

CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS DE TOMATE TRANSFORMADAS CON EL GEN EFR

Arruabarrena, A.^{1*}, Stransfeld, L.², Dalla Rizza, M.³, Zipfel, C.²

¹Laboratorio de Biotecnología, INIA Salto Grande, Camino al Terrible s/n, CP. 50000, Salto, Uruguay

²The Sainsbury Laboratory, Norwich Research Park, Norwich, NR4 7UH, UK.

³Unidad de Biotecnología, Estación Experimental “Wilson Ferreira Aldunate”, Ruta 48 Km. 10, Rincón del Colorado, CP. 90.200, Canelones, Uruguay.

*aarruabarrena@inia.org.uy

Palabras clave: tomate, EFR, resistencia a enfermedades.

Introducción

Las plantas tienen la capacidad de reconocer patógenos a través de dos sistemas de percepción. Un sistema detecta moléculas microbianas o celulares, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o daño celular (DAMPs). Esta percepción se lleva a cabo mediante receptores de reconocimiento de patrones bacteriano/celular (PRRs, pattern-recognition receptors) y desencadena la inmunidad activada por PAMPs (PTI). El otro sistema reconoce efectores microbianos a través de proteínas de resistencia (proteínas R). El mismo, desencadena la inmunidad activada por efectores (ETI). El receptor EFR es una PRR de *Arabidopsis thaliana* que reconoce el factor de elongación Tu (EF-Tu) y desencadena la inmunidad activada por PAMPs (PTI) (Zipfel C, et al., 2006). EF-Tu es una de las proteínas más conservadas y abundantes en bacterias, sin embargo, el receptor EFR se encuentra restringido a la familia de las Crucíferas. La expresión de este receptor en especies vegetales de otras familias confiere a las mismas la capacidad de desencadenar la PTI en respuesta a EF-Tu (Lacombe S, et al., 2010). El objetivo de este trabajo es caracterizar líneas de tomate transformadas con el gen *EFR* de *A. thaliana* y determinar si las mismas adquieren capacidad de desencadenar la PTI en respuesta a EF-Tu.

Metodología

Plantas de tomate de la variedad Milongón fueron transformadas en The Sainsbury Laboratory (UK) con una construcción para sobreexpresión del gen EFR. Se analizaron plantas de siete líneas de tomate transformadas con esta construcción (Líneas 4, 6, 8, 10, 16, 20, 29).

Se realizaron extracciones de ADN, ARN y proteínas de plantas transformadas y de plantas control wt (sin transformar). Se constató la presencia del inserto mediante PCR con primers específicos para EFR. Se realizaron análisis de la expresión de ARNm mediante PCR en tiempo real y análisis de la expresión de la proteína mediante Western blot. Finalmente se determinó la capacidad de las líneas de reconocer al péptido elf18 (parte EF-Tu) y desencadenar la PTI mediante la cuantificación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) de las diferentes líneas al ser tratadas con el péptido elf18.

Resultados y Discusión

Todas las líneas de plantas analizadas presentaron el inserto del gen EFR cuando se realizó la amplificación por PCR con primers específicos a diferencia de las plantas wt control donde no se observó la presencia de amplicón. En algunas de las plantas analizadas no se observó presencia del inserto. Esto se debe a que las plantas analizadas corresponden a la generación

T1 y fueron sembradas en tierra, sin selección por resistencia a antibiótico; por lo tanto, el inserto está segregando.

Para el análisis de la expresión génica se analizaron únicamente las líneas 4, 6, 8, 20 y 29 y se utilizaron tres plantas de cada línea. Se comparó la expresión del ARNm de *EFR* con respecto a plantas wt. Se determinó que la línea que tiene mayores niveles de expresión a nivel transcripcional es la línea 6 (Figura 1a). Lo mismo se observó a nivel proteico; las plantas de la línea seis presentan niveles mayores de expresión de la proteína EFR (Figura 1b).

En la determinación los niveles de producción de ROS y, por lo tanto, la capacidad de reconocer al péptido elf18 se observó que la línea 6 presenta niveles intermedios de producción de ROS (Figura 1c). El hecho de que esta línea presenta altos niveles de expresión del ARN y de la proteína no se corresponde con los niveles intermedios de capacidad de respuesta a elf18 e inducción de la PTI. Este resultado podría deberse a que la proteína producida no es totalmente funcional, por lo que la cantidad de receptor EFR que realmente reconoce a elf18 podría ser menor de lo observado en los análisis de expresión de ARNm y proteínas.

Las líneas que presentaron niveles mayores de inducción de la PTI (medido por acumulación de ROS) fueron las líneas 4, 20 y 29 (Figura 1c). Estas líneas serán seleccionadas para realizar futuros análisis como determinación del número de copias del inserto e inoculaciones con bacterias fitopatógenas.

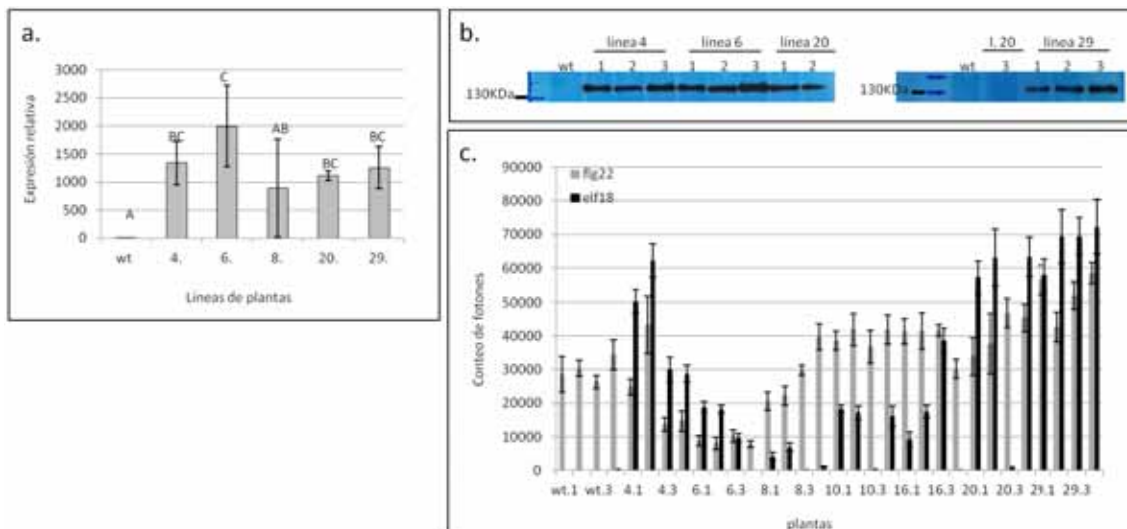


Figura 1. a. Niveles de expresión de ARNm de EFR. b. Niveles de expresión de proteína de EFR. c. Niveles de acumulación de ROS.

Bibliografía

Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse HP, Smoker M, Rallapalli G, Thomma BP, Staskawicz B, Jones JDG, Zipfel C.

2010. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat Biotechnol* 28: 365–369.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125: 749–760.