

RESISTENCIA A MARCHITEZ BACTERIANA EN PAPA MEDIADA POR EXPRESION DE EFR E INTROGRESSION DE GENES DE RESISTENCIA DE *SOLANUM COMMERSIONII*

Boschi F.¹, Schwartzman C.², Murchio S.², Ferreira V.³, Siri M.I.³, Galván G.A.⁴, Smoker M.⁵, Stransfeld L.⁵, Zipfel C.⁵, Vilaró F.⁶, and Dalla-Rizza M.^{2*}

¹ Instituto Nacional de Semillas (INASE). ² Unidad de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), ³ Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, ⁴ Departamento de Producción Vegetal, Centro Regional Sur (CRS), Facultad de Agronomía, Universidad de la República, ⁵ The Sainsbury Laboratory, ⁶ Programa de Producción Hortícola, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). *mdallarizza@inia.org.uy

Palabras Clave:

Introducción

La marchitez bacteriana o Bacterial Wilt (BW) causada por *Ralstonia solanacearum* es considerada como una de las enfermedades más destructivas en plantas con una distribución mundial. *R. solanacearum* puede persistir en suelo, desechos de plantas, rizósfera y puede asimismo alternar entre hospederos. Su principal forma de dispersión es por semilla pero también puede propagarse a través de herramientas de laboreo y del agua de riego, haciendo compleja la erradicación de la bacteria (Hayward, 1991). A la fecha no hay control eficiente de esta enfermedad a nivel de planta ni variedades comerciales resistentes disponibles para la producción (Álvarez et al., 2010).

La papa (*Solanum tuberosum*), es el cuarto cultivo más importante y uno de los más significativos del grupo solanácea. En Uruguay se plantan alrededor de 5000 ha, produciéndose 120000 toneladas por año (DIEA, 2016). Para la papa, la marchitez bacteriana es uno de los principales problemas productivos, siendo la segunda patología en importancia (Priou et al., 1999). El uso de cultivares resistentes es un método de control de bajo costo y amigable con el medio ambiente. Sin embargo, hay hasta el momento pocas fuentes de resistencia disponibles en el germoplasma de papa. *Solanum commersonii* (cmm), es una especie salvaje diploide nativa de Uruguay, Este de Argentina y Sur de Brasil que contiene muchos caracteres deseables como tolerancia a baja temperatura y resistencia a varios patógenos incluyendo *R. solanacearum* (Carputo et al., 2009). El Programa de Horticultura de INIA a logrado generar cruzamientos entre *S. tuberosum* y *S. commersonii* con niveles de resistencia variables a *R. solanacearum*. El receptor EFR de *A. thaliana* (At) perteneciente al sistema de reconocimiento PTI reconoce el factor de elongación Tu (Elongation Factor Tu, EF-Tu) descrito en la familia Brassicaceae, (Kunze, 2004). Se ha evaluado la expresión heteróloga de EFR en *Nicotiana benthamiana* y tomate (variedad Moneymaker), ambos miembros de la familia Solanaceae, observando que confiere resistencia a un rango filogenéticamente diverso de bacterias patógenas incluyendo *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* y *R. solanacearum* (Lacombe et al., 2010).

En este sentido, INIA en colaboración con The Sainsbury Laboratory, transformaron plantas del cultivar comercial susceptible INIA Iporá y el clon de mejoramiento 09509.6

(parcialmente resistente) con el receptor AtEFR. La evaluación de los genotipos generados evidenció expresión funcional del receptor EFR determinándose adicionalmente el número de copias del gen en cada evento (Boschi et al., 2017). En este trabajo se evaluó el efecto de la expresión del gen EFR en una línea comercial de papa (INIA Iporá) y un clon de mejoramiento (09509.6), al desarrollo de marchitez bacteriana en condiciones controladas de bioseguridad. Los resultados aquí presentados fueron publicados en Boschi et al 2017.

Metodología

Se trabajó con tres líneas de INIA Iporá (3, 12 y 27) y tres líneas del clon 09509.6 (34, 37 y 41) transformadas con el receptor EFR y sus respectivos testigos sin transformar. Para determinar la respuesta a *R. solanacearum* se realizaron ensayos de inoculación con daño de raíz con la cepa de *R. solanacearum* UY031 (Siri, 2010) a una concentración de 10^7 ufc/ml. 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 de 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). Para evaluar la transmisión de *R. solanacearum* a los tubérculos, 11 plantas por evento fueron inoculadas y mantenidas en condiciones de tuberización por 90 días. Los tubérculos de plantas resistentes fueron cosechados y analizados en la presencia de *R. solanacearum*.

La detección de infecciones de *R. solanacearum* en plantas resistentes (infecciones latentes) fue evaluada mediante BIO-multiplex PCR utilizando primers específicos para el filotipo IIB secuevar 1 y conteo en placa en medio selectivo mSMSA de tallos y estolones de los mini-tubérculos colectados.

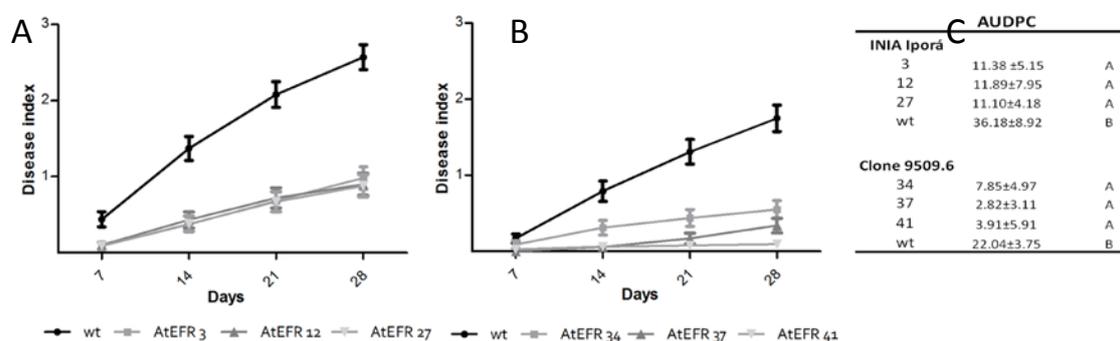


Figura 1. Curvas de progreso de enfermedad en Inia Iporá (A) y clon 09509.6 (B) luego de inoculación en suelo con *R. sonlanacearum*. En C, valores de AUDPC promedio de dos ensayos independientes y significancia estadística ($p < 0,05$) por test de tukey. Adaptado de Boschi et al 2017.

Resultados

La evaluación de la respuesta a *R. solanacearum* en condiciones de cámara de crecimiento mostraron que los eventos transformados de ambos genotipos son significativamente más resistentes respecto a los controles sin transformar (Figura 1).

INIA Iporá-AtEFR mostró una reducción de enfermedad del 68% mientras que en el caso del clon 09509.6-AtEFR un 77%. Estos resultados sugieren que el gen EFR confiere resistencia parcial a BW. Más aún, genes de resistencia menores introgresados de *cmm* estarían potenciando la respuesta observada medida por EFR.

Infecciones latentes y asintomáticas de *R. solanacearum* son un problema mayor en el control de BW y son un impedimento en el uso de los tubérculos como semilla-papa. Para determinar la infección latente de plantas resistentes de los ensayos de inoculación, se evaluaron tallos a los 28 días post inoculación. La proporción de plantas positivas a nivel de presencia de *R. solanacearum* en tallo se muestra en la figura 2A. Todos los eventos de transformación mostraron una reducción en el porcentaje de tallos infectados en comparación con los controles sin transformar. INIA Iporá EFR presentó un promedio de 10^3 cfu.mL⁻¹ mientras que en el clon 09509.6 AtEFR 10^2 cfu.mL⁻¹.

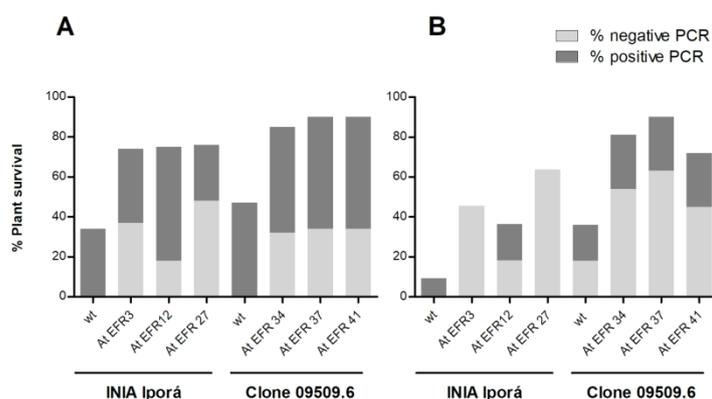


Figura 2. Las barras corresponden al porcentaje de sobrevivencia de plantas luego de la inoculación (28 días) en A o 90 días en B. La proporción de plantas positivas para *R. solanacearum* en tallo (A) o tubérculo (B) se denotan en gris oscuro. Promedio de 2 experimentos independientes, n=4. Adaptado de Boschi et al 2017.

En ensayos de tuberización, las plantas transformadas mostraron ser más resistentes a BW a los 90 días luego de la inoculación respecto los controles sin inocular. Más aún, los tubérculos cosechados mostraron menor proporción de presencia de bacteria cuando se comparan con los controles sin transformar (Figura 2B), siendo las cargas bacterianas menores a 10^3 cfu.mL⁻¹ en INIA Iporá 3 y 27, mientras que en el clon, los tubérculos positivos mostraron en promedio 10^2 cfu.mL⁻¹. Estos resultados muestran que en las condiciones evaluadas, la respuesta a BW se mantiene hasta la tuberización, siendo las plantas transformadas más resistentes que las sin transformar. Si bien se detectó infección latente en tallo y tubérculo, hubo menor proporción y carga bacteriana en los eventos de transformación.

Conclusiones

Ambos genotipos de papa transformadas con el receptor EFR mostraron mayor resistencia a la marchitez bacteriana y menor presencia de infecciones latentes en tallo y tubérculo. Más aún, las líneas del clon de mejoramiento 09509.6 EFR mostraron una respuesta potenciada, indicando que la resistencia parcial derivada de mejoramiento clásico puede ser combinada con estrategias de ingeniería genética para generar un efecto. Los eventos generados pueden contribuir hacia un control integrado de la marchitez bacteriana en papa.

Referencias bibliográficas

- Álvarez, B., Biosca, E. G., and López, M. M. (2010). On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.*, 267–279. Available at: https://pdfs.semanticscholar.org/aa85/77e213e2977a0e4eb739795e3fea51187181.pdf?_ga=2.156465595.1055873898.1504096691-1311319012.1504096691.
- Boschi, F., Schwartzman, C., Murchio, S., Ferreira, V., Siri, M. I., Galván, G. A., et al. (2017). Enhanced Bacterial Wilt Resistance in Potato Through Expression of Arabidopsis EFR and Introgression of Quantitative Resistance from *Solanum commersonii*. *Front. Plant Sci.* 8, 1642. doi:10.3389/fpls.2017.01642.
- Carpato, D., Aversano, R., Barone, A., Di Matteo, A., Iorizzo, M., Sigillo, L., et al. (2009). Resistance to *Ralstonia solanacearum* of sexual hybrids between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *Am. J. Potato Res.* 86, 196–202. doi:10.1007/s12230-009-9072-4.
- DIEA (2016). Anuario estadístico agropecuario.
- Hayward, A. C. (1991). Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu rev Phytopathol* 29, 65–87. doi:10.1146/annurev.py.29.090191.000433.
- Kunze, G. (2004). The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *Plant Cell Online* 16, 3496–3507. doi:10.1105/tpc.104.026765.
- Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H. P., et al. (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat. Biotechnol.* 28, 365–369. doi:10.1038/nbt.1613.
- Priou, S., Aley, P., Chujoy, E., Lemaga, B., and French, E. R. (1999). Integrated Control of Bacterial Wilt of Potato. CIP Series IV-III. Lima Available at: <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/10/guiaing.pdf>.