

EMPLEO DEL RECEPTOR EFR EN TOMATE PARA EL CONTROL DE BACTERIAS PATÓGENAS DEL TOMATE: ACTUALIZACIÓN DE RESULTADOS

Elsa Perdomo-Ferrando¹, Sara Murchio², Wilma Walasek³, Claudia Schwartzman², Diego Maeso³, Marco Dalla Rizza².

¹Departamento de Protección Vegetal, Cátedra de Fitopatología. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Garzón 780- Montevideo. CP 12900.

eperdomo@fagro.edu.uy

²Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas

³Sección Protección Vegetal, INIA Las Brujas

Palabras clave: Tomate, *Xanthomonas vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, EFR.

Introducción

La defensa de las plantas ante los patógenos puede darse siguiendo dos caminos de percepción básicos: la inmunidad inducida por PAMPS (patrones asociados a patógenos) conocida como PTI (PAMP Triggered Immunity) y la inmunidad inducida por efectores producida por patógenos ETI (Effector Triggered Immunity). En el primer caso, la planta percibe los PAMPS mediante proteínas de reconocimiento localizadas en la membrana plasmática de las células y desencadena mecanismos primarios de defensa vegetal: la pared se refuerza con calosa, se producen especies reactivas del oxígeno y se inducen genes de defensa. Por otra parte, la respuesta ETI actúa a través de la percepción de factores de virulencia de los patógenos (o sus efectos) por parte de proteínas de resistencia especializadas de la planta. La defensa que se desencadena es intensa y puede incluir reacción de hipersensibilidad (muerte celular programada para impedir la dispersión del patógeno). La enfermedad solamente se produce cuando el microorganismo logra superar exitosamente estos mecanismos de defensa (Boller and Felix, 2009).

El receptor EFR, componente de la PTI reconoce el factor de elongación Tu (EF-Tu), ampliamente conservado en bacterias fitopatógenas. Este receptor se encuentra en muchas especies de brassicáceas y mediante ingeniería genética ha sido transferido a especies de interés agronómico como tomate y papa, confiriendo resistencia a bacterias patogénicas (Boschi et al., 2017; Lacombe et al., 2010).

El cultivo de tomate es afectado por numerosas enfermedades. Entre ellas, la mancha bacteriana y el cancro, causadas por *Xanthomonas* spp y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* respectivamente, provocan cuantiosas pérdidas. La mancha bacteriana afecta fundamentalmente hojas, causando manchas primero cloróticas que se van necrosando. Estas manchas pueden coalescer y puede darse la defoliación de las plantas. También provoca manchas en los tallos y lesiones superficiales en los frutos. Éstos ven

afectada su calidad cosmética, pero la mayor pérdida se da al disminuir la capacidad fotosintética de la planta (frutos de menor tamaño) y por quemado (Jones 1991, Blancard 1992).

El cancro afecta fundamentalmente el xilema de la planta y sus síntomas van desde el marchitamiento parcial de las hojas hasta la muerte. Es altamente contagioso por el agua de riego y las labores del cultivo (desbrote, poda, etc). Las infecciones latentes son muy habituales, por lo que, por más que se tomen precauciones, la manipulación de las plantas es una forma usual de diseminar la enfermedad. De hecho, si se dan las condiciones, principalmente en invernáculo, es capaz de matar todas las plantas del cultivo en poco tiempo (Gitaitis 1991).

Para ninguna de estas enfermedades existen alternativas de control. No se han desarrollado variedades con resistencias adecuadas y el control químico es poco efectivo. Es por ello que INIA, en colaboración con The Sainsbury Lab (Reino Unido), ha generado líneas del cultivar INIA Milongón transformadas con el gen EFR. Los eventos de transformación han sido sometidos a autofecundación para fijar el carácter y su desempeño frente a enfermedades bacterianas de tomate está siendo evaluado (Dalla Rizza 2015).

En este trabajo se resumen los resultados de los ensayos de las generaciones T4 y T5 (posteriores a la transformación) frente a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) y a *Xanthomonas vesicatoria* (Xv).

Metodología

Todos los experimentos se realizaron en invernáculo de vidrio calefaccionado en INIA Las Brujas con normativa de bioseguridad según la Comisión para la Gestión de Riesgo.

Se designa como T0 a la planta transformada, T1 la primera generación de plantas de semilla obtenida por autofecundación y así sucesivamente.

La presencia del inserto en las plantas transformadas incluidas en los experimentos fue verificada mediante PCR, utilizando primers específicos del gen EFR y un gen constitutivo control (lat52).

Las plantas fueron sembradas en almácigos y cuando tuvieron el tamaño adecuado trasplantadas a bolsas-macetas (20 l) en T4 o macetas plásticas (1000 cc) en los experimentos con T5. Siempre se utilizó sustrato estéril.

El método de inoculación se describe en cada experimento, las plantas se mantuvieron en cámara húmeda 24 horas antes y después de la inoculación.

Evaluaciones:

En todos los ensayos se utilizaron como testigos (inoculado y sin inocular) plantas de Milongón sin transformar (denominadas como WT+ y WT-, respectivamente).

Se registró la evolución del número de plantas con síntomas, tipo de síntomas y severidad utilizando escalas diferentes dependiendo de la enfermedad. También se contabilizó el número de días a aparición de síntomas y muerte de cada planta.

En algunos experimentos se calculó el área debajo la curva de progreso de la enfermedad (ADCPE) utilizando los días entre evaluación y los valores observados para calcular la suma de los trapecios generados debajo de la curva.

Desafíos con *Clavibacter michiganensis* subesp. *michiganensis* (Cmm).

Se realizaron ensayos en T4, donde se inocularon 10 plantas por línea (4, 6, 16, 20 y 29) más 7 controles sin inocular y 5 controles positivos (Tabla 1).

Tabla 1. Número de plantas inoculadas con Cmm en la generación T4 (abril-diciembre 2016)

Línea	Número de plantas	
	Con inserto	Sin inserto
WT-	N/A	7
WT+	N/A	5
4	10	0
6	2	8
16	10	0
20	10	0
29	7	2

La inoculación se realizó mediante corte de raíces e inmersión en 5 ml de suspensión bacteriana Cmm de 10^8 UFC/ml previo al trasplante.

Por otra parte, en T5 Se inocularon 60 plantas de las líneas 4, 16, 20 y 29 todas presentando el inserto. Las plantas fueron separadas en seis bloques (mesas) de diez plantas cada una. También se incluyeron 60 testigos negativos y 60 positivos.

En todos los experimentos se registró la evolución del número de plantas con síntomas, días entre inoculación-aparición de síntomas y días entre inoculación y muerte de la planta. La severidad de los síntomas fue evaluada usando una escala numérica de 0 a 5 (0= sin síntomas, 1= síntomas incipientes en hojas basales, 2= síntomas moderados en hojas basales, 3= síntomas moderados en toda la planta, 4= síntomas fuertes generalizados con muerte de hojas y 5= muerte de planta (Figura 1). También se registró la evolución de los tipos de síntomas: amarillamiento y marchitez de hojas basales, necrosis de borde foliar, marchitamiento unilateral, marchitamiento de ápice, canchros en tallo, muerte de planta y degradación interna de tallo desde 14 a 147 dpi.



Figura 1: Escala visual de severidad de cancro bacteriano en plantas de tomate Milongón.

Desafío con *Xanthomonas vesicatoria* (Xv)

Los ensayos con Xv se realizaron con 60 plantas de la generación T5 de las líneas 4, 16, 20 y 29, todas con inserto. Se utilizaron 60 testigos positivos y 60 negativos sin inocular.

La inoculación se llevó a cabo mediante aspersion hasta el punto de goteo de una solución que contenía 1×10^8 UFC/ml. Los testigos negativos se inocularon con agua estéril.

Para la evaluación se utilizó la escala visual diagramática de Mello et al (1997) modificada, que se basa en el porcentaje de hoja afectada. Se evaluaron la quinta, sexta y séptima hojas verdaderas completamente desplegadas a los 11, 15, 18, 22 y 25 días post inoculación (dpi) (Figura 2). Hacia el fin de la evaluación a cada planta se le otorgó un puntaje de severidad global de 1 a 5 (1 sin síntomas y 5 planta totalmente afectada).

La infección con Xv fue verificada en lesiones típicas de mancha bacteriana mediante aislamiento en el 10% de las plantas.



Figura 2: Hoja mostrando síntomas típicos de mancha bacteriana causada por *Xanthomonas* spp.

Resultados y discusión

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm).

En la generación T4, en tres de las cinco líneas se obtuvieron plantas que sobrevivieron más allá de los 120 después de la inoculación (dpi.) (Figura 3)

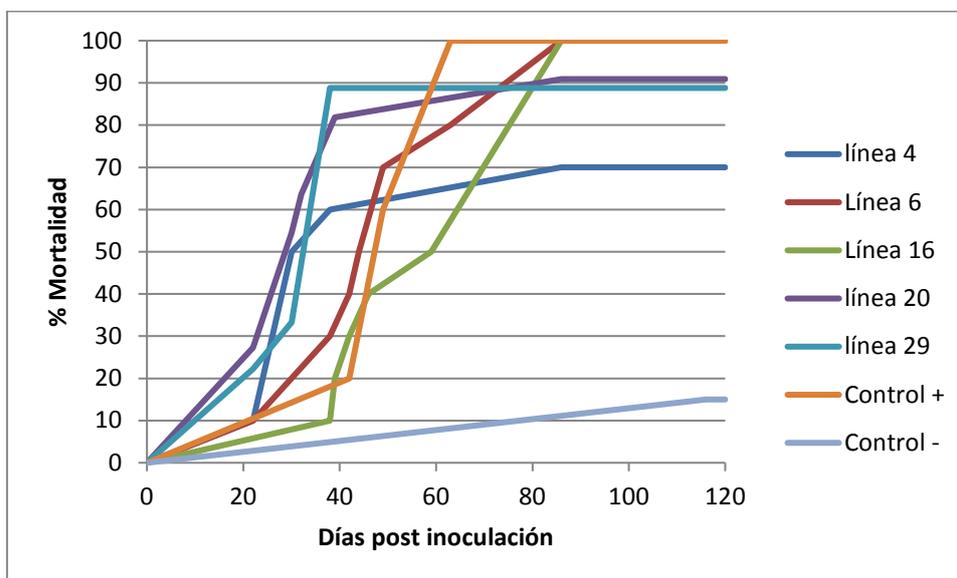


Figura 3. Mortalidad de plantas en función a días pos inoculación (generación T4).

Si bien existió un 100% de incidencia, la severidad de las infecciones fue menor en plantas que presentaron el inserto (Figura 4).

Se observó que las plantas sin transformar inoculadas (controles positivos) se enfermaron más tarde pero enfermaron de forma más severa, es decir, el progreso de la enfermedad una vez desencadenada es mucho más acentuado (sobre 120 días de evaluación, la enfermedad se desarrolla entre los días 44 y 64). Por otra parte, las plantas transformadas si bien muestran síntomas tempranamente sobreviven más en comparación con las no transformadas.

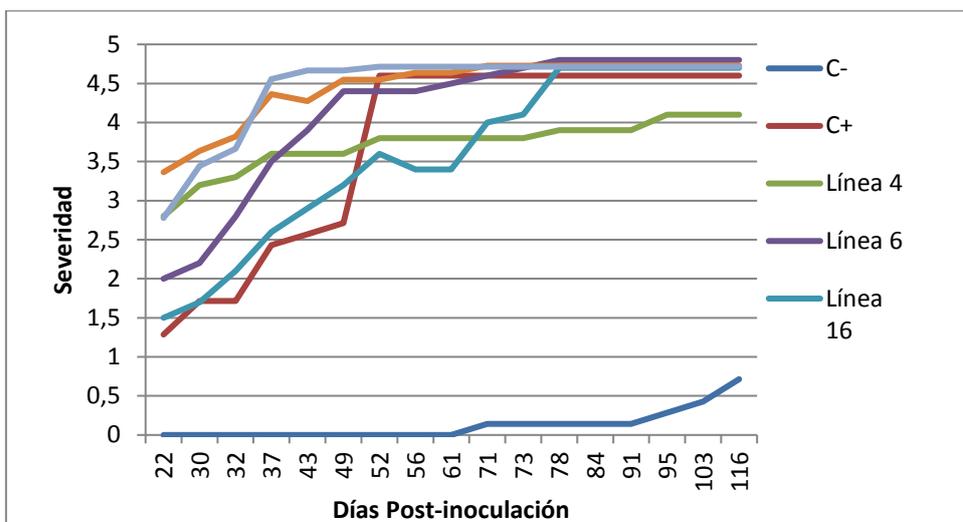


Figura 4: Severidad de respuesta a inoculación con Cmm de cada línea (generación T4) en función de los días post inoculación.

En la generación T5 si bien todas las plantas inoculadas desarrollaron síntomas, las líneas 16 y 20 presentaron una menor mortalidad que el testigo a los 120 dpi (Figura 5). A su vez, esas mismas líneas presentaron valores menores de severidad que el testigo en etapas más avanzadas del ensayo (Figura 6).

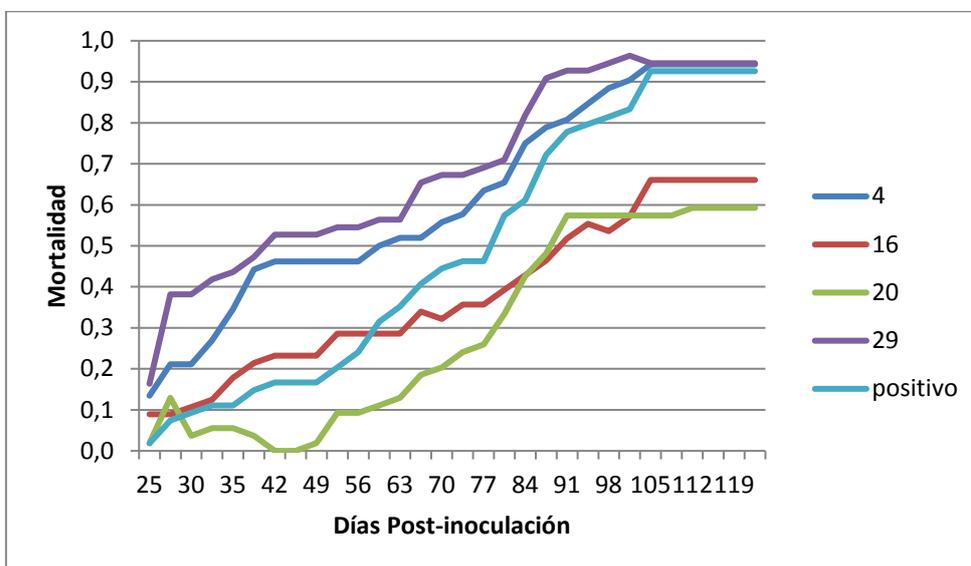


Figura 5: Mortalidad de plantas en función a días pos inoculación (generación T5).

Si bien no hay un efecto visiblemente mayor que diferencie el comportamiento de las líneas evaluadas parece haber nuevamente una tendencia en líneas 16 y 20 de menor desarrollo de la enfermedad pos inoculación.

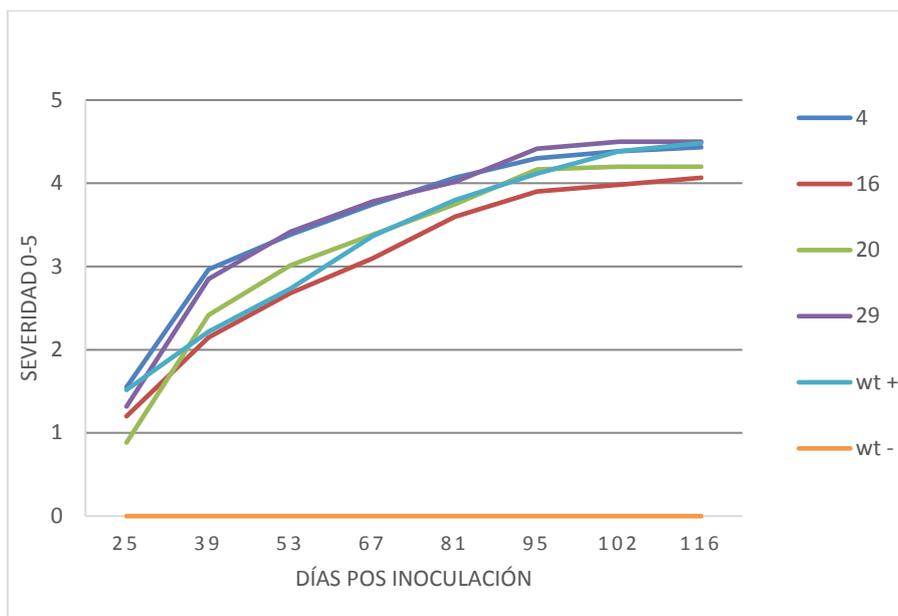


Figura 6 severidad en función de días pos inoculación (generación T5).

Xanthomonas vesicatoria (Xv)

Se observaron diferencias entre el área foliar afectada en las tres hojas evaluadas de los eventos transformados respecto a los no transformados (Figura 7). En este caso, si bien la respuesta de las líneas transformadas es diferente en todos los casos se observa una respuesta positiva consistente. A su vez, la severidad en toda la planta fue menor en los individuos transformados de hecho, la infección no avanzó hacia las hojas que se fueron desplegando a lo largo del experimento (Figura 8). Nuevamente la línea 16 parece dar una respuesta destacada en el conjunto de las líneas evaluadas.

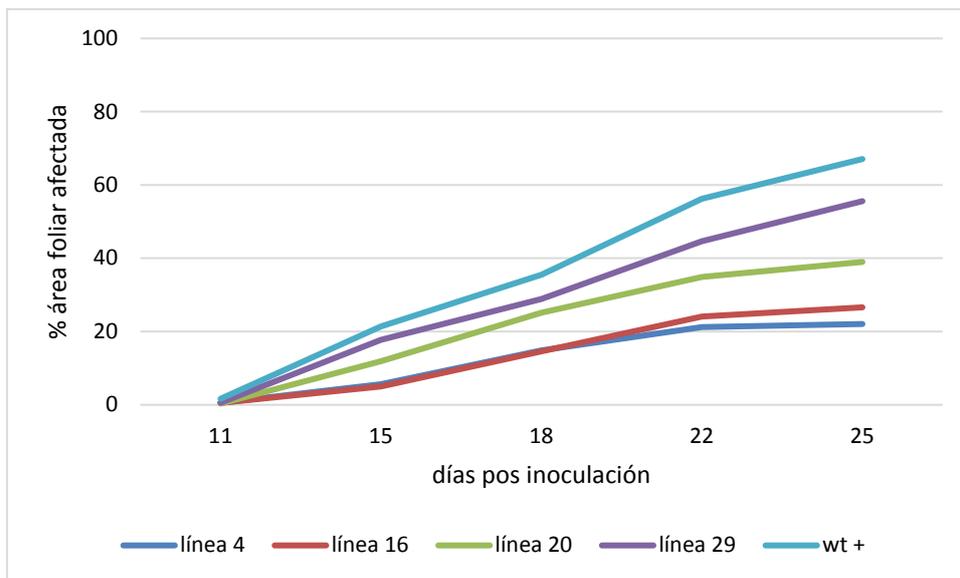


Figura 7: Porcentaje de área foliar afectada (promedio tres hojas inoculadas) según días post inoculación con Xv.

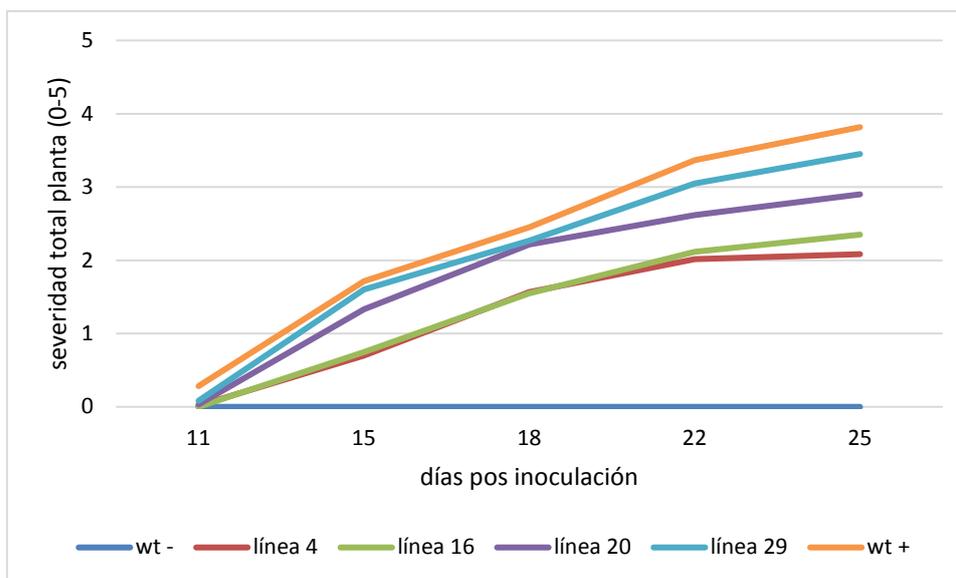


Figura 8: Severidad considerando toda la planta en función de días pos inoculación.

Conclusiones y perspectivas a futuro

En los ensayos realizados con Cmm se observa que a medida que se avanza en las generaciones de autopolinización, la respuesta de las plantas transformadas frente a este patógeno bacteriano se va haciendo más estable. Si bien no se ha logrado una resistencia completa a Cmm, resulta interesante el aumento en la sobrevivencia. En cuanto a los ensayos realizados con Xv, también se observa un efecto de la transformación con el gen efr respecto a los controles, observándose un menor porcentaje de hoja afectada.

Estos resultados son interesantes a la hora de pensar en el mejoramiento genético orientado a minimizar el impacto de estas enfermedades. Existen otras experiencias del uso del receptor EFR como herramienta contra infecciones provocadas por bacterias del género *Xanthomonas* que han llegado a resultados similares a los que aquí se presentan (Lacombe et al., 2010). Sin embargo, es la primera vez que se somete a este tipo de plantas modificadas a ensayos de desafío contra Cmm. Se continuará evaluando esta herramienta con generaciones subsiguientes de manera de tener un caudal mayor de información que permita concluir la utilidad de estas variedades para el control o al menos la minimización del impacto del cancro bacteriano a nivel de campo.

Referencias

- Blancard, D. (1992). Enfermedades del tomate. Observar, identificar, luchar. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. 212 p.
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346.
- 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.
- Dalla Rizza, M. Murchio, S., Walasek, W., Boschi, F., Maidana, M.; Schwartzman, C., Giménez, G., Maeso, D. (2015). Buscando nuevas herramientas para controlar un viejo enemigo: empleo del receptor EFR en tomate para el control de *Clavibacter Michiganensis* subsp *Michiganensis*. En: Resultados Experimentales en sanidad de tomate y morrón, Jornada de divulgación. INIA, 2015. p. 17-23 (Serie Actividades de Difusión ; 756).
- Gitaitis, R. (1991). Bacterial canker. in: Compendium of Tomato Diseases. 2nd Ed. J. B. Jones, J. P. Jones, R. E. Stall, and T. A. Zitter, eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.

Jones JB. (1991). Bacterial spot. En: Jones JB, Jones JP, Stall RE. (Eds.). Compendium of tomato diseases. St. Paul, Minnesota: APS Press.

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.

Mello SCM, Takatsu A, Lopes CA. (1997). Escala diagramática para avaliação da manchabacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, 22: 447-448.