

BUSCANDO NUEVAS HERRAMIENTAS PARA CONTROLAR UN VIEJO ENEMIGO: EMPLEO DEL RECEPTOR EFR EN TOMATE PARA EL CONTROL DE *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS*.

Marco Dalla Rizza¹, Sara Murchio¹, Vilma Wallace², Federico Boschi³, Matías Maidana¹, Claudia Schvartzman¹, Gustavo Giménez² y Diego Maeso²

¹Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas

²Programa Nacional de Horticultura, INIA Las Brujas

³INASE

Introducción

La ingeniería genética es considerada una herramienta más dentro del mejoramiento genético de plantas que puede facilitar la disponibilidad de genes cercanos o lejanos de la especie introducidos en su genoma mediante técnicas biotecnológicas. Una de las principales ventajas de esta herramienta es mejorar en las plantas alguna característica de interés productivo, de manejo y de resistencia a estrés, plagas y enfermedades, entre otras, utilizando un rango de genes más amplio.

Cada una de las variantes de la integración del transgén que se encuentran en plantas transformadas se denomina *evento*. Los eventos pueden diferir en la posición del transgén en el genoma, el número de copias y el nivel de integridad del transgén. El desarrollo de los eventos transgénicos puede ser limitado por muchos factores incluyendo los niveles de expresión, la estabilidad de la inserción y su herencia, y la identificación de eventos simples de inserción. Cuando se realiza una transformación genética generalmente se obtienen plantas hemicigotas T0 (el transgén se inserta sin una contraparte alélica) que sucesivamente deben pasar por una serie de cruzamientos dirigidos para obtener plantas homocigotas pasando simultáneamente por un proceso de selección buscando inserciones simples, con alta expresión de la característica y estable. En el caso de tomate, después de la inserción del transgén (evento primario T0), se realizan autofecundaciones sucesivas hasta llegar a T3/T4 para obtener progenies con alto porcentaje de homocigosis para el carácter deseado.

El cancro bacteriano del tomate es causado por el actinomicete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y es una de las enfermedades más importantes del cultivo en Uruguay. El mejoramiento genético presenta algunas soluciones con fuentes parciales de resistencia en especies emparentadas. El control químico de estas enfermedades es prácticamente imposible de realizar, ya que los pesticidas estudiados han mostrado muy baja efectividad. El patógeno sobrevive en la semilla en bajos niveles y este medio es la principal fuente de transmisión del inóculo primario. Sin embargo, cuenta con una diseminación muy eficiente a través del agua y las labores que se realizan sobre el cultivo por lo que una vez introducido, la infección se generaliza rápidamente y se pierde el cultivo en su totalidad (Xu et al. 2013). La enfermedad suele encontrarse en forma latente y los síntomas se desarrollan una vez que la planta alcanza la madurez. Los mismos comienzan con el marchitamiento unilateral y la posterior necrosis de las hojas basales. Luego la enfermedad asciende y finalmente la planta se marchita completamente. Este marchitamiento puede estar acompañado de canchros en tallos y pecíolos y manchas necróticas en los folíolos. Además se suelen observar síntomas derivados de la transmisión secundaria los cuales se manifiestan como necrosis marginal de la lámina.

El receptor EFR proveniente de *Arabidopsis thaliana* es un receptor de membrana que reconoce patrones moleculares asociados a patógenos el que puede detectar bacterias fitopatógenas. El reconocimiento del factor de elongación EF-Tu de la bacteria desencadena la resistencia basal de la planta. Lacombe et al., (2010) han reportado que la transferencia de este gen *efr* a plantas de tomate ha sido exitosa para aumentar el grado de resistencia al cancro bacteriano causado por *Xanthomonas campestris*. El objetivo de este trabajo es profundizar en la caracterización de la transformación con este gen hacia la generación de variantes de tomate resistentes a *Clavibacter michiganensis*. Particularmente, determinar el porcentaje de plantas transformadas de tomate en T2 y T3 que presentan el gen *efr* de *A. thaliana* obtenidas mediante autofecundación y realizar una primera evaluación de inoculación con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Metodología

Plantas de tomate de la variedad Milongón fueron transformadas en The Sainsbury Laboratory (UK) con una construcción para expresión del gen *efr*. En enero de 2015 se recibieron semillas de líneas T1 y T2 de tomate transformadas con esta construcción (Líneas 4, 6, 16, 20, 29) las que se sembraron en almacigueras en tierra tref estéril y adecuada fertilización para completar el ciclo y poder cosechar la semilla bajo estrictas normas de bioseguridad.

Lo primero que se debe estudiar en este método de mejoramiento genético es la presencia del transgén en cada línea de mejoramiento. Se constató la presencia del inserto mediante PCR con primers específicos para *efr* a partir de ADN genómico de plantas transformadas T2 y T3 y de plantas control sin transformar (WT). Como control de amplificación se empleó gen endógeno de papa lat52 en la misma reacción de PCR.

Se evaluó la respuesta de los eventos a la infección por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mediante inoculación con este microorganismo y seguimiento de los síntomas. Para ello inicialmente se inocularon plantas T2 por el método de punción axilar con 10^8 UFC/ml de la cepa 17 LB de Cmm de la colección del laboratorio de Fitopatología de INIA LB (16/4/2015). Las plantas fueron mantenidas en cámara húmeda embolsadas en plástico 24 horas antes y después de la inoculación (Figura 1).

Las condiciones de temperatura y humedad relativa en la cámara donde se llevó a cabo el experimento fueron registradas mediante un equipo ibutton Hygrochrom. Los valores promedio diarios se muestran en la figura 2. La temperatura se mantuvo cercana a 20°C y la HR superior a 70% siendo valores adecuados para el desarrollo de la enfermedad.

En el Cuadro 1 se describen los materiales inoculados y sus características.

Cuadro 1. Materiales de tomate Milongón transformado inoculados con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Línea	N° de plantas	
	Con inserto	Sin inserto
16	12	1
20	5	0
6	12	7
4	14	14
29	20	6

Al mismo tiempo se inocularon cuatro plantas sin modificar con el patógeno y dos con agua estéril.



Figura 1. Colonias Cmm, solución para inoculación, método de inoculación, pos inoculación

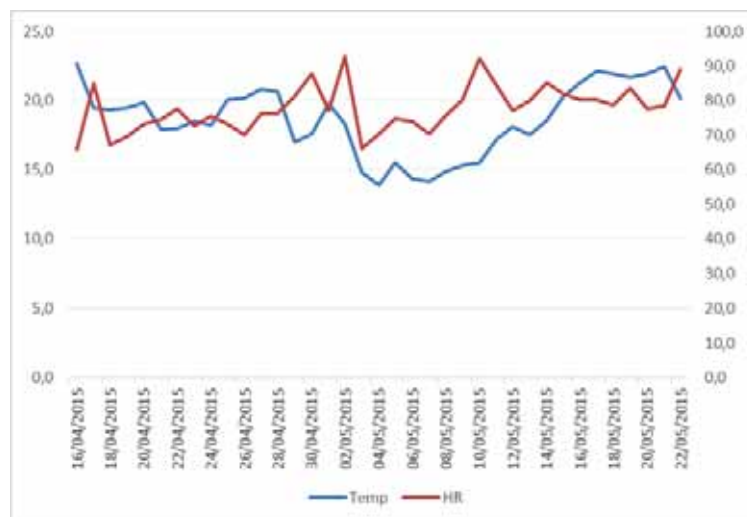


Figura 2. Promedio diario de temperatura y humedad relativa durante el experimento.

Los primeros síntomas aparecieron a los 18 días pos inoculación y se evaluaron externa e internamente.

Se registró el número de plantas con: 1) necrosis de la zona de inoculación, 2) amarillamiento de hojas inferiores, 3) marchitamiento de hojas inferiores, 4) necrosado de bordes de hojas, 5) marchitamiento de la mitad de hojas, 6) marchitamiento apical, 7) líneas en tallo y 8) canchros entre los 18-32 dpi.

A 35 dpi (21/5/2015) se cortaron longitudinalmente los tallos de las plantas inoculadas y se evaluó el estado de vasos y médula. Los 5 cm correspondientes al sector inoculado fueron conservados en heladera y fueron analizados mediante la prueba ELISA utilizando el antisuero monoclonal para CMM comercializado por AGDIA Inc. siguiendo el protocolo recomendado por la empresa.

Los síntomas se clasificaron en: a) tejido esponjoso no necrosado, b) médula amarronada, c) vasos amarronados, y d) puntos marrones en la sección.

Se calculó el porcentaje de plantas que presentaban cada tipo de síntomas en cada línea con y sin inserto. También se analizó el porcentaje de plantas que presentaban al menos uno de estos síntomas.

A los 70 dpi (25/6/2015) se evaluó el porcentaje de plantas que habían rebrotado luego del corte y el estado del tejido vascular y médula restante. Algunas de esas plantas fueron analizadas por ELISA.

Resultados y Discusión

Se analizaron en promedio 30 plantas por línea en las generaciones T2 y T3. La mayoría de 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 del transgén (Fig. 1). En algunas de las plantas analizadas no se observó presencia del inserto lo que puede deberse a que las plantas analizadas corresponden a la generación T2 y T3 donde en cada autofecundación el inserto está segregando. Es esperable observar un aumento del porcentaje de plantas transformadas al incrementar el número de autofecundaciones (Tabla 1).

Cuadro 2. Porcentaje de plantas transformadas determinado en líneas transformadas de tomate para las generaciones T2 y T3 determinadas mediante PCR.

Porcentaje /Línea	4	6	16	20	29
T2	60	59	84	67	80
T3	90	80	100	90	85

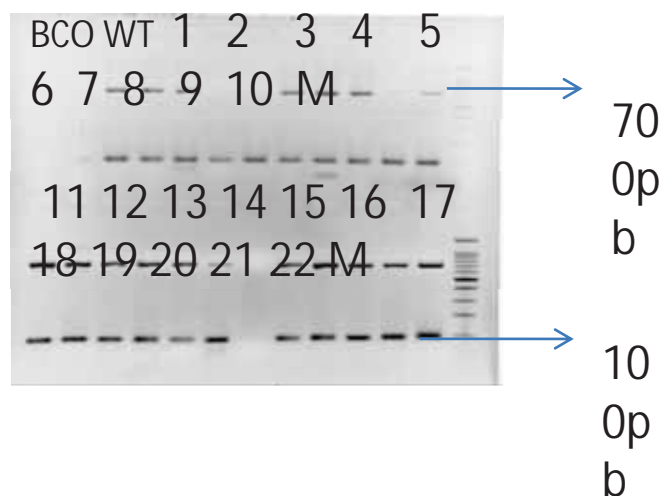


Figura 3. Productos de amplificación del gen *efr* (peso aproximado de banda 700 bp) y del gen endógeno *lat 52* de tomate (peso aproximado de banda 100 pb) observados en la línea 4, generación T3.

De acuerdo a lo esperado, al aumentar el número de autofecundaciones se obtienen proporciones mayores de plantas con el gen *efr* y se espera asimismo un aumento de la frecuencia de plantas homocigotas.

Las inoculaciones realizadas en las plantas T2 no mostraron diferencias importantes entre los controles sin transformar y los eventos analizados. Esto pudo deberse a que el método de inoculación fue muy agresivo y a que el material no tiene el transgén en homocigosis. Actualmente se está evaluando la inoculación de plantas T3 mediante corte de raíces, el cual se asemeja a la infección en campo.

Cuadro 3. Porcentaje de plantas con síntomas en la evaluación final.

	Amarillamiento hoja inferior	Marchitamiento hoja inferior	Necrosis borde hojas	Marchitez foliar unilateral	Marchitez apical	Necrosis zona inoculada	Líneas en tallo	Cancro
Sin inserto	96	100	96	100	61	89	82	89
Con inserto	100	97	100	94	57	86	70	75
Testigo inoculado	100	100	100	100	50	100	100	25

Cuadro 4. Días promedio a aparición de síntomas.

	Amarillamiento hoja inferior	Marchitamiento hoja inferior	Necrosis borde hojas	Marchitez foliar unilateral	Marchitez apical	Necrosis zona inoculada	Líneas en tallo	Cancro
Sin inserto	22	26	23	24	26	21	26	28
Con inserto	21	24	24	26	25	22	27	28
Testigo inoculado	18	18	24	21	26	18	25	31

Perspectivas y estudios a futuro

En la estación de INIA Las Brujas se están realizando ensayos de investigación en el cual se inocula la planta con la bacteria patógena para evaluar su respuesta de resistencia a la enfermedad. Los resultados preliminares obtenidos estimulan a continuar desarrollando el mejoramiento genético por este camino. En futuras etapas del mejoramiento se realizarán nuevos ensayos para observar respuesta a patógenos.



Figura 4. Síntomas de cancro bacteriano observados durante el experimento. Primer fila izquierda a derecha: a) necrosis zona inoculada, b) amarillamiento hojas basales, c) marchitamiento hoja basal, segunda fila de izquierda a derecha: d) necrosis de borde de hoja, e) marchitamiento de mitad de hoja, f) marchitamiento apical, tercer fila de izquierda a derecha: g) líneas en tallos y h,i) cancro.

Referencias Bibliográficas

Arruabarrena A, Stransfeld L, Dalla Rizza M, C Zipfel 2014. Caracterización de líneas de tomate transformadas con el gen *efr*. Serie Actividades de Difusión N° 741. VIII Jornada de Agrobiotecnología INIA.

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.

Xu X, Rajashekara G, Pierce P and S. Miller 2011. Colonization of tomato seedlings by bioluminescent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* under different humidity regimes. Phytopathology, 102, 177-184.