

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE GENOTIPOS TRANSGÉNICOS DE PAPA *Solanum tuberosum* L. CON EL RECEPTOR EFR INOCULADOS CON *Ralstonia solanacearum*

Boschi, F.^{1*} Vilaró, F.² Galván, G.³ Siri, M. Menoni, M. Murchio, S. Ferenczi, A. Dalla Rizza, M.²

¹Área Evaluación y Registro de cultivares. Instituto Nacional de Semillas (INASE)

²Unidad de Biotecnología. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA)

* E-mail: fboschi@inase.org.uy

Introducción

La papa (*Solanum tuberosum*) se encuentra entre los cuarto cultivos alimenticios más importante a nivel mundial, conjuntamente con el arroz, trigo y maíz (FAO, 2012). Con una producción aproximadamente de 300 millones de toneladas por año (Centro Internacional de la papa, CIP 2011) y su tasa de crecimiento es mayor que otros cultivos importantes (CIP, 2009).

La bacteria *Ralstonia solanacearum* es agente causal de la marchitez bacteriana, una de las enfermedades más destructivas nivel mundial. Este patógeno abarca un amplio rango de hospederos (más de 200 especies) y ataca un gran número de cultivos de importancia económica entre ellos la papa, plátano, pimiento, tomate y especies forestales. Está reportado en regiones tropicales, subtropicales y templadas (Hayward, 1994).

En el cultivo de papa la marchitez bacteriana afecta más de 80 países en un área aproximada de 3,75 millones de acres (aproximadamente 1,5 millones de ha), lo que ocasiona un daño económico estimado anual de 950 millones de dólares (Floyd, 2007). Cuando la enfermedad se da puede haber comenzado por la semilla infectada o a partir del suelo, generalmente la infección ingresa a nivel radicular por raíces secundarias o por heridas causadas en el manejo (Genin, 2010). El principal efecto negativo es que después que ingresa el patógeno al campo dependiendo de la raza puede permanecer latente durante años, asociado a especies malezas o silvestres hospederas, restos vegetales y cursos de agua, por lo tanto ese campo productivamente queda inapropiado para futuros cultivos ocasionando un daño actual en el cultivo presente y un daño a futuro restringiendo las opciones productivas (Wenneker *et al.*, 1999; Hayward, 1991).

Es una de las enfermedades más difíciles de controlar debido a la falta de tratamientos curativos, la gran diversidad genética del patógeno, la capacidad de sobrevivencia a distintas condiciones climáticas, los diversos mecanismos de diseminación, persistencia y de patogenicidad (Saddler, 2005). Dada la baja efectividad en el control de la enfermedad en el manejo del cultivo, los esfuerzos están dirigidos hacia el mejoramiento genético. Desde hace más de 40 años se han buscado fuentes de resistencia en especies cercanas a *Solanum tuberosum*, como por ejemplo *S. phureja*, *S. chacoense*, *S. raphanifolium*, *S. sparsipilum* y *S. multidissectum* en distintos programas de mejoramiento. El programa de mejoramiento genético de INIA ha introgresado genes de resistencia de *Solanum comersonii* al germoplasma base de mejoramiento (Gonzalez, 2010).

A nivel molecular las plantas reconocen patógenos potenciales a través de dos modos de percepción: Inmunidad Inducida por Efectores (ETI) o la Inmunidad inducida por PAMP (PTI). Esta última reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o daño (DAMP), a través de receptores de reconocimiento (PRRs) (Jones y Dangl, 2006). Chisholm *et al* (2006)

ilustran el reconocimiento vegetal al PAMP bacteriano y la reacción en cadena de las MAP Kinasas y reprogramación transcripcional mediada por factores de transcripción WRKY de la planta. Las bacterias patógenas utilizan el sistema de secreción de tipo III para liberar proteínas efectoras que se dirigen a múltiples proteínas del huésped para suprimir la respuesta inmune basal (PTI), lo que permite una acumulación significativa de bacterias en el apoplasto de la planta. Las Proteínas R de la planta reconocen la actividad efectora y restauran la resistencia a través de las respuestas inmunes efectoras activadas (ETI).

Lacombe *et al.*, (2010) reportaron que la expresión del receptor de membrana EFR de *Arabidopsis thaliana* en tomate y tabaco le confiere resistencia basal PTI a un amplio rango de bacterias entre las cuales se encuentra *Ralstonia solanacearum*.

En 2012 el Programa de mejoramiento genético de papa y la Unidad de Biotecnología enviaron a transformar el cultivar de papa INIA Iporá y el clon 09509.6 que tiene introgresado gens de *Solanum comersonii* al Laboratorio del profesor Zypfel, The Saynsbury Lab, Norwich, Inglaterra.

Este trabajo se encuentra en el marco de la tesis de maestría de Federico Boschi y tiene como objetivo general: Evaluar la respuesta de los genotipos de papa-efr obtenidos por ingeniería genética a *Ralstonia solanacearum* implementando el protocolo de Bioseguridad para su aplicación en programas de mejoramiento genético.

Metodología

Se trabajó con diez líneas de INIA Iporá y diez líneas del clon 09509.6 transformadas con el receptor EFR y sus respectivos testigos sin transformar. El estudio consistió en realizar la caracterización molecular para determinar la presencia del inserto, el número de copias del gen efr en cada genotipo y la respuesta a la inoculación con el patógeno.

Se presentan los resultados del primer ensayo de dos ensayos consecutivos que se realizaron en las mismas condiciones para la tesis. Para determinar la respuesta a la resistencia cada parcela constó de 16 plantas en un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Se estudió el índice de enfermedad (IE) en una escala del 0 a 4 (0= sin síntomas y 4= muerte de planta) cada 7 días hasta el día 28 después de la inoculación. Además, se realizó el estudio del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC).

La inoculación se realizó con daño de raíz con la cepa de *R. solanacearum* UY031 (Siri, 2010) a una concentración de 10^7 ufc/ml (Figura 1).



Figura 1. Daño de raíz e inoculación con *R. solanacearum*

Resultados Preliminares

Caracterización molecular

Se detectó la presencia del inserto en las 10 líneas estudiadas de INIA Iporá y en 7 líneas del clon 09509.6 transformadas con el receptor EFR. Se determinó el número de copias del gen efr empleando como gen endógeno de copia única en el genoma de papa UDP-glucosa pirofosforilasa (UGPasa), (Cuadro 1).

Líneas	Número de copias
INIA IPORA S/TRANSF	0
INIA Iporá-EFR 2	1
INIA Iporá-EFR 3	1
INIA Iporá-EFR 4	1
INIA Iporá-EFR 8	1
INIA Iporá-EFR 11	1
INIA Iporá-EFR 12	1
INIA Iporá-EFR 16	4
INIA Iporá-EFR 27	2
INIA Iporá-EFR 53	4
INIA Iporá-EFR 54	1

Líneas	Número de copias
Clon 09509.6 S/TRANSF	0
Clon 09509.6-EFR 31	0
Clon 09509.6-EFR 32	1
Clon 09509.6-EFR 34	1
Clon 09509.6-EFR 35	0
Clon 09509.6-EFR 36	0
Clon 09509.6-EFR 37	3
Clon 09509.6-EFR 38	12
Clon 09509.6-EFR 39	10
Clon 09509.6-EFR 40	1
Clon 09509.6-EFR 41	3

Cuadro 1. Número de copias de las líneas transformadas de INIA Iporá y del Clon 09509.6.

Estudio del primer ensayo de la respuesta de resistencia a *R. solanacearum*

Se detectaron diferencias significativas en el área bajo la curva del progreso de la enfermedad entre los diferentes tratamientos. Los testigos sin transformar fueron los tratamientos más susceptibles y se enfermaron en mayor medida que todas las líneas transformadas.

En la Figura 2 se presenta las cinco líneas transformadas con el receptor EFR más resistentes y los testigos sin transformar del cultivar INIA Iporá y el Clon 09509.6

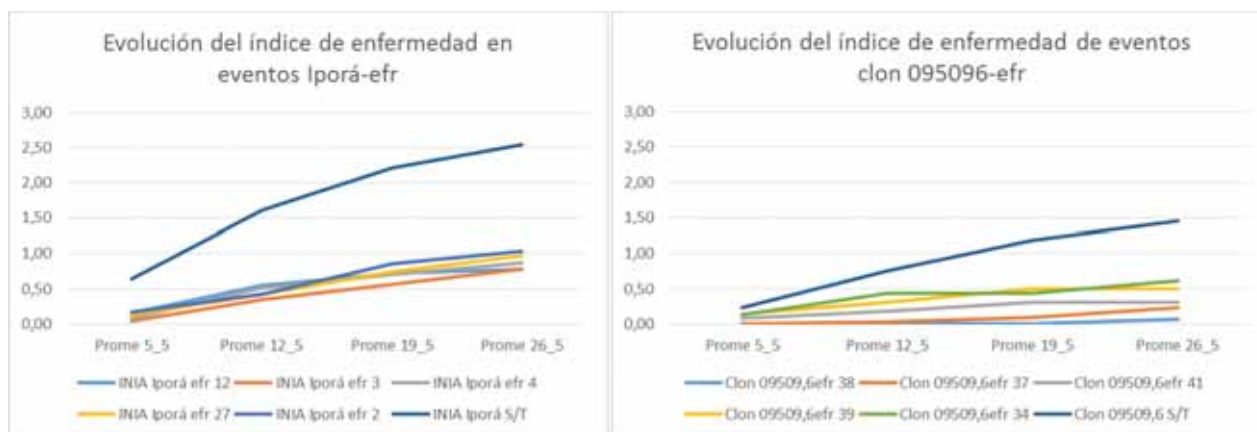


Figura 2. Evolución del índice de enfermedad para los 5 tratamientos más resistentes del clon 09509.6-EFR y los 5 tratamientos más resistentes del cultivar INIA Iporá-EFR con sus respectivos testigos sin transformar.

El área bajo la curva del progreso de la enfermedad para este primer ensayo en el cultivar INIA Iporá sin transformar fue 40.20 diferentemente significativo para los 5 tratamientos transformados que fueron desde 9.41 a 13.78. Para el clon 09509.6 sin transformar el área bajo la curva fue de 20.29, diferentemente significativo de los 5 tratamientos transformados más resistentes donde se observó una variación comprendida entre 0.22 hasta 9.13.

Perspectivas

Se realizará el estudio de la expresión proteica mediante la técnica de western blot y la expresión de las especies reactivas del oxígeno (ROS).

Se realizó el ensayo nuevamente en las mismas condiciones y los resultados observados fueron similares, restando realizar el análisis conjunto de los datos.

Estos estudios involucraron plantas genéticamente modificadas y fueron implementados bajo norma de bioseguridad en el Uruguay con el propósito de desarrollar herramientas agrobiotecnológicas *apostando a la investigación para un futuro innovador*.

Bibliografía

- 1) CIP (Centro Internacional de la Papa). 2011. Potato. <http://www.cipotato.org/potato/>. Accedido en 2015.
- 2) CIP (Centro Internacional de la Papa). 2009. Potato. <http://www.cipotato.org/potato/>. Accedido en 2015.
- 3) CIP (Centro Internacional de la Papa). 2007. Potato Bacterial wilt. http://www.cipotato.org/potato/pests_diseases/bacterial_wilt/. Accedido en 2015.
- 4) Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B. J. (2006). "Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response." *Cell*, 124(4), 803-14.
- 5) Dangl, J. L., and Jones, J. D. 2006. "The plant immune system" *Nature* Vol: 444.

- 6) **FAO.** 2012. Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo – Alcance, causas y prevención. Roma.
- 7) **Genin S.** 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*.
- 8) **González, M.** 2010. La resistencia a la marchitez bacteriana de *Solanum commersonii* Dun. y su utilización en el mejoramiento genético de papa. Master Thesis, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- 9) **Hayward A.C.** 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. A.C. Hayward y G.L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- 10) **Hayward, A.C.** 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology.
- 11) **Lacombe, S., Rougon-Cardoso A., Sherwood E., Peeters N., Dahlbeck D., van Esse P., Smoker M., Rallapalli G., Thomma B.P.H.J., Staskawicz B., Jones J.D.G., y Zipfel C.** 2010. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. Nature biotechnology. doi:10.1038/nbt.1613
- 12) **Saddler G.S.** 2005. Management of bacterial wilt disease. Pages 121-132 in: Bacterial Wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, y A.C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.