas, y en cada grupo se organizaron dos plantas de cada genotipo (CMC 40 y Ecu-72) de manera intercalada (figura 2 a y b). La jaula se infesto con moscas adultas durante cuatro días y posteriormente realizó el conteo de huevos. En este ensayo se contaron en la total cuatro plantas de cada genotipo y la cantidad de hojas que se contaron constituyeron en las réplicas del experimento. El ensayo a **no libre escogencia** se llevó a cabo en jaulas de 1m<sup>2</sup> en las que distribuyeron dos plantas del mismo genotipo (figura 2 c y d). Al igual que el ensayo a libre escogencia se contaron todas las hojas de las plantas, y la cantidad de hojas contadas constituyeron en las réplicas del experimento.

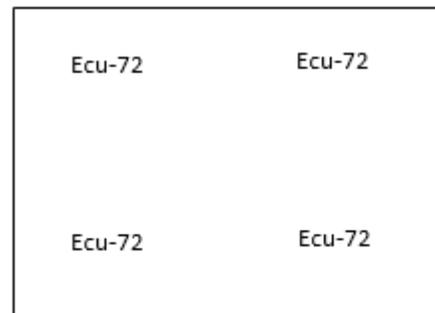
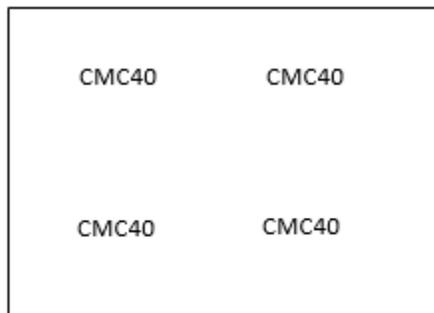
A,



B,



C.



D.



Figura 2. Diseño del experimento, bioensayo mosca blanca. A y B ensayo a libre escogencia, C y D ensayo a no libre escogencia.

#### 7.4 Análisis molecular de la interacción planta-artrópodo

La respuesta de la yuca frente al ataque del ácaro verde, se inició en un tiempo cero (estará libre de las plagas), 6h horas (primer contacto con la plaga), 24h (contacto directo) (temprana), 4 días (inicio de la colonia y 8 días (colonia establecida) (tardía) (Marín,

2015). Para la mosca blanca se inició en un tiempo de 24h, seguido las 48h, luego a los cinco días y por ultimo a los ocho días.

### **7.5 Extracción de ADN y ARN**

La extracción de DNA y RNA se realizó con 100mg de material vegetal utilizando el kit Invisorb® Spin Plant Mini Kit y el kit InviTrap Spin Plant RNA Mini Kit, respectivamente, siguiendo la recomendaciones del fabricante, se utilizaron en total 18 muestras de ARN para los análisis.

### **7.6 Cuantificación y gel de calidad**

La cuantificación de las muestras de DNA y RNA extraídas se realizó utilizando el espectrofotómetro Cytation 3, Cell Imaging Multi-Mode Reader de BioTek. Este lector cuenta con una placa de 16 pozos el cual permitió realizar una lectura duplicada de la muestra para así tener un valor exacto de la cuantificación. El gel de calidad de agarosa se realizó al 1,2%, este gel se corrió en una cámara de electroforesis con una configuración de 100 voltios por 40 minutos y se visualizó en el transiluminador E-Gel Imager.

### **7.7 Síntesis de cDNA**

Antes de realizar la síntesis de cDNA se hizo un paso, el cual consistió en una digestión de DNA de las muestras de RNA. Este se hizo con el kit de DNase I, partiendo de 500ng/ul de concentración de RNA, luego se agregó 1ul de Buffer 10x y 1ul de rDNase y se completó con agua ultra pura a 10ul, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, se adiciono 2ul de EDTA 25mM y por último se calentó a 65°C por diez minutos.

La síntesis se llevó a cabo utilizando el kit ProtoScript® First Strand Cdna Synthesis, en donde se agregó 3ul de oligo d(T)23VN (50 µM) a los 10ul obtenidos de la digestión de DNA, y se denaturó a 70°C por 5 minutos y se colocó inmediatamente en hielo, luego se adiciono 10ul del M-Mulv Reaction mix y y 2ul de M-Mulv Enzyme Mix, se incubo a 42°C por una hora, se inactivo la enzima a 80°C por 5 minutos y por último se diluyo la muestra a 50ul agregando 25ul de agua libre de nucleasas.

### **7.8 Búsqueda de Genes de referencia y genes relacionados con la vía del ácido salicílico**

Se identificaron nuevos candidatos de genes de referencia utilizando la herramienta RefGenes del software Genevestigator. Esta herramienta permite buscar que genes exhiben una expresión de varianza mínima en un conjunto de arreglos. Como primer paso para buscar genes relacionados con la vía del ácido salicílico se realizó una búsqueda con la herramienta Perturbations, con la cual se pueden comparar varios experimentos que estén relacionados con el sistema de estudio que se trabaje, en este caso artrópodos

plaga contra *M. esculenta*. Y a partir de los resultados obtenidos en este análisis se eligieron genes que estuviesen relacionados con la vía para así escoger los genes de referencia.

## 7.9 PCR y diseño de primers

El diseño de primers se llevó a cabo con la herramienta Primer 3, para el desarrollo de los primers primero se realizó un BLAST de la secuencia en yuca para así poder encontrar los genes dentro del genoma de la yuca ya que en primera instancia estos se encontraban en *A. thaliana*, ya con las secuencias obtenidas del alineamiento en BLAST se procedió a desarrollar los primers (tabla 2).

**Tabla 2.** Lista de primers empleados, que amplifican un fragmento del BSMT1 cysteine proteinase inhibitor y F-box.

		Foward	Reverse
<b>cysteine proteinase inhibitor</b>	<i>M. esculenta</i>	TGGGAACCGAAGCATACGAC	GGCATCTCCTGGCTGAAAGT
<b>BSMT1</b>	<i>A. thaliana</i>	CATGCCGTTTTATGATCCGAACG	CATTGCGTCTGCTTCAAAGTC
<b>auxin signaling F-box 2</b>	<i>A. thaliana</i>	GGAATCTTGCTGGTGAAGTTAGAGATG AA	ACAGAATGGCTTTCACAGAAGAAT CA

La técnica de la PCR se llevó a cabo utilizando el protocolo de la GoTaq® Green Master Mix. El cual consistía para un volumen de 10ul agregar 5ul de 2x GoTaq Master Mix, 0,25ul del primer foward y reverse a una concentración de 10uM, 4ul de agua y 0,5ul de DNA. La técnica se hizo un termociclador eppendorf Mastercycler pro® con el siguiente programa. Una denaturación a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de, 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los primers utilizados durante la PCR fueron el G3PDH (F: CACTGTCCACTCCATTACCG; R: CAGCTCTTCCACCTCTCCAG) y 18s (F: ATGATAACTCGACGGATCGC; R: CTTGGATGTGGTAGCCGTTT)

## 7.10 Caracterización estructural de los promotores

### Búsqueda y alineamiento de secuencias

La búsqueda de las secuencias de los diferentes genes en el genoma de la yuca, se realizó con el análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sobre la base de datos de Phytozome ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)). El alineamiento de las secuencias se realizó con en

el programa MEGA7 utilizando la herramienta de alineamiento Clustal W, y para el árbol filogenético se utilizó el método de Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000.

### **Búsqueda de promotores y análisis *in silico***

La búsqueda de los promotores se llevó a cabo utilizando la herramienta JBrowser la cual se encuentra dentro de Phytozome, se extrajeron las 1000 pares de bases aguas arriba del codón de inicio de cada gen. El análisis *in silico* se realizó utilizando el programa PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantCARE>, Lescot et al. 2002), herramienta que nos permite encontrar los motivos *cis* putativos.

### **7.11 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de la oviposición se realizó un gráfico de cajas y bigotes para observar la distribución de los datos. Al encontrar que los datos no presentaban una distribución homogénea se realizó la prueba de rangos de Wilcoxon utilizando el programa R, la cual nos permite comparar el rango medio de dos muestras relacionadas y determinar si las diferencias entre ellas se deben al azar o no, Para esta prueba se manejó dos hipótesis:

H0: La variable ovoposición tiene la misma distribución en los dos genotipos (las medianas son iguales).

H1: En una población, la ovoposición tiende a dar valores mayores que en la otra (Las medianas son diferentes).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Oviposición *Mononychellus tanajoa*

#### 8.1.1 No libre escogencia

En la figura 3, se puede observar que el genotipo CMC 40 presenta los máximos valores (25) en cada día en cuanto al número de huevos depositados por *M. tanajoa*, y se observa claramente la ausencia de la homocedasticidad. De esta manera se hizo un contraste para la comparación de los grupos pero no fue posible debido a la falta de homogeneidad de los datos, por consiguiente se realizó la prueba de rangos de Wilcoxon que arrojo un valor de p menor a  $2,2e^{-16}$ , de manera que a un nivel de significancia de 5%, rechazamos la hipótesis nula, por lo tanto podemos decir que la oviposición es diferente entre los genotipos CMC 40 y Ecu-72.

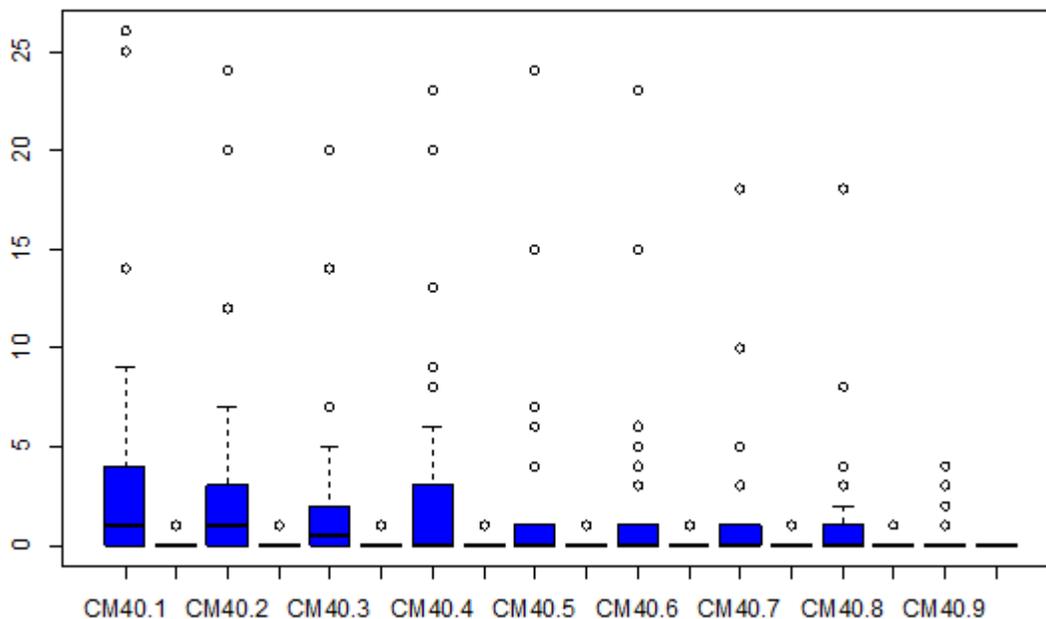


Figura 3. Modelo de cajas y bigotes, número de huevos según genotipo y día, a no libre escogencia.

Por otro lado la curva de oviposición (figura 4) presenta patrones bastante diferenciados en los genotipos, siendo así en el caso del genotipo Ecu-72 la oviposición día a día es casi nula y para el genotipo CMC 40 el primer día es el de máxima (3,7) oviposición pero desde allí empieza a descender. Dentro de los datos se observa que en todo momento el genotipo CMC 40 presenta los valores más de oviposición. Para apoyar estos resultados se plantearon varios modelos mixtos (teniendo en cuenta la correlación de los datos) con variable respuesta la oviposición (variable tipo conteo, por ello se usó el modelo Poisson) y de variables explicativas, el genotipo y el día.

Los resultados de estos análisis arrojaron el mejor modelo encontrado en función polinómica del tiempo en potencia con un coeficiente de  $-0,01940$ . En cuanto al genotipo, teniendo en cuenta como referencia al genotipo CMC 40, se puede observar que el genotipo Ecu-72 con un coeficiente de  $-3,85341$  presenta la menor oviposición a través del tiempo, aproximadamente de 4 huevos menos en promedio. Marín (2015), encontró que a no libre escogencia tuvo un rango de 2,2-12,5 huevos, y donde la fertilidad fue de 3 a 4 veces más alta sobre las accesiones 60444 (12,5 huevos) y CMC 40 (7,48 huevos), a comparación de otros materiales como ALT12, ECU72 y ECU160. En otro estudio que realizó Strucker *et al.* (2017) encontró que en la media general la AC-100 mostro una baja ocurrencia de huevos, así también como los cultivares G-83 y G-92, siendo clasificadas como menos preferidas para la oviposición de *M. tanajoa*. En comparación con los resultados obtenidos en este trabajo en donde el genotipo CMC 40 presenta los valores más altos de huevos (20) y el genotipo ECU72 los menores (5), podemos considerar que se sigue la misma tendencia en donde unos genotipos van a tener una mejor preferencia para la oviposición y así mismo para la alimentación (Strucker *et al.*, 2017). Esto es un paso importante ya que nos permite clasificar cuales genotipos de yuca son resistentes a una plaga. Como en el trabajo realizado por Burbano M. *et al.* (2007) donde encontró que especies silvestre de yuca (*Manihot fibellifolia* y *Manihot peruviana*) al comprarlas con genotipos comerciales de *M. esculenta* encontró que las silvestres presentaron una mayor resistencia a la plaga.

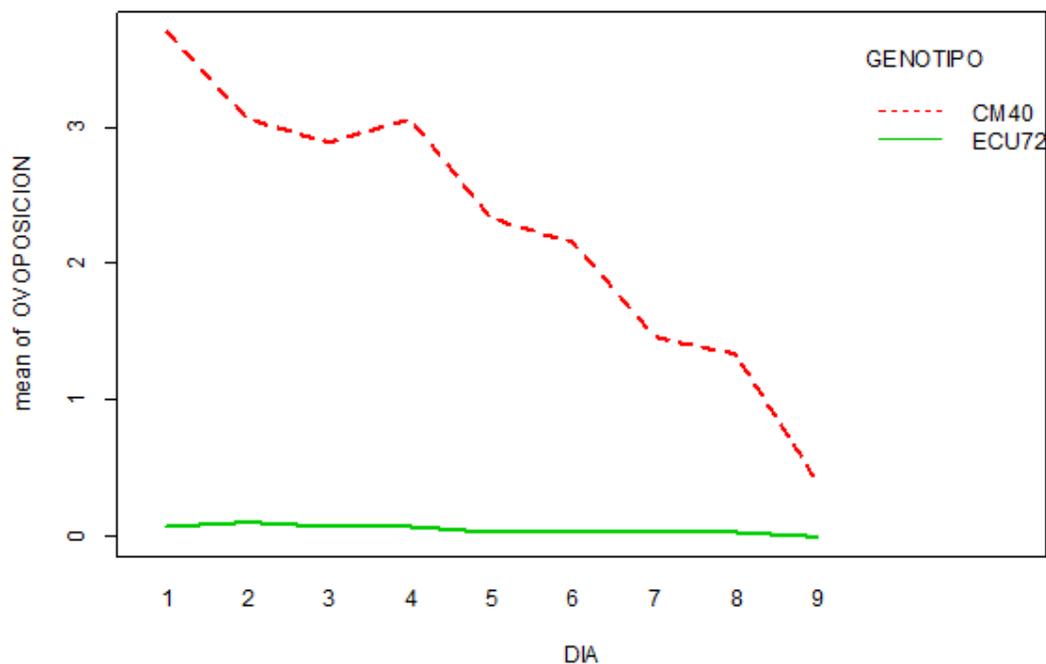


Figura 4. Curva de oviposición de los genotipos CMC 40 y Ecu-72, a no libre escogencia.

### 8.1.2 Libre escogencia

En la figura 5 se observa que el genotipo CMC 40 presenta los máximos valores en cada

día, y al igual que el ensayo a no libre escogencia al no presentar homogeneidad de los datos se aplicó la prueba de rangos de Wilcoxon manejando las mismas hipótesis. Dando así un valor de p menor a  $2,2e^{-16}$  y a un nivel de significancia de 5%, se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto podemos decir que la oviposición es diferente en los genotipos evaluados.

Al realizar la curva de oviposición (figura 6), esta presenta patrones bastantes diferencias en los genotipos. Aunque estos presentan una culminación de la oviposición hacia el segundo día, siendo CMC 40 el genotipo con un promedio superior de huevos puestos en el periodo de observación. De manera que para apoyar estos datos se realizó los mismos análisis de modelos mixtos que se realizaron en el modelo a no libre escogencia. El resultado obtenido de estos análisis mostro que en cuanto al genotipo, usando CMC 40 como referencia, el genotipo Ecu-72 presenta la menor oviposición (coeficiente de -0,9405) a través del tiempo de aproximadamente de 1 huevo por día. Para los experimentos a libre escogencia realizados por Marín (2015) encontró que el genotipo CMC 40 fue el más susceptible al ataque del *M. tanajoa* con un rango de 1,5-27,1 huevos/hembra/ 8 días, también obtuvo que el genotipo 60444 (27,1 huevos) y PER335 (17,5) fueron los que presentaron una alta oviposición y los menos preferidos fueron NAT31 (1,5 huevos). Comparando los resultados encontramos la misma tendencia sobre el genotipo CMC 40 (7 huevos) siendo el más susceptible a la oviposición y Ecu-72 el menos susceptible (4 huevos) al final del experimento. Al igual que las accesiones G-83 y G-92 las cuales tuvieron una baja preferencia de *M. tanajoa* en todas las evaluaciones (Strucker *et al.*, 2017). El encontrar y clasificar genotipos de yuca con alguna resistencia a *M. tanajoa* es importante porque estas plantas resistentes interfieren en el desarrollo y comportamiento de la plaga, siendo una herramienta fundamental para desarrollar un manejo integrado de plagas, para así promover un menor uso de productos químicos, para ver en el futuro una reducción de costos de producción y una mayor producción (CHOPERENA *et al.* 2012, Strucker *et al.* 2017).

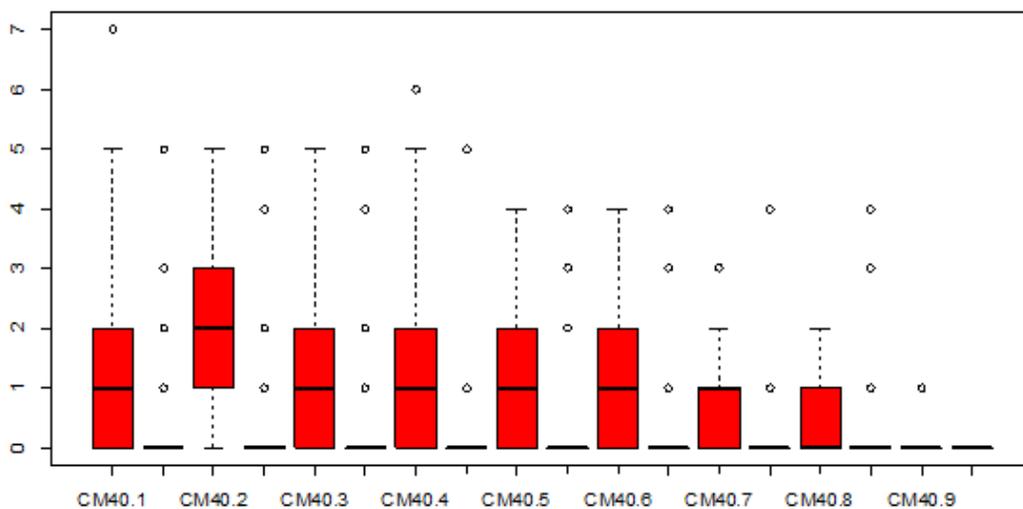


Figura 5. Modelo de cajas y bigotes, número de huevos según el genotipo y día a libre escogencia

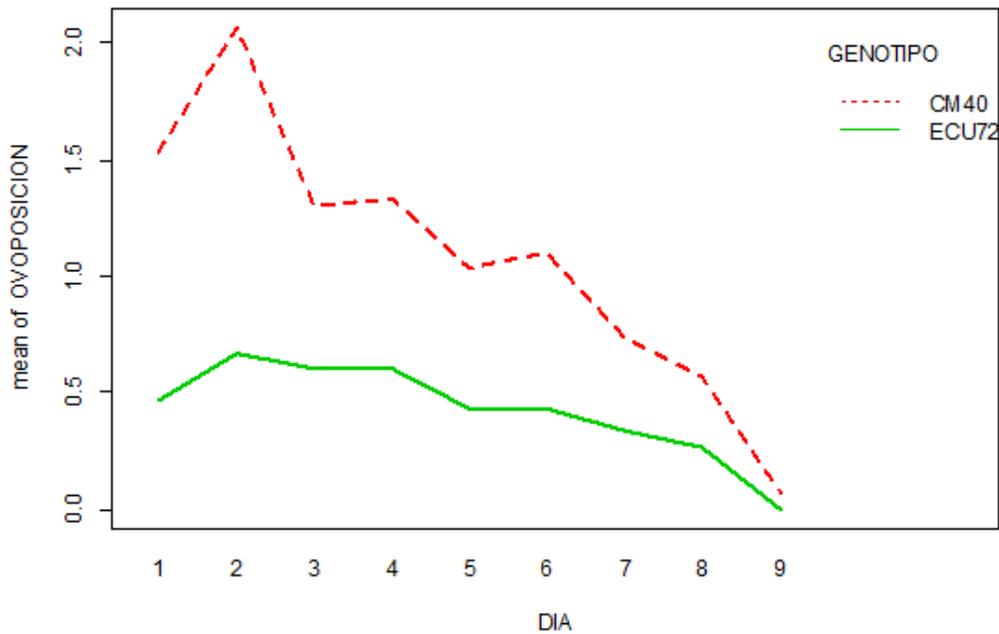


Figura 6. Curva de oviposición de los genotipos CMC 40 y Ecu-72 a libre escogencia.

## 8.2 Caracterización estructural de los promotores

Se partió de los genes de interés BSMT1, auxin signaling F-box 2, cysteine proteinase inhibitor y CA1 (carbonic anhydrase) asociados a la vía de señalización del ácido salicílico, la secuencia inicial de los genes se encontraba en *Arabidopsis thaliana*, y teniendo en cuenta que la especie de trabajo es la yuca se encontraron para el gen BSMT1 cinco secuencias en yuca similares a la de *A thaliana* (figura 7), cabe resaltar que en el cromosoma 17 se encontraron dos secuencias del gen.

Define	Score	E	Target View [click feature to view in JBrowse]
▶ Chromosome04	53.6	4.8E-5	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;"> <p>Feature scale</p> <p>10.0</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Target scale</p> <p>0 28M</p> </div> </div>
▶ Chromosome03	50.0	5.8E-4	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;"> <p>Feature scale</p> <p>10.0</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Target scale</p> <p>0 29M</p> </div> </div>
▶ Chromosome17	44.6	2.5E-2	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;"> <p>Feature scale</p> <p>10.0</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Target scale</p> <p>0 27M</p> </div> </div>
			<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;"> <p>Feature scale</p> <p>10.0</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Target scale</p> <p>0 27M</p> </div> </div>

Figura 7. Secuencias del gen BSMT1 encontradas en yuca

Una vez obtenidas las secuencias del análisis en BLAST, se realizó el alineamiento con el programa MEGA7. Este nos permitió saber cuáles de esas secuencias era la más similar

a la secuencia de *A. thaliana*, para esto se utilizó las secuencias de las proteínas de cada gen encontrado. El alineamiento Clustal W. arrojó que la secuencia que se encuentra en el cromosoma 4 y el cromosoma 1 son las más similares a la secuencia de *A. thaliana* (figura 8).

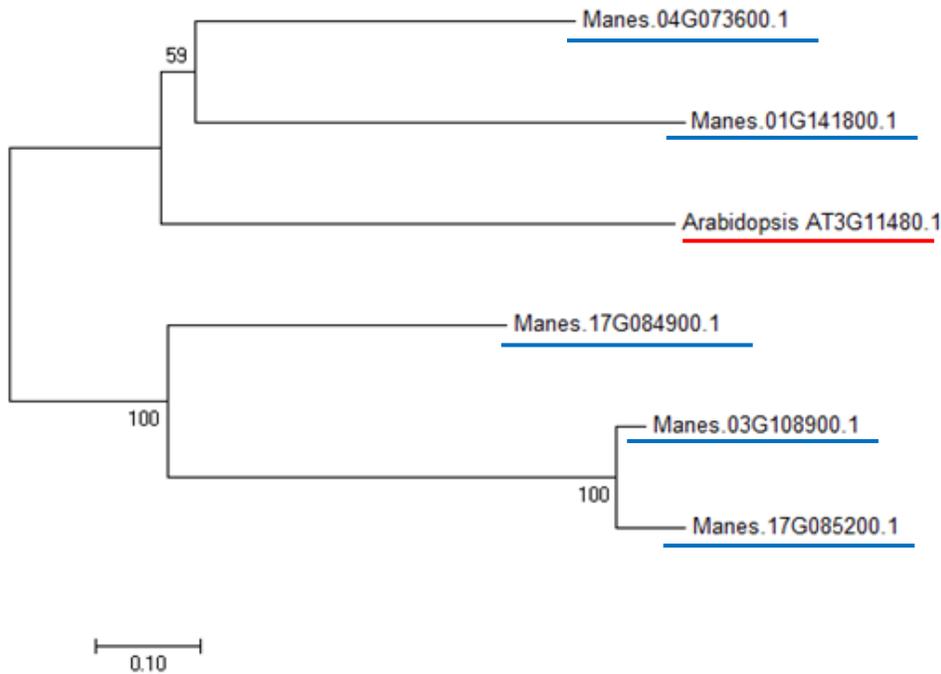


Figura 8. Árbol filogenético de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen BSMT1.

Ya encontradas las secuencias de yuca que más se asemejan a la secuencia de *A. thaliana*, paso seguido fue obtener del programa PlantCARE, los motivos *cis* putativos de la secuencia nucleotídica del promotor ya obtenida de la herramienta JBrowser. Primero se realizó la búsqueda de los motivos en el promotor de *A. thaliana* (figura 9) para así compararlos con los que se encuentra en las secuencias del promotor de yuca. Lo que se obtuvo es que el promotor de *A. thaliana* contiene motivos *cis* importantes como el ABRE (TACGTG, AGTACGTGGC,) elemento involucrado en la respuesta del ácido abscísico ubicado en la posición +285 -1127, el ARE (TGGTTT) de inducción a anaerobiosis ubicado en la posición +754 +1001, -943, -1147, la caja G-Box, elemento regulatorio involucrado en la respuesta de la luz ubicado en la posición -287, y dentro de los motivos que se encuentran involucrados en la respuesta al ácido salicílico se encontró el motivo SARE ubicado en la posición +923.

Dentro de los promotores de los genes en yuca se encontraron motivos *cis* compartidos entre los dos promotores analizados y el promotor de *A. thaliana*, como lo son los motivos ARE, G-Box, ABRE, Skn-1 motivo involucrado en la regulación de la expresión del

endospermo, el cual está en los dos promotores (cromosoma 4 y cromosoma 1) de yuca y *A. thaliana* al igual que el motivo TC-rich, motivo importante ya que es uno de los motivos involucrados en la defensa y el estrés de la planta, otro importante motivo *cis* putativo que se comparte en los promotores analizados es el motivo que se encuentra involucrado en la respuesta del ácido salicílico, el cual se encuentra en los promotores de yuca como TCA-element y SARE en *A. thaliana*.

Al realizar un histograma de frecuencias de los motivos *cis* encontrados, podemos observar que los motivos involucrados con la respuesta de la luz son los más abundantes (G-Box) dentro del promotor de *A. thaliana* (figura 10), como también el motivo ABRE y ARE.

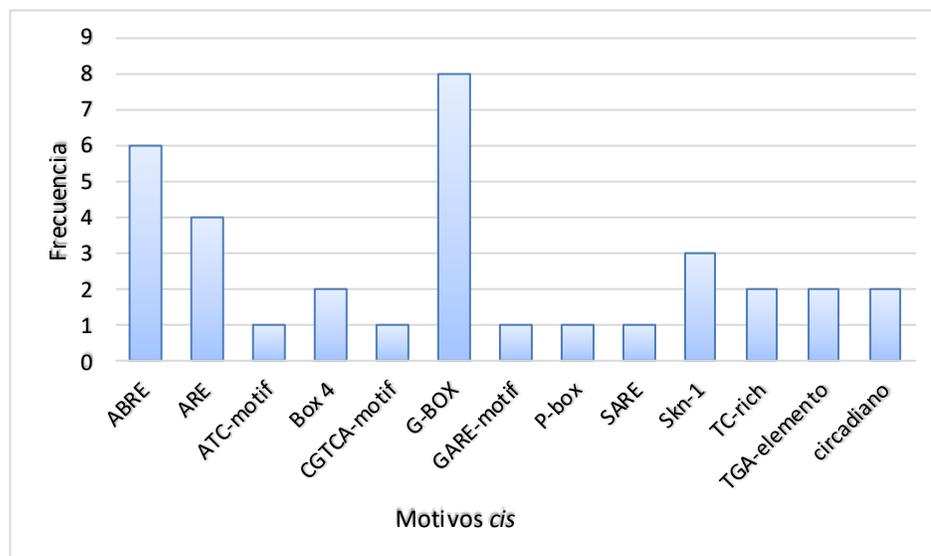


Figura 10. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen BSMT1 en *Arabidopsis thaliana*.

```

>arabidopsis promotor 12717
+ TAAATTGAAA TAGTCCTTTC TGATCATAAA TGGCCTGTTT TCTCCACTCT TTTAAATGAG TTTGGATTGT
- ATTTAACTTT ATCAGGAAAG ACTAGTATTT ACCGGACAAA AGAGGTGAGA AAATTTACTC AAACCTAACA

+ TCATAGACAG ATTTTCTCAT TTTTTCGAT ATATGTAAAT CTCCGATTAT TAAATTGTAG GCCGGATTGT
- AGTATCTGTC TAAAAGAGTA AAAAAAGCTA TATACATTTA GAGGCTAATA ATTTAACATC CGGCCTAACA

+ TAGATAAAGC TTCTACAAC TTAGATTTGT TGAGTTGTCA TACGTAAACA GTTTTGCTTC AAATTCACTA
- ATCTATTTTCG AAGATGTTGA TATCTAAACA ACTCAACAGT ATGCATTTGT CAAAACGAAG TTTAAGTGAT

+ ACCTAGGACC CTCCTTTGA TATTAATGTG TGGTTGTTAG AAAAACAATT TTTCGTGTTT CATATAATTT
- TGGATCCTGG GAGGAAAAC ATAAATACAC ACCAACAATC TTTTGTAA AAAGCACAAG GTATATTA

+ TAGAATTACG TGGCATGGA CATTACATC GGGATAAAT TAAGCGTCGT CCACAGATT TACGACAATG
- ATCTAATGC ACCGTACCTT GTAAATGTAG CCCCTATTTA ATTCGCAGCA GGTGTCTAAA ATGCTGTTAC

+ CTCCATATAA GAACATGCAT TACAAAAAAA AAGGAAAAA ATGCATGTTT ATGTATGGTC GTCTGTCTGT
- GAGGTATATT CTTGTACGTA ATGTTTTTTT TTCCCTTTT TACGTACAAG TACATACCAG CAGACAGACA

+ TTATAATTGA AAAGGACTTT GATGTTGTTA ATGTTATTAA TGGAGATTAC TTTGAATCTC ACACGGTTTG
- AATATTAAT TTTCTGAAA CTACAACAAT TACAATAATT ACCCTAATG AAACCTTAGAG TGTGCCAAC

+ ATTAACGAA TCTTCGTCAG CACACTCT GTTCACACTT ATTATTTGAG ACTAGCAGAA GAAACTCACT
- TAATTTGCTT AGAAGCAGTC GTGTGTGAGA CAAGTGTGAA TAATAAATC TGATCGTCTT CTTTGAGTGA

+ AGTTATCAT AGATTCTGAC CTTCGCACTT GTTAGTCTTT TAATAACTTG AAGATACTCG CCATTGTATA
- TCAAATAGTA TCTAAGACTG GAAGCGTGAA CAATCAGAAA ATTATTGAAC TTCTATGAGC GGTAACATAT

+ TCACAAC TAG CCGATTCTC GTTCATTTAA AATGTTAATA TFCGTGTTT ATGTATATTT AATTGAAGTA
- AGTGTGATC CGCTAAAGAG CAAGTAAAT TTTACAATTAT AAGCACAAT TACATATAAA TTAACCTCAT

+ ATGATTTTAC ATGTA CAAT GTATCCTAGT ATTTTGAATC TTCTAGTACC AAGTGGTTTT CTCTTCGATF
- TACTAAAATG TACATGTTTA CATAGGATCA TAAAACCTAG AAGATCATGG TTCACCAAAA GAGAAGCTAA

+ ACCTTTTTGT CTTTTTTCAT TACAACATGA ACAACACCAG CAATAATTAA AATATCGTGC TTTTTGTTTT
- TGGAAAAACA GAAAAAGTA ATGTTGACT GTTGTGGTC GTTATTAATT TTATAGCAG AAAAAACAAA

```

Figura 9. Motivos *cis* putativos encontrados en el promotor de gen BSMT1 en *A. thaliana*.

Dentro de los promotores de yuca se sigue el mismo patrón, los motivos involucrado en la respuesta de la luz son los más abundantes siendo que para el promotor del gen en el cromosoma 4 se encuentran los motivos GA-motif y Sp1, y para el promotor del cromosoma 1 se encuentran los motivos 3-AF1, Box 4, G-Box y GT1-motif (ver figura 11 y 12). Ahora bien al realizar un consenso de la frecuencia de los motivos en los diferentes promotores se sigue la misma tendencia sobre los motivos involucrados en la respuesta a la luz y los motivos ABRE y ARE (figura 13).

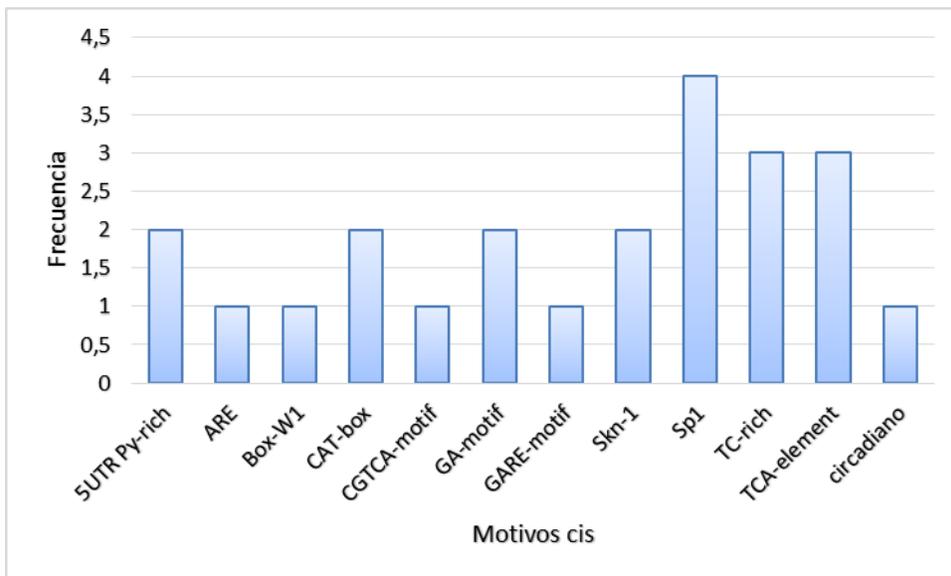


Figura 11. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen BSMT1 en *Manihot esculenta* del cromosoma 4.

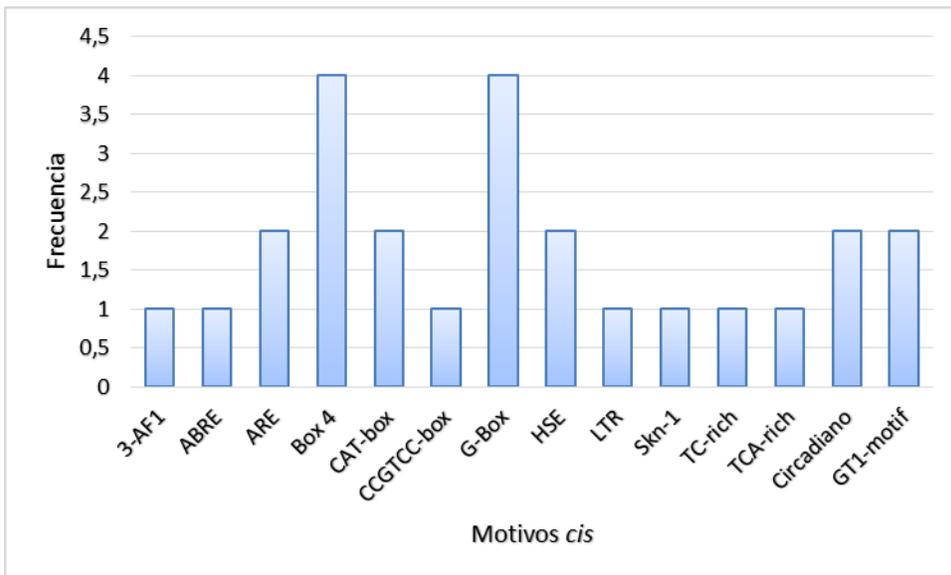


Figura 12. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen BSMT1 en *Manihot esculenta* del cromosoma 1.

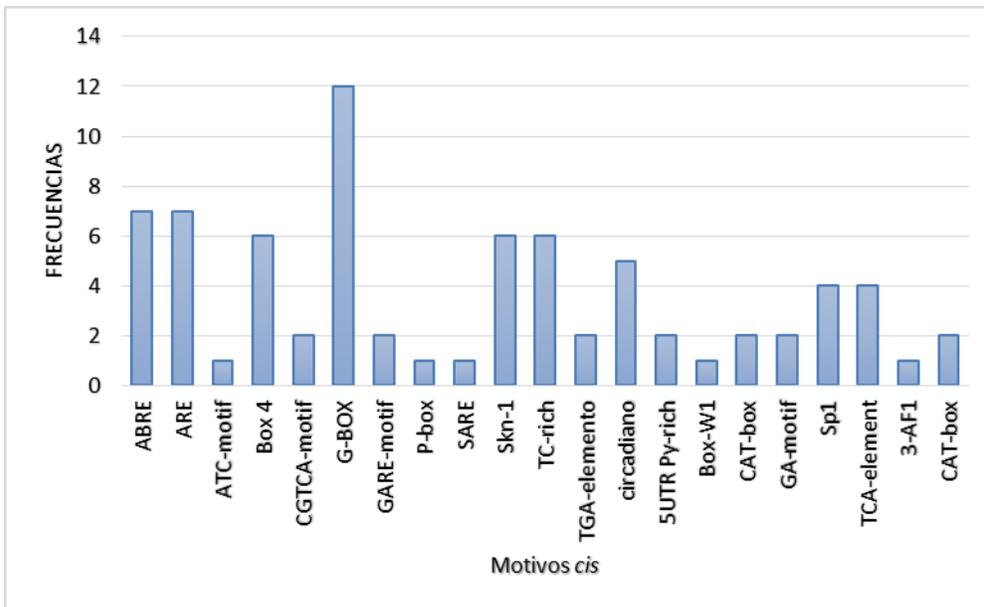


Figura 13. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen BSMT1 en *Arabidopsis thaliana*, y *Manihot esculenta* del cromosoma 1 y 4.

En cuanto al gen auxin signaling F-box 2, el árbol filogenético (figura 14) muestra una secuencia del gen en el genoma de la yuca con un porcentaje de Bootstrap del 100% lo que quiere decir que esta secuencia es muy similar a la secuencia del gen en el genoma de *A. thaliana*. A partir de esta secuencia se trabajó la comparación de los motivos *cis* de los promotores. Dentro del promotor de *A. thaliana* se sigue el mismo patrón que se encuentra en el gen BSMT1, en donde los motivos con respuesta a la luz son los más abundantes (figura 15), en este promotor se encuentran elementos importantes como los son los involucrados en la respuesta al estrés, defensa y el ácido salicílico. Para el promotor en el gen de *M. esculenta* (figura 16), encontramos motivos abundantes como el Box 4 (+215. +375) y ARE (+90, +1135), donde el primero está involucrado con la respuesta a la luz y el segundo involucrado en la inducción anaerobia, motivos también presentes en el gen BSMT1. Dentro de este promotor no se encontraron motivos que estuviesen relacionados con la vía del ácido salicílico o con la respuesta a la defensa. El histograma general (figura 17) de los dos promotores del gen auxin signaling F-box 2, muestra que el motivo que más frecuencia tiene es el ARE con un total de 9 y el menor el Skn-1, ciclo circadiano, entre otros.

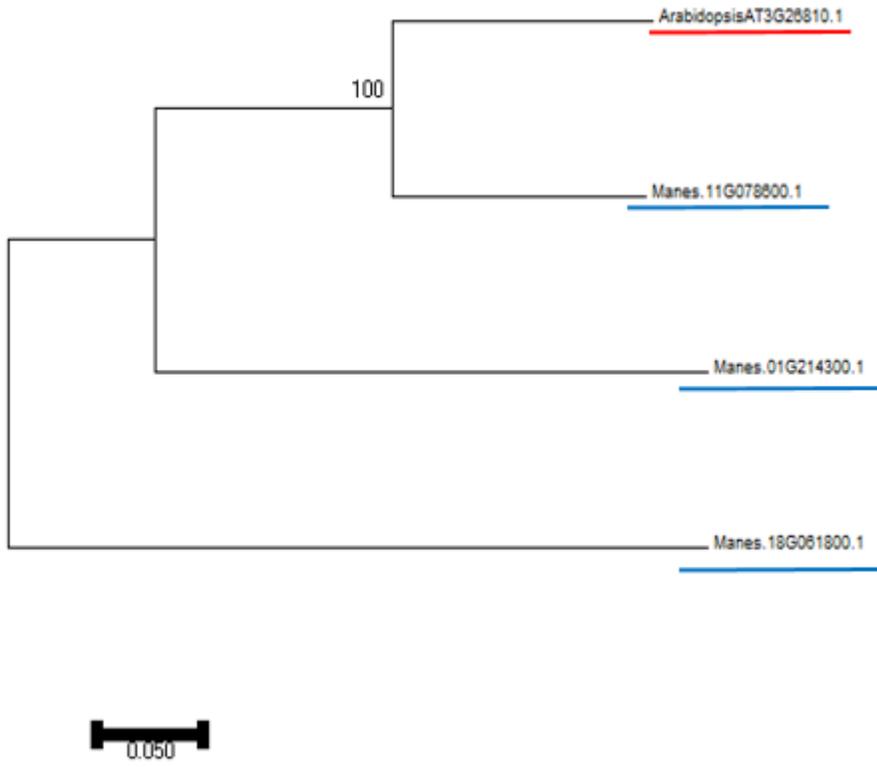


Figura 14. Árbol filogenético de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen auxin signaling F-box 2.

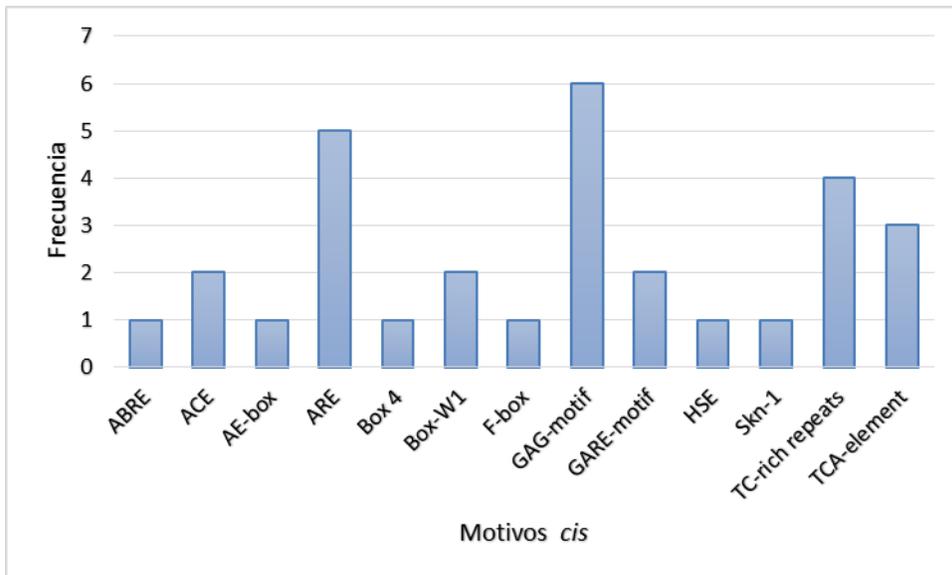


Figura 15. Frecuencia de motivos cis encontrados en el promotor del gen auxin signaling F-box 2 de *Arabidopsis thaliana*.

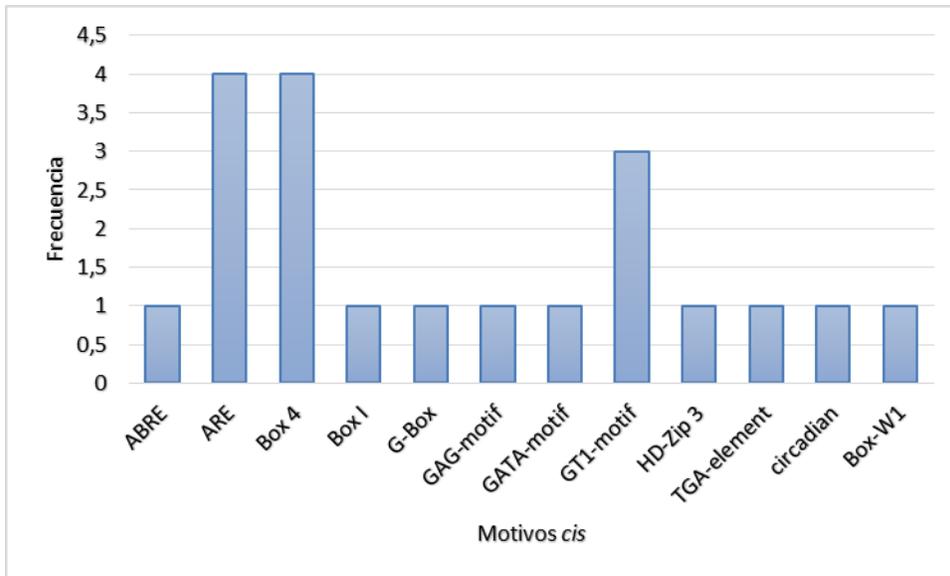


Figura 16. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen auxin signaling F-box 2 de *Manihot esculenta* en el cromosoma 11.

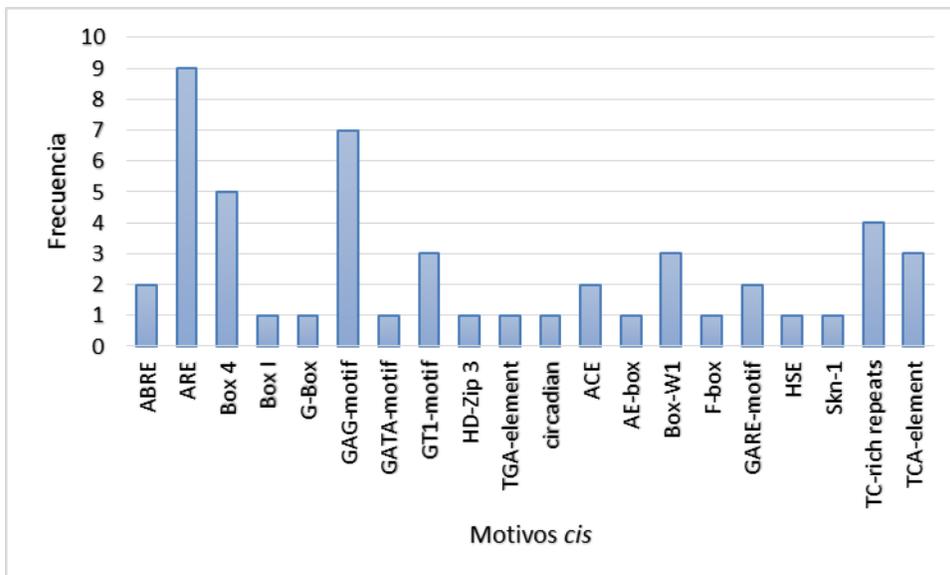


Figura 17. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen auxin signaling F-box 2 de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* en el cromosoma 11.

El alineamiento de secuencias y el árbol filogenético arrojaron que para el gen cysteine proteinase inhibitor, el gen en *M. esculenta* que más comparte similitud con la secuencia del gen en *A. thaliana*, es el gen que se encuentra en el cromosoma 8 de genoma de *M. esculenta* con un porcentaje de 69 para el análisis de Bootstrap (figura 18).

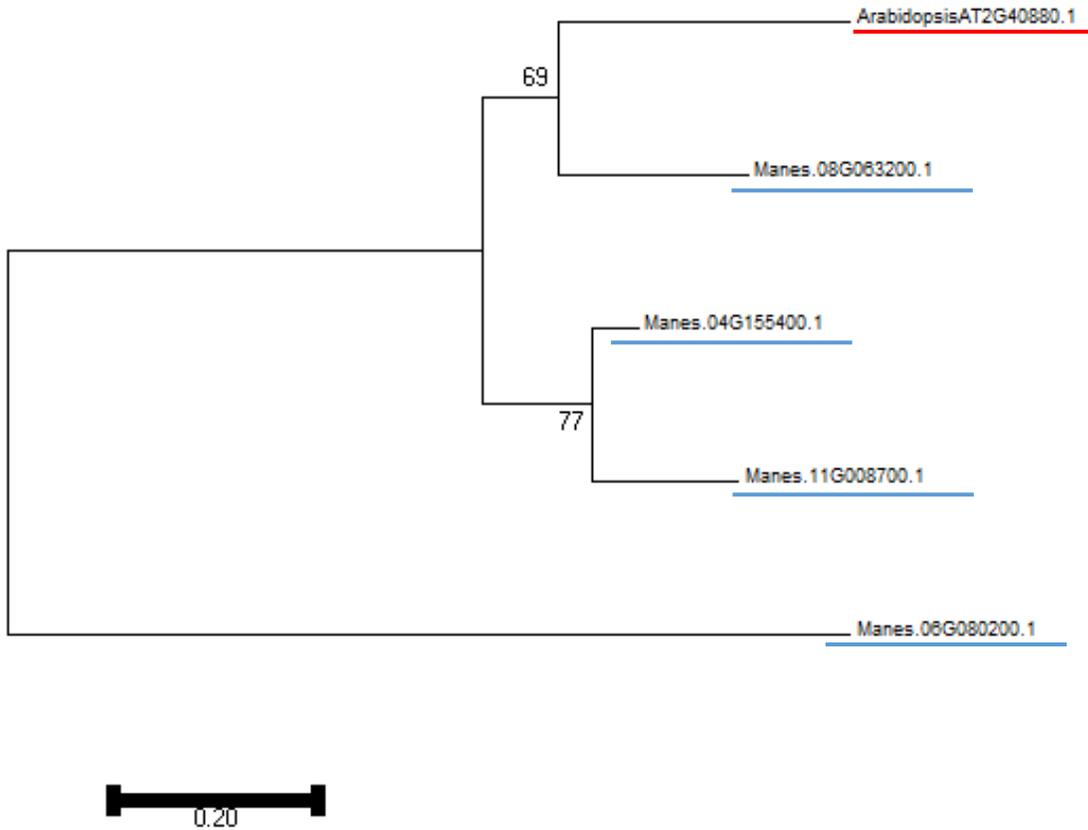


Figura 18. Árbol filogenético de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen cysteine proteinase inhibitor,

En análisis *in silico* para estos dos genes muestra que para el gen en *A. thaliana*, se encuentra diferentes motivos *cis*, de los que cabe resaltar son los involucrados con la respuesta a la luz (G-Box, -939), a la expresión del endospermo (Skn-1, -49, -758) y por supuesto los que están relacionados con la vía de señalización del ácido salicílico (TCA, -91, -1092) y con la respuesta al estrés y defensa (TC-rich, -316, +708) (figura 19).

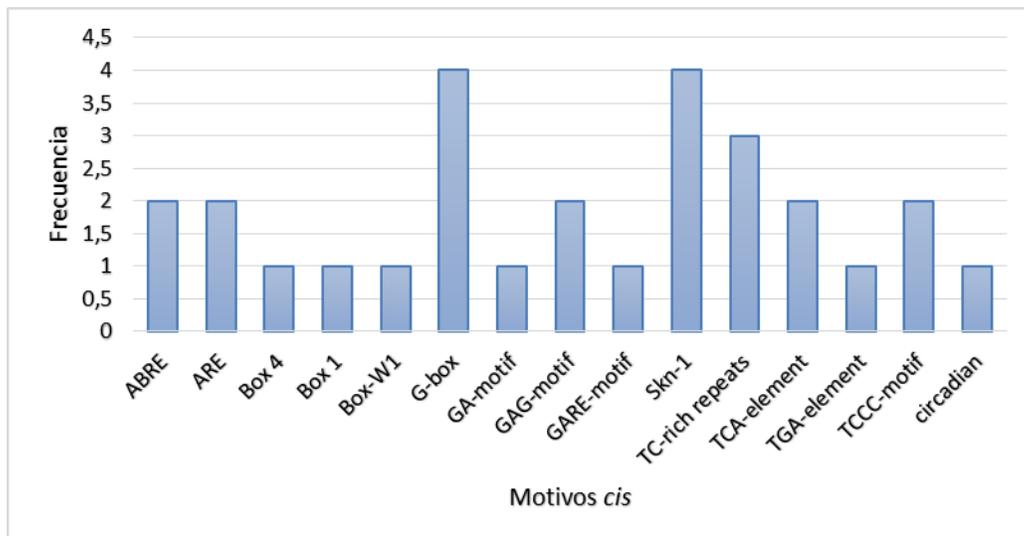


Figura 19. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen cysteine proteinase inhibitor de *Arabidopsis thaliana*.

Respecto al gen de *M. esculenta*, nos encontramos con un nuevo motivo *cis*, el motivo WUN en la posición +918, el cual está involucrado en la respuesta a las heridas, es decir un elemento que se puede activar cuando un artrópodo plaga como el ácaro verde o la mosca blanca ataca la planta, otro elemento importante encontrado es el TC-rich en la posición +991, también aparece otro nuevo motivo como el Box-W1, elemento responsable a la respuesta elicitor de hongos (figura 20). El histograma general para estos dos genes muestra que el motivo más abundante es el G-Box seguido del Skn-1 y que los motivos ABRE, ARE y Box-4, se encuentran en la misma frecuencia (figura 21).

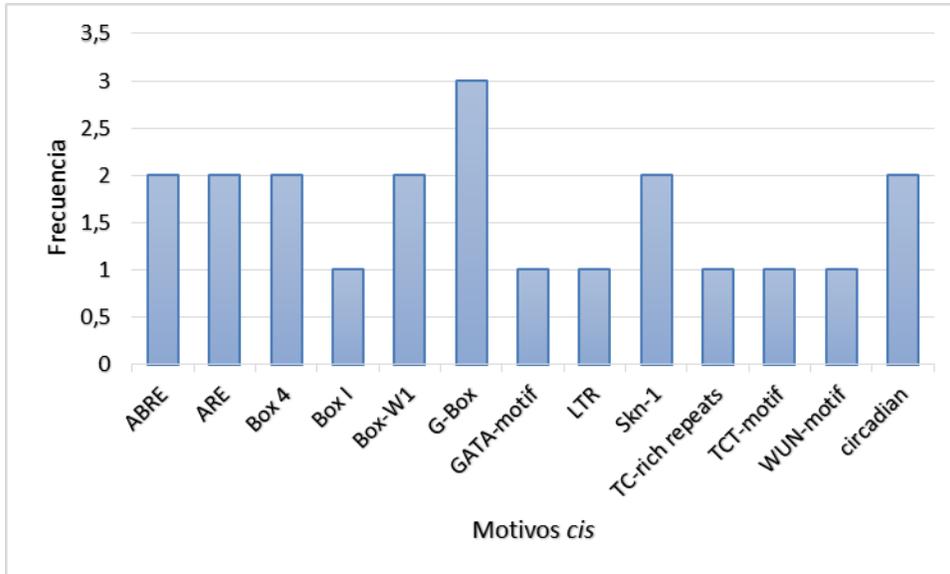


Figura 20. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen cysteine proteinase inhibidor de *Manihot esculenta* en el cromosoma 8.

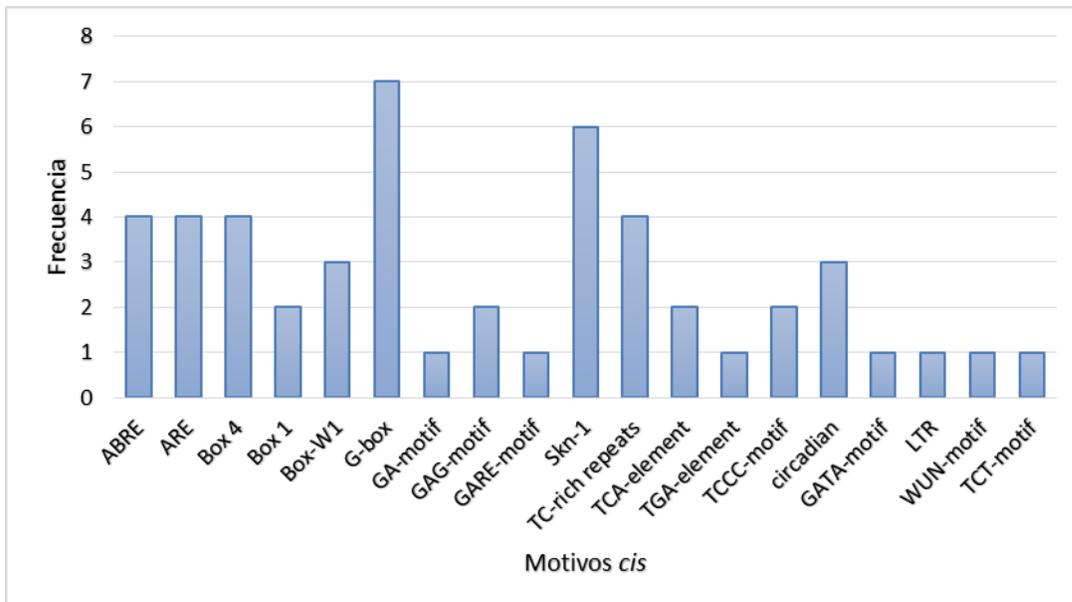


Figura 21. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen cysteine proteinase inhibidor de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* en el cromosoma 8.

El alineamiento para las secuencias del gen CA1 (figuraxx) encontramos que las secuencias del cromosoma 15 y 17 de *Manihot esculenta* son las más parecidas en cuanto a la secuencia de *Arabidopsis thaliana*. Con respecto al análisis *in silico* se encuentra que en la secuencia en el cromosoma 17 aparece el motivo Box4 como el más abundante junto (figuraxx) al motivo G-box en la secuencia del cromosoma 15 (figuraxx), ahora bien dentro de los motivos importantes para la defensa encontramos de nuevo el motivo TC-rich, junto al motivo ERE en la posición +181 el cual está relacionado con la vía del etileno. El histograma general muestra que el motivo más abundante es el Box-4 seguido del G-Box y que los motivos Box-1 y Skn-1, se encuentran en la misma frecuencia (figuraxx)

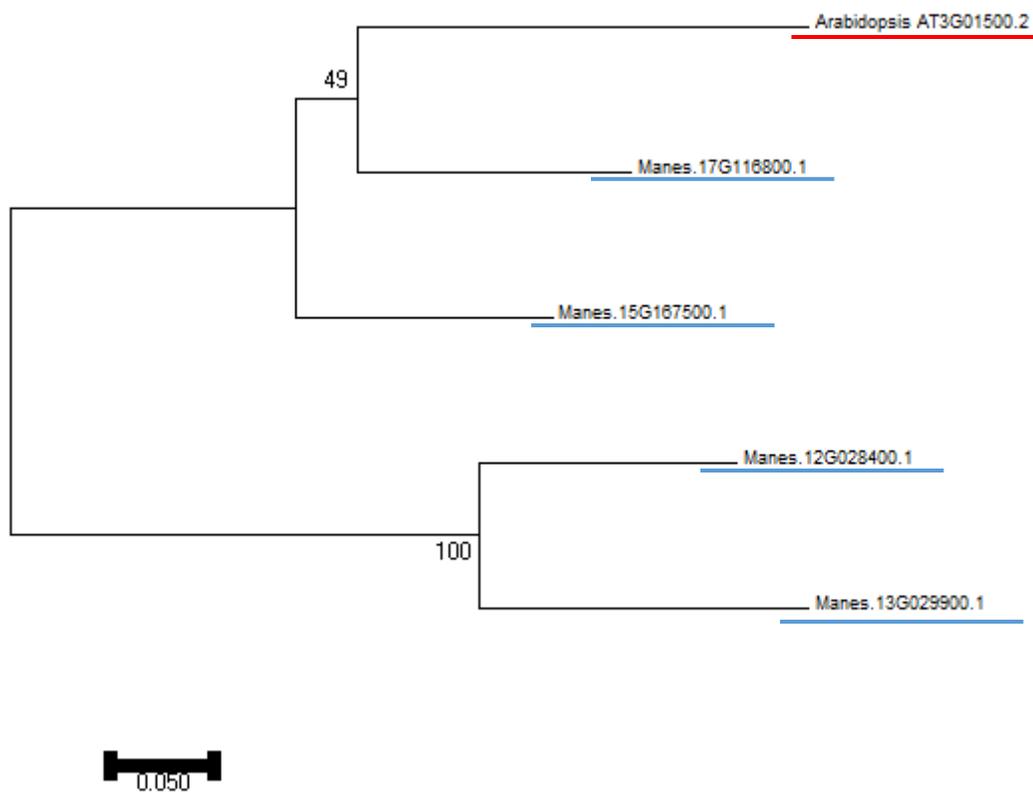


Figura 22. Árbol filogenético de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen CA1

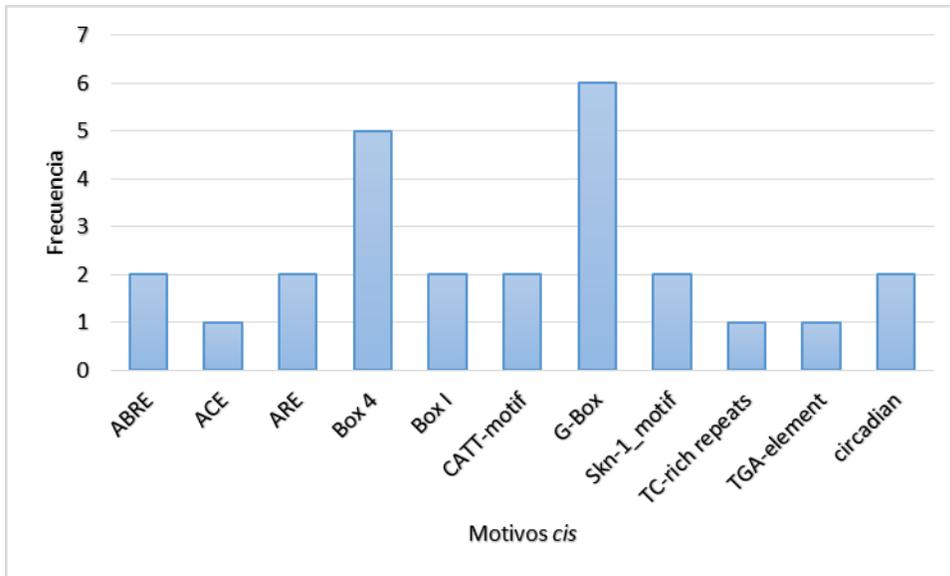


Figura 23. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen CA1 de *Manihot esculenta* en el cromosoma 15.

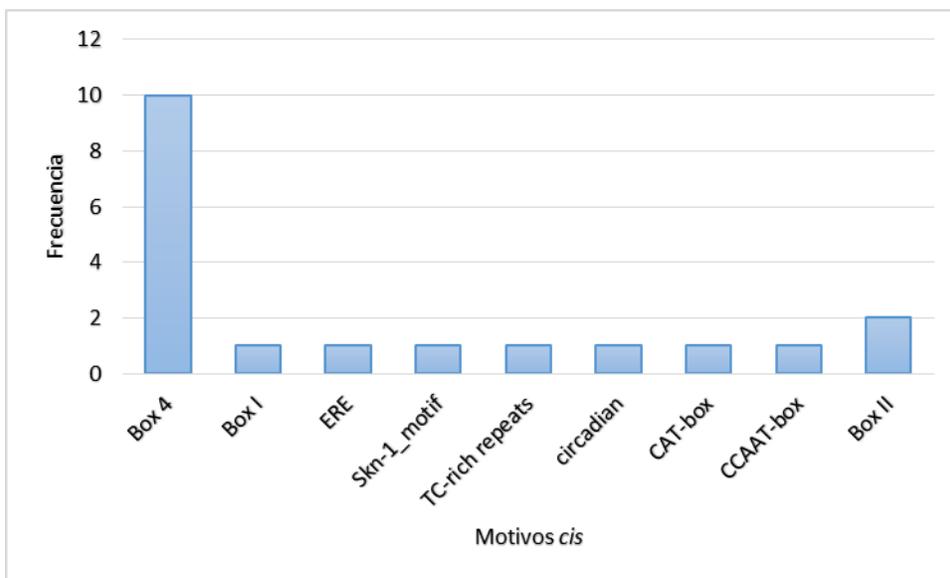


Figura 24. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen CA1 de *Manihot esculenta* en el cromosoma 17.

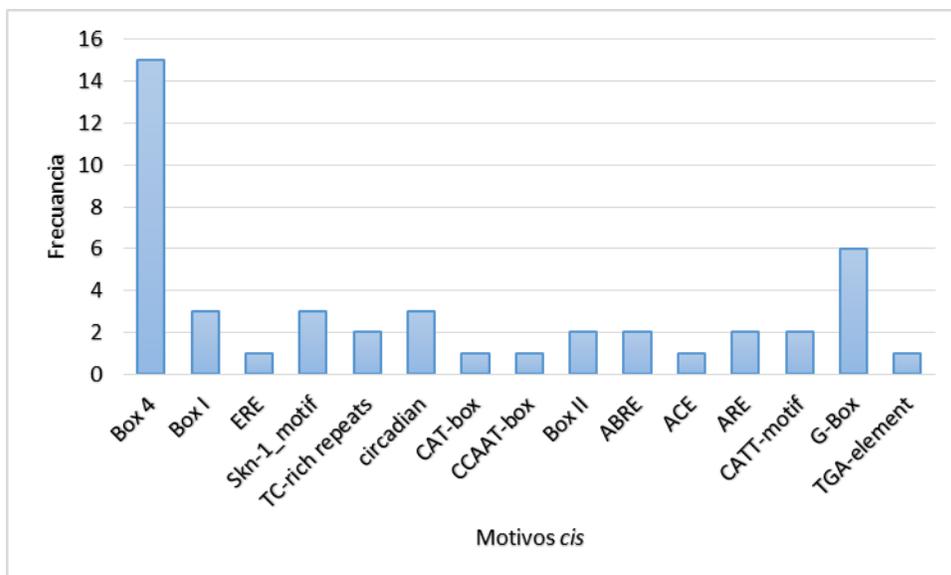


Figura 25. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen CA1 de *Manihot esculenta* en el cromosoma 15 y 17.

Si bien se sabe que el ácido salicílico juega un papel crítico en la reprogramación transcripcional que ocurre durante la respuesta de defensa contra el estrés biótico y abiótico. Durante la respuesta a la defensa, la transcripción de diferentes conjuntos de genes son controlados de manera espacio temporal gracias a mecanismos mediados por el ácido salicílico (Herrera-Vásquez *et al.*, 2015). En adición, diferentes líneas de evidencia indican que el ácido salicílico interacciona con las especies reactivas de oxígeno (ROS) y glutatión (GSH) frente al estrés de las plantas. La activación de la señalización de SA es precedida por la explosión oxidativa que se origina en diferentes compartimientos celulares (Wrzaczek *et al.*, 2013). Como primera instancia PTI induce ETI como respuesta de defensa contra los patógenos donde se ha reportado que este incrementa los niveles de ácido salicílico que son precedidos por peróxido de hidrogeno mediado por NADPH (O'Brien *et al.*, 2012; Mammarella, *et al.*, 2014).

El ácido salicílico promueve la acumulación de ROS, lo cual ha sido reportado en diferentes modelos de estrés incluyendo la respuesta de ETI a patógenos y como respuesta a la luz, sequía, salinidad y el estrés al frío (Miura and Tada, 2014). Esto permite corroborar los motivos *cis* encontrados en los promotores de los genes analizados en las dos especies, donde como se ha visto se presentan estos motivos con mayor frecuencia como por ejemplo el de respuesta a la luz. Por otro lado se ha encontrado que el ácido salicílico promueve la producción de ROS durante los diferentes eventos de señalización siendo estos esenciales para la defensa de la planta (Khokon *et al.*, 2011, Herrera-Vásquez *et al.*, 2015), de manera que soporta el elemento TC-rich encontrado en el promotor del gen BSTM1, el cual está involucrado en la respuesta a la defensa y el estrés.

Se ha encontrado que el que el gen ERF113 perteneciente a la familia ERF, posee una respuesta transcripcional para el ácido jasmónico, el ácido salicílico, ácido abisícico y el

etileno, donde además es inducido por el estrés a la sequía (Heyman *et al.*, 2017). En primera instancia la sobreexpresión del gen confiere la resistencia al estrés donde dispara el cierre de los estomas y la tolerancia a la inundación (Liu *et al.*, 2012). En adición este gen juega un papel en la recuperación del tejido afectado por una herida, sugiriendo que este gen promueve la división celular inducida por las heridas. Dentro de los promotores analizados en este estudio se encontró que hay motivos relacionados con el ácido abisícico, la respuesta a las heridas (motivo encontrado en el gen cysteine proteinase inhibitor de *Manihot esculenta*) los cual sugiere que estos genes son importantes para la defensa de la planta ya que pueden estar relacionados con otro genes de diferentes vías que actúan sobre la misma respuesta, como por ejemplo el gen LOX2 y ERF113 (Asahina *et al.*, 2011, Heyman *et al.*, 2017).

Algunos autores proponen que los patrones en los datos de expresión de genes pueden ser explicados con los perfiles de los elementos *cis* (Segal *et al.*, 2005, Appel *et al.*, 2014). Esto con la ayuda de modelos computacionales que permiten un punto de inicio para formación de hipótesis antes del inicio de los experimentos. Con el análisis *in silico* realizado donde se caracterizó los motivos *cis* de las regiones promotoras se encontró que los genes presentan motivos compartidos dentro de las dos especies de plantas trabajadas, y que en comparación con el trabajo realizado por Appel *et al.*, (2014) donde encontró que el motivo ABRE se sobre expresaba en los tratamientos con insectos, siendo este importante en la respuesta a la sequía y por su puesto con el ácido abisícico. Por otro lado, las TATA box, se encontraron en una alta frecuencia y sobrerreguladas, este elemento puede ser importante en la regulación al estrés biótico, como genes de *Saccharomyces sp* con TATA box que fueron encontrados sobre expresados en la respuesta al estrés (Basehoar *et al.*, 2004). Esto quiere decir que genes sin TATA box pueden ser utilizados como genes de referencia ya que no pueden tener mucha regulación transcripcional, a su vez la presencia de este motivo puede identificar genes de *A. thaliana* que están especialmente involucrados en la respuesta al estrés, en especial por las heridas producidas por insectos (Appel *et al.*, 2014).

Siendo así que los genes analizados en este estudio son importantes para la respuesta frente a los artrópodos ya que cada uno de estos genes presentan una gran cantidad de TATA box, acompañados a su vez por los motivos relacionados con el ácido salicílico, abisícico, defensa, sequía. También podemos inferir que estos datos sugieren una distinción de los genes involucrados en las respuestas al ataque de artrópodos plaga, pero sin embargo las regiones promotoras de los diferentes genes en las diferentes especies contienen los mismos elementos siendo esto esperado ya que se analizó cada gen tanto en *A. thaliana* como en *M. esculenta* y que una de las predicciones era que tanto *A. thaliana* como *M. esculenta* compartían los motivos *cis* en su región promotora. Sugiriendo así una regulación transcripcional en la respuesta al ataque de artrópodos, requiriendo múltiples factores de transcripción para poder iniciar los patrones de expresión (Zou *et al.*, 2011, Appel *et al.*, 2014).

### 8.3 Genes de referencia y genes relacionados con la vía del ácido salicílico

Para la búsqueda de los genes relacionados con la vía del ácido salicílico, se evaluaron diferentes especies de plantas con datos reportados de experimentos con artrópodos plaga. El sistema que se utilizó fue elegir dentro de los experimentos la búsqueda de genes sobrerregulados y reprimidos. Ahora bien dentro de las plantas evaluadas se utilizaron, *A. thaliana* con experimentos en *Bemisia tabaci*, *Liriomyza huidobrensis* y *Myzus persicae*, *Triticum aestivum* con experimentos en *Mayetiola destructor* y *Hordeum vulgare* *Rhopalosiphum padi*, de estas tres especies la que mejor genero resultados fue *A. thaliana* la cual contaba con un total de 21 experimentos (figura 22), aunque no se encontraron genes relacionados con la vía del ácido salicílico se lograron encontrar genes relacionados con la vía del etileno como el gen PORA y ERF6, a su vez también se encontraron genes relacionados con la defensa de la planta como el CYS4 involucrado con la actividad inhibidora de la endopeptidasa de tipo cisteína, y genes relacionados con la vía del ácido absicico como el CBL1, esta vía también es importante ya que actúa en respuesta al frio, estrés osmótico, estrés por salinidad, privación del agua, cabe resaltar que estos genes se seleccionaron porque presentaban una sobre regulación o inhibición. Con los genes encontrados y seleccionados se realizó la búsqueda de genes de referencia

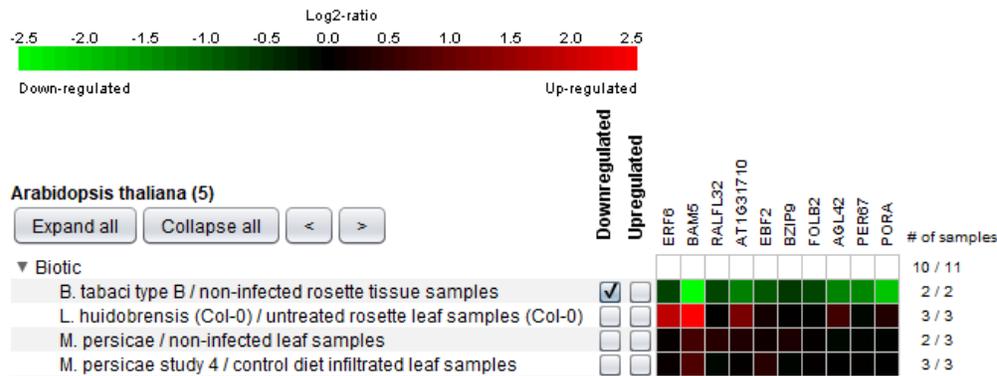


Figura 26. Experimentos evaluados para la búsqueda de genes relacionados con la vía del ácido salicílico.

Teniendo en cuenta como modelo *A. thaliana* y con los mismos experimentos evaluados anteriormente, en primera instancia se hizo una búsqueda sin genes blanco a evaluar, es decir con los valores predeterminados (Hruz *et al.*, 2011). Los resultados que arrojo fue que se encontraron 20 genes de referencia como el EXPA12 con un nivel bajo de expresión. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió hacer una búsqueda utilizando genes blanco de interés en este caso los obtenidos en el análisis de perturbaciones y el gen BSMT1, esto para poder sondear cuales genes son los mejores como referencia para poder usar. Con los genes blanco (figura 23) se obtuvo que el gen

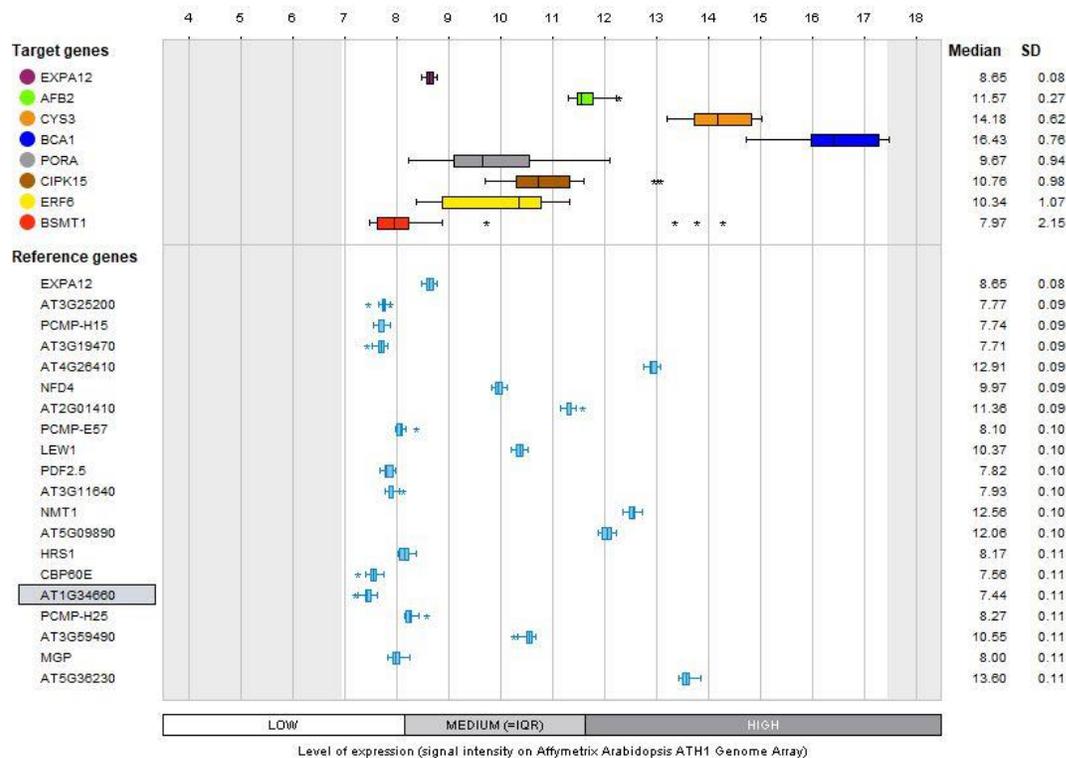


Figura 27. Genes de referencia encontrados utilizando como modelo *Arabidopsis thaliana*.

EXPA12 volvía aparecer como gen de referencia, y de la lista de genes obtenidos se escogió el gen AT4G26410, el cual se encuentra como sobre regulado.

El obtener genes de referencia con patrones de expresión estables es lo más recomendado para trabajar ya que nos permite normalizar y validar los datos que se estén utilizando. A su vez la normalización de los datos va de la mano con las variaciones de la calidad de la muestra de RNA, la cantidad de RNA y la eficiencia de la enzima utilizada para la síntesis de cDNA (Moreno *et al.*, 2011). El número recomendado de genes de referencia para trabajar es de por lo menos tres genes como controles internos para cuantificar de manera confiable la modulación de transcripción por RT-qPCR. Moreno *et al.*, (2011) probaron cinco genes de referencia con muestras de tres variedades de yuca infectadas con el virus marrón de la yuca (CBSV), de acuerdo los resultados de los

análisis, obtuvieron que la expresión de PP2A, UBQ10 y GTPb fueron los más estables en todas las muestras y variedades. Con lo cual demuestran que PP2A es el gen más adecuado para usar en diferentes condiciones en *A. thaliana* y yuca. En comparación con el gen UBQ10 el cual es el más estable ya que se expresa cuando se combina un conjunto de muestras de yuca no infectadas e infectadas, lo cual lo convierte en el gen de referencia más estable cuando se trabaja con infecciones como el virus marrón de la yuca.

El utilizar herramientas como RefGenes nos permite identificar genes de referencia que se ajusten al tipo de experimentos que estemos realizando, ya que este combina un enfoque ortólogo donde se combina especies como *A. thaliana* frente al cultivo de interés. Con una validación adecuada de los genes que se obtiene, se evita el problema con los genes denominados housekeeping, ya que estos tienden a presentar patrones de expresión menos estables (Brand and Hovav, 2010 Garg *et al.*, 2010). Cabe resaltar que cada diseño y condición experimental requiere de una evaluación cuidadosa para poder obtener resultados confiables por RT-qPCR (Moreno *et al.*, 2011).

#### 8.4 PCR primers G3PDH y 18s

Para el ensayo de PCR se utilizaron diez muestras de ARN correspondiente a cada uno de los tiempos estipulados para el ensayo molecular con el ácaro verde, en cuanto al ensayo con mosca blanca se utilizaron ocho muestras teniendo en cuenta los tiempos establecidos para el ensayo (Tabla 3). Como primer ensayo para probar los primers G3PDH, 18s y para ver la calidad de la síntesis de cDNA se realizó una PCR utilizando como negativo una muestra de RNA (figura 24), como se puede observar la muestra de RNA amplificó eso quiere decir que en la muestra todavía se encontraban trazas de ADN, es por esto que como paso importante para la síntesis de cDNA es necesario realizar una digestión del mismo.

**Tabla 3.** Muestras de RNA utilizadas para la síntesis de cDNA y posterior ensayo en PCR

	Ácaro verde ( <i>Mononychellus tanajoa</i> )		Mosca blanca ( <i>Aleurotrachelus socialis</i> )		
	Genotipo		Genotipo		
<b>Tiempo de ensayo</b>	CMC40	ECU-72	Tiempo de ensayo	CMC40	ECU-72
<b>0 horas</b>	CA0	EA0	24 horas	CMC 24	ECU 24
<b>6 horas</b>	CA6	EA6	48 horas	CMC 48	ECU 48
<b>24 horas</b>	CA24	EA24	5 días	CMC 5d	ECU 5d
<b>4 días</b>	CA4	EA4	8días	CMC 8d	ECU 8d
<b>8 días</b>	CA8	EA8	----	----	----

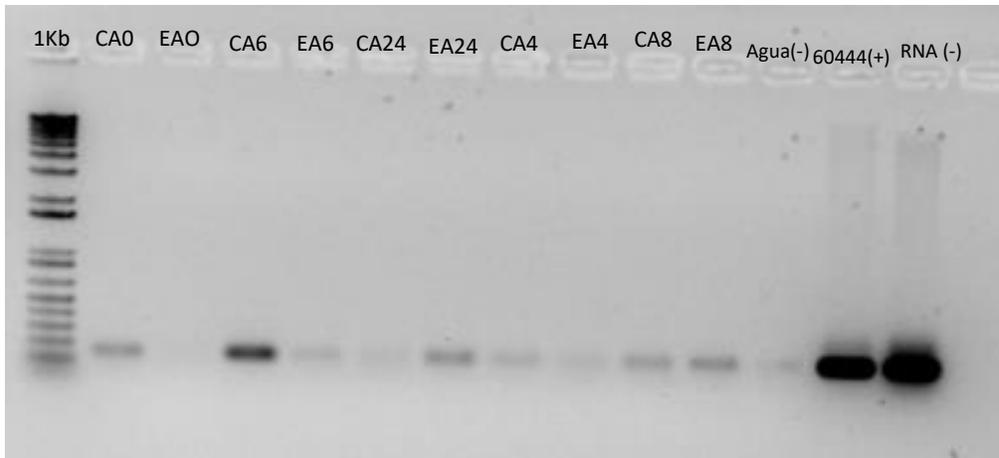


Figura 28. PCR con el primer G3PDH en muestras de ácaro, utilizando como negativo agua y RNA.

Como se puede apreciar en la figura 24, las bandas de las muestras quedaron muy nítidas. Para corregir este problema que también se presentó con las muestras de cDNA de mosca blanca, se hizo un ajuste en las cantidades del coctel más específicamente en la cantidad de cDNA que se agregaba, es decir que se pasó de utilizar 0,5ul de cDNA a 1,5ul de cDNA y en el número de ciclos utilizados pasando de 35 a 40. Este ajuste en la cantidad de muestras que se agregaba mejoro la calidad de las bandas notablemente. Otro ajuste que se realizó en el protocolo, fue que inicialmente se presentaba que algunas muestras en especial la primera muestra de cada ensayo no amplificaba para ninguno de los dos primers. Para corregir esto se hizo una dilución de las muestras en relación 1:3. En el ensayo realizado con mosca blanca se pudo notar que la banda de la primermuestra para el primer G3PDH apareció, sin embargo para el primer 18s y para las muestras con ácaro verde y el primer G3PDH no se pudo corregir (figura 25 y 26).

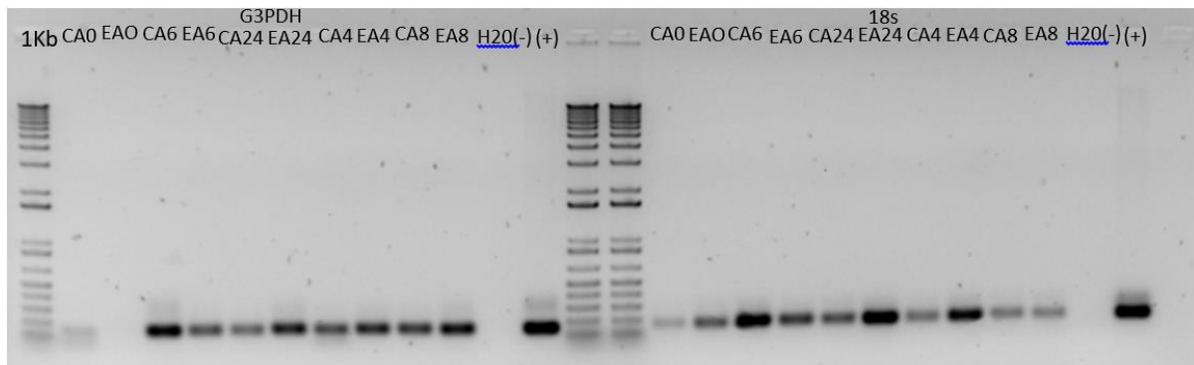


Figura 29. Muestras de cDNA del ensayo con *M. tanajoa* amplificadas con los primers G3PDH y 18s respectivamente. Como positivo se usó una muestra de DNA de 60444.

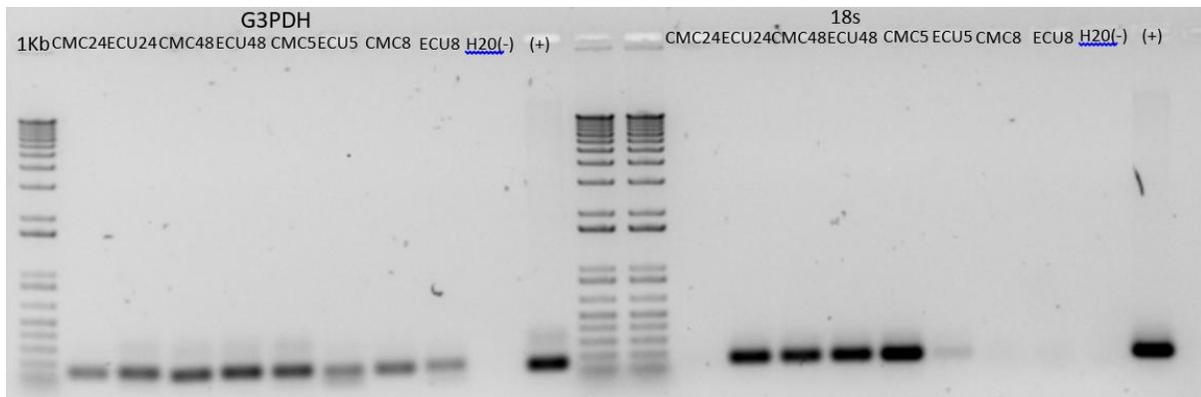


Figura 30. Muestras de cDNA del ensayo con *A. socialis* amplificadas con los primers G3PDH y 18s respectivamente. Como positivo se usó una muestra de DNA de 60444.

La principal característica de los genes de referencia es la estabilidad en su expresión, la cual no se debe ver afectada sin importar el tipo de tejido que se utilice, los tiempos de desarrollo o las condiciones físicas (Wang *et al.*, 2014, Galli *et al.*, 2015). Galli *et al.*, (2015) en su trabajo utilizó diferentes herramientas para poder evaluar los genes de referencia como NormFinder y geNorm. Como resultado obtuvo que para muestras de fresa analizadas, los genes de referencia 18s y G3PDH fueron los que menos presentaron estabilidad, al igual que en el trabajo de Clancy *et al.*, (2013) donde obtuvo el mismo resultado, sugiriendo así que estos genes de referencia tradicionales no son adecuados para normalizar datos de RT-qPCR. De acuerdo a los análisis realizados, los mejores genes de referencia para utilizar son los genes UBQ11 y HISTH4.

Wang *et al.*, (2014) encontró que en la especie arbórea *Populus euphratica*, los genes de referencia G3PDH y 18s fueron los que más se vieron afectados de acuerdo a diferentes tipos de estrés que se maneja para evaluarlos, determinando la inestabilidad de estos genes para su uso en pruebas de RT-qPCR. Y en adición encontró que los mejores genes de referencia para ser utilizados son los RPL17 frente al tratamiento de ácido abisícico, EF1 $\alpha$  para el tratamiento de frío, HIS para estrés de deshidratación. En un trabajo realizado en yuca por Hu *et al.*, (2016) encontró que de los genes de referencia evaluados los que presentaron menor estabilidad fueron el G3PDH y ACT7. Esto nos puede indicar por qué a pesar de que se realiza una PCR convencional se obtiene cierta calidad de las bandas y por qué en algunas muestras no se ve reflejada la amplificación de los genes, esto también se puede ver afectado por la calidad de la muestra o por la concentración a la que se maneja sugiriendo así, manejar otro tipo de concentración de la muestra.

## 9. CONCLUSIONES

Se estandarizaron los genes de referencia G3PDH y 18s para el ensayo tanto de ácaro verde (*M. tanajoa*) y mosca blanca (*A. socialis*) utilizando PCR convencional.

Se comprueba la preferencia de la oviposición y alimentación de las dos plagas (ácaro verde y mosca blanca) para el genotipo susceptible CMC 40 y para el genotipo resistente ECU-72 se comprueba la poca preferencia para la oviposición.

En la caracterización de los promotores de los genes BSMT1, F-BOX y cysteine protease inhibitor, se obtiene el resultado esperado en cuanto a los motivos *cis* que comparten estos genes para las especies manejadas (*A. thaliana* y *M. esculenta*), siendo el motivo G-box que siempre estuvo presente en las dos especies, al igual que el ABRE y ARE, dentro de los motivos relacionados con el ácido salicílico se obtiene que el TC-rich y SARE, están presente para las dos especies al igual que el motivo TCA-element, relacionado con la respuesta al estrés y defensa de la planta, junto con el motivo relacionado con la respuesta a las heridas. Estos motivos marcan una característica importante para los genes ya que actúan en la defensa para la planta.

## **PERSPETIVAS**

Desarrollar primers específicos para los motivos *cis* relacionados con la defensa y ácido salicílico en el modelo *M. esculenta*, para así amplificar esa región en específico y ver cómo se comportan los genes al encender o apagar estos motivos.

El software Genevestigator, no arrojó genes relacionados con la vía del ácido salicílico, sin embargo los genes que se encontraron, son propicios para analizar y complementar el trabajo.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Anand, A. Schmelz, E.A. y S. Muthukrishnan. 2003. Development of a lesion-mimic phenotype in a transgenic wheat line overexpressing genes for pathogenesis-related (PR) proteins is dependent on salicylic acid concentration. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16: 916-925
- Appel, H. M., Fescemyer, H., Ehling, J., Weston, D., Rehrig, E., Joshi, T., Schultz, J. (2014). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to chewing and sucking insect herbivores. *Frontiers in Plant Science*, 5(November), 1–20. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00565>
- Arias, B. 1995. Estudio sobre el comportamiento de la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) en diferentes genotipos de yuca, *Manihot esculenta* Crantz, Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, p.167
- Asahina, M., Azuma, K., Pitaksaringkarn, W., Yamazaki, T., Mitsuda, N., OhmeTakagi, M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Okada, K., Nishimura, T. et al. (2011). Spatially selective hormonal control of RAP2.6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108,16128-16132
- Bartsch T, Drexl A and Kröger S 2006. Scheduling the professional soccer leagues of Austria and Germany. *Comput Opns Res* 33: 1907–1937
- Basehoar, A. D., Zanton, S. J., and Pugh, B. F. (2004). Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* 116, 699–709. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00205-3
- Bednarek, P., Schneider, B., Svatos, A., Oldham, N.J. and Hahlbrock, K. (2005) Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 138, 1058–1070.
- Bellotti, A. C. & Vargas, O. 1986. Mosca blanca del cultivo de yuca: Biología y control; Unidad Audiotutorial, CIAT, Cali

- Bellotti, A. C.; Smith, L.; Lapointe, S. L. 1999. Recent advances in cassava pest management. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Londrina, Brasil* 44 (1): 343-370.
- Bellotti AC, & Arias B. 2001. Host plant resistance to whiteflies with emphasis on cassava as a case study. *Crop Protection* 20:813-823
- Bellotti A, Arias B, Vargas H, Reyes J, Guerrero J. 2002. Insectos y ácaros dañinos a la yuca y su control. *La Yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Compilado y dirigido por Bernardo Ospina y Hernán Ceballos (Capítulo 10: pp 160- 203). Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. (Publication CIAT N° 327). Cali, Colombia. 586p*
- Bellotti, A. 2008. Cassava pest and their management. *Encyclopedia of Entomology*. In: J.L. Capinera, Kluwer, Dordrecht.
- Bellotti, A.C., Herrera, C.L., Hernandez, M.P., Arias, B., Guerrero, J.M., Melo, E.L. 2012. Cassava Pests in Latin America, Africa and Asia. In R.H. Howeler, ed. *The Cassava Handbook –A reference manual based on the Asian regional cassava training course, held in Thailand. Cali, Colombia, CIAT. pp. 199-257.*
- Bohórquez, A. 2011. Aislamiento de secuencias expresadas diferencialmente durante la respuesta de defensa al ataque de la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*) en el cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mediante genómica funcional.
- Burbano, M.; Carabalí, A.; Montoya-L., J.; Bellotti, A. C. 2007. Resistencia de especies de *Manihot* a *Mononychellus tanajoa* (Acariformes), *Aleurotrachelus socialis* y *Phenacoccus herreni* (Hemiptera). *Revista Colombiana de Entomología* 33 (2): 110-115.
- Brand, Y., Hovav, R., 2010. Identification of suitable internal control genes for quantitative real-time PCR expression analyses in peanut (*Arachis hypogaea*). *Peanut Sci.* 37, 12–19.
- Burley S.K., Roeder R.G., 1996. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID), *Annual Review of Biochemistry* 65 769–799.
- Calatayud PA, & Munera DF. 2002. Defensas naturales de la yuca a las plagas de

- atrópodos. In: Ospina, B.; Cebbalos, H. (eds). La Yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Co. P. 250-254.
- Carabalí A, Bellotti A, Montoya-Lerma J, Fregene M. 2010. Resistance to the whitefly, *Aleurotrachelus socialis*, in wild populations of cassava, *Manihot tristis*. Journal of Insect Science 10:170
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell 124: 803–814
- Ceballos, H., Fregene, M., Lentini, Z., Puentes, J., Perez, J., Rosero, A., Tofiño, A. 2006. Development and identification of high-value cassava clones. Acta Hortícola 703: 63-70.
- Choperena, E. P. M.; Ospina, C.; Fregene, M.; Montoya-Lerma, J.; Bellotti, A. C. 2012 Identificación de microsatélites en yuca asociados con la resistencia al ácaro *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae). Revista Colombiana de Entomología. v. 38, n. 1, p. 70-75.
- CIAT. 2002. La yuca en Colombia y el mundo: nuevas perspectivas para un cultivo milenario. La yuca en el tercer milenio. Publicación CIAT. Cali, Colombia.
- CIAT. 1983. CIAT informe anual. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali,
- Clancy, M.A., Rosli, H.G., Chamala, S., Barbazuk, W.B., Civello, P.M., Folta, K.M., 2013. Validation of reference transcripts in strawberry (*Fragaria* spp.). Mol. Gen. Genomics. 288, 671–681.
- Costa, EZ.C., Teodoro, A.V., Rêgo, A.S., Maciel, A.G., and Sarmiento, R.A. 2012. Population structure and dynamics of the cassava green mite *Mononychellus tanajoa* (Bondar) and the predator *Euseius ho* (DeLeon) (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae). Arthropods 1: 55-62.
- Delaney, T.P. Uknes, S. Vernooij, B. Friedrich, L. Weymann, K. Negrotto, D. Gaffey, T. Gut-Rella, M. Kessman H. Ward E. y J. Ryals. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science. 266: 1247–1250
- Dodds, P. N., and Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. Nat. Rev. Genet. 11, 539–548. doi: 10.1038/nrg2812

- Evans G. A. (2008). The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of the world and their host plants and natural enemies. In World Whitefly Catalog, [http://www.sel.barc.usda.gov:591/1WF/World White-fly-Catalog.pdf](http://www.sel.barc.usda.gov:591/1WF/World%20White-fly-Catalog.pdf)
- Faria, M., Wraight, S. 2001. Biological control of Bemisia tabaci with fungi. Crop Protection 20 (9): 767-778. Farmer, E.E. 2001. Surface-to-air signals. Nature 411(6839): 854-856.
- FAO (2015) Global Administrative Unit Layers (GAUL). <http://www.fao.org/geonetwork/srv/en/metadata.show?id=12691>
- FAOSTAT. 2011 . FAO Statistics Division 2011 . Disponible en: URL: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>
- FAO. 2012. Food outlook. Global market analysis – November 2012. Rome.
- FAO, 2000. La economía mundial de la yuca, hechos tendencias y perspectivas. Roma-Italia. Food & Agriculture Organization of the United Nations 78 p.
- Fleisher, E. 2007 .Jasmonates in Cancer Therapy. Cancer Letters (245): p.1 -10
- Fluhr, R. 2001. Sentinels of disease. Plant resistance genes. Plant Physiology 127 (4): 1367-1374.
- Gaffey, T. Friedrich, L. Vernooij, B. Negrotto, D. Nye, G. Uknes, S. Ward, E. Kessmann, H. y J. Ryals. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. Science. 261: 754–756.
- Galli, V., Borowski, J. M., Perin, E. C., Messias, R. da S., Labonde, J., Pereira, I. dos S., ... Rombaldi, C. V. (2015). Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in strawberry fruits using different cultivars and osmotic stresses. Gene, 554(2), 205–214. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2014.10.049>
- Garg, R., Sahoo, A., Tyagi, A., Jain, M., 2010. Validation of internal control genes for quantitative gene expression studies in chickpea (Cicer arietinum L.). Biochem. Biophys. Res. Commun. 396, 283–288.
- Gutierrez, A. P., Yaninek, J. S., Wermelinger, B., Herren, B., & Ellis, C. 1988. Analysis Of Biological Control Of Cassava Pests In Africa. III. Cassava Green Mite Mononychellus tanajoa.

- Herrera-Vásquez, A., Salinas, P., & Holuigue, L. (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in Plant Science*, 6(March), 1–9. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00171>
- Heyman, J., Canher, B., Bisht, A., Christiaens, F., & Veylder, L. De. 2017. Emerging role of the plant ERF transcription factors in coordinating wound defense responses and repair.
- Hu, M., Hu, W., Xia, Z., Zhou, X., & Wang, W. 2016. Validation of Reference Genes for Relative Quantitative Gene Expression Studies in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by Using Quantitative Real-Time PCR. *Frontiers in Plant Science*, 7(May), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00680>
- Hughes, J. R., Roberts, N., MCGowan, S., Hay, D., Giannoulatou, E., Lynch, M., ... Higgs, D. R. 2014. Analysis of hundreds of cis-regulatory landscapes at high resolution in a single, high-throughput experiment. *Nature Genetics*, 46(2), 205–212. <http://doi.org/10.1038/ng.2871>
- Hruz, T., Wyss, M., Docquier, M., Pfaffl, M.W., Masanetz, S., Borghi, L., Verbrugghe, P., Kalaydjieva, L., Bleuler, S., Laule, O., 2011. RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics* 12, 156
- Hwang, S.H. Lee, I.A. Yie, S.W. y D.J. Hwang. 2008. Identification of an OsPR10a promoter region responsive to salicylic acid. *Planta*. 227: 1141–1150.
- Ibraheem, O., Botha, C. E. J., & Bradley, G. 2010. In silico analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa* Japonica) and *Arabidopsis thaliana*. *Computational Biology and Chemistry*, 34(5–6), 268–283. <http://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2010.09.003>
- Jansson, C., Westerbergh, A., Zhang, J., Hu, X., Sun, C. 2009. Cassava, a potential biofuel crop in (the) People's Republic of China. *Applied Energy* 86, Supplement 1: S95-S99.
- Karlsson M. F. 2005. Control de mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*) en yuca (*Manihot esculenta*). Swedish University of Agricultural Sciences SLU Communications. Minor Field Studies N° 325
- Kawano, K. 2003. Thirty years of cassava breeding for productivity – biological and social

- factors for success. *Crop Science*. 43 (4) 1 325-1335.
- Kessler, A., Baldwin, I.T. 2001 . Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291 :21 41 –44.
- Khokon, A. R., Okuma, E., Hossain, M. A., Munemasa, S., Uraji, M., Nakamura, Y. 2011. Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 34, 434–443. doi:10.1111/j.1365-3040.2010.02253.
- Kowalczyk, M.S. et al. Intragenic enhancers act as alternative promoters 2012. *Mol. Cell* 45, 447–458
- Lee T.I., Young R.A., 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes, *Annual Review of Genetics* 34 77–137
- Liu, P., Sun, F., Gao, R. and Dong, H. 2012. RAP2.6L overexpression delays waterlogging induced premature senescence by increasing stomatal closure more than antioxidant enzyme activity. *Plant Mol. Biol.* 79, 609-622.
- Lloyd, G., Landini, P., Bushby, S., 2001. Activation and repression of transcription initiation in bacteria. *Essays Biochem.* 37, 17–31.
- Navajas, M., Gutierrez, J., Bonato, O., Bolland, H.R. and Mapangou–Devassa, S. 1994. Intraspecific diversity of the cassava Green mite *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondria and nuclear ribosomal DNA sequences and cross breeding. *Experimental and Applied Acarology* 18: 351-360.
- Nhassico, D., Muquingue, H., Cliff, J., Cumbana, A., Bradbury, J.H. 2008. Rising African cassava production, diseases due to high cyanide intake and control measures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 2043-2049.
- Mammarella, N. D., Cheng, Z., Fu, Z. Q., Daudi, A., Bolwell, G. P., Dong, X., et al. 2014. Apoplastic peroxidases are required for salicylic acid-mediated defense against *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry* doi: 10.1016/j.phytochem.2014.07.010
- Marín Colorado JA. 2015. Caracterización Molecular de la Resistencia en Yuca (*Manihot esculenta* Crantz) al ataque del ácaro verde (*Mononichellus tanajoa*): una aproximación proteómica. Tesis de doctorado. Universidad del Valle - Univalle.
- Melnyk, C. W. 2017. Connecting the plant vasculature to friend or foe. *New Phytol.* 213, 1611-1617.

- Mesa, N., Bellotti, A., Duque, M. 1987. Tablas de vida de *Mononychellus progresivus* Doreste y *Tetranychus urticae* (Koch) (Acarina: Tetranychidae) en yuca. Revista Colombiana de Entomología 13 (2): 11-22.
- Molina C., Grotewold E., 2005 Genome wide analysis of Arabidopsis core promoters, BMC Genomics 6 25, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-1186-1125>.
- Moreno, I., Grisseem, W., Vanderschuren, H. 2011. Reference genes for reliable potyvirus quantitation in cassava and analysis of Cassava brown streak virus load in host varieties. Journal of virological methods, 177(1), 49-54.
- Miura, K., and Tada, Y. 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. Front. Plant Sci. 5:4. doi: 10.3389/fpls.2014.00004
- Mutisya D.L., Molo R. El-Banhawy E.M, Miano D., Kariuki C.W., Owiti A. And Aool W. 2016. Phylogenetic Diversity Of Cassava Green Mite, *Mononychellus Progresivus* From Different Geographical Sites In East Africa.
- O'Brien, J. A., Daudi, A., Finch, P., Butt, V. S., Whitelegge, J. P., Souda, P., et al. 2012. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured Arabidopsis cells functions in MAMP-elicited defense. Plant Physiol. 158, 2013– 2027. doi: 10.1104/pp.111.190140
- Parsa, S., Hazzi, N. A., Chen, Q., Lu, F., Herrera Campo, B. V., Yaninek, J. S., & VásquezOrdóñez, A. A. 2015. Potential geographic distribution of two invasive cassava green mites. Experimental and Applied Acarology, 65(2), 195–204.
- Pallangyo B, Hanna R, Toko M, Gnanvossou D, Mgoo V, Otema M, Onzo A, Hountondji F, Nsami E, Mfugale O, 2004. Biological control of cassava green mite in Tanzania. Proceedings of 9th Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops - Africa Branch (ISTRIC - AB) Mombasa, Kenya 1 - 5 Nov 2004 IITA [ed. by Mahungu, N. \Manyong, V.]. Mombasa, Kenya, Africa: IITA, 597-604 pp.
- Poiatti V. A. D., Dalmas F. R., Astarita L. V. 2009. Defense mechanisms of *Solanum tuberosum* L. in response to attack by plant-pathogenic bacteria. Biol. Res. 42 205–215.
- Rani, V., 2007. Computational methods to dissect cis-regulatory transcriptional networks.

- J. Biol. Sci. 32 (7), 1325–1330.
- Rangel Sánchez, G., Castro Mercado, E., Beltran Peña, E., Reyes de la Cruz, H., & García Pineda, E. 2010. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*, 12(2), 90–95.
- Rêgo, A.S., Teodoro, A.V., Maciel, A.G.S., and Sarmento, R.A. 2013. Relative contribution of biotic and abiotic factors to the population density of the cassava green mite, *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* 60: 479-484.
- Sasaki, K., Hiraga, S., Ito, H., Seo, S., Matsui, H. and Ohashi, Y. 2002. A woundinducible tobacco peroxidase gene expresses preferentially in the vascular system. *Plant Cell Physiol.* 43, 108-117.
- Savatin, D. V., Gramegna, G., Modesti, V. and Cervone, F. 2014. Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage. *Front Plant Sci.* 5, 470.
- Segal, E., Friedman, N., Kaminski, N., Regev, A., and Koller, D. 2005. From signatures to models: understanding cancer using microarrays. *Nat. Genet.* 37(Suppl.) S38–S45. doi: 10.1038/ng1561
- Shah, J. 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology.* 6: 365–371
- Shukla PT, 1976. Preliminary report on the green mite (*Mononychellus tanajoa*, Bonder) resistance in Tanzanian local cassava varieties. *East African Agricultural and Forestry Journal*, 42(1):55-59.
- Skovgard, H., J. Tomkiewicz, M. Münster-Swedensen, and G. Nachman. 1993. The dynamics of the cassava green mite *Mononychellus tanajoa* in a seasonally dry area in Kenya. *Exp. Appl. Acarol.* 17: 41-58.
- Soto-Suárez, M., Restrepo, S., Mosquera, G., Verdier, V., & Tohme, J. 2006. Análisis de expresión génica durante la respuesta de defensa de la yuca a la bacteriosis vascular (añublo bacteriano). *Revista Colombiana de Biotecnología* Vol. 8 Nom 2.
- Strucker, A., Falkyner, H., Cesar, A., Lima, S., Alves, M. A., & Trassato, L. B. 2017. Preferência alimentar e de oviposição do ácaro-verde ( Acari: Tetranychidae ) em diferentes genótipos de mandioca em Roraima, 248–257.

- Vernooij, B. Friedrich, L. Goy, P.A. Saub, T. Kessmann, H. y J. Ryals. 1995. 2,6-dichloroisonicotinic acid induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8: 228–234
- Vlot, A.C. Dempsey, D.A. y D.F. Klessig. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*. 47: 177-206.
- Wang, H.-L., Chen, J., Tian, Q., Wang, S., Xia, X., & Yin, W. 2014. Identification and validation of reference genes for *Populus euphratica* gene expression analysis during abiotic stresses by quantitative real-time PCR. *Physiologia Plantarum*, 152(3), 529–545. <http://doi.org/10.1111/ppl.12206>
- Wrzaczek, M., Brosche, M., and Kangasjarvi, J. 2013. ROS signaling loops production, perception, regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 575–582. doi: 10.1016/j.pbi.2013.07.002
- White RF. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus. *Virology* 99 410-412.
- Yonow, T. and Kriticos, D.J. 2014. *Mononychellus tanajoa* Geography. St. Paul, MN: InSTePP-HarvestChoice.
- Zou, C., Sun, K., Mackaluso, J. D., Seddon, A. E., Jin, R., Thomashow, M. F., et al. 2011. Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 14992–14997. doi: 10.1073/pnas.1103202108