Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

# Desarrollo de alternativas biotecnológicas para la obtención de plantas de Citrus sinensis (L.) Osbeck resistentes a la enfermedad de la Cancrosis de los cítricos

Furman, Nicolás

2013

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Furman, Nicolás. (2013). Desarrollo de alternativas biotecnológicas para la obtención de plantas de Citrus sinensis (L.) Osbeck resistentes a la enfermedad de la Cancrosis de los cítricos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Furman, Nicolás. "Desarrollo de alternativas biotecnológicas para la obtención de plantas de Citrus sinensis (L.) Osbeck resistentes a la enfermedad de la Cancrosis de los cítricos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

**Dirección:** Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

**Contacto:** digital@bl.fcen.uba.ar

**Universidad de Buenos Aires**
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**
**Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular**

# Desarrollo de alternativas biotecnológicas para la obtención de plantas de Citrus sinensis (L.) Osbeck resistentes a la enfermedad de la Cancrosis de los cítricos.

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas

**Lic. Nicolás Furman**

Director: Dr. Alejandro Mentaberry
Director Asistente: Dr. Ken Kobayashi
Consejero de Estudios: Dra. Sara Maldonado

Laboratorio de Agrobiotecnología

Buenos Aires, 2013

**Desarrollo de alternativas biotecnológicas para la obtención de plantas de Citrus sinensis (L.) Osbeck resistentes a la enfermedad de la Cancrosis de los cítricos.**

Resumen

Entre las enfermedades bacterianas más relevantes para la citricultura argentina se encuentra la Cancrosis de los cítricos, presente en la mayoría de las zonas productoras de todo el mundo, a excepción de Europa. Las pérdidas económicas más importantes son ocasionadas por las restricciones cuarentenarias a los frutos, impuestas por países libres de estas enfermedades, que limitan las exportaciones a tales destinos. Dado que no se ha encontrado resistencia natural a la enfermedad, ni en el germoplasma disponible para el mejoramiento, ni en las especies utilizadas como pie para propagar las variedades comerciales de citrus, actualmente se intenta controlar al patógeno causante de la Cancrosis (Xanthomonas axonopodis pv. citri) mediante la aplicación de bactericidas de contacto a base de cobre. Si bien éstos permiten controlar parcialmente el desarrollo de la enfermedad, no sólo son eliminados por las lluvias y el viento, sino que también resultan contaminantes para el ambiente y para el hombre. Por estas razones el desarrollo de estrategias biotecnológicas representa una alternativa atractiva para la búsqueda de la resistencia a la Cancrosis. En tal sentido, el objetivo principal de esta Tesis fue desarrollar plantas transgénicas de Citrus sinensis (naranjo dulce) resistentes a la enfermedad, a partir de la expresión del péptido antimicrobiano dermaseptina. En primer lugar, se demostró el efecto bactericida del péptido frente a Xanthomonas spp. en ensayos in vitro. Siguiendo estos resultados, se realizó una construcción que permite la expresión constitutiva de dermaseptina y su exportación a apoplasto, región donde se multiplica la bacteria durante la infección. Luego, se transformaron plantas de C. sinensis y se obtuvieron 7 positivas para los genes marcadores de selección utilizados (resistencia kanamicina y GFP), cuya posterior caracterización molecular confirmó la presencia de la secuencia de dermaseptina en el genoma de las plantas. Finalmente, mediante ensayos de infección en cámaras de crecimiento, se estableció que la expresión del péptido antimicrobiano en las plantas transgénicas de naranjo indujo resistencia parcial frente a la infección con X. axonopodis. Si bien aún resta desarrollar ensayos de infección en invernadero, estos resultados permitieron convalidar la estrategia biotecnológica escogida para conferir resistencia a la Cancrosis.

Palabras claves: citricos transgénicos, dermaseptina, Cancrosis, Xanthomonas.

**Development of biotechnological alternatives to obtain Citrus sinensis (L.) Osbeck plants resistant to citrus canker disease.**

Summary

Canker disease is one of the most important bacterial diseases affecting citric production in Argentina, and it is also present in most producing areas around the world, except in Europe. Since that a substantial percentage of lemon, grapefruit and orange is intended for export, outbreaks of this disease provoke an immediate quarantine for the fruits harvested in the affected areas, with the subsequent losses of economic income. As no natural resistance has been found, neither in commercial orange varieties nor in any of the common graft stock varieties, current attempts to control the Canker causative pathogen Xanthomonas axonopodis pv. citri consists of preventive sprayings with copper-based bactericides. Despite this approach confers partial disease control, copper-based bactericides are not only be eliminated by rain and wind, but they also result harmful to the environment and to human beings. Due to these limitations, biotechnological strategies represent an attractive alternative for the search of Canker resistance. In that way, the main aim of this work was to obtain transgenic Citrus sinensis (sweet orange) plants expressing an antimicrobial peptide (dermaseptin) in order to confer resistance against Xanthomonas axonopodis pv. citri infections.

First of all, bactericidal effect of dermaseptin against Xanthomonas spp. was demonstrated by in vitro assays. Following these results, a genetic construct allowing the constitutive expression of dermaseptin and its export to apoplast was generated. That´s where bacteria multiplies during infection. Then, C. sinensis plants where transformed with this construction, obtaining seven positive plants for the GFP and kanamycin marker genes. Later molecular characterization confirmed the presence of dermaseptin sequence in the corresponding genomes. Finally, controlled X. axonopodis infection assays showed significant reduction of disease symptoms in transgenic plants. Even though the results obtained in this work should be confirmed at the level of greenhouse and field trial assays (since controlled infection assays cannot be directly extrapolated to real agricultural conditions), they indicate that the strategy used in this work could be effective in achieving Canker resistance.

**Key words**: transgenic citrus, dermaseptina, citrus Canker disease, Xanthomonas

Dedicada a mi padre,

Rubén Furman

**Agradecimientos**

A mi madre, María Angélica. Por estar siempre y por tanto amor.

A mi hermano Leandro y a Viviana por darme dos sobrinos increíbles, Pablo e Iván.

A mi hermana María, por los consejos y las charlas sobre la familia y la vida.

A mi hermanita querida, Paula. Por las charlas, almuerzos y cenas compartidos desde su regreso a Buenos Aires.

A Pía, a quien amo con todo mi corazón, por animarse a compartir este viaje que se llama vida. Por ayudarme en la corrección de la Tesis, por explicarme estadística y por bancarme siempre.

A mis amigos y compañeros Agustín Sileoni, Martín Graziano y Matías Blaustein.

A mis amigos de la vida Leopoldo Pepa Magiolo, Jachu Fernández, Miguel Traga Adamo, Martín Albino Pereyra, Ignacio el Mono Sileoni y Gonzalo Pomelo Cáceres.

A mi amiga del alma Natalia Fernández Eraso, por su solidaridad y generosidad cuando entré al INGEBI, y por prestarme su oído en malos momentos de mi vida.

A mi primo Andrés, a quien encontré de grande y construí el vínculo a través de charlas filosóficas sobre la ciencia y sobre la familia.

A Mirta Merino, por enseñarme a canalizar mis enojos, ordenar mis pensamientos y sentimientos, y por enseñarme a quererme.

A Magdalena Cuenca, por devolverme la posibilidad de recordar mis sueños y ayudarme a entender los mecanismos que gobiernan mi cabeza.

A Alejandro Rodríguez Bustamante, por sus consejos, por enseñarme computación cuando era un niño, y por recibirme en Córdoba con los brazos abiertos.

A Ken Kobayashi. Por las charlas sobre ciencia y sobre la vida. Por sus analogías futboleras. Por ser un gran motivador. Por enseñarme Chi-Kung, arte milenaria que me ayuda en la búsqueda de paz interior.

A Alejandro Mentaberry, por abrirme las puertas del Laboratorio Agrobiotecnología allá por el año 2000, y por aceptar el tema de Doctorado propuesto.

A Fernando Bravo-Almonacid, quien me enseñó lo que sé de Biología Molecular y por su apoyo, afecto y generosidad.

A mis compañeros actuales del laboratorio que aguantan a diario mi ironía y sarcasmo.

A Carlotto, por quedarse el último día hasta la madrugada ayudándome con la edición de la Tesis, y por la buena onda de siempre.

A Ezequiel Lentz y Eugenia Segretin, por ayudarme desinteresadamente siempre que les pedí.

A Blanca I. Canteros, Ana María Romero, Gustavo Gudesblast y Mariana Piuri, por brindarme horas de su tiempo para discutir sobre mi trabajo de Tesis. A Martín Edreira, por facilitarme cientos de papers que no conseguía en ningún lado.

A Rodrigo Pagano por facilitarme el anticuerpo anti lisozima que utilicé durante mi Tesis.

A Mirta Flawiá, por sus consejos.

A Javier Calcagno, por ayudarme a entender estadística cuando lo tuve de profesor en Biometría las dos veces que la cursé, y por su colaboración en el diseño experimental de los desafíos con Xanthomonas.

A Cecilia Zanek y Carina Reyes, por su colaboración con mi proyecto de mi Tesis de Doctorado.

A María Laura García, por aceptar ser mi Directora posdoctoral y por la colaboración durante mi Doctorado.

A Sara Maldonado, por aceptar ser mi consejera de estudios durante la Licenciatura y el Doctorado. Y, sobre todo, por las charlas de ciencia y política.

A mis ex compañeros del grupo PAPA, con los que compartí los primeros años del Doctorado: María, Natalia F. E., Paula, Florencia, Natalia M., Sergio, Eugenia, Ezequiel, Mauro, Patricia, Silvia.

A Martín Schoo por acompañarnos en la primera travesía en kayak que unió Tigre-Carmelo en 3 días y medio de aventura. Modalidad de viaje que me acompañará el resto de mi vida! También al resto del team kayakista (Alan, Nico, Pablo, Mati y Andrés) con los que disfrutamos de la travesía, la murga, los tablados y el carnaval uruguayo.

A mis ex compañeros y compañeras de Investigadores Populares sobre la Problemática Minera (IPPM), por animarse a militar en un tema de relevancia nacional y a exponerse en cada viaje que hicimos a Tinogasta.

A mis ex compañeras y compañeros del Bachillerato Popular La Dignidad, con quienes compartí la experiencia de construir un Bachillerato Popular durante 3 años. En especial a Maga y a Gaby, dos compañeras que admiro.

A mis ex compañeros y compañeras del NEI, del Taller de Aguas, de JCP, del Colectivo desde el Pie (en sus dos versiones), por compartir el sueño del cambio social, y por militar para llevarlo a cabo.

**Abreviaturas**

| | |
|---|---|
| AND | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico copia |
| AMPs | Antimicrobial peptides |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| CaMV | Cauliflower mosaic virus |
| Ci | Curie |
| Cm | Centimetro |
| CTAB | Bromuro de hexadecil trimetil amonio |
| cv. | Cultivar |
| D | Día |
| D.O. | Densidad óptica |
| d.p.i. | Días post-inoculación |
| Datp | Deoxiadenosina trifosfato |
| Dctp | Deoxicitidina trifosfato |
| dGTP | Deoxiguanosina trifosfato |
| DNTPs | Desoxirribonucleóticos trifosfato |
| Dttp | Deoxitimidina trifosfato |
| EDTA | Ácido etilenediamintetra-acético |
| EEAOC | Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres |
| G | Gramo |
| GFP | Green fluorescent protein |
| H | Hora |
| HEWL | Hen egg-white lysozyme |
| INTA | Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria |
| kV | Kilovatio |
| LB | Luria-Bertani |
| M | Molar |
| µM | Micromolar |
| µL | Microlitro |
| Min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mM | Milimolar |
| MS | Murashige y Skoog |
| NEA | Noreste argentino |
| Nm | Nanómetro |
| NOA | Noroeste argentino |
| nptII | Secuencia codificante de la neomicina fosfotrasferasa II |
| ºC | Grados Celcius |
| Pb | Pares de base |

| | |
|---|---|
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| Pnos | Secuencia promotora del gen de nopalina sintetasa |
| pv. | Patovar |
| PYM | Peptone-Yeast extract-Malt extract nutrient medium |
| r.p.m. | Revoluciuones por minuto |
| RT-PC | Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| Seg | Segundos |
| SENASA | Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria |
| Sgfp | Secuencia codificante de green fluorescent protein |
| Spp. | Especies |
| Taq | Thermus aquaticus |
| TMV | Tobacco mosaic virus |
| Tnos | Secuencia terminadora del gen de nopalina sintetasa |
| U | Unidad |
| u.f.c. | Unidades formadoras de colonia |
| UV | Ultravioleta |
| V | Voltio |
| Xg | x veces la gravedad |

## Índice

**Introducción**

**1.** La producción de cítricos en Argentina y el mundo. 2

**1.1** La producción de naranjas en Argentina. 3

**2.** Enfermedades bacterianas de los cítricos. 4

**2.1.** Cancrosis de los cítricos. 6

**2.1.1.** Biología de la enfermedad. 7

**2.1.2.** Asociación de Pseudomonas en síntomas de Cancrosis. 10

**2.2.** Clorosis Variegada de los Citrus (CVC). 11

**2.3.** Huang-long-bind (HLB) o ex greening. 11

**2.4.** Tizón bacterial (citrus blast). 12

**3.** Pérdidas económicas provocadas por la Cancrosis de los cítricos. 12

**4.** Alternativas actuales para el control de la Cancrosis de los cítricos. 12

**5.** La interacción planta-patógeno. 13

**5.1.** El sistema de defensa de las plantas. 14

**6.** Estrategias biotecnológicas para introducir resistencia a enfermedades bacterianas. 16

**6.1.** Estrategia basada en la introducción de genes de resistencia/avirulencia. 16

**6.2.** Estrategias basadas en la expresión de enzimas líticas, tioninas y fitoalexinas. 20

**6.3.** Estrategias basadas en la interferencia del quorum sensing. 21

**6.4.** Estrategias basadas en la expresión de genes que aumentan el sistema defensivo de la planta. 24

**6.5.** Estrategias basadas en la expresión de péptidos antimicrobiano 25

**6.5.1.** Características principales de los péptidos antimicrobianos. 25

**6.5.2.** Modo de acción de la dermaseptina. 27

**6.5.3.** Obtención de plantas resistentes a enfermedades bacterianas mediante expresión de péptidos antimicrobianos. 28

**7.** Ventajas y limitaciones de la ingeniería genética en el caso de los cítricos. 30

**Objetivos e Hipótesis**

**1.** Objetivo general. 33

**2.** Objetivos específicos. 33

**3.** Hipótesis de trabajo. 34

**Materiales y Métodos**


**1.** Cepas bacterianas. 36

**1.1.** Conservación de cepas bacterianas. 36

**1.2.** Escherichia coli. 36

**1.2.1.** Condiciones de cultivo. 36

**1.2.2.** Preparación de células bacterianas competentes. 36

**1.2.3.** Transformación de células competentes. 36

**1.3.** Agrobacterium tumefaciens. 37

**1.3.1.** Cepas y condiciones de cultivo. 37

**1.3.2.** Preparación de células competentes de A. tumefaciens. 37

**1.3.3.** Transformación de células competentes de A. tumefaciens. 37

**1.4.** Xanthomonas spp. 38

**1.4.1.** Especies y condiciones de cultivo. 38

**2.** Material vegetal y condiciones de crecimiento. 38

**3.** Técnicas y métodos de ingeniería genética y ADN recombinante. 39

**3.1.** Aislamiento de ADN plasmídico. 39

**3.1.1.** Método de la lisis alcalina. 39

**3.1.2** Purificación mediante matrices comerciales. 39

**3.1.3.** Preparación del ADN plasmídico a gran escala. 40

**3.2.** Preparación de plásmidos e insertos de ADN. 40

**3.2.1.** Amplificación de insertos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 40

**3.2.2.** Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa. 40

**3.2.3.** Digestión con enzimas de restricción. 41

**3.2.4.** Desfosforilación de extremos compatibles. 41

**3.2.5.** Reacciones de ligación. 41

**3.2.6.** PCR colony. 41

**4.** Oligonucleótidos iniciadores (cebadores). 42

**5.** Electroforesis de ADN. 42

**6.** Vectores y plásmidos. 43

**6.1.** Vectores comerciales. 43

**6.2.** Vectores no comerciales. 43

**6.2.1.** Vectores no comerciales obtenidos previamente en el laboratorio. 43
**6.2.2.** Vectores no comerciales obtenidos durante este trabajo. 44
**7.** Secuencias.
**7.1.** Secuencia codificante de dermaseptina. 44
**7.2.** Secuencia codificante de lisozima. 44
**7.3.** Secuencia aminoacídica de dermaseptina. 44
**7.4.** Secuencia aminoacídica de lisozima. 45
**8.** Transformación genética. 45
**8.1.** Transformación genética de N. benthamiana. 45
**8.1.1.** Análisis de PCR de plantas de N. benthamiana. 46
**8.1.2.** Rusticación de las plantas transgénicas de N. benthamiana. 46
**8.1.3.** Obtención de la generación F1 y F2 de las líneas transgénicas de N. benthamiana. 46
**8.2.** Transformación genética de C. sinensis. 47
**8.2.1.** Preparación de los explantos. 47
**8.2.2.** Co-cultivo I. 47
**8.2.3.** Co-cultivo II. 47
**8.2.4.** Regeneración. 48
**9.** Selección visual por la fluorescencia de GFP. 48
**10.** Desarrollo de plántulas transgénicas de C. sinensis. 48
**10.1.** Injerto in vitro. 48
**10.2.** Análisis de PCR de plántulas de C. sinensis. 49
**10.3.** Propagación de plantas transgénicas de C. sinensis. 49
**11.** Análisis de ADN. 49
**11.1.** Preparación de ADN vegetal. 49
**11.1.1.** Preparación de ADN total de plantas para análisis por PCR. 49
**11.1.2.** Preparación de ADN total de C. sinensis para Southern blots. 50
**11.2.** Ensayo de Southern blot. 50
**11.2.1.** Preparación de sonda. 51
**12.** Análisis de ARN. 52
**12.1.** Extracción de ARN total por el método de TRIzol. 52
**12.2.** Preparación de ADNc y RT-PCR. 52

**13.** Análisis de proteínas. 53

**13.1.** Obtención de anticuerpos anti-dermaseptina. 53

**13.2.** Ensayos de Western blot. 54

**13.3.** Dot-blot. 55

**13.3.1.** Dot-blot con péptido sintético. 55

**13.3.2.** Dot-blot con extractos vegetales. 55

**13.3.3.** Dot-blot de los extractos vegetales filtrados. 56

**14.** Ensayos de inhibición in vitro de crecimiento bacteriano. 56

**14.1.** Ensayos de inhibición con dermaseptina sintética. 56

**14.2.** Ensayos de inhibición con lisozima comercial. 57

**14.3.** Ensayos de inhibición in vitro en medio líquido con extractos de plantas transformadas de N. benthamiana. 57

**14.3.1.** Obtención de extractos vegetales. 57

**14.3.2.** Preparación del inoculo. 58

**14.3.3.** Incubación y siembra. 58

**14.4.** Ensayos de inhibición in vitro en medio sólido con extractos de plantas transgénicas de N. benthamiana. 58

**14.5.** Ensayos de inhibición in vitro en medio sólido con extractos vegetales de plántulas transformadas de N. benthamiana. 59

**15.** Ensayos de agroinfiltración. 59

**16.** Ensayos de infiltración de Xanthomonas spp. en plantas de N. benthamiana. 60

**17.** Ensayos de co-infiltración de X. axonopodis y A. tumefaciens en plantas de N. benthamiana. 61

**18.** Ensayos de infección con X. axonopodis en hojas escindidas de C. sinensis. 61

**18.1.** Punción de hojas de C. sinensis seguido de la inoculación mediante spray. 61

**18.2.** Inmersión de hojas de C. sinensis en suspensiones bacterianas. 62

**19.** Ensayos de infección in planta con X. axonopodis en plantas de C. sinensis. 63

**20.** Métodos estadísticos. 64

**Resultados**

**1.** Ensayos de inhibición in vitro del crecimiento bacteriano. 66

**1.1.** Ensayos de inhibición de E. coli con dermaseptina sintética. 66

**1.2.** Ensayos de inhibición de Xanthomonas spp. con dermaseptina sintética. 67
**1.3.** Ensayos de inhibición de Xanthomonas spp. con lisozima comercial. 68

**2.** Desarrollo de construcciones genéticas para expresar dermaseptina y lisozima. 69

**3.** Ensayos de funcionalidad de los transgenes. 73

**3.1.** Análisis de la funcionalidad del transgen sgfp. 73

**3.2.** Análisis de la funcionalidad del transgen dermaseptina. 74

**4.** Transformación de N. benthamiana con las construcciones pBIN19sgfp-Der y pBIN19sgfp-Liz. 75

**5.** Segregación de la descendencia de plantas de N. benthamiana transformadas genéticamente. 77

**6.** Caracterización molecular y selección de las plantas de N. benthamiana transformadas genéticamente (generación F2). 80

**7.** Transformación de C. sinensis con la construcción pBIN19sgfp-Der. 82

**8.** Caracterización genético-molecular de plantas de C. sinensis transformadas. 84
**8.1.** Análisis de Southern blot. 84
**8.2** RT-PCR. 85
**8.3.** Obtención del anticuerpo anti-dermaseptina. 86
**8.4.** Detección de dermaseptina en plantas transgénicas. 87

**9.** Ensayos de infiltración y titulación de X. campestris en plantas de N. benthamiana. 88

**10.** Ensayos de inhibición in vitro de Xanthomonas spp. con extractos totales de N. benthamiana transformadas genéticamente. 90

**11.** Ensayos de infección en hojas escindidas de C. sinensis con X. axonopodis. 93

**12.** Ensayos de infección in planta en hojas de C. sinensis con X. axonopodis. 95

**13.** Ensayos de infección in planta con plantas transgénicas de C. sinensis. 97

**13.1.** Primeros ensayos de infección in planta. 98

**13.2.** Tercer ensayo de infección in planta. 105

**14.** Ensayos de infección de plantas transgénicas de C. sinensis en condiciones de invernadero. 112

**Discusión** 113

**Conclusiones y Perspectivas** 121

**Bibliografía** 124

**Anexo Estadístico** 135

# Introducción

## 1. La producción de cítricos en Argentina y el mundo.

La producción mundial de frutas cítricas totales está distribuida entre los países de los hemisferios Norte y Sur en porcentajes aproximados del 70% y 30%, respectivamente. Esta distribución permite que parte de la producción de un hemisferio sea exportada al otro para satisfacer las demandas que se generan en contraestación (Justo and Rivera, 2009).

Argentina es actualmente el séptimo productor de frutos cítricos, con una participación del 3,1% del total mundial. A su vez, ocupa el cuarto lugar en industrialización de frutas cítricas y es el segundo productor del hemisferio Sur, luego de Brasil. Según un informe publicado en 2011 por la Federación Argentina del Citrus (FederCitrus), la producción del sector citrícola argentino para el año 2010 se estimó en U$S 1.153,7 millones, de los cuales 527,5 correspondieron al mercado interno y 626,2 a la exportación (FederCitrus, 2011).

La producción de cítricos de nuestro país está concentrada en el Noroeste y Noreste argentinos (NOA y NEA, respectivamente). El NOA, integrado por las provincias de Tucumán, Salta, Jujuy y Catamarca, produce el 54,84% de la producción argentina. El NEA, integrado por Entre Ríos, Corrientes, Misiones y Buenos Aires, produce el 42,77 %. El 1,39% restante está distribuido en otras provincias, tales como Chaco y Formosa (FederCitrus, 2011).

La expansión citrícola en el NOA es relativamente reciente y se destaca del resto del país por estar localizada en áreas de baja contaminación ambiental, donde también es posible producir utilizando bajos niveles de plaguicidas, ya que existen enemigos naturales de las distintas plagas. La actividad agrícola en estas regiones ha logrado un alto grado de especialización, capitalización e incorporación de tecnología, lo que le permite competir en los mercados más exigentes del mundo. Así, se ha desarrollado una infraestructura de apoyo y de servicios (transporte, provisión de insumos, cosecha), de procesamiento (plantas de empaque, industria), industrias anexas (envases, viveros, maquinarias, mantenimiento) y de apoyo tecnológico (generación y transferencia de tecnología de producción, procesamiento, administración, comercialización), que permite una alta eficiencia productiva. La amplia diversidad climática comprendida en las regiones citrícolas, ha permitido la especialización de la producción en las diversas provincias, como es el caso de la producción de limones en Tucumán y la de pomelos rojos y rosados en Salta y Jujuy. Ha posibilitado además maximizar la producción de mandarinas y naranjas tanto tempranas como tardías (Justo y Rivera, 2009).

A diferencia del NOA, el NEA es una región con problemas de enfermedades cuarentenarias, como la Cancrosis de los cítricos, que plantean una marcada dificultad para cumplir con los protocolos de exportación. Por ello, los productos de esta región tienen vedado el acceso a mercados importantes como EEUU y Japón y enfrentan considerables limitaciones en mercados como los de Brasil, Chile, Uruguay y la Unión Europea. Sin embargo, con la aplicación del programa de mitigación de riesgos elaborado por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), y aprobado por los países compradores de la Unión Europea[1], ha permitido mantener abiertos los mercados e ir ampliando paulatinamente el volumen de los envíos (Justo and Rivera, 2009).

## 1.1. La producción de naranjas en Argentina.

La producción argentina de naranjas en el año 2010 fue de 833.000 Tn, lo que representa el 1,69% de la producción mundial y un 4,47% de la producción del hemisferio Sur. La exportación en el mismo período fue de 162.000 Tn, representando 4,28% de la exportación mundial y 11,31% de la del hemisferio Sur (FederCitrus, 2011).

La superficie cultivada con naranjas en Argentina es de 48.229 Ha, siendo las provincias de Entre Ríos, Corrientes y Jujuy las que presentan la mayor área cultivada y el mayor volumen de producción. La principal provincia productora es Entre Ríos, con el 56,58% de la producción nacional.

| Provincia | Superficie cultivada | Producción (Tn) |
|---|---|---|
| Buenos Aires | 2.344 | 22.000 |
| Catamarca | 950 | 5.500 |
| Corrientes | 12.143 | 130.000 |
| Chaco | 33 | 300 |
| Entre Ríos | 20.056 | 471.626 |
| Formosa | 238 | 729 |
| Jujuy | 4.515 | 92.444 |
| Misiones | 2.800 | 9.687 |
| Salta | 4.000 | 73.700 |
| Tucumán | 1.150 | 27.500 |
| **TOTAL** | **48.229** | **833.486** |

Tabla 1. Principales provincias productoras de naranja en la campaña 2010 (FederCitrus, 2011).

[1] Resolución SAGPyA 56/2008 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación, deja sin efecto las Resoluciones Nº 78 del 24 de enero de 2001 y Nº 42 del 13 de marzo de 2003, y aprueba el Programa de Certificación de Fruta Fresca Cítrica para exportación a la Unión Europea. http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=nyin=1332yio=8334

Del total de la producción de naranjas argentinas, el 48,69% se destina principalmente al consumo interno, el 21,9% se destina a la industria, y el 19,41% a la exportación. El 10% restante se debe a pérdidas pre- y post-cosecha (FederCitrus, 2011).

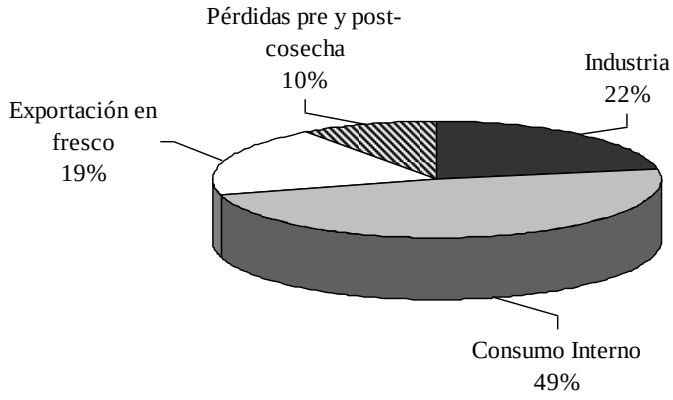



**Figura 1. Destino de la producción de naranjas en Argentina**. Los principales destinos de exportación en 2010 fueron España, Rusia, Holanda, Bélgica e Italia (FederCitrus, 2011).

## 2. Enfermedades bacterianas de los cítricos.

Las bacterias fitopatógenas capaces de infectar y desarrollar enfermedades en un gran número de especies vegetales de importancia económica pertenecen a un reducido grupo de géneros. Los géneros de bacterias Gram-negativas más estudiados desde el punto de vista de su biología, impacto fitopatológico y aspectos genético-moleculares son Agrobacterium, Erwinia, Pseudomonas y Xanthomonas (Daniels et al., 1992).

La mayor parte de las bacterias fitopatógenas de importancia agronómica son Gram-negativas, poseen una membrana externa, una pared compuesta de péptidoglicanos y una membrana interna (Figura 2 a). La pared celular de la mayoría de las bacterias fitopatógenas está cubierta por un material viscoso y gomoso que puede ser delgado (capa mucilaginosa) o denso (cápsula). Poseen un largo flagelo (en algunos casos pueden ser más de uno) cuya disposición puede ser unipolar, bipolar o sobre toda la superficie bacteriana. El material nuclear se presenta en forma de corpúsculos filiformes, esféricos o elipsoidales (Figura 2 b) (Agrios, 1997; Llacer et al., 1996).

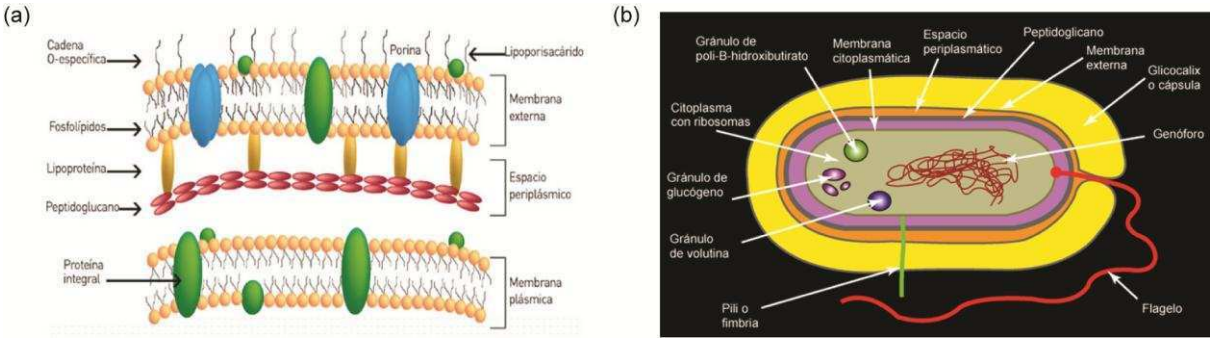



**Figura 2. (a)** Esquema de la membrana y pared típica de una bacteria fitopatógena Gram-negativa. **(b)** Esquema generalizado de la ultraestructura de una bacteria fitopatógena típica (Adaptado de Llacer et al., 1996).

Entre los principales patógenos bacterianos de los cítricos se encuentran Xanthomonas axonopodis pv. citri, X. axonopodis pv. aurantifolii, X. axonopodis pv. citrumelo, Xylella fastidiosa, Candidatus Liberibacter asiaticus, Ca. Liberibacter americanus, Ca. Liberibacter africanus y Pseudomonas syringae pv. syringae. Todas ellas producen enfermedades que redundan en pérdidas económicas debido a la merma de rendimiento de las plantas afectadas y, en algunos casos, se suman las pérdidas debidas a las restricciones cuarentenarias a los frutos impuestas por los países que están libres de tales patógenos.

Las Xanthomonas spp. son bacterias aeróbicas, Gram-negativas, que presentan un único flagelo. La mayoría de las especies de este género produce abundantes cantidades de polisacáridos extracelulares como el xantano (Scnaad et al., 2001; Llacer et al., 1996). Este exopolisacárido es un heteropolímero cuya estructura primaria consta de una serie de unidades repetitivas formadas por dos glucosas, dos manosas y un ácido glucurónico unidas por enlaces β-1,4 (Figura 3 b). La cadena principal presenta una estructura química idéntica a la celulosa, con cadenas de trisacáridos unidas al C3 de los residuos glicosídicos alternados (Yun et al., 2005).

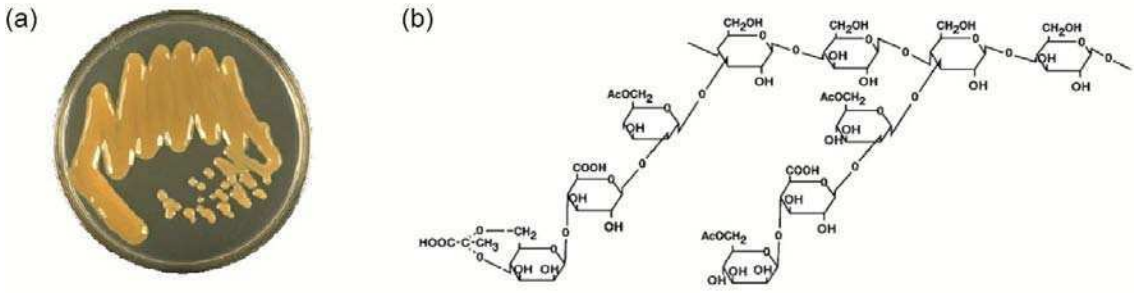



**Figura 3. (a)** Placa de Petri conteniendo una estría de Xanthomonas axonopodis pv. citri, se puede ver el color amarillo-anaranjado característico de este género bacteriano. **(b)** Estructura primaria del exopolisacárido xantano mostrando la unión de dos unidades repetitivas.

## 2.1. Cancrosis de los cítricos.

El agente causal de la Cancrosis de los cítricos es la bacteria Xanthomonas axonopodis pv. citri. La enfermedad se describió por primera vez en EE.UU. en 1915. Hoy se identifican al menos cinco (5) tipos de Cancrosis según la cepa de Xanthomonas que produce la enfermedad y la región donde se distribuye.

La Cancrosis A o asiática es la forma más ampliamente distribuida en el mundo. Está presente en Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay, Japón, China, India, Arabia Saudita, Irán, Pakistán, Francia, EE.UU, entre otros países. Las Xanthomonas del grupo A afectan pomelos, lima Key, naranjas, mandarinas, limones y otras especies de Rutáceas (familia de plantas que agrupa, entre otros géneros, a los cítricos). El agente causal de la Cancrosis A es X. axonopodis pv. citri.

La Cancrosis B fue descripta en 1929 en la Argentina y estaba localizada sólo en algunas zonas de Corrientes y Entre Ríos. Afectaba principalmente a limones y lima Key. Actualmente se la considera ausente en la región. El agente causal de la enfermedad es X. axonopodis pv. aurantifolii.

La Cancrosis C fue descripta únicamente en Brasil, en plantas de limonero gallego (Citrus aurantifolia). En algunos estudios taxonómicos moleculares se clasificaron a las cepas del grupo C como X. axonopodis pv. aurantifolii. Si bien se ha propuesto el mismo nombre para las cepas productoras de la Cancrosis B y C, la cepa que causa la C se diferencia del grupo B por que no produce síntomas en pomelo en inoculaciones artificiales.

La cancrosis D o bacteriosis apareció por primera vez en 1981 en México, en plantas de lima mexicana (Citrus aurantifolia –Christm– Swingle). Si bien existen estudios con cepas presuntamente aisladas de las plantas portadoras de esos síntomas, su existencia es dudosa ya que nunca pudo recuperarse nuevamente del mismo lugar y los síntomas descriptos inicialmente son causados por una nueva variante del hongo Alternaria.

La Cancrosis E, de los viveros o mancha bacteriana (CBS, por Citrus Bacterial Spot) apareció en Florida (EE.UU.) en 1984, sobre el portainjerto de citrumelo Swingle. Se intentó la erradicación pero se suspendió cuando se determinó que la cepa poseía baja agresividad. En la actualidad, se la puede encontrar esporádicamente en plantas de vivero o en plantas adultas de diversas especies. El agente causa es X. axonopodis pv. citrumelo.

En la Figura 4 se puede observar la distribución mundial de la enfermedad para el año 2002. En la actualidad, las zonas afectadas por la Cancrosis son las mismas que se observan con el agregado de Bolivia y el NOA.

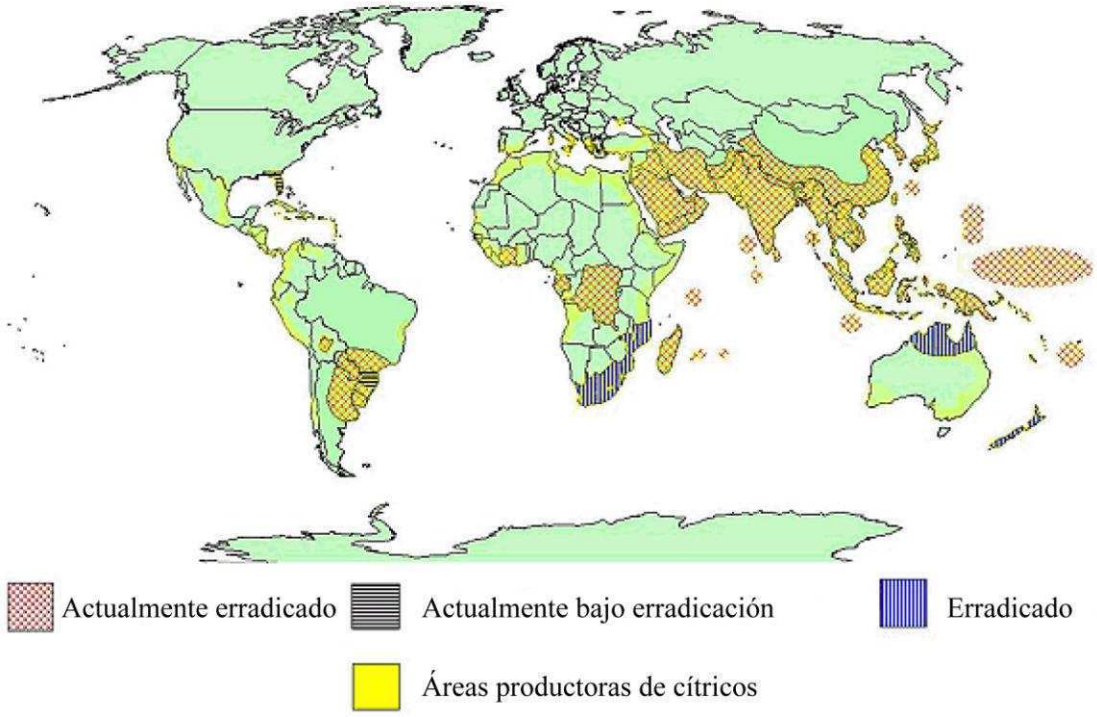



**Figura 4.** Distribución mundial de la Cancrosis de los cítricos (Gottwald et al., 2002).

Tanto los cultivos del NOA como los del NEA se encuentran actualmente afectados por la Cancrosis de los cítricos. Las cepas de Xanthomonas aisladas en territorio nacional pertenecen al grupo A, causante de la Cancrosis tipo A. En el NOA la enfermedad fue reportada por primera vez en el verano de 2002, y aún hoy afecta a la producción citrícola de la región; sin embargo, dicha región aún no ha sido declarada zona endémica. En cambio, el NEA es zona endémica, lo cual limita las exportaciones argentinas a los países de la Unión Europea.

### 2.1.1. Biología de la enfermedad.

La Cancrosis afecta a todos los citrus y a las especies y variedades de portainjertos y copas cultivadas comercialmente. De todas las especies cultivadas, las más atacadas son los pomelos, algunas limas, las naranjas tempranas, algunas mandarinas, y los limones. El grado

de susceptibilidad de los distintos cultivos citrícolas a Xanthomonas varía según la variedad de cítrico considerada:

| Altamente susceptibles | Moderadamente susceptibles | Moderadamente resistentes |
|---|---|---|
| Pomelos | Naranja amarga | Mandarina |
| Lima Key | Limón | - |
| Naranja trifoliada | Naranja dulce | - |

Todos los tejidos del vástago de la planta son susceptibles a la infección bacteriana: hojas, ramas y frutos. La bacteria penetra en los tejidos jóvenes (tejidos en expansión) de la planta hospedante a través de los estomas (Gottwald et al., 2002). Es por ello que la resistencia observada en el campo ha sido correlacionada con el tamaño y número de aperturas estomáticas disponibles para permitir la entrada de la bacteria dentro de la planta debido al viento y a la lluvia (Brunings and Gabriel, 2003). En el caso de tejidos maduros, la entrada se produce a través de heridas causadas por el viento, el granizo, la acción del hombre, o por lesiones causadas por insectos tales como el minador de la hoja de los cítricos (Phyllocnistis citrella). En este último caso, las larvas del lepidóptero generan galerías en las hojas a medida que se alimenta, dejando al descubierto el mesófilo y facilitando la entrada de la bacteria (Figura 5 d y e). Así, el minador de la hoja actúa como amplificador de la Cancrosis, aumentando la incidencia[2] y la severidad[3] de la enfermedad (Gottwald et al., 2002). Tanto en los tejidos en expansión como en los tejidos maduros, la presión que ejerce el viento sobre los tejidos es crucial para permitir la penetración bacteriana. Por ello, las lluvias acompañadas de fuertes vientos son los factores climáticos ideales para lograr la infección. En el campo los síntomas generalmente comienzan a hacerse visibles alrededor de 20 d después de la infección. Las bajas temperaturas retrasan la aparición de los síntomas (Canteros, 2009b).

[2] La incidencia incidencia está relacionada con el número de individuos afectados, con síntomas. Generalmente se expresa como porcentaje de individuos afectados, o porcentaje de plantas muertas; etc.
[3] La severidad se refiere a la intensidad del ataque producido por el patógeno. Suele expresarse como porcentaje de la superficie afectada, pérdida de biomasa, etc.

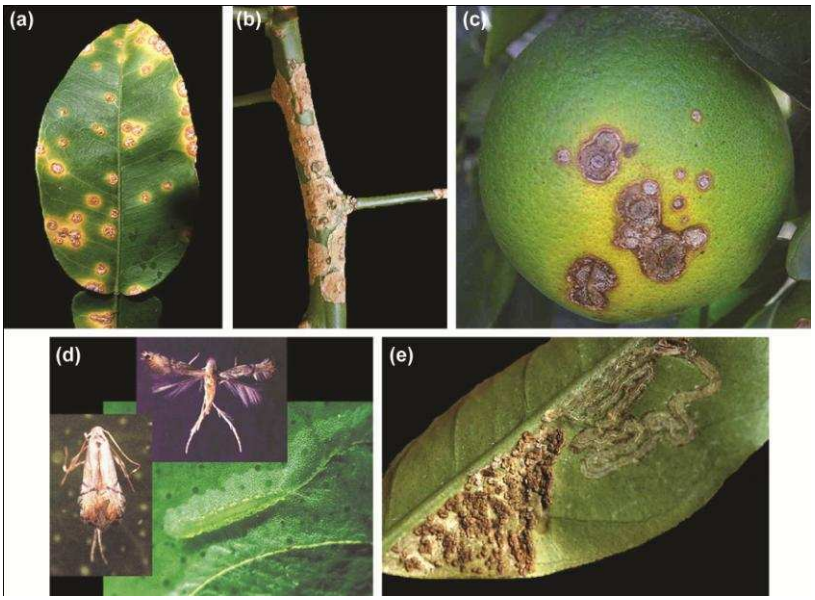



**Figura 5. Lesiones sobre los distintos órganos de una planta de cítrico producidas por Xanthomonas. (a)** Hoja de pomelo rojo severamente afectada por Xanthomonas. **(b)** Lesión sobre el tallo de una planta de C. sinensis. **(c)** Grandes lesiones sobre una fruta inmadura rodeadas por halos cloróticos. **(d)** Fotografía de un adulto y de una larva de P. citrella alimentándose de la hoja. **(e)** Hoja de naranjo con galerías infectadas con cancros como consecuencia de la exposición del mesófilo (izquierda), y galerías aún no infectadas (derecha). Fotografías tomadas de Gottwald et al., 2002.

Una vez que ingresaron a la planta, las bacterias se multiplican en los espacios intercelulares de la célula vegetal o apoplasto (Figura 6a), produciendo una pústula o cancro, necrosis y muerte celular. A los 5-7 d de haber ingresado a la planta, emerge nuevamente a través de los estomas o de las heridas, proporcionando el inóculo para una nueva infección. Los polisacáridos extracelulares encapsulan a las bacterias exudadas en la superficie de las lesiones, ayudando a la dispersión causada por el viento y a su supervivencia (Gotto and Hyodo, 1985).

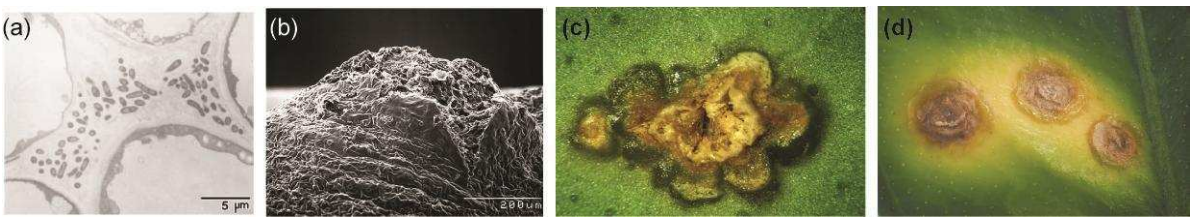



**Figura 6. Detalle de las lesiones producidas por Xanthomonas en cítricos. (a)** X. axonopodis pv. citrumelo a los 7 d.p.i en el espacios apoplástico de una planta de pomelo (Graham et al., 2004). **(b)** Fotografía tomada con un microscopio electrónico de barrido de un cancro rompiendo la epidermis. **(c)** Lesión húmeda característica (water soakin) rodeando la pústula o cancro. **(d)** Cancros rodeados del halo clorótico amarillento característico de la infección con Xanthomonas. Fotografías **(b)**, **(c)** y **(d)** pertenecientes al trabajo de Gottwald et al., 2002.

Los primeros síntomas de la enfermedad en las hojas aparecen como pequeñas manchas circulares ligeramente levantadas, embebidas en agua (water soaking) y de un color verde más oscuro que los tejidos circundantes. Más tarde las lesiones cambian a un color blanco grisáceo, se abren y adquieren una apariencia esponjosa o suberosa, con el centro parecido a un cráter, y se las denomina cancro. Los bordes de las lesiones están bien definidos y embebidos en agua, y suelen rodearse de un halo clorótico o amarillento característico (Figura 6d; Brunings and Gabriel, 2003). Las lesiones en las hojas se hacen visibles entre 7-10 d.p.i. en ambos lados de la lámina. Las lesiones que ocurren sobre vástagos permanecen visibles por muchas estaciones y permiten que el inóculo sobreviva durante largos períodos de tiempo. Si bien las lesiones en los frutos no alteran necesariamente su calidad interna, ocasionan pérdidas de valor en el mercado por el aspecto que adquiere la cáscara (Gottwald et al., 2002).

Las pústulas húmedas y los cancros se producen como consecuencia de la inducción del crecimiento celular (hipertrofia) y la división celular (hiperplasia). La inducción ocurre dentro de las 72 h posteriores a la inoculación, como consecuencia de la secreción de la proteína PthA en las células del hospedante. El gen pthA es el responsable de la patogenicidad de Xanthomonas y es necesario para que la bacteria cause la enfermedad. Este gen o un gen homólogo están presentes en todas las Xanthomonas que causan Cancrosis. La expresión en forma transitoria del gen pthA dentro de células de cítricos es suficiente para la producción de los síntomas de hipertrofia, hiperplasia y muerte celular. A su vez, mutaciones de pthA en Xanthomonas causan la pérdida de habilidad de generar la enfermedad, pérdida en la habilidad de formar ampollas húmedas, y pérdida significativa de la habilidad del patógeno de crecer en la planta, lo cual indicaría que pthA también sería necesario para la liberación de nutrientes en los cítricos (Brunings and Gabriel, 2003).

La defoliación, la muerte progresiva de las ramas y la caída temprana de los frutos son los impactos económicos directos de la enfermedad (Graham et al., 2004), que disminuyen el rendimiento del cultivo. Cuando la severidad de la enfermedad es elevada, la Cancrosis puede afectar el contenido interno de los frutos, lo que constituye un severo problema para las plantas afectadas (Goto and Yaguchi, 1979; Gottwald et al., 1988).

### 2.1.2. Asociación de Pseudomonas en síntomas de Cancrosis.

Los síntomas de la Cancrosis pueden presentarse en ocasiones con un aspecto diferente al habitual, debido a la invasión de los cancros de las hojas y/o de los frutos por la bacteria P. syringae pv. syringae. Esta asociación de Xanthomonas y Pseudomonas ocurre generalmente en plantines y plantas adultas de pomelo, limón y algunas naranjas. Es más evidente en épocas de temperaturas frescas, ya que la bacteria Pseudomonas es de clima templado (Canteros, 2009b).

### 2.2. Clorosis Variegada de los Citrus (CVC).

La Clorosis Variegada de los Cítricos es una enfermedad producida por la bacteria Xylella fastidiosa que afecta todas las variedades de cítricos y portainjertos. La enfermedad es trasmitida por el insecto Homalodisca coagulata (Damsteegt et al., 2006) y es específica de xilema (Dow et al., 2000). La bacteria inyectada por el insecto, invade el xilema de las plantas produciendo como síntoma característico una clorosis internerval muy notable, seguida de manchas con inclusión de goma color marrón claro. La bacteria no se encuentra en las zonas cloróticas ni en las zonas con goma debido a que invade únicamente las nervaduras. En los frutos se observa fructificación en racimo, maduración precoz y disminución del tamaño final de la fruta. En nuestro país, se la encontró por primera vez en Misiones en 1984 en plantas de naranjo, y se la reportó como "pecosita" (Brlansky et al., 1993). En la actualidad se encuentra presente en Argentina, Brasil, EE.UU. y Costa Rica (Damsteegt et al., 2006).

### 2.3. Huang-long-bind (HLB) o ex greening.

HLB es una enfermedad causada por la bacteria Candidatus Liberibacter asiaticus (Las), Ca. Liberibacter americanus (Lam) y Ca. Liberibacter africanus (Laf). El patógeno se aloja en el floema de las plantas afectadas y causa síntomas en las hojas y frutos. Los frutos se vuelven no comestibles por el sabor amargo y la mayoría de las plantas muere luego de la infección. Estas bacterias patogénicas aún no han podido ser cultivadas en el laboratorio, por lo que los diagnósticos se realizan mediante análisis moleculares. Laf está presente en Sudáfrica y Las en China. En EEUU y Brasil ingresó recientemente el tipo Las, y en este último se encontró posteriormente el tipo Lam. En 2007 la enfermedad fue reportada en 131 municipios de San Pablo, Brasil (Mangussi, 2008). Tanto Lam como Las tienen como vector el psílido Diaphorina citri (Ramos Méndez, 2008), insecto que también se encuentra presente en el territorio argentino. En junio de 2012, el SENASA confirmó la detección del patógeno en la localidad misionera de Andresito y en su informe especificó que "se pusieron en marcha

los procedimientos necesarios para erradicar las plantas afectadas" y que la "la situación no representa un riesgo epidemiológico significativo, dado que las plantas fueron encontradas en casas de familia" (http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=nyin=11yio=21289).

### 2.4. Tizón bacterial (citrus blast).

Esta enfermedad es causada por P. syringae pv. syringae. Aparece muy ocasionalmente en plantines de almácigo. En Argentina no ocurre en plantas adultas y es más común en plantines de pomelo. La bacteria penetra por la unión de la lámina foliar con el pecíolo y origina el tizón (necrosis) de las zonas adyacentes, provocando eventualmente la caída de las hojas (Canteros, 2009b).

## 3. Pérdidas económicas provocadas por la Cancrosis de los cítricos.

Según un informe del Banco Mundial de 2010, la Cancrosis de los cítricos provoca en Argentina una pérdida anual de U$S 36 millones (Huerga and San Juan, 2005). Si bien las lesiones provocadas en los frutos por Xanthomonas no alteran necesariamente su calidad interna, la infección bacteriana ocasiona la pérdida de valor en el mercado por el aspecto que adquiere la cáscara, y adicionalmente, por la pérdida económica causada por las restricciones cuarentenarias a los frutos provenientes de áreas infectadas (barreras para-arancelarias), impuestas por países libres de Cancrosis (Canteros, 2004).

## 4. Alternativas actuales para el control de la Cancrosis de los cítricos.

Hasta el momento no se ha encontrado resistencia natural en variedades comerciales de naranjos, ni en las especies utilizadas como pie o patrón, que son aquellas sobre las que se propagan las especies de interés comercial. Por ello, los intentos de controlar la enfermedad consisten actualmente en la aplicación de bactericidas de contacto a base de cobre, que mitigan el impacto de la enfermedad. A su vez, pueden utilizarse insecticidas contra el minador de la hoja para disminuir la severidad y la incidencia de las infecciones. Este tipo de controles basados en la aplicación superficial de químicos, tiene como desventajas que son eliminados por las lluvias y el viento, producen contaminación ambiental y ponen en riesgo la salud de los operarios encargados de las pulverizaciones y de las poblaciones cercanas a las plantaciones. Adicionalmente, el uso sistemático de cobre trajo aparejado en los últimos años la aparición de cepas de Xanthomonas resistentes al bactericida en distintas fincas de la región del NEA (Canteros et al., 2010; Behlau et al., 2012). Como consecuencia de la aparición de

resistencia, comenzó a utilizarse una mezcla de cobre y del fungicida Mancozeb[4], recuperándose la acción bactericida de las aspersiones (Canteros, 2009a y 2009b).

En los últimos años, tanto en Argentina como en el resto del mundo, se implementaron programas de Manejo Integrado para el control de la Cancrosis de los cítricos. Las medidas incluyen: a) estricto calendario de pulverizaciones a base de cobre (combinado con Mancozeb en casos que sea necesario), variable según el cultivo; b) control químico del minador de la hoja de los cítricos (P. citrella); c) utilización de cortinas rompevientos; d) monitoreo constante de las plantaciones para detectar en forma temprana la aparición de síntomas; e) poda y eliminación de órganos afectados por el patógeno; f) erradicación y quema de plantaciones muy afectadas; g) desinfección de la fruta cosechada (hipoclorito de sodio 200 ppm durante 2 min y/o ortofenilfenato de sodio); h) cosecha selectiva de frutas destinadas a la exportación; i) tareas de saneamiento que incluyen desinfección de ropa, herramientas y maquinaria utilizadas por lote (Gottwald et al., 2002; Canteros, 2009a).

En la actualidad, el SENASA junto con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Universidades, Gobiernos Provinciales, Municipios y Asociaciones de Productores, han conformado una red que impulsa el "Programa de Sanidad Citrícola", el cual busca mejorar la condición fitosanitaria de las plantaciones de cítricos para que los frutos puedan ingresar en los mercados compradores más restrictivos. Específicamente, este programa busca: a) erradicar o llevar a niveles económicamente aceptables la incidencia de las principales plagas en las zonas de producción; b) establecer y proteger zonas libres y liberadas de las principales plagas citrícolas; c) implementar programas oficiales de cuarentena y certificación de material de propagación; y d) implementar programas específicos que permitan aumentar las posibilidades de comercialización externa de la producción citrícola nacional (Justo and Rivera, 2009).

## 5. La interacción planta-patógeno.

En la naturaleza, se pueden reconocer dos tipos de interacción entre una planta y un patógeno, en función de las respuestas de la planta frente al ataque del mismo. La interacción compatible y la interacción incompatible. La interacción compatible es aquellas en la cual un patógeno logra infectar y enfermar a una planta. Este tipo de interacción se produce cuando las condiciones ambientales son favorables y el sistema defensivo de la planta resulta

[4] Mancozeb: complejo de manganeso etilen bis (ditiocarbamato) (polimérico) con sal de zinc.

inadecuado, ya sea porque la planta no es capaz de detectar al patógeno, o porque la respuesta defensiva es ineficiente. En cambio, la interacción incompatible es aquella en la cual la planta resiste al ataque del patógeno y no se produce enfermedad. Esta resistencia puede ser inespecífica (también denominada no-hospedante) y se produce cuando el patógeno no encuentra las condiciones favorables para realizar la infección, la planta presenta estructuras preformadas eficientes, o sintetiza compuestos tóxicos que impiden la proliferación y colonización del patógeno. También puede deberse a un reconocimiento del patógeno por parte de la planta de forma inespecífica, a través de la detección de moléculas comunes a la mayoría de microorganismos fitopatógenos, tales como los lipopolisacáridos de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas o de la proteína flagelina, componente estructural del flagelo. Otra posibilidad es que se produzca un reconocimiento específico entre la planta y un patógeno determinado, que involucre la interacción de productos génicos del hospedante (genes R) y del patógeno (genes Avr).

Una vez que se produce el reconocimiento del patógeno (de forma específica o inespecífica), la respuesta defensiva de la planta comprende una serie de eventos comunes. Se produce un rápido intercambio de iones desde el medio extracelular a través de la membrana plasmática. Como consecuencia, se incrementa la concentración intracelular de $H^+$ y $Ca^{2+}$ y disminuye la de $Cl^-$ y $K^+$, lo cual permite la activación de las proteín quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés Mitogen-Activating Protein Kinase) y la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species) a través de una NAD(P)H oxidasa asociada a membrana. Una vez activadas las MAPKs, algunas son traslocadas al núcleo y otras son rápidamente fosforiladas y desfosforiladas. Finalmente, se induce la transcripción de genes relacionados a la patogenicidad (PR, del inglés Pathogenicity Related), genes involucrados en la biosíntesis de fitoalexinas y la síntesis de metabolitos secundarios de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana (Gadjev et al., 2008; Zurbriggen et al., 2010).

### 5.1. El sistema de defensa de las plantas.

Las plantas poseen sistemas de defensa preexistentes al ataque del patógeno que pueden clasificarse en barreras bioquímicas y mecánicas. Las barreras bioquímicas involucran tres grandes grupos de compuestos: péptidos y proteínas, metabolitos secundarios e inhibidores de proteasas. Las barreras mecánicas dependen del grosor de la epidermis, calidad de la cutícula, y forma, tamaño y localización de estomas y lenticelas. Además, las plantas

han desarrollado mecanismos de respuesta fisiológicos, bioquímicos y moleculares que les permiten responder frente al ataque de los patógenos. Así, una vez que la planta detecta la presencia de un microorganismo invasor, se induce una serie de mecanismos defensivos que incluyen la Respuesta Hipersensible (HR; del inglés, Hypersensitive Response), la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR; del inglés Systemic Acquired Resistance), la síntesis de proteínas PR, la síntesis de fiotalexinas y las respuestas morfológicas.

La HR se caracteriza por una necrosis rápida y localizada en respuesta al ataque del patógeno. Ocurre en las células vegetales aproximadamente 24 h después de que la planta percibe un patógeno potencial. Consiste en una rápida activación alrededor del sitio de infección de las reacciones de defensa asociadas a la muerte celular, similares a la muerte celular programada de los animales. La muerte celular es precedida por la producción de especies reactivas de oxígeno que participan de la señalización dentro y hacia otras células, tiene efecto tóxico sobre los microorganismos invasores y participan en el refuerzo de la pared celular. El objetivo de la muerte celular en la zona de ingreso de un microorganismo patogénico es el de aislar al invasor. En el caso de los biótrofos, los depriva del acceso a más nutrientes; en el caso de los necrótrofos, la muerte celular resultaría en la liberación de sustancias inhibitorias para el patógeno (Hofius et al., 2007; Gadjev et al., 2008).

Luego que ocurre la HR en algún lugar del hospedante, la planta adquiere resistencia en tejidos distales al sitio primario de infección. Esta resistencia, que protege a toda la planta, es conocida como SAR. El ácido salicílico actúa como una de las principales moléculas señalizadoras de esta respuesta, aumentando las defensas en toda la planta para posteriores ataques del mismo o de otros patógenos (Hofius et al., 2007).

La síntesis de proteínas PR incluye enzimas capaces de degradar la pared celular de los microorganismos, como por ejemplo quitinasas o glucanasas, diversos polipéptidos con actividad antimicrobiana, y componentes de las cascadas de transducción de señales que coordinan la respuesta defensiva.

A su vez, en los sitios de interacción con el patógeno, se produce la síntesis de fitoalexinas, que son moléculas con actividad antimicrobiana provenientes del metabolismo secundario (fenilpropanoides, flavonoides, isoflavonoides, sesquiterpenos y policétidos). Las distintas enzimas involucradas en la síntesis de las fitoalexinas son producidas de novo en el momento de la infección (Hammerschmidt, 1999).

Otro de los mecanismos defensivos que se producen luego del reconocimiento de un patógeno por parte de la planta, son las respuestas estructurales que impiden el avance del invasor. Entre las respuestas más comunes se encuentran la formación de capas de corcho; la formación de capas de abscisión; formación de tílides; depósito de sustancias gomosas; hinchazón de tejido parenquimático rodeado de material fibrilar amorfo; engrosamiento de las paredes celulares; deposición de calosa; cierre de estomas; etc.

## 6. Estrategias biotecnológicas para introducir resistencia a enfermedades bacterianas.

En los últimos años, los avances de la biología molecular y la ingeniería genética han permitido desarrollar diferentes estrategias biotecnológicas para obtener plantas resistentes a distintos fitopatógenos en un gran número de cultivos de interés agronómico (Collinge et al., 2010; McDowell and Woffenden, 2003). Las estrategias más utilizadas para tal fin incluyen: 1) introducción de genes de resistencia; 2) expresión de enzimas líticas, tioninas y fitoalexinas; 3) interferencia con el mecanismo de quorum sensing de comunicación bacteriana; 4) incremento de los sistemas de defensa naturales de la planta; 5) expresión de péptidos antimicrobianos de distinto origen.

### 6.1. Estrategia basada en la introducción de genes de resistencia/avirulencia.

La coexistencia entre las plantas y sus patógenos en la naturaleza, indica que ambos tipos de organismo han co-evolucionado a lo largo del tiempo. De esta forma, las bacterias fitopatógenas han desarrollado a lo largo de la evolución, una serie de compuestos que contribuyen a la invasión y colonización de sus respectivos hospedadores. Estos compuestos, denominados factores de virulencia, determinan la patogenicidad y el grado de virulencia del patógeno. Algunos de los mismos son comunes a todas las interacciones hospedante-patógeno y otros son específicos de interacciones particulares.

El modelo del “gen por gen” propuesto por Harold Flor (Flor, 1971), postula que los factores de virulencia (proteína efectora Avr) pueden ser “reconocidos” por el sistema de defensa de la planta mediante las proteínas de resistencia (proteína R), desencadenando la Respuesta Hipersensible (HR). Si bien durante mucho tiempo se postuló un modelo de co-evolución entre los genes R y Avr, según el cual sus productos génicos interactuarían de manera directa, en los últimos años cobró fuerza un modelo que tiene en cuenta los numerosos casos en que se verificó que no existe una unión directa entre los productos de los

genes R y Avr. Este nuevo modelo, denominado de la proteína "guardiana" (Dangl and Jones, 2001), postula que las proteínas R detectarían modificaciones provocadas por las proteínas Avr sobre sus blancos intracelulares. En la Figura 7 se muestra un esquema de este modelo.

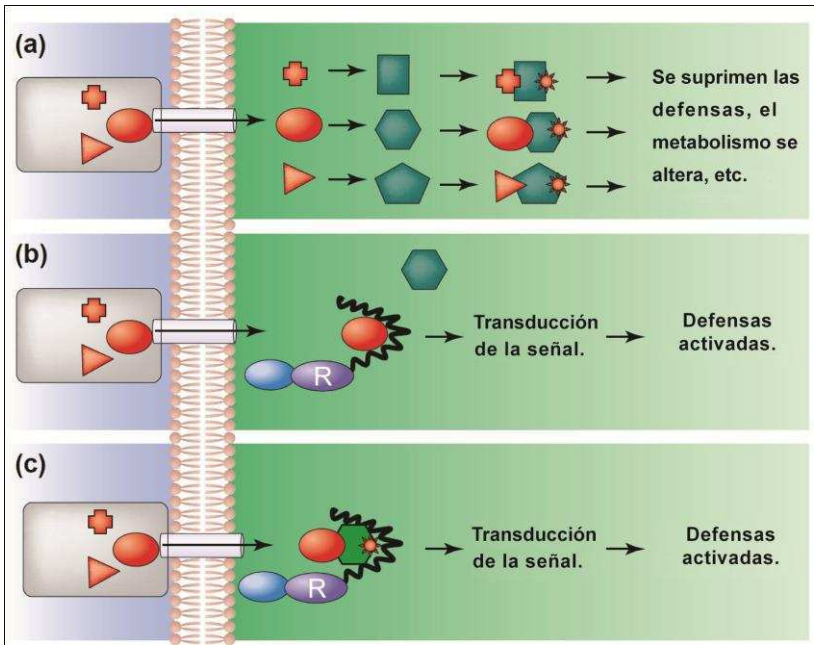



**Figura 7. Interacciones entre las proteínas Avr del patógeno y las proteínas R de las plantas**. El patógeno hipotético (rectángulo gris) se ha unido a una célula de la planta y expresa distintas proteínas de virulencia (símbolos en rojo). En el caso de las bacterias, estas proteínas se translocan a la célula vegetal a través de un sistema de secreción de Tipo III (ver página 17). Una vez dentro de la célula, las proteínas Avr interactúan con las distintas proteínas del hospedador (símbolos en verde) que controlan las respuestas defensivas de la planta y permiten expresar la virulencia de patógeno. **(a)** Caso de no reconocimiento. La célula de la planta no expresa una proteína R capaz de reconocer a las proteínas de virulencia (Avr). En consecuencia, la planta no puede detectar eficientemente al patógeno. Las proteínas Avr se unen a sus blancos moleculares suprimiendo el sistema de defensa y alterando el metabolismo del hospedante. **(b)** Reconocimiento directo por una proteína R. La proteína R, que comprende un dominio receptor y un dominio inductor, se une directamente una proteína de virulencia (Avr). Este reconocimiento activa una red compleja de transducción de señales que desencadena las respuestas defensivas de la planta. **(c)** Modelo de la proteína "guardiana". Una proteína R ("guardiana") que comprende un dominio receptor y un dominio inductor detecta una proteína del hospedador que se halla modificada (símbolo de estrella roja) como consecuencia de su unión con una proteína de avirulencia Avr. Este reconocimiento desencadena una cadena de transducción que gatilla las respuestas defensivas. Esquema tomado de McDowell and Woffenden, 2003.

La mayor parte de los genes de resistencia (R) codifican proteínas de localización citoplasmática y contienen un dominio de unión a nucleótidos llamados NBS (por Nucleotide Binding Site), y otro domino rico en leucinas llamado LRR (por Leucine-Rich Repeats). Otros genes de resistencia capaces de participar en la detección de genes Avr codifican receptores del tipo RLK (por Receptor-Like Kinase) y RLP (por Receptor-Like Protein). Muchos genes de resistencia poseen en su secuencia dominios involucrados en la señalización, como cierres

de leucina (leucine zippers), o dominios de proteínas quinasas. En base a esto, se cree que las proteínas codificadas por los genes R tienen dos tipos de funciones: el reconocimiento de la señal derivada de la proteína Avr, y la activación de las vías de señalización que desencadenan la respuesta contra el patógeno.

Los productos de los genes Avr tienen dos efectos potencialmente contrapuestos. Uno, presente en todos ellos, es el de ser blanco directo o indirecto de los productos génicos de resistencia (proteína R), induciendo de esa manera una respuesta defensiva del hospedador. El segundo, descripto en un número cada vez mayor de proteínas Avr, es el de interferir con las señalizaciones defensivas del hospedador. Por ejemplo, el gen AvrPtoB de P. syringae es capaz de suprimir la muerte celular programada de las plantas de tomate que no poseen el gen de resistencia Pto (Avramovich et al., 2006). La proteína AvrPtoB posee, por una parte, un dominio N-terminal que desencadena la respuesta HR y, por otra, un dominio C-terminal que es necesario para la supresión de la respuesta inducida por el domino N-terminal. Por ende, una bacteria mutante que carece del domino C-terminal de AvrPtoB es incapaz de infectar, ya que desencadenará rápidamente una respuesta HR.

Diversas enzimas extracelulares son también importantes factores de virulencia ya que en su ausencia, el poder de infección del patógeno disminuye considerablemente. Entre ellas se cuentan las pectinasas, celulasas, proteasas, glicanasas, poligalacturonasas y esterasas. Estas enzimas son capaces de degradar componentes de la pared celular de las plantas y otros componentes celulares, contribuyendo al ingreso del patógeno a la planta y, una vez dentro de los tejidos, a la provisión de nutrientes para su multiplicación.

Muchas proteínas Avr son introducidas en la célula del hospedador a través de sistemas bacterianos de secreción que las transportan a través de las paredes celulares bacterianas primero, y a través de las membranas del hospedador después. El sistema de secreción Tipo III es el utilizado para secretar a la mayoría de las proteínas Avr (Alfano and Collmer, 2004). Mientras que las proteínas de este sistema que participan del transporte a través de la pared bacteriana están altamente conservadas[5], las que interaccionan con la célula vegetal son variables, ya que están especializadas según el rango de hospedador de la bacteria. A pesar de esa variabilidad, pueden ser agrupadas en tres clases: subunidades Hrp del pilus,

[5] Este grupo de proteínas Avr también son llamados factores de patogenicidad, ya que son imprescindibles para generar la enfermedad, pero a diferencia otros factores de virulencia propiamente dichos, no son los responsables de los síntomas ni modulan la gravedad de la enfermedad, como ocurre, por ejemplo, con algunas toxinas o las fitohormonas, por ejemplo.

harpinas (harpins) y factores de translocación. Los pili son proyecciones proteicas de 8 nm de diámetro que sirven de conducto para el transporte de los efectores bacterianos al citoplasma vegetal. Las harpinas estarían involucradas en la interacción con la pared celular y la membrana plasmática, mientras que los factores de translocación forman poros en la membrana plasmática.

Si bien en la mayor parte de las publicaciones referidas a la supresión de la respuesta inmune de las plantas se estudia el rol de distintos genes Avr, ellos no son los únicos efectores bacterianos capaces de causar dicho efecto. En los últimos años se demostró que las mutantes de X. campestris pv. campestris que poseen una deficiencia en la síntesis del exopolisacárido xantano, tienen afectada su capacidad de infección. Esto se debe a que el xantano es capaz de interferir con una de las respuestas defensivas de las plantas, impidiendo el refuerzo de la pared celular por deposición de calosa al interferir con la vía de señalización que lleva a la activación de la calosa sintetasa (Yun et al., 2005). A su vez, esta mutación afecta la capacidad de las bacterias de formar biofilmes, importantes en la diseminación y la capacidad de infección del patógeno (Torres et al., 2007). En el caso de mutantes similares de X. axonopodis pv. citri, se observó que además de tener afectada la patogénesis, las bacterias tenían afectada la capacidad de formar biofilmes y de adherirse a la superficie foliar.

En los últimos años, se logró introducir resistencia en distintos cultivos de interés agronómico mediante la expresión de genes de resistencia en plantas que originalmente eran susceptibles. Como ejemplo, cabe mencionar la expresión del gen de resistencia Bs2 de pimiento en plantas de tomate, el cual confiere resistencia a cepas de X. campestris pv. vesicatoria que contienen el gen de avirulencia avrBS2 (Tai et al., 1999). Un caso similar es el de la expresión del gen de resistencia del arroz Xa21, proteína que posee un dominio quinasa serina/treonina capaz de autofosforilarse en varios sitios en el curso de una interacción incompatible. Mediante la expresión de Xa21 en variedades de arroz susceptible se logró obtener resistencia a X. oryzae pv. oryzae (Xoo), medida como una disminución del tamaño de las lesiones foliares (Zhang et al., 1998).

Yang et al. (2010) lograron obtener resistencia frente a la infección de X. axonopodis pv. citri en plantas de transgénicas de naranjo, expresando la región carboxi-terminal (la cual contiene tres señales de localización nuclear) de la proteína pthA. El gen de avirulencia pthA es uno de los responsables de la infección de X. axonopodis pv. citri en cítricos, y cuando es transferido a otras especies de Xanthomonas, las bacterias resultantes adquieren la capacidad

de inducir cancros e hiperplasia en cítricos. Este tipo de estrategia, en la cual se desencadena la resistencia mediante la expresión de secuencias génicas del propio patógeno, se denomina resistencia derivada del patógeno o PDR (del inglés, Pathogen Derived Resistance).

### 6.2. Estrategias basadas en la expresión de enzimas líticas, tioninas y fitoalexinas.

Entre las estrategias biotecnológicas más utilizadas para la obtención de plantas resistentes a bacterias fitopatógenas, se encuentra la expresión de compuestos antimicrobianos de diverso origen en plantas genéticamente modificadas. Tales compuestos incluyen proteínas, enzimas o moléculas de estructura derivadas del metabolismo secundario de las plantas.

Un ejemplo de este tipo de estrategia es la utilización de péptidos de bajo peso molecular ricos en residuos de cisteína, llamados tioninas, que se encuentran presentes en el endosperma y en las hojas de los cereales. Su mecanismo de acción es no-específico y se basa en la permeabilización de las membranas celulares. Cuando se expresó el gen de la α-tionina de cebada y de trigo en plantas de tabaco transgénicas (Nicotiana tabacum cv. Samsun NN), se obtuvo una menor proporción de lesiones necróticas en ensayos de infección con P. syringae pv. tabaci 153 y P. syringae pv. syringae, respecto al control sin transformar (Carmona et al., 1993).

Las enzimas líticas tales como las lisozimas, hidrolizan el enlace entre el ácido N-acetil-D-murámico y el residuo N-acetil-D-glucosamina de los péptidoglicanos en la pared celular bacteriana, lo que produce su degradación y conduce a la lisis celular. Si bien pocas lisozimas vegetales han sido caracterizadas y clonadas, se sabe que se localizan en las vacuolas de las células y entran en contacto con las bacterias fitopatógenas una vez que éstas han producido la lisis celular (Beintema and Terwisscha van Scheltinga, 1996). En base a este conocimiento, se expresó con éxito la lisozima del bacteriófago T4, una de las enzimas bacteriolíticas más activas, en plantas transgénicas de S. tuberosum. De esta forma, Düring et al. (1993) obtuvieron una reducción significativa en la maceración de los tejidos de tubércoulo infectados con la bacteria fitopatógena Erwinia carotovora susp. atroseptica. En otro trabajo más reciente, Rivero et al. (2012) expresaron la lisozima de la clara del huevo de la gallina en plantas de S. tuberosum, logrando una elevada resistencia frente a E. carotovora y Streptomyces scabies en ensayos con plantas y tubérculos transgénicos, y una resistencia moderada frente a Fusarium solani en ensayos con tubérculos.

Por último, el uso de ingeniería genética para modificar rutas metabólicas secundarias relacionadas con la producción de fitoalexinas, es otra alternativa posible para obtener resistencia a fitopatógenos bacterianos. Las fitoalexinas son moléculas que provienen del metabolismo fenilpropanoide. Su naturaleza química cubre prácticamente todo el espectro químico de los productos naturales, reflejando la complejidad de las rutas metabólicas que intervienen en la síntesis de estas moléculas. Se acumulan rápidamente en los tejidos afectados por algún patógeno y tienen fuerte actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de hongos y bacterias. En 1993, Hain et al. aislaron el gen Vst1 de la estilbeno sintetasa de vid (Vitis vinifera), responsable de la síntesis de la fitoalexina resveratrol. Al expresar el gen en plantas de tabaco, obtuvieron una mayor resistencia del cultivo a la infección con el hongo Botrytis cinerea, logrando así el primer reporte de aumento de la resistencia en plantas transgénicas basada en la expresión de una fitoalexina de otra especie. En 1997, Stark-Lorenzen et al. y Thomzik et al., utilizando el mismo gen, lograron aumentar la resistencia en arroz y en tomate, frente a la infección de Pyricularia oryzae y Phytophthora infestans, respectivamente. Varios años más tarde, Zhu et al. (2004) obtuvieron resultados similares frente a la infección con P. palmivora en plantas de papaya (Carica papaya L.) que expresaban la gen la estilbeno sintetasa de vid.

### 6.3. Estrategias basadas en la interferencia del quorum sensing.

Las bacterias han desarrollado un sistema de comunicación molecular denominado quorum sensing, que les permite censar la densidad de su población y modificar su expresión génica y su comportamiento en función de ello, determinando así distintas estrategias para sobrevivir en la naturaleza, por ejemplo, competir por un nicho determinado, o colonizar un hospedante particular (Braeken et al., 2008). A través de este mecanismo molecular, se produce la regulación de algunos factores de virulencia (en particular, de las enzimas extracelulares y los exopolisacáridos) y de la formación de biofilmes bacterianos, dependiendo del número de bacterias presentes. Existen estrategias biotecnológicas para neutralizar a los fitopatógenos bacterianos basadas en la interferencia del quorum sensing, en las que se altera la comunicación bacteriana y los procesos de regulación controlados por éste mecanismo. Estas estrategias se denominan en su conjunto quorum quenching (Dong et al., 2005).

El mecanismo de quorum sensing fue dilucidado en los años 60 mientras se estudiaba en la bacteria marina bioluminiscente Vibrio fischeri, la cual emite luz sólo cuando se reúne

un gran número de células. Se observó que la luminiscencia era mediada por la acumulación de un activador cuando la población bacteriana alcanzaba una determinada concentración crítica, y que las bacterias eran capaces de censar esta concentración mediante la detección de esta molécula activadora. Algunos años más tarde, la molécula activadora fue aislada y se la identificó como una acil-homoserin lactona (AHL; Fuqua et al., 2001).

Las AHLs son sintetizadas a un nivel basal por acil-HSL sintasas codificadas por las bacterias y liberadas por difusión al medio externo. El incremento de la población bacteriana eleva la concentración de las AHLs y, a niveles elevados de concentración, estas moléculas reingresan en las células bacterianas e interactúan con los factores de transcripción que modulan la expresión de los genes dependientes del quorum sensing. Así, la activación de genes bacterianos relacionados con la patogenicidad se produce cuando el nivel poblacional es suficiente para realizar un ataque exitoso. En la Figura 8 se muestra un esquema simplificado del mecanismo de quorum sensing.

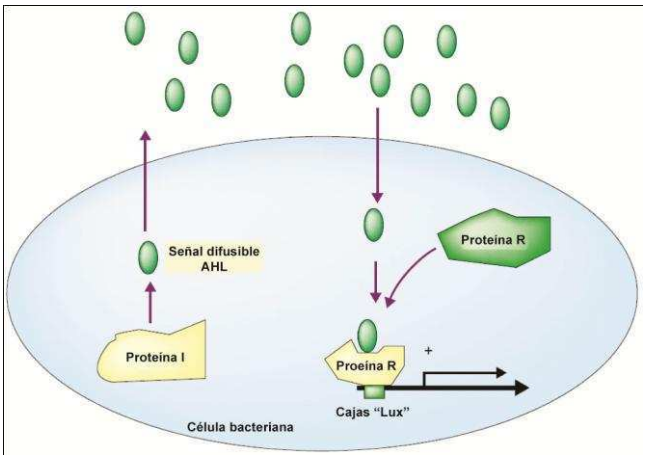



**Figura 8. Esquema simplificado del quorum sensing que ilustra la función de control de las moléculas de AHL mediada por las proteínas I y R en Vibrio fischeri.** Las células bacterianas (óvalo celeste) contienen una proteína (I) que es responsable de la síntesis de la señal difusible (óvalos verdes). Cuando se alcanza una alta concentración de las moléculas de AHL en el medio externo, las mismas comienzan a ingresar y a acumularse intracelularmente, interaccionando así con la proteína R. Esta interacción induce un cambio conformacional en la proteína R que altera su afinidad por secuencias específicas de ADN. En el caso particular de Vibrio fischeri, R se une a las secuencias comprendidas en las cajas "Lux", las que se encuentran dentro de la promotores de los genes regulados por la AHL. Figura tomada de Loh et al., 2002.

La estrategia de interferencia de factores de virulencia denominada quorum quenching, ha sido utilizada para obtener plantas resistentes a bacterias fitopatógenas. La misma consiste en interferir la comunicación entre bacterias en distintos niveles del mecanismo de quorum sensing: 1) degradación de la molécula señal; 2) secuestro o neutralización de la señal; 3)

utilizando moléculas que imitan la señal y compiten por el sitio de unión de las moléculas de AHL (Braeken et al., 2008; Figura 9).

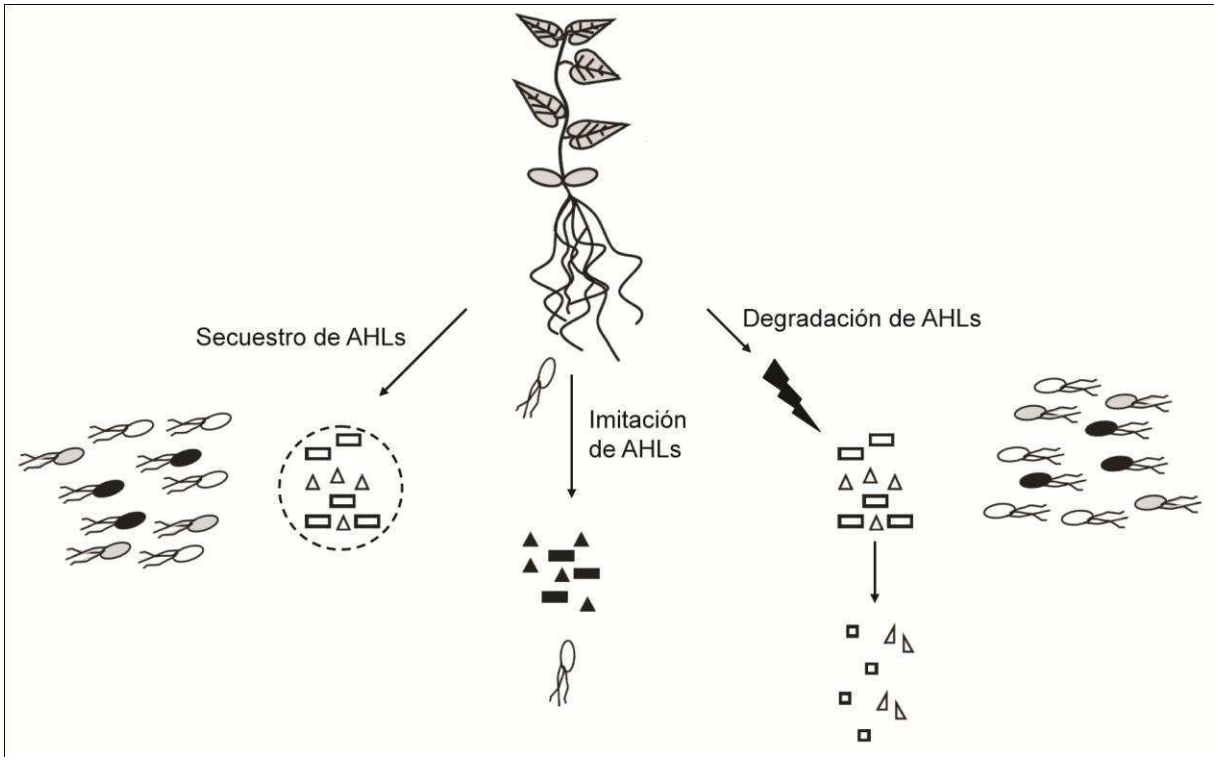



**Figura 9. Esquema de las distintas estrategias de quorum quenching utilizadas para intervenir en la comunicación de las bacterias fitopatógenas.** Utilizando genes de distintas organismos se puede modificar genéticamente a las plantas para que produzcan moléculas que interfieren en el mecanismo de comunicación bacteriana (quorum sensing). En la figura se muestran distintas estrategias exitosas relacionadas con el secuestro, la imitación o la degradación de la AHLs. Adaptado del trabajo de Braeken et al., 2008.

Entre las estrategias de degradación de las señales que intervienen en el quorum sensing bacteriano, se incluye la expresión constitutiva en plantas de una amino acilasa (o acil-homoserin lactonasa) que degrada las moléculas de AHLs. Así, la introducción en plantas de S. tuberosum del gen aiiA, que codifica la lactonasa de Bacillus sp. 240B1, incrementó notablemente la resistencia frente E. carotovora en ensayos de infección realizados con tubérculos transgénicos (Dong et al., 2001).

Las furanonas son moléculas que interfieren el sistema de comunicación entre bacterias mediado por AHL. Por ejemplo, las furanonas halogenadas producidas por el alga marina Delisea pulchra inhiben el quorum sensing entre bacterias, impidiendo la formación de biofilmes en Pseudomonas spp. e inhibiendo la síntesis de factores de virulencia en E.

carotovora (Loh et al., 2002). Su mecanismo de acción se basa en la unión de las furanosas a las moléculas de AHL, lo que anula su acción señalizadora.

La producción de N-oxoacil-homoserina lactona (OHL, un tipo particular de AHL) juega un papel esencial en el control de los factores de virulencia de E. carotovora durante la infección de plantas. Con la idea de alterar la expresión de tales factores de virulencia, se introdujo en plantas de N. tabacum el gen expI de E. carotovora, gen que codifica la enzima responsable de la síntesis de OHL. La expresión de OHL por parte de la planta indujo tempranamente la expresión de los genes de virulencia del patógeno, proceso que normalmente no ocurre hasta que la población bacteriana alcanza una mayor concentración. Así, se logró en plantas de N. tabacum y de Arabidopsis thaliana que Erwinia infecte a la planta en forma extemporánea e induzca una respuesta defensiva efectiva que conduce a la eliminación del patógeno cuando la densidad celular era todavía muy baja (Mae et al., 2001; Lee et al., 2008).

### 6.4. Estrategias basadas en la expresión de genes que aumentan el sistema defensivo de la planta.

Cuando el patógeno es detectado por la planta en una interacción incompatible, se produce un aumento drástico de los niveles de $H_2O_2$ en el sitio de infección, por acción de una NAD(P)H oxidasa de membrana (Gechev et al., 2006). Además del efecto tóxico que produce sobre los microorganismos, el $H_2O_2$ produce en el sitio de infección reacciones de entrecruzamiento de los componentes de la pared celular, dificultando el avance del patógeno (Hofius et al., 2007). Por otra parte, el $H_2O_2$ actúa como molécula señalizadora en el proceso de muerte celular programada de las células vegetales, asociada a la HR (Gechev and Hille, 2005; Zurbriggen et al., 2010). Por lo tanto, una posible estrategia para inducir resistencia antimicrobiana en plantas transgénicas, se basa en la inducción de la producción de $H_2O_2$ por debajo del nivel citotóxico. Con este objetivo, Wu et al. (1995) expresaron el gen de la glucosa oxidasa (GO) de Aspergillus niger en plantas de S. tuberosum. Ello promovió un aumento de la producción de $H_2O_2$ en las plantas transgénicas e incrementó la resistencia a E. carotovora subsp. carotovora y a P. infestans. Otro ejemplo de resistencia obtenida por el aumento de los niveles de producción de $H_2O_2$ fue reportado en 2011 por Fu et al., quienes sobreexpresaron el gen de la espermidina sintetasa de manzano (MdSPDS1) en plantas de C. sinensis. La espermidina sintasa es la responsable de la síntesis de espermidina, una poliaminas que serviría como sustrato de la poliamina oxidasa (PAO) y que permitiría la

rápida producción y acumulación de $H_2O_2$ durante la HR. De esta forma, las plantas transgénicas mostraron una resistencia mayor frente al ataque de X. axonopodis pv. citri en ensayos de infección realizados en condiciones controladas.

## 6.5. Estrategias basadas en la expresión de péptidos antimicrobianos.

### 6.5.1. Características principales de los péptidos antimicrobianos.

Los péptidos antimicrobianos (AMPs; del inglés AntiMicrobial Peptides) son sintetizados por una amplia variedad de organismos y tienen un rol importante en la defensa innata frente al ataque o invasión de microorganismos patógenos. Los AMPs tienen un amplio espectro de acción contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, levaduras, hongos y protozoos (Marshall and Arenas 2003; Nakatsuji and Gallo 2012). Su acción deriva de la interacción directa con la bicapa lipídica de la membrana plasmática de los microorganismos, lo que provoca su permeabilización y la lisis celular (Zasloff, 2002).

Las principales características de todos los AMPs son: 1) interactúan específicamente con los grupos polares de la membrana plasmática sin necesidad de receptores, incrementando la permeabilidad de la misma, la consecuente salida de componentes citoplasmáticos y la lisis celular; 2) tienen un amplio espectro de acción, incluyendo bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, levaduras y protozoos; 3) la gran mayoría actúa a bajas concentraciones y los más eficientes actúan en rangos de 0,1-1 µg/ml; 4) afectan a patógenos multirresistentes a antibióticos tradicionales (tienen una Concentración Inhibitoria Mínima –C.I.M.– y una Concentración Bactericida Mínima –C.B.M.– similares, lo que indica que tienen acción bactericida); 5) por la naturaleza de su mecanismo de acción, es poco probable que se genere resistencia a los AMPs cuando la presión de selección es elevada, al contrario de lo que ocurre con los antibióticos convencionales.

En la actualidad se conocen más de 1.600 AMPs cuya longitud varía entre 10-60 residuos aminoacídicos. Fueron aislados de diversas fuentes que abarcan todos los reinos: microorganismos, plantas, anfibios, insectos, moluscos, peces, aves y mamíferos, incluyendo humanos. Los AMPS son principalmente catiónicos, anfipáticos, y de secuencia y estructura variable. Se sintetizan como pre-pro-péptidos que son procesados por proteasas específicas que remueven el pre-péptido señal y luego el pro-péptido para dar lugar al péptido maduro.

Un análisis de la Antimicrobial Peptide Database (http://aps.unmc.edu/AP/main.html) realizado por Wang et al. (2008) permite observar que, de los más de 1.600 AMPs analizados, 600 fueron aislados de anfibios. Entre los péptidos más estudiados se encuentran la magainina 2 de Xenopus laevis, la dermaseptina B1 de Phyllomedusa bicolor y dermaseptina S de P. sauvagii.

La piel de los anfibios anuros del género Phyllomedusa (en particular al especie P. bicolor) tiene tres glándulas de las cuales la más importante es la glándula serosa (o glándula ponzoñosa), que contiene gránulos de secreción de AMPs y otros péptidos activos maduros. Estos péptidos son expulsados mediante un mecanismo de secreción holócrino[6] para proteger la piel de los anfibios frente a los patógenos presentes en el medio ambiente. Las otras dos glándulas contienen lípidos y mucosidades. La simple presión en la región laterodorsal de la piel de la rana hace posible recuperar el exudado rico en péptidos y ácidos nucleídos, sin necesidad sacrificar el animal.

Entre los 80 AMPs aislados hasta la fecha de las ranas de este género, 50 corresponden a dermaseptinas, constituyendo la familia más grande de AMPs reportados para estos batracios. Los integrantes de esta familia son AMPs catiónicos y anfipáticos ricos en residuos de lisina. Están compuestos por 20-34 residuos aminoacídicos y casi siempre tienen un residuo triptófano en la posición número tres. Actúan sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Navon-Venezia et al., 2002; Osusky et al., 2005; Yaron et al., 2003), levaduras (Coote et al., 1998), protozoos (Hernandez et al., 1992) y hongos filamentosos (De Lucca et al., 1998), y no poseen actividad hemolítica (Amiche and Galant, 2011; Nicolas and Amiche, 2006; Mor et al., 1994). Todas las dermaseptinas se sintetizan a partir de precursores pre-pro-dermaseptinas, organizados en 2 dominios (Figura 10). El dominio N-terminal, notablemente conservado dentro y entre especies, incluye la secuencia señal hidrofóbica de (22 residuos) seguido por una pro-secuencia rica en aminoácidos ácidos (20-25 residuos), a continuación, una secuencia di-básica que sirve como sitio de escisión durante la maduración proteolítica. El dominio C-terminal tiene entre 10-50 residuos, es hipervariable y se corresponde con la secuencia del AMP maduro. La hipervariabilidad del dominio C-terminal, el cual determina la actividad antimicrobiana, es el origen de la diversificación de los péptidos maduros en un amplio espectro de la actividad antimicrobiana.

[6] Durante la secreción holócrina, las células liberan la secreción correspondiente como consecuencia de la destrucción celular.

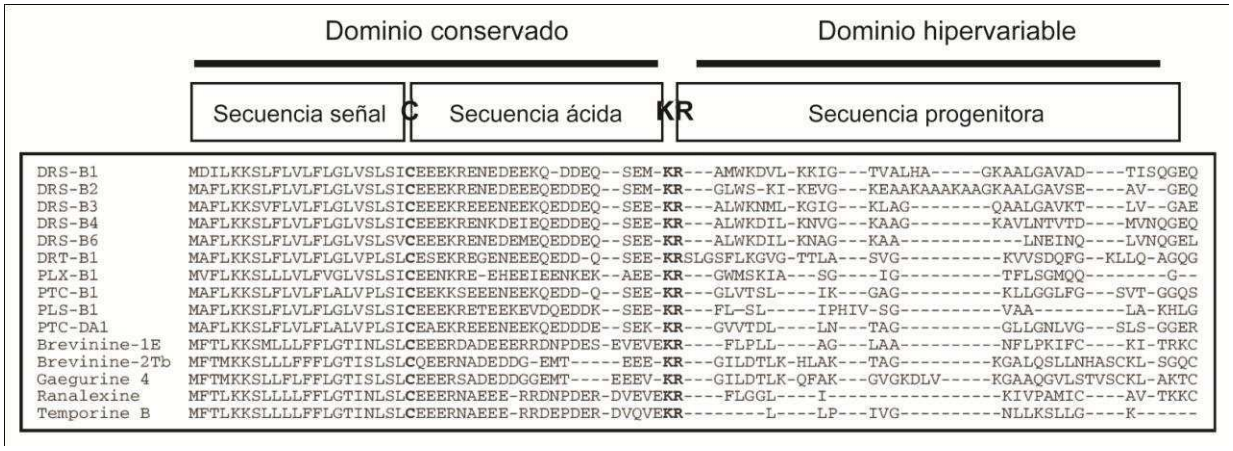



**Figura 10. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de precursores pre-pro-dermaseptinas aisladas de distintos anfibios.** Se remarcan los dominios conservados y los dominios hipervariables de los pre-pro-péptidos. Los residuos altamente conservados se muestran en negrita. Tomado de Amiche and Galant, 2011.

### 6.5.2. Modo de acción de la dermaseptina.

La actividad antimicrobiana de los AMPs está dada por sus propiedades físico-químicas, que son determinadas por la carga neta del péptido y por sus características anfipáticas e hidrófobicas, y por las propiedades de la membrana de la célula blanco. Estas características son interdependientes y, por lo tanto, la modificación de un parámetro con frecuencia conduce a la alteración compensatoria en otro parámetro. Las propiedades físico-químicas son las que proveen al péptido las características necesarias que le confieren de actividad antimicrobiana. Por un lado, se requieren interacciones electrostáticas entre la carga positiva del péptido y la cabeza polar negativa de los fosfolípidos de la superficie de la membrana plasmática. Por la otra parte, es necesaria la inserción de los residuos hidrofóbicos del péptido en el medio de la bicapa lipídica, mediante la interacción con las cadenas de los ácidos grasos de los fosfolípidos. Por ello, la hidrofobicidad del péptido desempeña un papel crucial en la inserción del péptido en la membrana. Una reducción de esta característica puede ser responsable de la pérdida de la eficiencia del péptido para perturbar y desorganizar la membrana procariota (Amiche and Galant, 2011; Nguyen et al., 2011; Zasloff, 2002).

A partir del estudio de la dermaseptina B2 (Amaiche and Galant, 2011), se propuso un mecanismo de acción dividido en dos etapas. En primer lugar, la dermaseptina se acumularía en la región superficial de la membrana (mecanismo de alfombra) mientras se produce una interacción reversible con los lípidos aniónicos de la misma. Luego, los residuos hidrofóbicos se anclarían en el interior (hidrófobo) de la bicapa lipídica. Cuando se alcanza una concentración crítica, una fracción del péptido cambiaría su orientación, quedando en

posición perpendicular respecto al plano de la membrana. Así, las cabezas polares de los lípidos de la bicapa inducirían una curvatura positiva de la membrana y la formación de un poro toroidal transitorio. En este segundo paso, otras dos propiedades de los AMPs tienen un rol fundamental para optimizar la actividad biológica: la hidrofobicidad, que permite la inserción del péptido en la bicapa de fosfolípido, y la flexibilidad del péptido inducida por los residuos Val-9 y Gly-10 (en el caso de la dermaseptina B2) que facilitan la inserción de los residuos hidrofóbicos en la bicapa lipídica altamente curvada (Amiche and Galant, 2011; Nguyen et al., 2011; Zasloff, 2002).

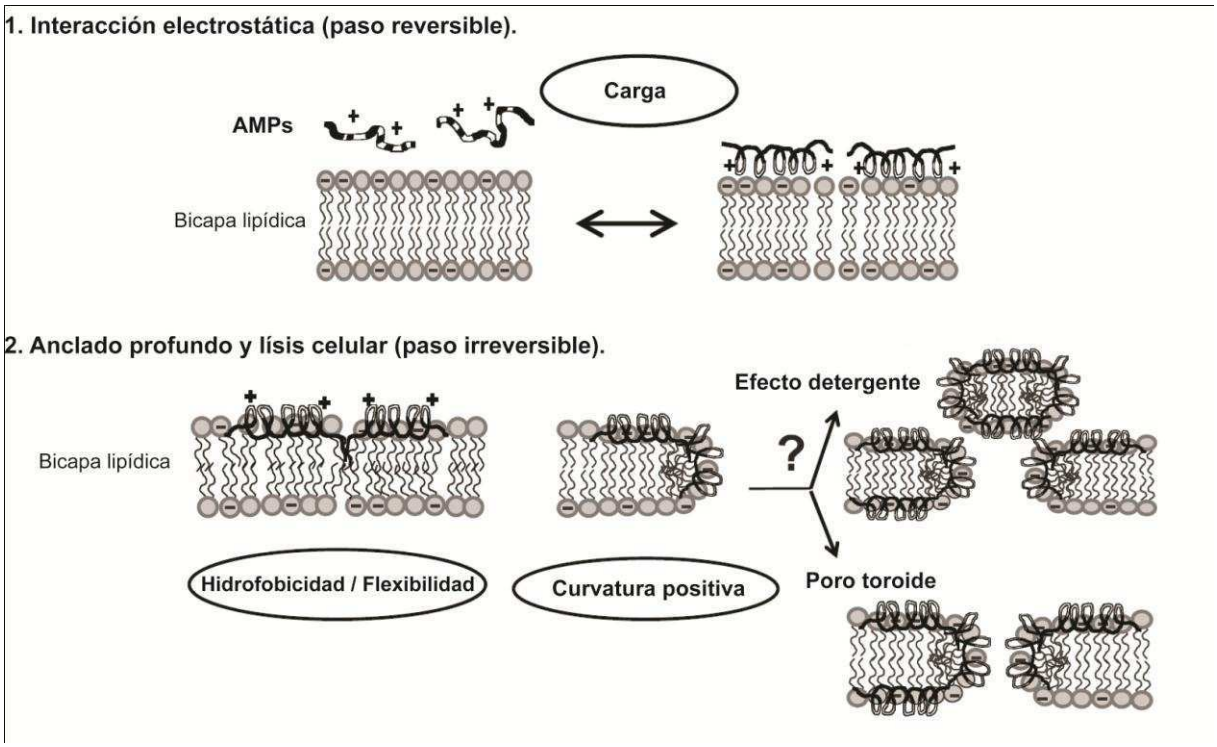



**Figura 11. Mecanismo de acción hipotético de la dermaseptina B2. 1)** Interacción reversible de los residuos básicos del péptido con lípidos aniónicos ("mecanismo de alfombra"). **2)** Interacción irreversible: anclaje profundo del péptido en el núcleo hidrofóbico de la membrana y lisis celular. Las áreas blancas y negras corresponden a las regiones catiónicas e hidrofóbicas de los AMPs, respectivamente. Los círculos grises y las líneas onduladas corresponden a los grupos de cabeza polar y a las cadenas acilo de los fosfolípidos de la bicapa lipídica, respectivamente. Modelo propuesto para la dermaseptina B2 por Amiche and Galant (2011).

### 6.5.3. Obtención de plantas resistentes a enfermedades bacterianas mediante expresión de péptidos antimicrobianos.

Los enfoques basados en la expresión de AMPs en plantas transgénicas fueron implementados con éxito en distintos cultivos de interés agronómico, incluyendo papa, arroz, manzano y cítricos (Osusky et al., 2005; Sharma et al., 2000; Ko et al., 2002; Cardoso et al.,

2010, respectivamente).

En 2001, De Gray et al. transformaron cloroplastos de N. tabacum con una construcción que codifica al péptido MSI-99, un análogo de la magainina 2 aislada de X. laevis. Los ensayos de infección de plantas transgénicas de tabaco con la bacteria P. syringae pv. tabaco mostraron un aumento a la resistencia a la infección, evidenciada por una ligera clorosis de las hojas transgénicas frente a la necrosis de la lámina foliar observada en los controles. A su vez, las plantas fueron resistentes a la infección con el hongo Colletotrichum destructivum, responsable de la antracnosis en diversos cultivos de interés comercial. Por último, los extractos foliares de las plantas transgénicas (generación F1) inhibieron el crecimiento de Aspergillus flavus, Fusarium moniliforme, y Verticillium dahliae, hongos patógenos de relevancia agronómica en los cultivos de maíz, arroz y olivo, respectivamente. Mediante la expresión de este mismo péptido, se obtuvo resistencia a F. oxysporum f.sp. cubense y Mycosphaerella musicola en plantas de banana (Musa spp. cv. Rasthali) (Chakrabarti et al., 2002).

Otro péptido utilizado para obtener resistencia en plantas transgénicas es la sarcotoxina, aislada a partir de Sarcophaga peregrina. Este péptido posee 39 aminoácidos y pertenece al grupo de las cecropinas. Éstas son pequeños AMPs aislados de la hemolinfa de diversos insectos, que presentan actividad lítica y antibacteriana contra muchas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Mediante la expresión del péptido sarcotoxina en plantas de naranja, Bespalhok Filho et al. (2001) lograron la obtención de resistencia a X. axonopodis pv. citri, mientras que Oshima et al. (1998) obtuvieron resultados favorables frente a P. syringae pv. tabaci y E. carotovora subsp. carotovora en plantas de tabaco. Una variante de este último trabajo, fue la transformación de plantas de tabaco con el gen de la sarcotoxina bajo el control de un promotor inducible por ácido salicílico (PR1a). Así, Mitsuhara et al. (2000) lograron un aumento de la resistencia frente a los hongos Rhizoctonia solani y Pythium aphanidermatum.

Se han descrito otros péptidos antimicrobianos que se secretan en la hemolinfa de algunos insectos en respuesta a la infección bacteriana. A estos péptidos se los conoce como atacinas y tienen un tamaño aproximado de 20kDa. Poseen una secuencia aminoacídica rica en residuos de glicina y actúan sobre la membrana externa de bacterias Gram-negativas alterado su permeabilidad y dificultado la síntesis de proteínas. Mediante la expresión del gen

attA de Tricloplusia ni en plantas de naranjo, se logró el aumento de la resistencia frente a la infección con Xanthomonas (Boscariol et al., 2006).

## 7. Ventajas y limitaciones de la ingeniería genética en el caso de los cítricos.

Hasta el momento, no se ha encontrado resistencia natural en el germoplasma de los cítricos para sus principales enfermedades bacterianas (Cancrosis, CVC y HLB), responsables de pérdidas económicas considerables a nivel mundial. Sin embargo, a partir del avance en los últimos años de la ingeniería genética, la biología molecular y la bioinformática, se generaron una importante cantidad de trabajos biotecnológicos en los que se reportó la resistencia parcial en cítricos frente a fitopatógenos bacterianos.

Las principales ventajas que presentan las técnicas de ingeniería genétioca para el control de enfermedades bacterianas son:

- Se requieren lapsos más cortos para introducir un transgen antibacteriano y generar nuevas variedades sobre fondos genéticos ya establecidos, en comparación con el mejoramiento clásico.
- Permiten incrementar la eficiencia de la resistencia en la planta, mediante la estrategia conocida como “apilamiento génico”, el cual consiste en la introducción en la misma planta de varios genes antibacterianos.
- Permiten combinar transgenes que posibiliten el control de distintos patógenos, bajo un mismo fondo genético (por ejemplo, una bacteria y un hongo, o una bacteria y su insecto vector).
- Permitirían disminuir el uso de bactericidas a base de cobre u otros compuestos químicos utilizados para el control de las enfermedades, los cuales resultan contaminantes para el medio ambiente (principalmente suelo y agua) y son perjudiciales para la salud de operarios que realizan los manejos. Esto generaría, además, un descenso de costos de producción.
- Disminuiría la presión de selección que origina cepas bacterianas resistentes al cobre.

Las principales desventajas pueden clasificarse entre las que suponen riesgos para el medio ambiente y las que implican riesgos para la salud.

En relación con los riesgos medioambientales las principales desventajas son:

- Puede producirse polinización cruzada con plantas sexualmente compatibles, con el consiguiente pasaje de los transgenes a otras especies.
- El uso de transgenes que actúan sobre un blanco específico (por ejemplo, un receptor) puede generar la aparición de individuos resistentes, con la consiguiente pérdida de valor del cultivo desarrollado.
- El uso cultivos transgénicos de alto interés comercial o mejor adaptados a un determinado ambiente podría acentuar el proceso de pérdida de biodiversidad que se genera como consecuencia de la agricultura intensiva.

En relación con los riesgos para la salud humana, las principales desventajas son:

- El producto del transgen utilizado podría ser tóxico para los humanos, o bien para alguna especie que consuma naturalmente el fruto.
- El producto del transgen utilizado puede resultar alergénico para determinados subgrupos de la población humana.

# Objetivos e Hipótesis

## 1. Objetivo general

Obtención de plantas transgénicas de C. sinensis (L.) Osbeck resistentes a la infección con X. axonopodis pv. citri, causante de la Cancrosis de los cítricos.

## 2. Objetivos específicos

1) Evaluación del efecto del péptido sintético dermaseptina sobre el crecimiento de X. axonopodis pv. citri y sobre X. campestris pv. campestris cepa 8004.

2) Evaluación del efecto de la enzima bacteriolítica lisozima sobre el crecimiento de X. axonopodis pv. citri y sobre X. campestris pv. campestris cepa 8004.

3) Obtención mediante ingeniería genética de un vector binario adecuado que porte la secuencia codificante de dermaseptina bajo la regulación de un promotor constitutivo y con una señal de exportación a apoplasto.

4) Obtención mediante ingeniería genética de un vector binario adecuado que porte la secuencia codificante de lisozima bajo la regulación de un promotor constitutivo y con una señal de exportación a apoplasto.

5) Transformación genética de plantas de N. benthamiana con las construcciones genéticas obtenidas en (3) y (4).

6) Transformación genéticas de plantas de C. sinensis (L.) Osbeck con las construcciones genéticas obtenidas en (3) y (4).

7) Producción de anticuerpos anti-dermaseptina con los cuales realizar ensayos de detección inmunológica para determinar el nivel de acumulación del péptido en las líneas transgénicas obtenidas.

8) Caracterización fenotípica y genético-molecular de las plantas transgénicas obtenidas en (5) y (6).

9) Evaluación de las plantas transgénicas de N. benthamiana en ensayos de infección con X. campestris pv. campestris cepa 8004 bajo condiciones controladas.

10) Evaluación de las plantas transgénicas de C. sinensis (L.) Osbeck en ensayos de infección con X. axonopodis pv. citri bajo condiciones controladas.

11) Evaluación de las plantas transgénicas de C. sinensis (L.) Osbeck en ensayos de infección con X. axonopodis pv. citri en condiciones de invernadero.

## 3. Hipótesis de trabajo

1) El péptido sintético dermaseptina y la enzima comercial lisozima producirán un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de X. axonopodis pv. citri y X. campestris pv. campestris cepa 8004, en ensayos in vitro.

2) La expresión ectópica del péptido antimicrobiano dermaseptina en plantas de C. sinensis (L.) Osbeck y de N. benthamiana, producirá un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de X. axonopodis pv. citri y sobre X. campestris pv. campestris cepa 8004, en ensayos in planta.

3) La expresión ectópica de la enzima lisozima en plantas de C. sinensis (L.) Osbeck y de N. benthamiana, producirá un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de X. axonopodis pv. citri y sobre X. campestris pv. campestris cepa 8004, en ensayos in planta.

4) Los ensayos realizados con plantas transgénicas de N. benthamiana brindarán información extrapolable a las plantas transgénicas de C. sinensis (L.) Osbeck.

5) Los ensayos de infección realizados en cámaras de crecimiento con plantas de C. sinensis (L.) Osbeck y X. axonopodis pv. citri, permitirán seleccionar plantas resistentes para la realizar ensayos posteriores en invernadero.

# Materiales y Métodos

## 1. Cepas bacterianas.

### 1.1. Conservación de cepas bacterianas.

En el caso de clones bacterianos, se mezcló en un tubo Eppendorf un volumen de cultivo crecido durante toda una noche con una solución de glicerol estéril, hasta alcanzar una concentración final de 10-20% de glicerol. Los stocks bacterianos se guardaron a -70°C.

### 1.2. Escherichia coli.

#### 1.2.1. Condiciones de cultivo.

Se utilizó la cepa DH5α de E. coli. Los cultivos líquidos se desarrollaron a 37ºC en medio LB (peptona de caseína o triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, y NaCl 5 g/L) con agitación a 250 r.p.m. (revoluciones por minuto). Los cultivos sólidos se realizaron en placas de Petri a 37ºC, en medio LB adicionado con 1,5% de agar. De acuerdo con la resistencia conferida por cada vector, el medio de cultivo se suplementó con ampicilina (100 μg/mL), kanamicina (50 μg/mL), estreptomicina (100 μg/mL) y espectinomicina (100 μg/mL), gentamicina (100 μg/mL) o rifampicina (50 μg/mL).

#### 1.2.2. Preparación de células bacterianas competentes.

Se inocularon 600 mL de medio LB con un cultivo crecido durante toda la noche (dilución 1/100) a partir de una colonia de E. coli. El cultivo se incubó con agitación a 250 r.p.m. a 37ºC hasta alcanzar una $D.O._{600nm}$ de 0,5-1. Posteriormente, se mantuvieron las células en hielo durante 30 min y se centrifugaron las mismas a 4.000 xg durante 15 min a 4°C. Luego, se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 600 mL de $H_2O$ MiliQ pre-enfriada y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El procedimiento de centrifugación y lavado del pellet se repitió dos veces, utilizando la mitad (300 mL), y un cuarto (150 mL) del volumen inicial de $H_2O$ MiliQ. Finalmente, se realizó un lavado con 20 mL de glicerol 10% y se resuspendió el pellet en 2-3 mL de glicerol 10%. Las células se fraccionaron en alícuotas de 50 μL, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C.

#### 1.2.3. Transformación de células competentes.

Las células competentes previamente preparadas se descongelaron en hielo. Una vez descongeladas, se agregó el ADN correspondiente (100-500 ng) y se las incubó en hielo por

10 min. La mezcla de ADN y bacterias se transfirió a una cubeta de electroporación (Bio-Rad; 0,2 cm) y se aplicó un campo eléctrico de 2,5 kV por 5 milisegundos utilizando un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad). Inmediatamente después del pulso eléctrico, las células se dejaron recuperar mediante el agregado de 950 µL de LB y una incubación de 1 h a 37ºC. Finalmente, las células se plaquearon en medio LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes.

### 1.3. Agrobacterium tumefaciens.

#### 1.3.1. Cepas y condiciones de cultivo.

Se utilizaron las siguientes cepas: a) GV3101, que porta resistencia genómica a rifampicina y resistencia plasmídica (plásmido pTiC58) a gentamicina; b) LBA4404, que posee resistencia genómica a rifampicina y plasmídica (plásmido pAL4404) a estreptomicina; c) EHA105, que porta resistencia genómica a kanamicina y plasmídica (plásmido pTiBo542) al acído nalidíxico. Los cultivos de A. tumefaciens se realizaron en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubaron con agitación durante toda la noche a 200 r.p.m. y 28ºC. Las concentraciones de antibióticos utilizadas en cada caso fueron: a) rifampicina: 100 µg/mL; b) gentamicina: 100 µg/mL; c) estreptomicina: 100 µg/mL; d) kanamicina: 50 µg/mL; e) ácido nalidíxico: 100 µg/mL.

#### 1.3.2. Preparación de células competentes de A. tumefaciens.

Para la preparación de células de Agrobacterium competentes, se partió de una colonia aislada y se inició con ésta un cultivo en 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente a la cepa utilizada. El cultivo se incubó con agitación durante toda la noche a 200 r.p.m. y 28ºC. Este cultivo se utilizó para inocular 200 mL de medio LB fresco, el cual se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una $D.O._{600nm}$ de 0,5-1. Para la preparación de células competentes, se utilizó el mismo protocolo que en el caso de E. coli (ver Sección 1.2.2.). Posteriormente, las bacterias se conservaron a -70ºC en alícuotas de 50 µL.

#### 1.3.3. Transformación de células competentes de A. tumefaciens.

Se agregaron entre 100-250 ng del ADN de interés a 50 µL de células competentes previamente descongeladas. Una vez agregado el ADN, la mezcla se mantuvo en hielo por 10 min. Las células se transformaron las por electroporación utilizando las mismas condiciones detalladas en la Sección 1.2.3. La recuperación de las células se efectuó por agregado de 950

µL de medio LB líquido e incubación durante 1 h a 28ºC. Las células transformantes se seleccionaron sembrando 150 µL de suspensión bacteriana en medio LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes luego de una incubación de 48 h a 28ºC.

### 1.4. Xanthomonas spp.

#### 1.4.1. Especies y condiciones de cultivo.

La cepa de X. axonopodis pv. citri fue aislada de cancros de plantas de cítricos en campos de la provincia de Tucumán, Argentina (Siciliano et al., 2006). El aislamiento fue provisto por el Dr. Atilio Castagnaro (Estación Experimental Agroindustrial Obispo Columbres). Esta cepa no posee resistencia a ningún antibiótico.

La cepa 8004 de X. campestris pv. campestris fue provista por el Dr. Adrian Vojnov (Instituto de Ciencia y Tecnología "Dr. Cesar Milstein", Fundación Cassará, Argentina). Esta cepa posee resistencia genómica a rifampicina.

Las dos especies de Xanthomonas se cultivaron en medio Peptona-Extracto de Levadura-Extracto de Malta (PYM; 5 g Peptona, 3 g Extracto de Levadura y 3 g Extracto de Malta por litro de medio) conteniendo 1% (p/v) de D-glucosa. Para el crecimiento en placas de Petri, ambas cepas se cultivaron en placas de Petri conteniendo medio PYM adicionado con 1,5% (p/v) de agar (medio PYM-A).

Para cada uno de los ensayos realizados con Xanthomonas, se transfirió una colonia de X. axonopodis o X. campestris a medio PYM y se incubó con agitación a 200 r.p.m. durante toda la noche a 28ºC. Luego, se midió el crecimiento del cultivo a $D.O._{600nm}$ y se realizaron diluciones seriadas en medio PYM hasta obtener una suspensión de $1x10^7$ u.f.c./mL. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 3.500 xg durante 10 min y se resuspendieron en una solución 10 mM de $MgCl_2$ o en medio PYM a una concentración final determinada por el experimento a realizar.

### 2. Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Para los ensayos de transformación genética y de agroinfiltración, se utilizaron plantas de N. benthamiana sin transformar. Las plantas de N. benthamiana se mantuvieron en cuartos de crecimiento en condiciones de crecimiento controladas (22-26ºC, 16 h luz / 8 h oscuridad, 45% de humedad relativa).

Para la transformación de naranjo dulce, se utilizaron plantas de C. sinensis (L.) Osbeck (cv. pineapple) de 6-12 meses de edad como fuente de explantos. Para los ensayos de infección con Xanthomonas, se utilizaron como control sin transformar, plantas de C. sinensis (L.) Osbeck germinadas en invernadero a partir de semillas certificadas. Todas las plantas de cítricos (las de naranjo y las de limón utilizadas como portainjerto) se mantuvieron en invernáculos de crecimiento bajo condiciones de crecimiento controladas (24-28ºC, 16 h luz / 8 h oscuridad, irradiación de 45 µE/$m^2$/s, 45% de humedad relativa).

Una vez obtenidas las plantas transgénicas de C. sinensis (L.) Osbeck, se mantuvieron en cuartos de crecimiento en condiciones de crecimiento controladas (22-26ºC, 16 h luz / 8 h oscuridad, 45% de humedad relativa), hasta el momento de realizar los ensayos de infección.

## 3. Técnicas y métodos de ingeniería genética y ADN recombinante.

### 3.1. Aislamiento de ADN plasmídico.

#### 3.1.1. Método de la lisis alcalina.

Para la extracción de ADN plasmídico en pequeña escala, se inoculó una colonia aislada en 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubó a 37ºC durante toda la noche. Al día siguiente, las bacterias se centrifugaron durante 10 min a 3.000 r.p.m. El precipitado se resuspendió en 300 µL de solución de resuspensión (25 mM Tris-HCl, pH 8, 25 mM EDTA, 100 µg/mL ARNasa A). Luego, se agregaron 300 µL de solución de lisis (0,2 N NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente entre 3 y 5 min. A continuación, se agregaron 300 µL de solución de neutralización (acetato de potasio 3 M, pH 5,5), y se incubó en hielo durante 10 min. Se centrifugó por 10 min a 13.000 r.p.m. a 4ºC. El sobrenadante se trasvasó a otro tubo y el ADN plasmídico se precipitó con 0,7 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó durante 15 min a 13.000 r.p.m. a 4ºC y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500 µL de etanol 70% y se centrifugó nuevamente por 10 min a 13.000 r.p.m. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado, para luego resuspenderlo en 30-40 µL de $H_2O$ bidestilada estéril.

#### 3.1.2 Purificación mediante matrices comerciales.

Las preparaciones de ADN plasmídico utilizadas para secuenciación se obtuvieron utilizando el sistema de purificación Wizard plus SV minipreps DNA Purification System (Promega) de acuerdo con el protocolo suministrado con el mismo. El sistema consiste en una

modificación del método de la lisis alcalina, en la que el paso de precipitación del ADN con isopropanol es reemplazado por el pasaje a través de una columna conteniendo una matriz de fibra de vidrio. El ADN unido diferencialmente a la columna se eluyó con 50-100 µL de $H_2O$ bidestilada estéril, según la concentración final en que se deseaba obtener el ADN.

### 3.1.3. Preparación del ADN plasmídico a gran escala.

Para la preparación de ADN plasmídico a gran escala se utilizaron los sistemas comerciales QIAGEN Plasmid Midi Kit y QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen), según los protocolos sugeridos por la empresa.

## 3.2. Preparación de plásmidos e insertos de ADN.

### 3.2.1. Amplificación de insertos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Todas las reacciones de PCR se efectuaron en un termociclador MyCyclerTM (Bio-Rad) en un volumen final de 50 µL conteniendo buffer de reacción 1X (Invitrogen), 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 500 ng de oligonucleótidos específicos (Invitrogen o Ruralex) y 1,25 U de enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen). Las muestras se amplificaron usando 30 ciclos de 45 seg a 95ºC, 45 seg a 58ºC y 1 min a 72ºC. Se incluyó un paso inicial de desnaturalización de 4 min a 95ºC y un paso final de 5 min a 72ºC para completar la polimerización. De acuerdo con la secuencia nucleotídica que se deseaba amplificar, se utilizaron diferentes oligonucleótidos iniciadores. En el caso de utilizar como molde ADN genómico proveniente de plantas, se agregaron a la mezcla de reacción 100 ng de ADN. En el caso de utilizar un vector binario o intermediario como molde, se agregaron 2-5 ng de ADN.

### 3.2.2. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

Los plásmidos, fragmentos de ADN y productos de PCR se identificaron y separaron por electroforesis en geles de agarosa de 1-2% TAE 1X (Tris-ácido acético 40 mM, pH 8, EDTA disódico 2 mM). Las bandas de interés se cortaron del gel y el ADN se purificó utilizando sistemas comerciales basados en la unión diferencial del ADN a una matriz de fibra de vidrio (GFX PCR DNA and Gel Band Purificaction Kit, Amersham Biosiences; Wizard PCR Preps DNA Purification System, Promega). Los productos se eluyeron de la matriz con 20-50 µL de $H_2O$ bidestilada estéril o con el buffer recomendado por el fabricante, en forma tal de obtener una concentración de ADN del orden de los 50-100 ng/µL.

### 3.2.3. Digestión con enzimas de restricción.

Las digestiones de plásmidos para el clonado o para el análisis de restricción se realizaron con enzimas comerciales (New England Biolabs, Promega, Gibco BRL y Fermentas). Las reacciones se realizaron según las condiciones especificadas por cada empresa proveedora. En cada restricción se incluyeron las cantidades necesarias de buffer 10X (específico para cada enzima), 100 ng de ADN, 5 U de enzima de restricción y $H_2O$ hasta completar el volumen. Las restricciones que implicaron el uso de más de una enzima de restricción, y cuyas condiciones de incubación eran incompatibles entre sí, se hicieron en forma secuencial, purificando el ADN por precipitación con acetato de amonio y etanol luego de cada reacción. Todas las reacciones se incubaron 2 h a la temperatura óptima correspondiente a cada enzima. Los productos de la digestión fueron separaron por electroforesis en gel de agarosa, como se indica en el punto 3.2.2.

### 3.2.4. Desfosforilación de extremos compatibles.

Los fragmentos de ADN con extremos romos y cohesivos compatibles, se desfosforilaron previamente a la reacción de ligación. Se utilizó la fosfatasa alcalina SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Promega), en las condiciones indicadas por el fabricante. El ADN purificado se incubó a 37ºC durante 15 min con 1 unidad de SAP por cada μg de ADN, en el buffer suministrado con la enzima, en 50 μl de reacción. La enzima se inactivó calentando la reacción a 65ºC durante 15 min.

### 3.2.5. Reacciones de ligación.

En las reacciones de ligación entre vectores e insertos, se utilizó la enzima ADN T4 ligasa (Promega). A 100-150 ng de ADN del vector se agregó ADN de inserto en relaciones molares de vector:inserto de 1:1, 1:3, 1:5 y 1:10. El volumen de la reacción de ligación fue siempre de 20 μL. A cada reacción de ligación se agregaron 2 μL de buffer de ligación 10X, vector, inserto y 0,1-1 U de ADN ligasa de fago T4 por cada 10 ng de vector y se llevó a volumen con $H_2O$. Las reacciones se incubaron a 16ºC durante 16 h.

### 3.2.6. PCR colony.

Esta técnica permite analizar directamente si la colonia bacteriana posee el plásmido de interés, sin necesidad de realizar mini preparaciones de ADN plasmídico. Para esto se

repicó con una punta de micropipeta estéril una colonia posiblemente transformada y se la sumergió en el volumen de $H_2O$ correspondiente a la reacción de PCR. Con la misma punta se inocularon 5 ml de medio LB, para recuperar la bacteria en caso de que la reacción de PCR diese el producto esperado. Finalmente, se agregaron los restantes reactivos como se indica en la Sección 3.2.1.

## 4. Oligonucleótidos iniciadores (cebadores).

Las secuencias de los oligonucleótidos iniciadores utilizados en este trabajo de Tesis se presentan en la siguiente tabla:

| Nombre | Secuencia | Tamaño (pares de bases) | Técnica en que fue utilizado |
|---|---|---|---|
| Der-Fw | 5´ tggctctttggaagactatgc 3´ | 104 | PCR de ADN genómico, y RT-PCR |
| Der-Rv | 5´ ttgagttccttgagaaatagtatcagc 3´ | | |
| GFP-Fw | 5´ atggtgagcaagggcgagga 3´ | 600 | PCR de ADN genómico |
| GFP-Rv | 5´ ggaccatgtgatcgcgcttc 3´ | | |
| Cs-Act-Fw | 5′ catccctcagcaccttcc 3′ | 195 | RT-PCR |
| Cs-Act-Rv | 5′ ccaaccttagcacttctcc 3′ | | |
| Liz-Fw | 5′ gtgatatctccactgacgtaag3′ | 482 | RT-PCR |
| Liz-Rv | 5′ gcgagcgtgaactgcgcgaagaag 3′ | | |
| Liz-PCR-Fw | 5′ gtgatatctccactgacgtaag 3′ | 682 | RT-PCR |
| Liz-PCR-Rv | 5′ gcacgggccctcgagaattccc 3′ | | |
| Nb-Act-Fw | 5´ atggcagatggagaggatattc 3´ | 750 | RT-PCR |
| Nb-Act-Rv | 5´ cctgcccatccggtagctcat 3´ | | |

**Tabla 2.** Secuencia de los oligonucleótidos iniciadores utilizados en el desarrollo del trabajo de Tesis.

## 5. Electroforesis de ADN.

Se utilizaron geles de entre 1 y 2% de agarosa en solución TAE 1X (Tris-ácido acético 40 mM, pH 8, EDTA disódico 2 mM); con 0,5 μg/mL de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm y a temperatura ambiente. Las muestras para sembrar se prepararon adicionando a la solución de ADN, buffer de siembra de ADN 5X (glicerol 10%, azul de bromofenol 0,5%). Los geles fueron fotografiados utilizando luz

ultravioleta (UV) de 365 nm en los transiluminadores Multi Genius Bio Imaging System o GeneTools, ambos de la empresa SynGene.

## 6. Vectores y plásmidos.

### 6.1. Vectores comerciales.

**pZeRO-2** (Invitrogen Life Technologies): vector de clonado para productos de amplificación por PCR utilizando la enzima Taq ADN polimerasa.

### 6.2. Vectores no comerciales.

**pBIN19sgfp**: vector binario desarrollado por Chiu et al. (1996), derivado del vector binario pART27. Contienen el gen sgfp bajo la regulación del promotor constitutivo 35S del Cauliflower mosaic virus (CaMV) y el terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintetasa (Tnos) de A. tumefaciens. Contiene además la secuencia codificante de la neomicina fosfotrasferasa II (nptII), que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, bajo el control del promotor (Pnos) y la secuencia terminadora (Tnos) del gen de la nopalina sintetasa de A. tumefaciens. Ambos genes se encuentran clonados entre los bordes derecho e izquierdo del ADN-T.

#### 6.2.1. Vectores no comerciales obtenidos previamente en el laboratorio.

**pHES74-Derma:** vector derivado del pHES74 (López et al., 1996) en el que se clonó la secuencia codificante de dermaseptina de Phyllomedusa sauvagii (GenBank AJ564794.1). El plásmido resultante contiene el cassette de expresión de dermaseptina (1906 pb) compuesto por el promotor 35S del CaMV, la secuencia potenciadora de la traducción Omega (Ω) del Tobacco mosaic virus (TMV), el pre-péptido señal esporamida (señal de exportación apoplástica), la secuencia codificante de dermaseptina (GenBank AJ564794.1) y el terminador de la transcripción de la nopalina sintasa (Tnos).

**pDe:** vector binario derivado del pPZP200 donde se clonó el cassette de expresión de dermaseptina (Rivero et al., 2012), a partir de la construcción pHES74-Derma.

**pUC-lyso:** vector derivado de la construcción pUC (Serrano et al., 2000) donde se clonó la secuencia codificante de la lisozima de clara de huevo de Gallus gallus (HEWL). El vector resultante contiene el cassette de expresión de lisozima (1.513 pb), compuesto por la secuencia codificante de lisozima fusionada a la señal de exportación a apoplasto de la

amilasa de cebada, flanqueada por el promotor doble 35S (2 x 35S) del CaMV y la secuencia terminadora de la transcripción de la nopalina sintasa (Tnos).

**pLy**: vector binario derivado del pPZP200, conteniendo el cassette de expresión de lisozima (Rivero et al., 2012) obtenido a partir de la construcción pUC-lyso.

### 6.2.1. Vectores no comerciales obtenidos durante este trabajo.

**pBIN19sgfp-Der**: vector derivado del vector binario pBIN19sgfp, conteniendo el cassette de expresión de dermaseptina obtenido a partir de la digestión del vector pDe con la enzima Hind III.

**pBIN19sgfp-Liz**: vector derivado del vector pBIN19sgfp, conteniendo el cassette de expresión de lisozima obtenido a partir de la digestión del vector pZeRO-2-Liz con la enzima Hind III.

**pZeRO-2-Liz:** vector intermediario conteniendo el cassette de expresión de lisozima obtenido a partir del fragmento Kpn I-Xho I del cassette del vector binario pLy.

## 7. Secuencias.

### 7.1. Secuencia codificante de dermaseptina.

atggctctttggaagactatgcttaag*aagctt*ggaactatggctcttcatgctggaaaggc
tgctcttggagctgctgctgatactatttctcaaggaactcaataa

### 7.2. Secuencia codificante de lisozima.

```
caagacccttcctctatataaggaagttcatttcatttggagagg   45
acacgctgaaatcaccagtctctctctacaagatcccccaacATG   90
AGGTCTTTGCTAATCTTGGTGCTTTGCTTCCTGCCCCTGGCTGCT   135
CTGGGGAAAGTCTTTGGACGATGTGAGCTGGCAGCGGCTATGAAG   180
CGTCACGGACTTGATAACTATCGGGGATACAGCCTGGGAAACTGG   225
GTGTGTGTTGCAAAATTCGAGAGTAACTTCAACACCCAGGCTACA   270
AACCGTAACACCGATGGGAGTACCGACTACGGAATCCTACAGATC   315
AACAGCCGCTGGTGGTGCAACGATGGCAGGACCCCAGGCTCCAGG   360
AACCTGTGCAACATCCCGTGCTCAGCCCTGCTGAGCTCAGACATA   405
ACAGCGAGCGTGAACTGCGCGAAGAAGATCGTCAGCGATGGAAAC   450
GGCATGAGCGCGTGGGTCGCCTGGCGCAACCGCTGCAAGGGTACC   495
GACGTCCAGGCGTGGATCAGAGGCTGCCGGCTGTGA            531
```

### 7.3. Secuencia aminoacídica de dermaseptina.

MALWKTMLKKLGTMALHAGKAALGAAADTISQGTQ

### 7.4. Secuencia aminoacídica de lisozima.

KVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGSTDYGILQINSRW
WCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNCAKKIVSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWI
RGCRL

## 8. Transformación genética.

### 8.1. Transformación genética de N. benthamiana.

Se utilizó el protocolo de transformación basado en A. tumefaciens reportado por Horsch et al. (1985), con ligeras modificaciones. Se utilizaron plantas cultivadas in vitro durante 2-4 semanas, con hojas bien expandidas. Se tomaron hojas, se eliminó la nervadura media y se cortaron explantos de lámina foliar de aproximadamente 1 $cm^2$, realizando cortes alrededor de los mismos para aumentar la superficie de contacto con A. tumefaciens. Se incubaron los explantos con 50 µL de un cultivo de la cepa LBA4404 crecido durante toda la noche, en 50 mL de medio MS (Murashige and Skoog, 1962) durante 5 min (co-cultivo primario). Se secaron los explantos sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de cultivo bacteriano. Se colocaron todos los explantos en placas de Petri conteniendo MS-A (MS con agar 0,8%) suplementado con 3% de sacarosa, con la cara abaxial de la hoja apoyada sobre el medio de cultivo, de manera de respetar su polaridad. Se colocaron las placas de Petri en la cámara de cultivo envueltas en papel de aluminio en oscuridad durante 48 h (co-cultivo secundario). A las 48 h se lavaron los explantos con el bacteriostático cefotaxime (200 mg/L) y se los secó sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de cultivo bacteriano y evitar su sobrecrecimiento. Los explantos se colocaron en Medio de Regeneración (MS-A suplementado con 3% p/v de sacarosa, 1 mg/L de ácido indolacético, 0,1 mg/L de 6–bencilaminopurina, 300 mg/L de cefotaxime, 50 mg/L de kanamicina y agar 0.8 %, pH 5.8), bajo un fotoperíodo de 16 h luz / 8 h oscuridad a 23-25ºC. Se realizaron controles de regeneración (explantos sin trasformar cultivados en medio sin kanamicina) y controles de selección (explantos sin trasformar cultivados en medio con kanamicina). Ambos controles fueron sometidos al mismo procedimiento que los explantos transformados pero sin el agregado de A. tumefaciens. Los explantos se repicaron a medio de cultivo fresco cada 15-20 d.

### 8.1.1. Análisis de PCR de plantas de N. benthamiana.

Una vez que los brotes enraizaron en selección, se efectuó la extracción de ADN según lo descrito en 11.1.1. y se realizó un análisis por PCR para confirmar la presencia de la secuencia de dermaseptina y de lisozima, según lo descrito en la Sección 3.2.1.

### 8.1.2. Rusticación de las plantas transgénicas de N. benthamiana.

Para la rusticación, las raíces se lavaron cuidadosamente con $H_2O$ corriente para eliminar los restos de medio de cultivo antes de traspasar las plantas a macetas conteniendo una mezcla 4:2:1:1 de tierra, turba, perlita y vermiculita. Durante la primera semana, las plantas se mantuvieron cubiertas con un film de polietileno para evitar su deshidratación y facilitar su adaptación a las nuevas condiciones de humedad. El crecimiento se efectuó en cámaras de crecimiento bajo un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad y a una temperatura de entre 23 y 25ºC.

### 8.1.3. Obtención de la generación F1 y F2 de las líneas transgénicas de N. benthamiana.

Una vez rusticadas, las plantas transgénicas de N. benthamiana fueron cultivadas en cámaras de crecimiento para la obtención de semillas. Para cada una de las plantas transgénicas obtenidas, tanto para la secuencia de dermaseptina como de lisozima, se obtuvo la generación F1 por autocruzamiento.

Las semillas de la generación F1 se sumergieron en una solución de etanol 70% durante 2 min y se traspasaron a una solución 6% de lavandina comercial (45 g/L de cloro) en la que se incubaron durante 10 min. A continuación, se hicieron 4 pasajes sucesivos por $H_2O$ estéril para eliminar los restos de lavandina, y se sembraron en medio MS-A suplementado con kanamicina (50 mg/L) para analizar la segregación del gen selector nptII. Para la obtención de semillas de la generación F2, las plántulas de la generación F1 resistentes a kanamicina fueron rusticadas, cultivadas en cámara de crecimiento (fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad a 23-25ºC) y sometidas a autocruzamiento. Luego, las semillas fueron desinfectadas como se describió anteriormente y se las hizo germinar en medio MS-A suplementado con kanamicina (50 mg/L) para analizar la segregación del gen selector nptII.

El análisis de la segregación se realizó para seleccionar plantas que tuvieran una sola copia y así obtener plantas de la generación F2 que se comportasen como homocigotas. Para establer el porcentaje de semillas transgénicas, se contabilizó el número de semillas

germinadas y el número de plantas que enraizaron en selección y desarrollaron hojas verdes. El análisis de la segregación se realizó con entre 100-200 semillas por planta. Las plantas utilizadas en los ensayos de infección con Xanthomonas posteriores, tanto in planta como in vitro, fueron las que exhibieron una relación de 3:1 (plantas que desarrollan vástagos normales en selección: plantas que no proliferan con selección) en la generación F1 y una relación 4:0 en la generación F2, para cada uno de los transgenes analizados.

## 8.2. Transformación genética de C. sinensis.

### 8.2.1. Preparación de los explantos.

Como fuente de explanto para la transformación genética de los cítricos, se utilizaron brotes de plantines C. sinensis (L.) Osbeck (naranjo dulce, cv. Pineapple) de 6 a 12 meses de edad, germinados a partir de semillas certificadas y cultivados en invernáculo. Una vez cortadas las hojas y espinas, los tallos se lavaron con una solución de 0,1% (v/v) de Tween 20 y se desinfectaron superficialmente durante 10 min en 2% (v/v) de hipoclorito de sodio conteniendo 0,1% (v/v) de Tween 20. Los tallos se lavaron 3 veces con $H_2O$ estéril en el flujo laminar y se procedió a dividirlos en segmentos internodales de aproximadamente 1 cm de longitud. Los segmentos se conservaron en una placa húmeda estéril hasta el momento de la transformación.

### 8.2.2. Co-cultivo I.

Los explantos de tallo se co-cultivaron durante 15 min con células de A. tumefaciens portadoras de la construcción pBIN19sgfp-Der y del vector pBIN19sgfp como control. El co-cultivo se efectuó utilizando un inóculo $1x10^7$ células/mL en medio MS suplementado con 100 μg/mL de myo-inositol, 0,2 μg/mL de tiamina-HCI, 1 μg/mL de piridoxina-HCI, 1 μg/mL de ácido nicotínico, pH 5,7 y 3% (p/v) de sacarosa. Posteriormente, los explantos se secaron en papel de filtro estéril con el fin de retirar el exceso de cultivo bacteriano.

### 8.2.3. Co-cultivo II.

Los explantos se cultivaron en placas de Petri conteniendo Medio de Co-cultivo (medio MS suplementado con 3% (p/v) de sacarosa, 2 μg/mL de ácido indolacético, 2 μg/mL de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 1 μg/mL de 2-isopentenil adenina). Los explantos se

mantuvieron durante 3 d en semioscuridad con fotoperíodo de 16 h para permitir la transformación de las células del cambium.

### 8.2.4. Regeneración.

Luego del co-cultivo II, los explantos se transfirieron a placas de Petri frescas conteniendo Medio de Regeneración (medio MS suplementado con 3% (p/v) de sacarosa y 3 μg/mL bencilaminopurina) suplementado con los bacteriostáticos cefotaxime y vancomicina (en cada caso 250 μg/mL) para inhibir el crecimiento de Agrobacterium. Además, se adicionó kanamicina a una concentración final de 100 μg/mL para seleccionar los brotes transformantes frente a los no transformados. Se mantuvieron en oscuridad a 26ºC durante 2-4 semanas hasta la visualización bajo lupa de células de callo. Luego, los explantos se transfirieron a Medio de Regeneración fresco en una cámara de cultivo bajo un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad (intensidad de luz, 45 $\mu E/m^2/s$) a 26ºC con el fin de inducir el crecimiento de brotes. Los explantos fueron sub-cultivados en medio fresco cada 3-4 semanas.

## 9. Selección visual por la fluorescencia de GFP.

Los brotes regenerados a partir de las células transformadas con la construcción pBin19sgfp-Der se visualizaron bajo una lupa MZ8 (Leica) equipada con un módulo de fluorescencia GFP Plus que comprende un filtro de excitación de 480/40 nm, un filtro dicroico LP (Long Pass) 505 nm de emisión y filtro de bloqueo LP 510 nm. Las fotografías se tomaron con una cámara Wild MP5 518 (Leica) usando film Kodak Ektachrome 400. El tiempo de exposición óptimo fue de 5 a 10 min. Este procedimiento permite seleccionar visualmente brotes transgénicos mediante la fluorescencia de GFP.

## 10. Desarrollo de plántulas transgénicas de C. sinensis.

### 10.1. Injerto in vitro.

La parte apical de los brotes que expresaban el gen sgfp fueron injertados in vitro sobre un pie etiolado de C. sinensis x P. trifoliata (Citrange Troyer), cuidando de preservar el contacto entre los anillos vasculares del pie y del injerto. Las plántulas se cultivaron en medio líquido (medio MS suplementado con 7,5% (p/v) de sacarosa) en cámara de cultivo bajo un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad (intensidad de luz, 45 $\mu E/m^2/s$) a 26ºC.

### 10.2. Análisis de PCR de plántulas de C. sinensis.

A las 3-4 semanas de la realización del injerto, se efectuó la extracción de ADN y se realizó un análisis por PCR para confirmar la presencia de la secuencia de dermaseptina y del gen marcador sgfp. Como templado, se utilizó ADN extraído de hojas de plántulas, según lo descrito en la Sección 11.1.1. El ensayo de PCR se realizó según lo descrito en la Sección 3.2.1.

### 10.3. Propagación de plantas transgénicas de C. sinensis.

Luego de 6-8 semanas, las plántulas caracterizadas positivamente por PCR se injertaron en plantines de Citrus jambhiri Lush. (limón rugoso) de 6 meses de edad y cultivados en invernáculo bajo un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad a 24-26°C.

El injerto se realizó cortando una yema de C. sinensis rodeada de una Sección de corteza. El corte abarcó todo el espesor de la corteza y una fina capa de lámina. Luego, la yema seleccionada se colocó bajo la corteza de la planta a injertar. Para ello, se realizó una pequeña herida en forma de T invertida, a una distancia de 10 cm de la base del tallo, en la planta que serviría como pie. El injerto se fijó utilizando una cinta plástica del tipo Saran Wrap. A las 2 semanas de realizado el injerto se realizó una inspección para constatar la fusión de los tejidos. Una vez que la yema brotó y se hubo desarrollado unos 10 cm, se cortó la copa del pie a unos 10-20 cm por encima del injerto. Luego de 10-12 meses de crecimiento, las plantas así propagadas fueron utilizadas en ensayos de infección.

## 11. Análisis de ADN.

### 11.1. Preparación de ADN vegetal.

#### 11.1.1. Preparación de ADN total de plantas para análisis por PCR.

La extracción de ADN se realizó según el protocolo descripto por McGarvey and Kaper (1991). Como fuente de material se utilizaron hojas de plantas crecidas in vitro. Brevemente, se homogeneizaron 10 mg de hojas en un tubo Eppendorf con la ayuda de un vástago plástico de punta cónica. Se resuspendió el homogenato en 400 µl de Solución de Extracción. El extracto se agitó vigorosamente durante 10 seg, se incubó durante 1 h a 65ºC y se extrajo por el agregado de 400 µl de cloroformo. Se centrifugó a 16.000 xg durante 10 min para separar las fases. El ADN contenido en la fase acuosa se precipitó agregando 1 volumen

de isopropanol e incubando durante 15 min a -20ºC. Se centrifugó a 14.000 xg durante 10 min a temperatura ambiente y se lavó el precipitado con etanol 70%, secándolo al aire para eliminar las trazas de alcohol. El ADN se resuspendió en 10 µl de $H_2O$ bidestilada estéril.

### 11.1.2. Preparación de ADN total de C. sinensis para Southern blots.

Para la extracción de ADN genómico utilizado en los Southern blots se utilizó el protocolo descrito por Futterer et al. (1995). Se molió en mortero 1g de material foliar con nitrógeno líquido, se resuspendió la molienda en 1,6 mL de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH 8; 700 mM NaCl; 10 mM EDTA; 1% p/v CTAB; 1% v/v β-mercaptoetanol) y se incubaron las muestras a 56°C durante 15 min. Se realizó una extracción utilizando 1 volumen de cloroformo-isoamílico (24:1). Se centrifugó a 14.000 xg durante 15 min. A la fase acuosa obtenida se le agrega 0,1 volúmenes de 10% p/v CTAB y se mezcla suavemente. Se re-extrae la fase acuosa agregando 1 volumen de cloroformo-isoamílico (24:1) y se centrifugó a 14.000 xg durante 15 min. A la fase acuosa obtenida se le agregaron 1,2 volúmenes de buffer de precipitación (50 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA; 1% p/v CTAB), se mezcló suavemente incubando a temperatura ambiente durante 20 min y centrifugó a 14.000 xg por 10 min. Se resuspendió el pellet obtenido con 400 µl de NaCl 1M, agregando 3 µl de RNAsa (20 mg/mL) e incubando a 37°C durante 30 min. Se precipita el DNA agregando 2,5 volúmenes de etanol absoluto e incubando a -70°C durante 30 min o a -20°C overnigth. Se centrifugó a 14.000 xg por 10 min a 4°C y se lavó el pellet obtenido con etanol 70%, secándolo al aire para eliminar las trazas de alcohol. Se resuspendió el DNA agregando 50 µL de agua bidestilada estéril y se lo dejó a 4ºC resuspendiendose durante toda la noche. La concentración e integridad del ADN obtenido se verificó analizando una alícuota mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8%–TAE 1X en presencia de bromuro de etidio.

## 11.2. Ensayo de Southern blot.

La integración del transgén en las plantas transgénicas nucleares se evaluaron en ensayos de Southern blot. Se incubaron muestras de ADN total (12 µg) de las plantas transformadas durante 1 h con 40 U de la enzima Bgl II (Fermentas) utilizado el buffer sugerido por el proveedor. Luego de 1 h de incubación, se agregó espermidina (Sigma Chemical) a una concentración final de 1 mM más otras 40 U de la enzima y se incubó a 37ºC durante toda la noche. En caso de ser necesario, a la mañana siguiente se agregaron 40 U más de enzima. Como controles, se utilizaron muestras de ADN total de C. sinensis sin

transformar, digerido de igual forma que el ADN de las plantas transgénicas. El ADN digerido se separó por electroforesis en geles de agarosa 0,8 % en TAE 1X, a 70 V constante durante 8 h. El gel se lavó con $H_2O$ destilada, se incubó en HCl 0,25 M durante 10 min, y luego en 10 volúmenes de Solución Desnaturalizante (NaOH 0,4 M, NaCl 1,5 M) durante 20 min, con agitación suave. El ADN se transfirió por capilaridad con NaOH 0,4 M a membranas de nylon Hybond $N^+$ (Amersham Biosciences). Las membranas de nylon Hybond $N^+$ conteniendo el ADN se incubaron en 12 mL de solución de hibridación Church (SDS 7%, BSA 1%, buffer sodio fosfato 1 M pH 7,2, 0,2% y EDTA-$Na_2$ 1 mM, pH 8) durante 2 h a 63ºC en un horno de hibridación rotatorio. Luego de esta pre-hibridación, se agregó a la solución la sonda desnaturalizada marcada con radioactividad y se incubó toda la noche a 63ºC. Al otro día, se descartó la solución con la sonda y se hizo un enjuague rápido con SSC 2X, SDS 0,1%, seguido de tres lavados sucesivos de 15 min cada uno con 1) SSC 2X, SDS 0,1% a temperatura ambiente; 2) SSC 2X, SDS 0,1% a 63ºC; 3) SSC 0,2X, SDS 0,1% a 63ºC (20X SSC: citrato de sodio 300 mM, pH 7, NaCl 3 M). Cuando fue necesario rehibridar una membrana, la sonda se eliminó de la misma sumergiéndola en una solución de SDS 0,1% precalentada a 100ºC, y se la incubó hasta que la solución alcanzó la temperatura ambiente.

Las membranas se revelaron mediante exposición a placas radiográficas (Amersham Hyperfilm™ ECL) a -70ºC por un período de 7 d, utilizando una pantalla amplificadora de la señal. Alternativamente, se expuso la membrana a una pantalla de almacenamiento de fósforo y se analizó usando el sistema de revelado Storm 840 PhosphorImager (Amersham).

### 11.2.1. Preparación de sonda.

El fragmento molde para la sonda de dermaseptina, se obtuvo por amplificación por PCR de la secuencia de dermaseptina (104 pb) a partir de la construcción pBIN19sgfp-Der, utilizando como iniciadores los oligonucleótidos Der-Fw y Der-Rv (Sección 4 de Materiales y Métodos). La sonda utilizada en el ensayo de Southern se preparó mediante el sistema de iniciación al azar Prime-a-gene (Promega). Se desnaturalizaron 25 ng del fragmento utilizado como molde por incubación a 95ºC durante 5 min y se mezclaron con 400 μg/mL de seroalbúmina bovina, 5 unidades de ADN polimerasa I Klenow, 20 μM de dATP, dGTP y dTTP, 50 μCi (333 nM) de $\alpha$-$^{32}$P dCTP 3000 Ci/mmol y el buffer de marcación 5X conteniendo los oligonucleótidos iniciadores en un volumen final de 50 μl. Esta mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción se detuvo calentando a 95ºC durante

2 min y agregado de EDTA a una concentración final de 20 mM. Se utilizaron columnas elutip-d (Schleicher & Schuell) según las indicaciones sugeridas por los fabricantes. Se desnaturalizó la sonda purificada por 10 min y se la colocó en hielo durante 10 min. Luego se la agregó al tubo de hibridización, para dejarla incubando over night.

Todas las manipulaciones de material radiactivo se efectuaron en un cuarto de INGEBI-CONICET destinado a tal fin, según las normativas establecidas por el Ente Regulador de la Comisión de Energía Atómica.

## 12. Análisis de ARN.

### 12.1. Extracción de ARN total por el método de TRIzol.

Se molió 1 g de tejido foliar procesándolo en un mortero con $N_2$ líquido. Se le agregó al tejido molido 1 mL de TRIzol LS Reagent (Invitrogen Life Technologies) y se lo mantuvo a temperatura ambiente por 5 min. El tejido molido se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL y se centrifugó 10 min a 13.000 r.p.m. a 4ºC. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf limpio, se agregaron 400 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 seg y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 13.000 r.p.m. por 15 min a 4ºC para separar las fases acuosa y orgánica y la primera se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf. Se agregaron 600 µL de isopropanol y se centrifugó a 13.000 r.p.m. por 20 min a 4ºC. El precipitado se lavó con etanol 70% y se centrifugó a 13.000 r.p.m. por 5 min a 4ºC. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. El ARN se resuspendió en 50 µL de $H_2O$ estéril libre de ARNasas. La calidad del ARN obtenido se analizó en geles de agarosa 1% conteniendo 0,5 µg/mL de bromuro de etidio libre de ARNasas. La cuantificación se realizó con el espectrofotómetro de masa Thermo Scientific Nanodrop 2000.

### 12.2. Preparación de ADNc y RT-PCR.

A partir del ARN extraído, se sintetizó ADNc utilizando el iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad) según el protocolo sugerido por el fabricante. La amplificación de ADNc de dermaseptina se efectuó con oligonucleótidos iniciadores específicos para esta secuencia (iniciadores Der-Fw y Der-Rv; Tabla 2). La amplificación del ADNc de la secuencia de lisozima se efectuó utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos para la misma (iniciadores Liz-Fw y Liz-Rv; Tabla 2). Como control de carga se utilizó la amplificación del

ADNc del gen de actina B de C. sinensis (iniciadores Cs-Act-Fw y Cs-Act-Rv; Tabla 2) o de N. benthamiana (iniciadores Nb-Act-Fw y Nb-Act-Rv; Tabla 2). El programa de amplificación utilizado consistió en 24 ciclos de 30 seg a 94ºC, 30 seg a 58ºC, y 30 seg a 72ºC, seguidos por un paso final de elongación de 5 min a 72ºC. Se utilizó un termociclador MyCyclerTM (Bio-Rad). Se realizó un control de contaminación de ADN sin el agregado de transcriptasa reversa. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de 2% de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

## 13. Análisis de proteínas.

### 13.1. Obtención de anticuerpos anti-dermaseptina.

Para producir anticuerpos anti-dermaseptina, se hicieron sintetizar 2 mg de dermaseptina (de secuencia idéntica a la usada en la transformación de plantas) acoplados al carrier KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin). La síntesis fue realizada por la empresa Peptide 2.0 Inc.

El protocolo de inmunización fue establecido por el personal especializado del Bioterio de la Facultad de Ciencia Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Se utilizaron 40 µg de péptido conjugado por inoculación para inmunizar ratones hembra Balb c. El protocolo seguido fue:

Día 1: sangrado pre-inoculación. Punción submaxilar para extraer 50 µl de sangre.
Día 2: inoculación subcutánea en pliegue nucal de 40 µg de antígeno en adyuvante de Freund.
Día 21: inoculación subcutánea en pliegue nucal de 40 µg de antígeno en adyuvante de Freund.
Día 30: extracción de 50 µl de sangre por animal mediante punción submaxilar.
Día 42: inoculación subcutánea en pliegue nucal de 40 µg de antígeno en adyuvante de Freund.
Día 50: extracción de 50 µl de sangre por animal mediante punción submaxilar.
Día 63: inoculación subcutánea en pliegue nucal de 40 µg de antígeno en adyuvante de Freund.
Día 74: inoculación subcutánea en pliegue nucal de 40 µg de antígeno en adyuvante de Freund. En este paso, se inocularon 20 µg de dermaseptina sin acoplar para incrementar la respuesta inmune.
Día 80: sangrado total por punción cardíaca con anestesia.

Con el suero obtenido en cada extracción se realizó un ensayo de dot-blot para determinar el nivel de detección de los distintos antisueros.

### 13.2. Ensayos de Western blot.

Por cada muestra, se homogeneizaron 100-200 mg de tejido foliar en 150 µL de Cracking Buffer 4x (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, β-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,008%). Las muestras se incubaron en un baño térmico durante 5 min a 95-100ºC. El extracto se centrifugó a 13.000 r.p.m. por 2 min y se analizaron entre 10-20 µL del sobrenadante en geles de poliacrilamida.

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida de 10 x 10 cm y de 1 mm de espesor preparados en el sistema SE 260 Mini Vertical Unit (Amersham Biosciences) o Mini Protean III (BioRad). Por cada 10 mL de gel separador se mezclaron 4 mL de $H_2O$, 3,3 mL de acrilamida 30% (acrilamida 29,2: bisacrilamida 0,8), 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, 100 µL de SDS 10%, 100 µL de persulfato de amonio 10% y 8 µL de TEMED. Por cada 5 mL de gel concentrador se colocaron 3,4 mL de $H_2O$, 830 µL de acrilamida 30%, 1 mL de Tri-HCl 1M, pH 6,8, 75 µL de SDS 10%, 75 µL de persulfato de amonio 10% y 10µL de TEMED. Las muestras se prepararon en buffer de siembra 5X y se calentaron a 100ºC durante 5 min para desnaturalizar totalmente las proteínas. La electroforesis se realizó a 100 V constantes en buffer Tris-Glicina (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1%). Los geles se incubaron a 37ºC durante 2 h a temperatura ambiente en solución de tinción (Coomasie Brillant Blue R250 0,05%, metanol 40%, ácido acético 10%). Luego, se efectuaron varios lavados con una solución conteniendo 50% de metanol y 10% de ácido acético, hasta desteñir el gel por completo.

Para la transferencia de las proteínas se utilizó el sistema para geles pequeños Mini Trans-BlotTM (Bio-Rad) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los geles se sumergieron en buffer de transferencia (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, glicina 196 mM, metanol 20%). La membrana de nitrocelulosa (Hybond C-Extra; Amersham Biosciences) se hidrató 10 min en el mismo buffer. El cassette de transferencia se ensambló en el cartucho y se colocó dentro de la cuba de electrotransferencia llena con buffer de transferencia. La transferencia se llevó a cabo a 60 V durante 1 h. Las membranas se guardaron secas a temperatura ambiente y fueron teñidas con solución conteniendo 650 mM de Rojo Ponceau y 1% de ácido acético.

Las membranas transferidas se incubaron durante 1 h con agitación suave en Solución de Bloqueo TTBS (100 mM, Tris-HCl, pH 7,5; NaCl 150 mM y Tween 20 0,1% v/v) suplementada con 5% (p/v) de leche descremada en polvo. Luego, se agregó el primer anticuerpo diluido en solución de bloqueo y la membrana se incubó con agitación suave durante toda la noche a 4ºC. Al día siguiente, se realizaron 4 lavados de 5 min cada uno con TTBS y, al finalizar el último, se agregó el segundo anticuerpo comercial diluido en solución de bloqueo. Finalmente, se hicieron 4 lavados adicionales de 5 min con TTBS y 1 lavado de 5 min con TBS.

Los anticuerpos utilizados en ensayos de inmunodetección fueron los siguientes:

Anti-dermasptina de ratón (Bioterio de la FCEyN-UBA). Dilución de uso: 1:500.

Anti-lisozima de ratón (Santa Cruz). Dilución de uso: 1:4000 a 1:100.

Anti-lisozima de conejo (Bioterio del Fundación Instituto Leloir). Dilución de uso: 1:2000.

Anti-IgG de ratón conjugados a fosfatasa alcalina (Gibco BRL). Dilución de uso: 1:4000.

Anti-IgG de conejo conjugados a fosfatasa alcalina (Gibco BRL). Dilución de uso: 1:4000.

Las membranas incubadas con los anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina se revelaron utilizando los sustratos cromogénicos NBT (Nitroblue tetrazolium; Sigma-Aldrich) y BCIP (5 bromo-4 cloro-3 indoil fosfato; Sigma-Aldrich). Luego de los lavados finales, las membranas se incubaron durante 10 min en buffer fosfatasa (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM). Posteriormente, cada membrana se incubó en la oscuridad en 10 mL de buffer fosfatasa conteniendo 100 µL de BCIP (BCIP 30 mg/mL en dimetilformamida 100%) y 100 µL de NBT (NBT 50 mg/mL, en dimetilformamida 70%). La reacción se detuvo removiendo la solución de revelado y agregando $H_2O$ destilada.

### 13.3. Dot-blot.

#### 13.3.1. Dot-blot con péptido sintético.

Se prepararon diluciones estándar de dermaseptina de concentraciones 20, 10, 5, 1 y 0,1 ng/µL. Se sembró 1 µL de cada solución estándar en un tira de una membrana de nitrocelulosa (Hybond C-Extra; Amersham Biosciences) y se incubó y reveló a las membranas según lo descrito en la Sección 13.2.

#### 13.3.2. Dot-blot con extractos vegetales.

Se molieron 200 mg de tejido foliar joven con $N_2$ líquido hasta obtener un polvo fino. Se agregaron 400 µL de buffer fosfato pH 7,4 y se centrifugó a 16.000 xg durante 30 min a 4°C. Luego de transferir el sobrenadante a un nuevo tubo, se repitió el procedimiento 2 veces, obteniéndose un extracto proteico crudo clarificado. Se utilizaron 20 µL del extracto clarificado por cada spot sembrado sobre una membrana de nitrocelulosa (Hybond C-Extra; Amersham Biosciences). Las membranas fueron incubadas y reveladas según se describe en la Sección 13.2.

### 13.3.3. Dot-blot de los extractos vegetales filtrados.

Se molieron 2 g de tejido foliar con $N_2$ líquido hasta obtener un polvo fino. Se agregaron 4 mL de buffer fosfato pH 7,4 y se centrifugó a 16.000 xg durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se repitió la centrifugación 2 veces más. El sobrenadante obtenido (2 mL) se pasó por una columna Amicon Ultra 10K (Milipore) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizó 1 mL del percolado obtenido para sembrar cada spot sobre una membrana de nitrocelulosa Hybond C-Extra (Amersham Biosciences). Las membranas fueron incubadas y reveladas según se describe en la Sección 13.2.

## 14. Ensayos de inhibición in vitro de crecimiento bacteriano.

### 14.1. Ensayos de inhibición con dermaseptina sintética.

Los cultivos de E. coli y de Xanthomonas spp. se realizaron en los medios LB y PYM, respectivamente. Luego de desarrollar los mismos durante toda una noche, se realizaron diluciones seriadas hasta obtener suspensiones bacterianas de $1x10^7$ células/mL (D.O. $_{600nm}$ = 0,1). Se cosechó 1 mL de las respectivas suspensiones por centrifugación a 3.500 xg durante 10 min a temperatura ambiente y las células se resuspendieron en 90 µL de medio LB líquido.

Los ensayos de inhibición se efectuaron siguiendo el protocolo de Osusky et al. (2005) con modificaciones menores. Para ello, se incubó en un tubo Eppendorf 90 µL de cada suspensión bacteriana ($1x10^7$ u.f.c. totales) con 10 µL de una solución conteniendo distintas concentraciones de dermaseptina en $H_2O$ estéril. Las concentraciones finales utilizadas para los ensayos fueron 50, 65 y 80 µg/mL en el caso de E. coli, y 5, 10, 20 y 35 µg/mL en el caso de Xanthomonas. Como controles, se incluyeron tubos suplementados con 10 µL de $H_2O$ estéril en lugar de la solución de dermaseptina. Las incubaciones se realizaron durante 4 h a 25ºC con una agitación suave para evitar la decantación de las bacterias. Luego, se realizaron

diluciones seriadas y los distintos tratamientos de dermaseptina se sembraron en placas de Petri conteniendo medio LB-A (E. coli) o PYM-A (Xanthomonas spp.). A las 24 h de crecimiento a 37ºC (E. coli) o 28ºC (Xanthomonas spp.), se realizó el conteo de las colonias para cada tratamiento. Cada experimento se realizó 3 veces. El número de u.f.c. se estableció promediando 3 placas de Petri correspondientes a un mismo tratamiento.

### 14.2. Ensayos de inhibición con lisozima comercial.

Se crecieron cultivos de Xanthomonas spp. en medio PYM durante toda la noche y se realizaron diluciones seriadas en medio PYM hasta obtener suspensiones bacterianas de $1x10^6$ células/mL.

Se prepararon placas de Petri con medio de cultivo PYM-A. Una vez solidificado el medio, se sembraron spots con soluciones conteniendo distintas concentraciones de lisozima de huevo de gallina (Sigma). Para generar cada spot se emplearon 15 µL de la solución de lisozima de 10, 50, 250 y 500 ng/mL. Como control positivo, se utilizaron 15 µL de una solución de kanamicina (50 µg/mL) y como control negativo se utilizaron 15 µL $H_2O$ destilada estéril. Una vez que las distintas soluciones de lisozima fueron absorbidas por el medio de cultivo agarizado, se sembraron 100 µL del cultivo de las distintas especies de Xanthomonas ($1x10^6$ u.f.c./mL) para desarrollar un césped bacteriano sobre la placa. A las 48 h de crecimiento a 28ºC, se fotografiaron los resultados observados.

### 14.3. Ensayos de inhibición in vitro en medio líquido con extractos de plantas transformadas de N. benthamiana.

Se utilizaron plantas de N. benthamiana transformadas con la secuencia de dermaseptina y de lisozima correspondientes a la generación F2. Se seleccionaron las plantas que mostraban buena capacidad de enraizamiento en medio selectivo y resultaron positivas en los ensayos de RT-PCR (Liz-1.1.2, 4.5.1 y 4.6.1; Der-5.1.1, 6.1.2 y 13.1.1). Como control, se incluyeron plantas de N. benthamiana no transformadas.

#### 14.3.1. Obtención de extractos vegetales.

Se molieron 200 mg de hojas con $N_2$ líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino. Se agregaron 200 µL de buffer fosfato pH 7,4 y se centrifugó la mezcla a 10.000 xg por

15 min a 4ºC. Se repitió el paso para clarificar la muestra, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se lo conservó en hielo hasta el momento de la incubación.

**14.3.2. Preparación del inoculo.**

Las bacterias utilizadas en estos ensayos fueron X. axonopodis y X. campestris. Se desarrollaron cultivos de Xanthomonas spp. en medio PYM. Luego de una noche de incubación, se midió la $D.O._{600}$ de los cultivos y se realizaron diluciones seriadas hasta obtener suspensiones bacterianas de 400.000 u.f.c./mL. Se centrifugaron 100 µL de estas suspensiones durante 10 min a 3.500 xg. Se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron los precipitados en 20 µL de una solución de $MgCl_2$ 10 mM, obteniéndose así una suspensión conteniendo aproximadamente 40.000 células bacterianas que fue utilizada como inóculo.

**14.3.3. Incubación y siembra.**

Se incubaron 380 µL de extracto vegetal con 20 µL de suspensión bacteriana durante 4 h, con una agitación suave para evitar la decantación de las bacterias. Al finalizar la incubación, se realizaron diluciones seriadas y se las sembró en placas de Petri conteniendo medio PYM-A. En el caso de la especie de X. campestris, se adicionó rifampicina (50 µg/mL) al medio de cultivo. Se incubó durante 48 h a 28ºC y se realizó el conteo de las colonias para cada tratamiento. Cada experimento se realizó 3 veces. El número de u.f.c. se estableció promediando 3 placas de Petri correspondientes a un mismo tratamiento.

**14.4. Ensayos de inhibición in vitro en medio sólido con extractos de plantas transgénicas de N. benthamiana.**

Los extractos se realizaron utilizando plantas de N. benthamiana transformadas y no transformadas, de 6 semanas de edad. En el caso de las primeras, se utilizaron plantas de la generación F2 que mostraron buena capacidad de enraizamiento en medio selectivo y fueron positivas en los ensayos de RT-PCR (plantas Der-5.1.1., -6.1.2., -13.1.1., -14.1.1. y -18.1.2.; Liz-1.1.2., -2.3.1., -4.5.1., -4.6.1. y -4.8.1.). La obtención de los extractos se realizó según lo descrito en 14.3.1. Como control negativo se utilizaron plantas no transformadas. Como control de la inhibición bacteriana se utilizó kanamicina. La especie utilizada para estos ensayos fue únicamente X. axonopodis.

Se prepararon placas de Petri conteniendo medio PYM-A y se sembraron en las mismas 100 µL de un cultivo de $1x10^6$ u.f.c./mL de X. axonopodis. Una vez que la suspensión bacteriana fue absorbida por el medio, se colocaron discos de papel Whatman en que se sembraron 50 µL de los extractos de las plántulas transformadas, de los extractos controles, y el antibiótico kanamicina. Se dejó secar las placas en el flujo laminar y se las incubó a 28ºC durante 72 h. Al cabo de este tiempo, se fotografiaron las placas para documentar los resultados del ensayo, con una lupa de campo claro (Olympus SZ61). Cada ensayo se realizó tres veces.

### 14.5. Ensayos de inhibición in vitro en medio sólido con extractos vegetales de plántulas transformadas de N. benthamiana.

Se obtuvieron extractos de plántulas transformadas de N. benthamiana de 10 d de edad germinadas en medio MS-A suplementado con kanamicina (50 µg/mL), según se describe en la Sección 14.3.1. Las plántulas utilizadas correspondieron a la generación F2 y fueron seleccionadas entre las líneas con mayor capacidad de enraizamiento en medio selectivo y resultado positivo en los ensayos de RT-PCR (plantas Liz-1.1.2., -2.3.1., -4.5.1., -4.6.1. y -4.8.1.; Der-5.1.1., -6.1.2., -13.1.1., -14.1.1. y -18.1.2.). Como control negativo, se utilizaron plántulas no transformadas germinadas en medio MS-A sin agregado de antibióticos. Como control de la inhibición bacteriana se utilizó kanamicina. La especie utilizada para estos ensayos fue únicamente X. axonopodis.

Se prepararon placas de Petri conteniendo medio PYM-A y se sembraron en las mismas 100 µL de un cultivo de $1x10^6$ u.f.c./mL de X. axonopodis. Una vez que la suspensión bacteriana fue absorbida por el medio, se colocaron discos de papel Whatman en que se sembraron 50 µL de los extractos de las plántulas transgénicas, de los extractos controles, y el antibiótico kanamicina. Se dejó secar las placas en el flujo laminar y se las incubó a 28ºC durante 72 h. Al cabo de este tiempo, se fotografiaron las placas para documentar los resultados del ensayo, con una lupa de campo claro (Olympus SZ61). Cada ensayo se realizó tres veces.

### 15. Ensayos de agroinfiltración.

Los cultivos de A. tumefaciens (cepa GV3101) se efectuaron bajos las condiciones citadas en el punto 1.3.1. A todos los cultivos se agregó rifampicina (100 µg/mL) y gentamicina (50 µg/mL), antibióticos correspondientes a la selección cromosómica y

plasmídica de la cepa A. tumefaciens utilizada. Además, para seleccionar las bacterias transformadas con las construcciones pBIN19sgfp, pBIN19sgfp-Der y pBIN19sgfp-Liz, se agregó kanamicina (50 μg/mL). Se utilizó un inoculo de 2 mL (dilución 1:10) de un cultivo crecido durante toda la noche para iniciar cultivos frescos de 20 mL. Se dejó desarrollar a los mismos con agitación a 28ºC hasta alcanzar $D.O._{600nm}$ = 1 y se centrifugaron las células a 3.500 xg durante 10 min. Luego de resuspenderlas en buffer de infiltración ($MgCl_2$ 10 mM, MES 10 mM, pH 5,6, acetosyringona 100 μM), se las dejó 2 h en oscuridad antes de iniciar la inoculación.

Las infiltraciones se hicieron según el protocolo descripto por Schob et al. (1997) utilizando hojas de N. benthamiana. Se utilizaron plantas de 4-6 semanas de dad y se infiltraron hojas completamente expandidas (tercera a quinta hoja). La infiltración de las suspensiones bacterianas se efectuó con una jeringa sin aguja aplicando presión contra la parte abaxial de la hoja. Los ensayos se realizaron con agrobacterias que portaban las construcciones pBin19sgfp-Der, pBin19sgfp-Liz, y el vector binario pBIN19sgfp como control. Como control positivo, se agroinfiltraron hojas con bacterias sin transformar. A las 48-72 h de la agroinfiltración, se tomaron muestras y se realizaron observaciones al microscopio. Se utilizó un microscopio de epifluorescencia Nikon E600 y una cámara Optronics Magnafire (Intelligent Imaging Innovations, Inc.) acoplada a dicho microscopio.

**16. Ensayos de infiltración de Xanthomonas spp. en plantas de N. benthamiana.**

Las infiltraciones se realizaron según el protocolo descripto por Yun et al. (2006). En cada uno de los experimentos, se utilizaron plantas de 4-6 semanas de edad y se infiltraron hojas jóvenes completamente expandidas (tercera a quinta hoja). Se realizaron ensayos con plantas de N. benthamiana transformadas y no transformadas. En el caso de las primeras, se utilizaron plantas de la generación F2 que mostraron buena capacidad de enraizamiento en medio selectivo y fueron positivas en los ensayos de RT-PCR.

Se efectuaron cultivos de X. axonopodis y X. campestris en medio PYM durante toda la noche. Se midió la $D.O._{600nm}$ y se realizaron diluciones seriadas en medio PYM hasta obtener suspensiones de $1x10^7$ células/mL. Se centrifugaron 5 mL de los respectivos cultivos durante 10 min a 3.500 xg a temperatura ambiente, se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron los precipitados en 5 mL de una solución de $MgCl_2$ 10 mM. A partir de estas suspensiones, se obtuvieron las diluciones utilizadas como inóculos. Se utilizaron inóculos de

concentraciones altas ($1x10^7$ y $1x10^5$ u.f.c./mL) y bajas ($1x10^3$ u.f.c./mL y $1x10^2$ u.f.c./mL). Los ensayos de infiltración se repitieron 3 veces. Cada ensayo incluyó 3 plantas de N. benthamiana sin transformar. De cada planta se infiltraron dos hojas, cada una con una concentración de inóculo diferente.

El procedimiento de infiltración fue análogo al utilizado para Agrobacterium (ver punto 15). Se dejó recuperar las hojas 12 h para recolectar la primera muestra y se tomaron luego 5 muestras más a intervalos de 24 h. Las tomas de muestra se efectuaron mediante un sacabocado sobre la zona agroinfiltrada, de forma tal que todas tuvieran la misma superficie (0,64 $cm^2$). Los discos de hoja se colocaron en un tubo Eppendorf conteniendo 450 µL de $MgCl_2$ 10 mM, y se molieron con la ayuda de un vástago plástico de punta cónica. El homogenato se agito 5 seg en un Vortex y se centrifugó a 1.000 xg durante 1 min. Se pasó el sobrenadante a un tubo limpio y se realizaron diluciones seriadas en $MgCl_2$ 10 mM que se sembraron en placas de Petri conteniendo medio PYM-A. En el caso de la especie X. campestris, se adicionó rifampicina (50 µg/mL) al medio de cultivo. Se incubaron las placas a 28ºC durante 48 h y se determinó el número de u.f.c. Los resultados se presentan como el promedio obtenido en 3 placas de Petri correspondientes a un mismo tratamiento.

## 17. Ensayos de co-infiltración de X. axonopodis y A. tumefaciens en plantas de N. benthamiana.

El protocolo de co-infiltración utilizado fue el descripto por Metz et al. (2005), con modificaciones menores. Los cultivos de A. tumefaciens (cepa GV3101) se prepararon según se describe en la Sección 15 hasta obtener suspensiones bacterianas de $1x10^7$ u.f.c./mL. Los cultivos de X. axonopodis se prepararon según se describe en la Sección 16 hasta obtener suspensiones bacterianas de $2x10^5$ u.f.c./mL. Se mezclaron volúmenes iguales de los cultivos de Agrobacterium y Xanthomonas de manera tal de obtener una suspensión bacteriana cuyas concentraciones finales fueran, respectivamente, $5x10^6$ y $1x10^5$ u.f.c./mL. Luego, se co-infiltraron hojas de N. benthamiana siguiendo el procedimiento descripto en las Sección 15. Se utilizaron células de A. tumefaciens portando la construcción pBIN19sgfp-Der y de A. tumefaciens portando el vector pBIN19sgfp como control. Los ensayos se realizaron 3 veces utilizando 5 plantas de N. benthamiana sin transformar e inoculando 3 hojas por planta.

## 18. Ensayos de infección con X. axonopodis en hojas escindidas de C. sinensis.

### 18.1. Punción de hojas de C. sinensis seguido de la inoculación mediante spray.

Se adaptó el protocolo establecido en el trabajo de Tesis Doctoral de Alves de Azevedo, de la Universidad de San Pablo, Brasil (2005). Los cultivos de X. axonopodis se prepararon según se describe en la Sección 16 hasta obtener suspensiones bacterianas de $1x10^5$ u.f.c./mL. Las plantas de C. sinensis fueron cultivadas y mantenidas como se detalla en la Sección 2.

Cada ensayo incluyó 10 hojas por planta transgénica, y 10 hojas de plantas sin transformar, aisladas inmediatamente antes del ensayo. La inoculación comprendió cuatro zonas, dos de cada lado de la vena media. Cada zona de inoculación incluyó 4 heridas efectuadas con una aguja estéril sobre la cara abaxial de la hoja, que se hallaban separadas entre sí por 2 mm de distancia. Dos zonas se inocularon con Xanthomonas y dos zonas con una solución de $MgCl_2$ 10 mM como control. Se realizaron 2 pulverizaciones con una suspensión bacteriana de $1x10^5$ u.f.c./mL sobre cada zona de inoculación. Luego, se colocaron las hojas en un tubo Falcon de 50 mL previamente esterilizado, con el pecíolo sumergido en $H_2O$ destilada estéril. Se taparon los tubos, se lo selló con Parafilm y se los colocó en cámara de crecimiento bajo las condiciones descriptas en la Sección 2. En cada ensayo, se colocaron hojas sin inocular en tubos Falcon, como controles del estado fisiológico.

Las observaciones de los síntomas se realizaron en forma periódica utilizando una lupa de mano, y las fotografías se tomaron utilizando una cámara Sony Cyber Shot DSC-S70 acoplada a una lupa estereoscópica Stemi 2000-C (Zeiss). Se realizaron 3 experimentos independientes.

### 18.2. Inmersión de hojas de C. sinensis en suspensiones bacterianas.

El protocolo de inoculación se adaptó de ensayos de infección utilizados previamente con otras especies de Xanthomonas y otras especies de plantas (Kousik and Ritchie, 1996). El procedimiento adoptado consistió en sumergir hojas sanas de C. sinensis durante 1 min en una suspensión de X. axonopodis ($1x10^4$ u.f.c./mL) conteniendo Silwet L-77 0,04%. Luego, se retiró la hoja de la suspensión y se la mantuvo en posición horizontal durante 3-5 min para permitir la adhesión de la bacteria sobre la superficie foliar. Al cabo de este tiempo, las hojas se colocaron en tubos Falcon estériles de 50 mL, con el pecíolo sumergido en $H_2O$ destilada estéril, se tapó el tubo y se lo selló con Parafilm. Finalmente, los tubos fueron dispuestos en una cámara de crecimiento en las condiciones descriptas en la Sección 2.

Se utilizaron entre 5 y 13 hojas por planta transgénica y un número similar de hojas de una planta sin transformar. En cada ensayo se incluyeron hojas de las plantas que fueron sumergidas en una solución de $MgCl_2$ 10 mM complementada con Silwet L-77 0,04%, como controles del efecto del tratamiento y del estado fisiológico de las mismas. Durante el ensayo, realizaron observaciones periódicas de los síntomas mediante una lupa de mano. Los resultados finales se documentaron con una cámara Cyber Shot DSC-S70 (Sony) acoplada a una lupa estereoscópica Stemi 2000-C (Zeiss). Se realizaron 2 ensayos independientes utilizando el mismo protocolo.

**19. Ensayos de infección in planta con X. axonopodis en plantas de C. sinensis.**

La inoculación se realizó utilizando el método descrito por Yang et al. (2010) con modificaciones menores. Se utilizó como inóculo una suspensión X. axonopodis conteniendo $1x10^5$ u.f.c./mL. Se realizaron 16 heridas con una aguja estéril sobre la cara abaxial de la hoja, en dos zonas adyacentes situadas a ambos lados de la vena central. Cada área de infección estaba conformada por 8 heridas separadas entre sí por 2 mm de distancia. La suspensión bacteriana se pulverizó sobre cada área de infección un total de 3 veces seguidas, a una distancia aproximada de 3 cm de la lámina. Se pulverizó además una hoja de cada planta con una solución de $MgCl_2$ 10 mM como control.

Se realizaron 3 ensayos independientes con las distintas plantas transgénicas y plantas de C. sinensis sin transformar como control, obtenidas a partir de semilla certificada. Los dos primeros ensayos incluyeron entre 9 y 12 hojas completamente expandidas por planta evaluada. El tercer y último ensayo de infección, incluyó 20 hojas completamente expandidas por planta evaluada. En cada experimento se incluyó un número igual de hojas correspondiente a una planta de C. sinensis sin transformar.

Luego de la inoculación, las plantas fueron mantenidas en cámara de crecimiento en las condiciones descriptas en la Sección 2. Las observaciones de los síntomas se realizaron en forma periódica (cada 2-3 d) utilizando una lupa de mano. A medida que avanzaba el desarrollo de los cancros, se fueron tomando fotografías, utilizando para ello una cámara Cyber Shot DSC-S70 (Sony) acoplada a una lupa estereoscópica Stemi 2000-C (Zeiss). Los ensayos se extendieron entre 24 y 40 d según los casos. Se registró el número y momento de aparición de cancros por hoja inoculada, su tamaño, la presencia o ausencia de halo clorótico

característico, y la presencia o ausencia de margen húmedo (water soaking) alrededor de la herida.

La susceptibilidad de las plantas transgénicas y controles, expresada como cantidad de cancros/hoja, se comparó mediante la prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico por rangos), y realizando comparaciones de a pares entre las plantas transgénicas y el control, y entre las distintas plantas transgénicas, mediante el método de comparaciones múltiples de Dunn (dms). La dispersión y la simetría de la variable número de cancros/hoja se analizó mediante un gráfico de cajas y bigotes (o box plot). Para representar los datos en forma gráfica, se establecieron tres categorías, según la frecuencia de formación de cancros (baja: 1-4 cancros; media: 5-8 cancros; alta: 9-16 cancros). Los resultados se expresaron como el porcentaje de hojas en cada una de las tres categorías.

## 20. Métodos estadísticos.

La variable cancros/hoja, utilizada para determinar la susceptibilidad/resistencia de las plantas ensayadas frente a la infección con X. axonopodis, no presentó una distribución normal (ver Anexo Estadístico; página 135). Por lo tanto, para evaluar el efecto del tratamiento aplicado (transgénesis vegetal), se escogió el test de ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. Luego, para evaluar la diferencia entre las plantas, se realizaron comparaciones de a pares mediante el método de contrastes de Dunn.

Para realizar los cálculos del test de Kruskal-Wallis se utilizaron los datos experimentales (número de cancros/hoja) mostrados en las Tablas 5 y 8 de las Secciones 13.1. y 13.2. de Resultados, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Statistica 7.0. Los resultados del mismo se observan en las Tablas 6 y 9 de las mismas Secciones. Una vez que demostrado que al menos un tratamiento difiere del otro en la mediana poblacional (diferencias significativas en el test de Kruskal-Wallis), se realizaron los cálculos para las comparaciones múltiples de Dunn utilizando los datos de las Tablas 6 y 9. Los resultados del análisis se muestran en las Tablas 7 y 10.

# Resultados

## 1. Ensayos de inhibición in vitro del crecimiento bacteriano.

Con anterioridad a este trabajo de Tesis, se demostró el efecto inhibitorio del péptido antimicrobiano dermaseptina y de la enzima bacteriolítica lisozima sobre el crecimiento de dos bacterias fitopatógenas, Erwinia carotovora y Streptomyces scabies (Rivero et al., 2012). Sin embargo, no se habían demostrado sus efectos sobre Xanthomonas spp.

Para llevar a cabo los ensayos de inhibición del crecimiento con dermaseptina, se adquirieron 2 mg de péptido sintético. En el caso de la lisozima, se utilizó la versión comercial HEWL de Sigma (Hen Egg White Lysozyme). Ver secuencias aminoacídicas en Secciones 7.3. y 7.4. de Materiales y Métodos.

### 1.1. Ensayos de inhibición de E. coli con dermaseptina sintética.

Para corroborar la actividad antimicrobiana de dermaseptina sintetizada, se realizaron ensayos preliminares con E. coli, ya que existían reportes previos indicando toxicidad en esta bacteria por parte de versiones similares a la utilizada en esta Tesis (Osusky et al., 2005). Para ello se implementó un ensayo de inhibición in vitro en medio líquido según se describe en la Sección 14.1. de Materiales y Métodos. El porcentaje de supervivencia de E. coli referido al control sin agregado del péptido se determinó utilizando concentraciones de dermaseptina de 50, 65 y 80 µg/mL.

Como se puede observar en la Figura 12, utilizando una concentración del péptido de 50 µg/mL, se obtuvo una inhibición del 60% del crecimiento bacteriano respecto del control. Asimismo, se estableció que la Concentración Inhibitoria Mínima (C.I.M.) del péptido para E. coli es de alrededor de 80 µg/mL.

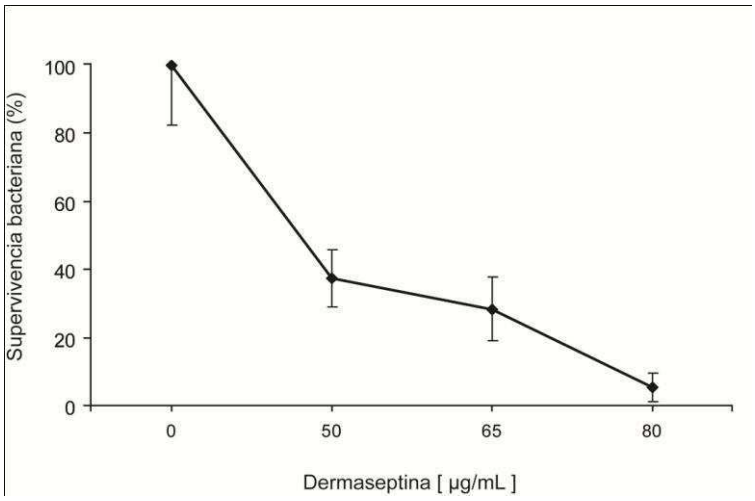



**Figura 12. Efecto de dermaseptina sobre el crecimiento de E. coli.** Se expresa el porcentaje de supervivencia de E. coli (inóculo inicial de $1x10^7$ u.f.c.) luego de 4 h de incubación en medio LB con las concentraciones indicadas de dermaseptina sintética. Los resultados representan los valores de la media ± DE de tres ensayos independientes.

## 1.2. Ensayos de inhibición de Xanthomonas spp. con dermaseptina sintética.

Una vez comprobado el efecto tóxico de dermaseptina frente a E. coli, se realizaron ensayos de inhibición con X. axonopodis y X. campestris. Los ensayos de inhibición del crecimiento se efectuaron siguiendo el mismo protocolo que se empleó para E. coli, pero las concentraciones de dermaseptina utilizadas en este caso fueron de 5, 10, 20 y 35 µg/mL. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13.

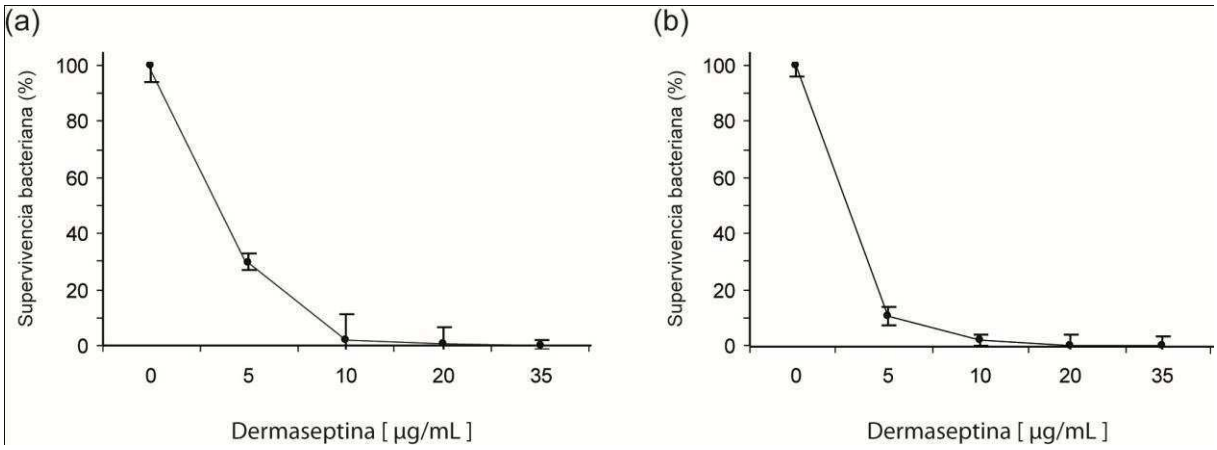



**Figura 13. Efecto de dermaseptina sobre el crecimiento de Xanthomonas spp.** Se expresa el porcentaje de supervivencia de X. axonopodis **(a)** y X. campestris **(b)** luego de 4 h de la incubación en medio PYM (inóculo inicial de $1x10^7$ u.f.c.) con las concentraciones indicadas de dermaseptina sintética. Los resultados representan los valores de la media ± DE de tres ensayos independientes.

Como puede observarse, con ambas especies de Xanthomonas se obtuvo una inhibición del crecimiento con concentraciones del péptido superiores a 5 µg/mL. A su vez, estos resultados permitieron establecer una C.I.M. de 20 µg/mL para X. campestris y de 10 µg/mL para X. axonopodis. El efecto bactericida del péptido sobre Xanthomonas spp. observado en estos ensayos permitió convalidar la elección de dermaseptina como gen de interés para conferir resistencia a estos patógenos.

### 1.3. Ensayos de inhibición de Xanthomonas spp. con lisozima comercial.

Para corroborar la actividad antimicrobiana de lisozima frente a Xanthomonas spp., se realizaron ensayos de inhibición in vitro en medio de cultivo sólido (PYM-A), con células de X. axonopodis y X. campestris. Se utilizaron concentraciones de la enzima comercial de 10, 50, 250 y 500 ng/mL. Se realizaron 3 ensayos independientes según se describe en la Sección 14.2 de Materiales y Métodos, con resultados similares. La Figura 14 muestra fotografías representativas de uno de los ensayos realizados, luego de una incubación a 28ºC durante 48 h.

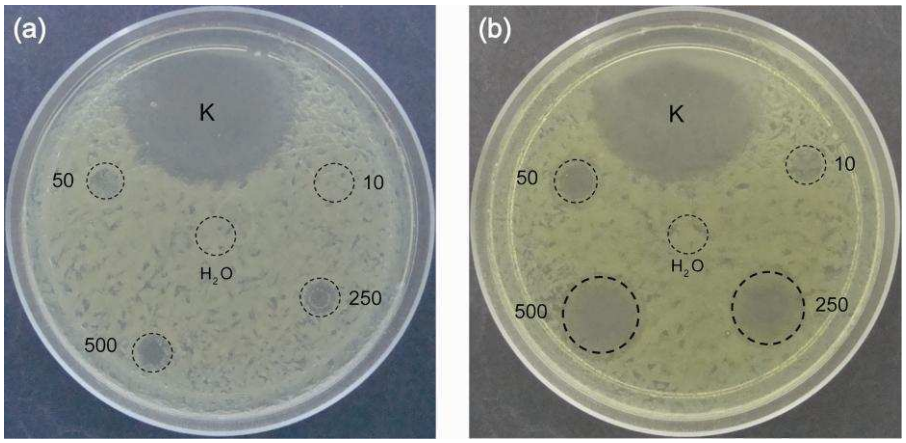



**Figura 14. Efecto de lisozima sobre el crecimiento de Xanthomonas spp.** Se muestran ensayos realizados con X. axonopodis **(a)** y X. campestris **(b)**. En los puntos indicados, se sembraron 15 µL de solución conteniendo 10, 50, 250 y 500 ng/mL de lisozima comercial. Como control positivo, se sembraron 15 µL de una solución de kanamicina de 50 µg/mL (K). Como control negativo, se sembraron 15 µL de $H_2O$ estéril ($H_2O$). La fotografía se tomó luego de una incubación de 48 h a 28ºC. Se muestran fotografías representativas de los resultados obtenidos en uno de 3 ensayos realizados con resultados similares.

Como se puede observar en la Figura 14, tanto el crecimiento de X. axonopodis como el de X. campestris fue inhibido por la presencia de lisozima. Si bien el ensayo utilizado no es cuantificable (el ensayo no permite determinar la C.I.M.), se puede observar que lisozima

inhibe el crecimiento de X. campestris a concentraciones mayores de 10 ng/mL, mientras que el crecimiento de X. axonopodis comienza a inhibirse a concentraciones de alrededor de 50 ng/mL. A su vez, se puede observar que a todas las concentraciones de lisozima utilizadas, los halos de inhibición producidos sobre X. campestris son de mayor tamaño que los producidos sobre X. axonopodis, lo que implicaría una mayor susceptibilidad de la primera al efecto de la enzima. El efecto bactericida de la enzima observado sobre Xanthomonas spp. en estos ensayos permitió convalidar la elección de lisozima como gen de interés para conseguir resistencia a estos patógenos.

## 2. Desarrollo de construcciones genéticas para expresar dermaseptina y lisozima.

El vector binario seleccionado para la obtención de plantas transgénicas vía A. tumefaciens fue el pBIN19sgfp (Chiu et al., 1996), debido a su amplia utilización en la transformación genética de cítricos. Este vector tiene 13.500 pares de bases y un solo sitio de clonado para la enzima Hind III (Figura 15). El sitio de clonado está dispuesto entre el gen marcador de selección para kanamicina (nptII) y el gen reportero sgfp, que codifica a la proteína fluorescente verde (GFP).

**Figura 15. Esquema del vector binario pBIN19sgfp (Chiu et al., 1996).** Este vector fue el utilizado para clonar los cassettes de expresión que portan las secuencias de dermaseptina y de lisozima. El esquema muestra el gen marcador de selección (nptII), el gen marcador de selección vidual (sgfp) y el sitio único de clonado (Hind III), flanqueados por los bordes derecho (BD) y borde izquierdo (BI). Tnos: secuencia terminadora de la transcripción del gen de nopalina sintasa. Pnos: promotor de nopalina sintasa; 35S: promotor del transcripto de 35S del CaMV. El esquema no está a escala.

El sistema de expresión está diseñado para seleccionar visualmente los brotes transgénicos por medio de la fluorescencia de GFP, permitiendo la fácil visualización de los brotes transgénicos bajo lupa y, a su vez, descartar posibles quimeras. Además, debido a la disposición del gen sgfp respecto a los bordes derecho e izquierdo del vector binario, la inserción de la secuencia codificante de GFP en el genoma de la célula vegetal, señala con alta probabilidad la integración del gen de interés y del gen de selección nptII.

En base al vector binario pBIN19sgfp, se realizaron dos construcciones genéticas que se utilizaron para la transformación de plantas de C. sinensis y N. benthamiana en las etapas

posteriores de este trabajo de Tesis. Uno de las construcciones obtenidas fue pBIN19sgfp-Der (Figura 17), la cual porta el cassette de expresión para dermaseptina. El mismo se obtuvo mediante la digestión parcial del vector pDe (Rivero et al., 2012) con la enzima Hind III y su posterior purificación a partir del gel de agarosa en que se realizó la electroforesis. Una vez purificado, el cassette de expresión para dermseptina se ligó al vector pBIN19sgfp, previamente linealizado con Hind III, y desfosforilado para evitar el autoligamiento. La Figura 16 muestra un esquema de los pasos seguidos para obtener la construcción pBIN19sgfp-Der.

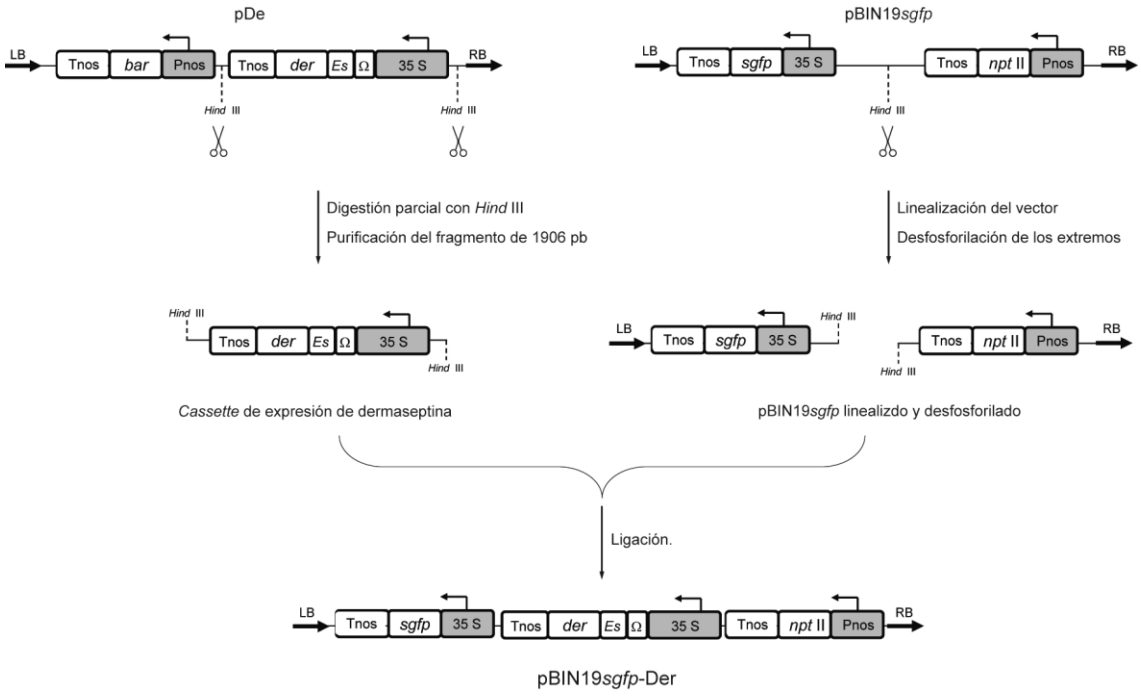



**Figura 16. Esquema seguido para la obtención de la construcción pBIN19sgfp-Der.** El cassette de expresión de dermaseptina fue clonado en el vector binario pBIN19sgfp a partir del vector pDe (Rivero et al., 2012). La construcción pBIN19sgfp-Der fue utilizada en la transformación de plantas de C. sinensis y N. benthamiana. Los esquemas de las construcciones no están a escala.

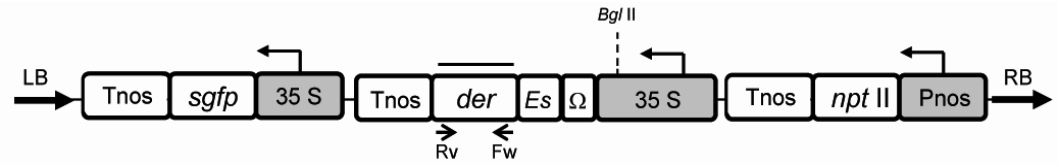



**Figura 17. Esquema de la construcción genética pBIN19sgfp-Der.** 35S: promotor del transcripto de 35S del CaMV; Pnos: promotor de nopalina sintasa; Tnos: terminador de la transcripción de nopalina sintasa; Ω: potenciador de la traducción del TMV; Es: péptido señal de exportación a apoplasto de esporamina; der: secuencia codificante de dermaseptina de P. sauvagii; nptII: secuencia codificante de neomicina fosfotransferasa; sgfp: secuencia codificante de la proteína de fluorescencia verde; BD y BI: bordes derecho e

izquierdo, respectivamente. Las flechas indican los sitios de hibridación del oligonucleótidos iniciadores sentido (Fw) y reverso (Rv) utilizados para amplificar la secuencia de dermaseptina. La barra superior indica la posición de la sonda de ADN utilizado en el análisis de Southern blot. El esquema no está a escala.

La segunda construcción genética obtenida a partir del vector pBIN19sgfp, fue pBIN19sgfp-Liz, la cual porta el cassette de expresión de lisozima. El mismo, se escindió del vector pLy (Rivero et al., 2012) por digestión con las enzimas de restricción Kpn I y Xho I. Luego, se lo subclonó en el vector comercial pZErO-2, previamente tratado con las enzimas Kpn I y Sal I, aprovechando la compatibilidad entre los sitios de las enzimas Xho I y Sal I, dando lugar a la construcción genética intermediaria pZErO-2-Liz (Figura 18). De esta manera, el cassette de expresión de lisozima quedó flanqueado por sitios Hind III. A continuación, se efectuó una digestión con Hind III para escindir de pZErO-2-Liz el fragmento de interés (1.513 pb) y se lo ligó al vector pBIN19sgfp previamente digerido con la misma enzima y desfosforilado para evitar su autoligamiento, generando así la construcción pBIN19sgfp-Liz (Figura 19).

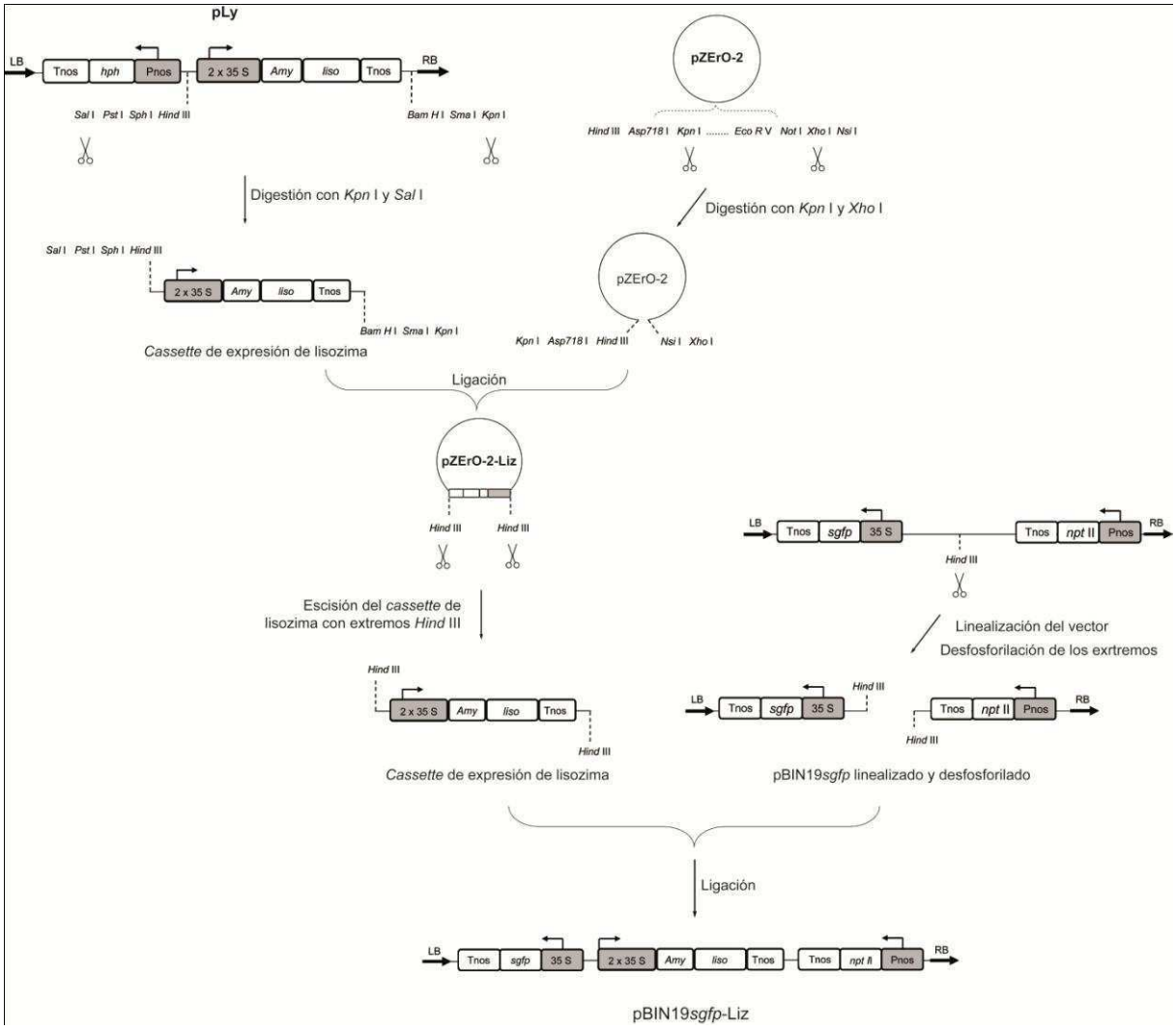



**Figura 18. Esquema seguido para la obtención de la construcción pBIN19sgfp-Liz.** El cassette de expresión de lisozima fue clonado en el vector binario pBIN19sgfp a partir del vector pLy (Rivero et al., 2012). Los esquemas de las construcciones no están a escala.

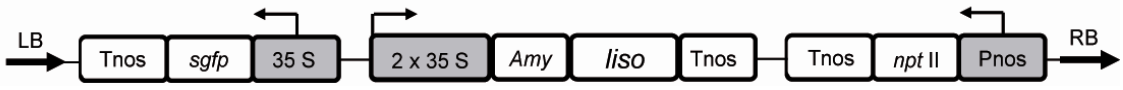



**Figura 19. Esquema de la construcción genética pBIN19sgfp-Liz.** 2x35S: promotor doble del transcripto de 35S del CaMV; Pnos: promotor de nopalina sintasa; Tnos: terminador de la transcripción de nopalina sintasa; Amy: secuencia del péptido señal de α-amilasa de cebada; liso: secuencia codificante de lisozima (HEWL); nptII: secuencia codificante de neomicina fosfotransferasa; sgfp: secuencia codificante para la proteína de fluorescencia verde; BD y BI: bordes derecho e izquierdo, respectivamente. El esquema no está a escala.

Las construcciones pBIN19sgfp-Der y pBIN19sgfp-Liz fueron secuenciadas para confirmar el correcto ensamblaje de los fragmentos y la presencia de los marcos abiertos de lectura correspondientes a los distintos genes.

## 3. Ensayos de funcionalidad de los transgenes.

### 3.1. Análisis de la funcionalidad del transgen sgfp.

Una vez confirmadas las secuencias de las construcciones pBIN19sgfp-Der y pBIN19sgfp-Liz, se realizaron agroinfiltraciones de hojas de N. benthamiana con la finalidad de verificar la funcionalidad del transgen reportero sgfp. Se utilizó la cepa GV3101 de A. tumefaciens transformada con las construcciones pBin19sgfp-Der, pBin19sgfp-Liz, y el vector pBIN19sgfp como control (Sección 15. de Materiales y Métodos). A las 48-72 h post-infiltración, se obtuvieron muestras de epidermis de hojas y se realizaron observaciones al microscopio de epifluorescencia. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20.

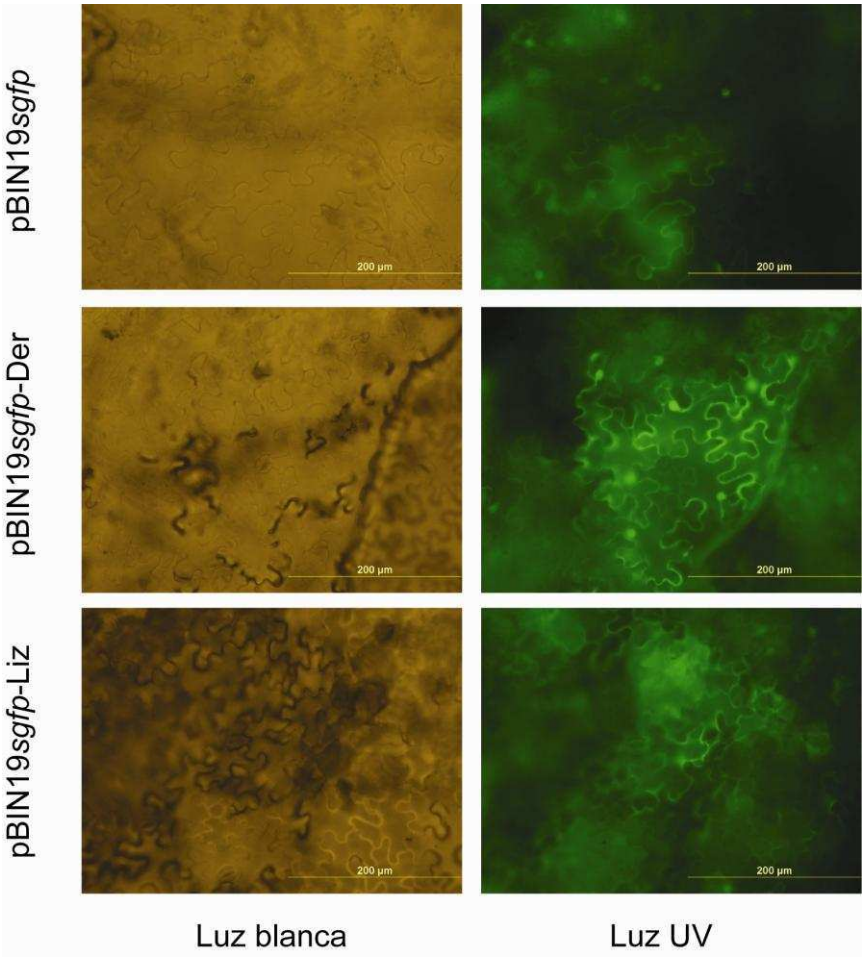



**Figura 20. Ensayo de funcionalidad del transgen sgfp.** Fotografías de la epidermis de una hoja de N. benthamiana agroinfiltrada con el vector vacío pBIN19sgfp (fila superior), pBIN19sgfp-Der (fila del medio) y pBIN19sgfp-Liz (fila inferior). A la izquierda y a la derecha del panel se observan exposiciones con luz blanca y UV, respectivamente. Como control negativo de estos ensayos se agroinfiltraron en paralelo hojas de N. benthamiana con agrobacterias sin transformar. Estas hojas no mostraron fluorescencia bajo la luz UV (resultados no mostrados).

## 3.2. Análisis de la funcionalidad del transgen dermaseptina.

Para comprobar si la expresión transitoria de dermaseptina tenía efecto sobre X. axonopodis, se decidió realizar un ensayo de co-infiltración con ésta y A. tumefaciens. Para ello, en primer lugar se infiltró únicamente Xanthomonas para visualizar la sintomatología generada en hojas de N. benthamiana (Sección 16. de Materiales y Métodos). Los síntomas producidos se observan en la Figura 21.

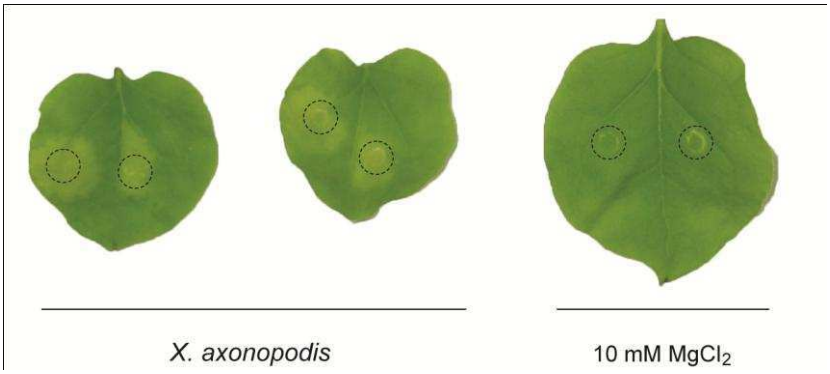



**Figura 21. Ensayo de infiltración de hojas de N. benthamiana con X. axonopodis.** A la izquierda de la Figura se muestran dos hojas infiltradas con Xanthomonas. Las zonas de infiltración están indicadas con círculos a trazos. Alrededor de éstos, se observa una zona clorótica fácilmente reconocible. A la derecha de la figura se muestra una hoja control infiltrada con una solución 10 mM de $MgCl_2$ (solución utilizada para resuspender las bacterias). La fotografía fue tomada a los 5 d.p.i. Las fotografías de las hojas son representativas de 3 ensayos de infiltración independientes. La concentración de inóculo utilizada fue de $1x10^5$ u.f.c./mL.

Estos ensayos permitieron confirmar que al infiltrar X. axonopodis en hojas de N. benthamiana se produce un síntoma conspicuo (clorosis), fácilmente reconocible, lo que indicaría que la bacteria prolifera sin inconvenientes dentro de la hoja. Luego, con el fin de analizar el efecto de la expresión transitoria de dermaseptina sobre la sintomatología producida por Xanthomonas, se realizaron ensayos de co-infiltración junto con A. tumefaciens. Para ello, se co-infiltraron células de X. axonopodis y de A. tumefaciens transformadas con la construcción pBIN19sgfp-Der en hojas de N. benthamiana según lo descripto en la Sección 17. de Materiales y Métodos. Como control, se co-infiltraron hojas con X. axonopodis y de A. tumefaciens transformadas con la construcción pBIN19sgfp. Los resultados de los ensayos se observan en la Figura 22.

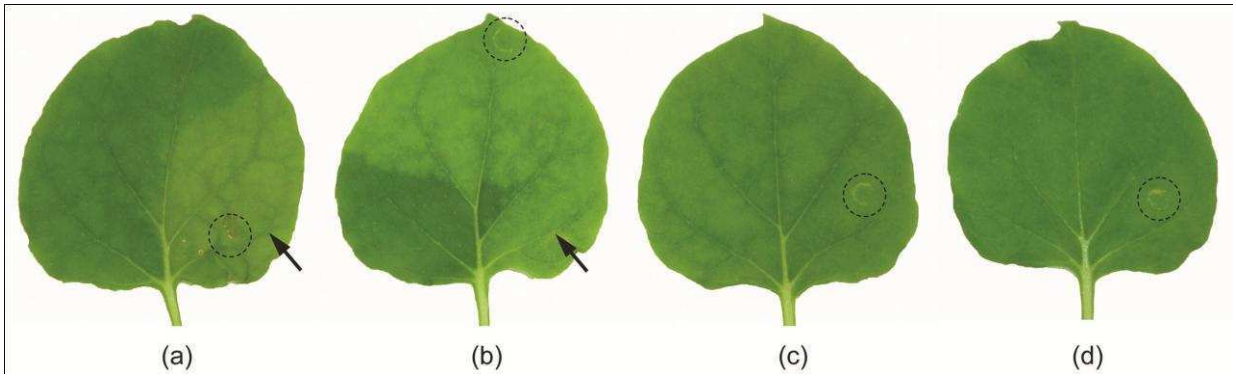



**Figura 22. Ensayos de co-infiltración de hojas de N. benthamiana con X. axonopodis y A. tumefaciens.** Las flechas muestran síntomas característicos producido por X. axonopodis al ser infiltrada en hojas de N. benthamiana. El círculo punteado indica la zona de infiltración. **(a)** Hoja infiltrada con X. axonopodis. Se observan los síntomas de clorosis característicos originados por la bacteria (flecha negra). **(b)** Hoja co-infiltrada con X. axonopodis y A. tumefaciens portando el vector binario pBIN19sgfp (control). Se observan síntomas similares que en **(a)**. **(c)** Hoja co-infiltrada con X. axonopodis y A. tumefaciens portando la construcción pBIN19sgfp-Der. Se observa la disminución de los síntomas característicos producidos por Xanthomonas. **(d)** Hoja infiltrada con el buffer utilizado para resuspender ambas bacterias. No se observan síntomas de la infección. Los ensayos de co-infiltración se realizaron 3 veces, utilizando 5 plantas de N. benthamiana en cada ensayo. La concentración de X. axonopodis utilizada fue de $1x10^5$ u.f.c./mL y de A. tumefaciens $5x10^6$ u.f.c./mL. Se muestran resultados representativos de los obtenidos en 3 ensayos independientes. Las fotografías fueron obtenidas a los 5 días post-infiltración.

Como se puede observar en la Figura 22, la clorosis característica producida por X. axonopodis en N. benthamiana resultó fuertemente atenuada en las hojas co-infiltradas con A. tumefaciens portando la construcción pBIN19sgfp-Der. En cambio, la co-infiltración de X. axonopodis con A. tumefaciens portando el vector vacío pBIN19sgfp, utilizado como control negativo, no mostró diferencias respecto de la infiltración individual con X. axonopodis. Aunque la acumulación de dermaseptina en los extractos de hojas infiltradas no pudo ser determinada directamente, los ensayos de co-infiltración con pBIN19sgfp-Der proveyeron una evidencia indirecta sobre su la funcionalidad de dicha construcción en el tejido vegetal.

## 4. Transformación de N. benthamiana con las construcciones pBIN19sgfp-Der y pBIN19sgfp-Liz.

El principal patosistema utilizado en este trabajo de Tesis, fue el integrado por C. sinensis y X. axonopodis. Sin embargo, debido a las dificultades propias de la transformación de plantas leñosas, a que la transformación vegetal mediante A. tumefaciens posee baja eficiencia, sumado a que el crecimiento de las plantas de naranjo es lento y requiere varias etapas de multiplicación in vitro y en porta-injertos hasta disponer de plantas adultas adecuadas para los ensayos de infección, se decidió transformar plantas de N. benthamiana con las dos construcciones genéticas obtenidas, con el fin de desarrollar ensayos preliminares

mientras las plantas transgénicas de naranjo crecían hasta un estadío apropiado para ser desafiadas.

La elección de N. benthamiana se basó en reportes previos en que se utilizó a esta especie en estudios de patogenicidad de X. campestris pv. campestris cepa 8004 (Metz et al., 2005; Yun et al., 2006). Si bien N. benthamiana no es un hospedante natural de X. campestris, muestra síntomas claros en respuesta a la infección por esta bacteria, lo que posibilita la realización de estudios de interacción reproducibles. Además, N. benthamiana presenta otras ventajas para su uso en el laboratorio, tales como un ciclo de vida corto, menor tamaño y alta eficiencia de transformación. Asimismo, permitiría realizar cruzamientos entre líneas transgénicas y estudiar los efectos del apilamiento de transgenes con vistas al diseño de estrategias futuras. Se asumió que los resultados de los ensayos conducidos con X. campestris en N. benthamiana podrían ser extrapolados a las infecciones posteriores en cítricos con X. axonopodis.

La transformación de plantas de N. benthamiana con las construcciones pBIN19sgfp-Der y pBIN19sgfp-Liz se efectuó a partir de explantos de hoja utilizando un protocolo basado en A. tumefaciens (ver Sección 8.1. de Materiales y Métodos). Luego de varias rondas de repique en medio conteniendo kanamicina, se obtuvieron plantas que enraizaron consistentemente en el medio selectivo. Los controles correspondientes a explantos no transformados, no prosperaron en estas condiciones (Figura 23).

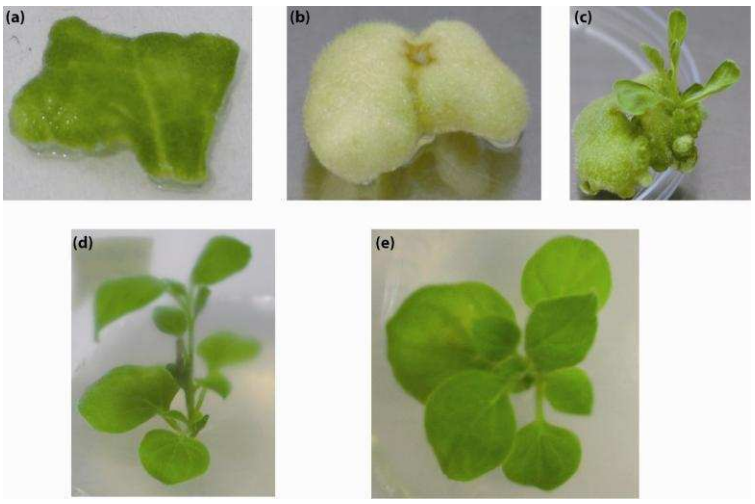



**Figura 23. Regeneración de plantas de N. benthamiana transformadas genéticamente. (a)** Explanto correspondiente al control de regeneración a las 2 semanas de crecimiento en medio MS. **(b)** Explanto correspondiente control de selección, luego de 2 semanas en medio conteniendo kanamicina. **(c)** Brote

transgénico regenerando sobre el explanto foliar. **(d)** Plántula aislada a partir de un brote regenerante. **(e)** Vista superior de la plántula documentada en **(d)**.

Con el fin de efectuar una caracterización preliminar de las plántulas enraizadas en medio selectivo, se extrajo ADN de hojas para realizar el ensayo de amplificación mediante la técnica de PCR. La reacción se efectuó utilizando oligonucleótidos específicos para las secuencias de dermaseptina y lisozima (Sección 8.1.1. de Materiales y Métodos). En ambos ensayos, se incorporaron reacciones utilizando como moldes las construcciones pBIN19sgfp-Der y pBIN19sgfp-Liz como controles positivos y ADN total de una planta no transformada como control negativo. En todas las plantas evaluadas se obtuvieron fragmentos de ADN del tamaño esperado para cada construcción genética. (Figura 24).

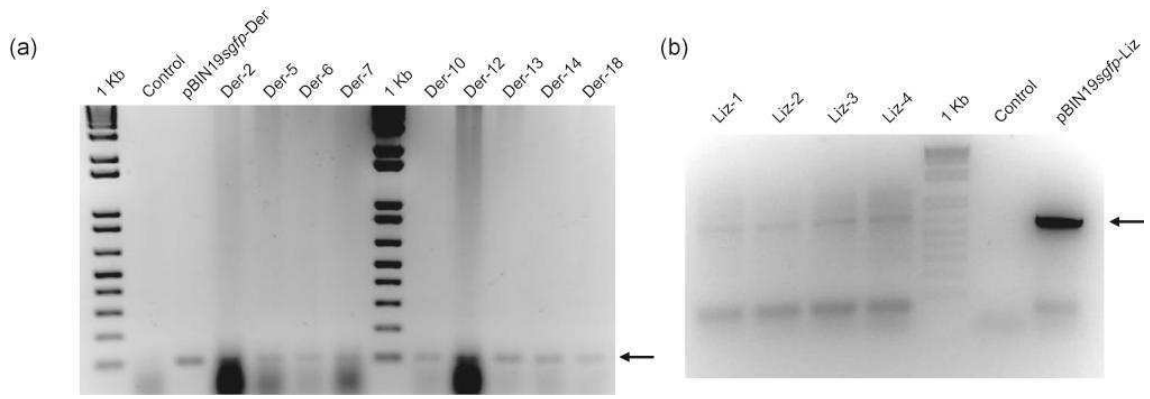



**Figura 24. Análisis por PCR de plantas transformadas de N. benthamiana. (a)** Amplificación de la secuencia de dermaseptina (104 pb) en extractos de hoja de N. benthamiana. 1 Kb: marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen); Control: ADN de N. benthamiana no transformada; pBin19sgfp-Der: control positivo. Der-2, -5, -6, -7. -10, -12, -13, -14 y Der-18: plantas transformadas con pBin19sgfp-Der. **(b)** Amplificación de la secuencia de lisozima (682 pb) en extractos de hoja de N. benthamiana. 1 Kb: marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen); Control: ADN de N. benthamiana no transformada; pBin19sgfp-Liz: control positivo. Liz-1, -2, -3 y Liz-4: plantas transformadas con pBin19sgfp-Liz.

Los ensayos mostrados en la Figura 24 confirmaron la presencia de las secuencias de dermaseptina y lisozima en 9 y 4 plantas seleccionadas en medio de cultivo suplementado con kanamicina, respectivamente. Las plantas positivas para el ensayo de PCR fueron cultivadas en medio selectivo hasta alcanzar un tamaño adecuado y fueron luego cultivadas en macetas para la obtención de semillas.

## 5. Segregación de la descendencia de plantas de N. benthamiana transformadas genéticamente.

Si bien la segregación de los transgenes se infirió indirectamente en base al fenotipo del gen de selección (nptII), se consideró que cada vez que se insertó el gen selector, también lo fue el gen antimicrobiano. Por lo tanto, se asumió que la proporción de semillas que germinan y enraízan en medio selectivo, será igual a la proporción de semillas que portan el transgen de interés.

El análisis de la segregación se efectuó con el fin de seleccionar las plantas cuya generación F2 se comporte como homocigota. Para ello se contabilizó el número de semillas germinadas y el número de plántulas que enraizaron en selección, tanto para la generación F1 como para la generación F2, según se describe en la Sección 8.1.3. de Materiales y Métodos. Las plantas que exhibieron una relación 3:1 (plantas que desarrollan normalmente en selección: plantas que no proliferan en selección) en la generación F1 y una relación 4:0 en la generación F2, fueron las que se rusticaron para observación del fenotipo, obtención de nuevas semillas y para su posterior caracterización molecular (Figura 25 y Tabla 3).

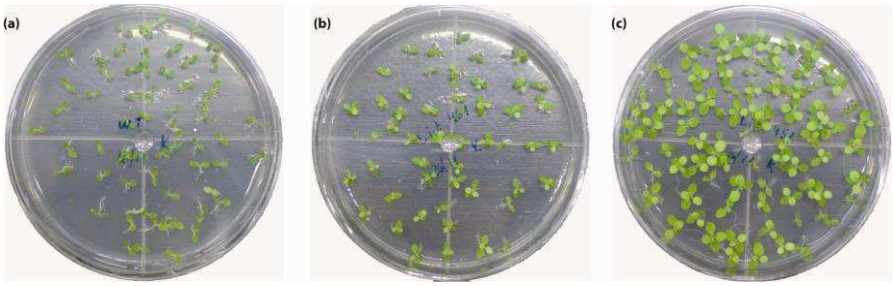



**Figura 25. Análisis de segregación del gen nptII.** Se muestran fotografías representativas de tres placas de Petri correspondientes a un ensayo de germinación en medio MS suplementado con kanamicina. Se observan las semillas germinadas de la generación F2 de plántulas sin transformar, las cuales no alcanzaron a desarrollar cotiledones por acción de la kanamicina **(a)**, plántulas de la línea transgénica Liz-4.6.1 **(b)** y plántulas de la línea transgénica Liz-4.5.1 **(c)**.

A partir del análisis de la segregación de los transgenes de las distintas líneas de N. benthamiana, la capacidad de enraizamiento de la generación F2 en medio selectivo, el fenotipo de la planta rusticada y la caracterización molecular de individuos de la generación F2 (ver más abajo), se seleccionaron aquellas líneas que se utilizaron en los ensayos de infección posteriores con Xanthomonas spp. La Tabla 3 resume las características de las distintas líneas obtenidas.

***N. benthamiana* - Dermaseptina**

| Generación | Línea | PCR | RT-PCR | # semillas germinadas | # plántulas con hojas | % plántulas resistentes | Relación Resistentes:Sensibles | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **F0** | **2** | + | nd | nd | nd | nd | nd | |
| F1 | 2.1 | + | nd | 84 | 62 | 73,81 | 3:1 | |
| F2 | 2.1.1 | nd | - | 112 | 112 | 100,00 | 4:0 | s |
| **F0** | **5** | + | nd | nd | nd | nd | nd | |
| F1 | 5.1 | + | nd | 91 | 71 | 78,02 | 3:1 | |
| F2 | 5.1.1 | nd | + | 129 | 129 | 100,00 | 4:0 | x |
| **F0** | **6** | + | nd | nd | nd | nd | nd | |
| F1 | 6.1 | + | nd | 116 | 91 | 78,45 | 3:1 | |
| F2 | 6.1.1 | nd | nd | 179 | 175 | 97,77 | 4:0 | |
| | 6.1.2 | nd | + | 124 | 124 | 100,00 | 4:0 | x |
| **F0** | **13** | + | + | nd | nd | nd | nd | |
| F1 | 13.1 | + | nd | 77 | 58 | 75,32 | 3:1 | |
| F2 | 13.1.1 | nd | + | 189 | 189 | 100,00 | 4:0 | x |
| **F0** | **14** | + | nd | nd | nd | nd | nd | |
| F1 | 14.1 | + | nd | 112 | 89 | 79,46 | 3:1 | |
| F2 | 14.1.1 | nd | + | 195 | 195 | 100,00 | 4:0 | x |
| F0 | 18 | + | nd | nd | nd | nd | nd | |
| F1 | 18.1 | + | nd | 79 | 60 | 75,95 | 3:1 | |
| F2 | 18.1.1 | nd | nd | 181 | 179 | 98,90 | 4:0 | |
| | 18.1.2 | nd | + | 139 | 139 | 100,00 | 4:0 | x |

***N. benthamiana* - Lisozima**

| Generación | Línea | PCR | RT-PCR | # semillas germinadas | # plántulas con hojas | % plántulas resistentes | Relación Resistentes:Sensibles | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **F0** | **1** | + | nd | nd | nd | nd | nd | |
| F1 | 1.1 | + | nd | 197 | 140 | 71,07 | 3:1 | |
| F2 | 1.1.2 | nd | + | 54 | 54 | 100,00 | 4:0 | x |
| | 1.1.3 | nd | - | 51 | 51 | 100,00 | 4:0 | s |
| **F0** | **2** | + | nd | nd | nd | nd | nd | |
| F1 | 2.3 | + | nd | 230 | 178 | 77,39 | 3:1 | |
| F2 | 2.3.1 | nd | + | 147 | 147 | 100,00 | 4:0 | x |
| | 2.3.2 | nd | nd | 53 | 0 | 0,00 | 0 | |
| | 2.3.3 | nd | nd | 162 | 162 | 100,00 | 4:0 | |
| **F0** | **3** | + | nd | nd | nd | nd | nd | (*) |
| **F0** | **4** | + | nd | nd | nd | nd | nd | |
| F1 | 4.5 | + | nd | 146 | 114 | 78,08 | 3:1 | |
| | 4.6 | + | nd | 114 | 81 | 71,05 | 3:1 | |
| | 4.8 | + | nd | 95 | 75 | 78,95 | 3:1 | |
| F2 | 4.5.1 | nd | + | 170 | 156 | 91,76 | 3:1 | x |
| | 4.6.1 | nd | + | 204 | 189 | 92,65 | 3:1 | x |
| | 4.8.1 | nd | + | 215 | 215 | 100,00 | 4:0 | x |

x Plantas utilizadas en ensayos biológicos.
s Plantas que no expresan el transcripto correspondiente a dermaseptina una vez que se pasaron a tierra.
(*) Planta que desarrolla flores pero no produce semillas.
\+ Resultado positivo.
\- Resultado negativo.
nd No determinado.
*Las plantas Der-7, -10, -11, -12 no fueron caracterizadas molecularmente ni se realizó el análisis de la la segregación del transgen.*

**Tabla 3. Selección de las plantas de N. benthamiana transformadas genéticamente (generación F2) para los ensayos de infección posteriores.** La Tabla resume los criterios considerados para de la selección de las

plantas transformadas con la secuencia de dermaseptina y de lisozima. Todas las líneas seleccionadas (x) mostraron un fenotipo normal en tierra.

## 6. Caracterización molecular y selección de las plantas de N. benthamiana transformadas genéticamente (generación F2).

Utilizando plantas transformadas y rusticadas de la generación F2, se confirmó la expresión de transcriptos correspondientes dermaseptina y lisozima mediante la técnica de RT-PCR (Figuras 26 y 27).

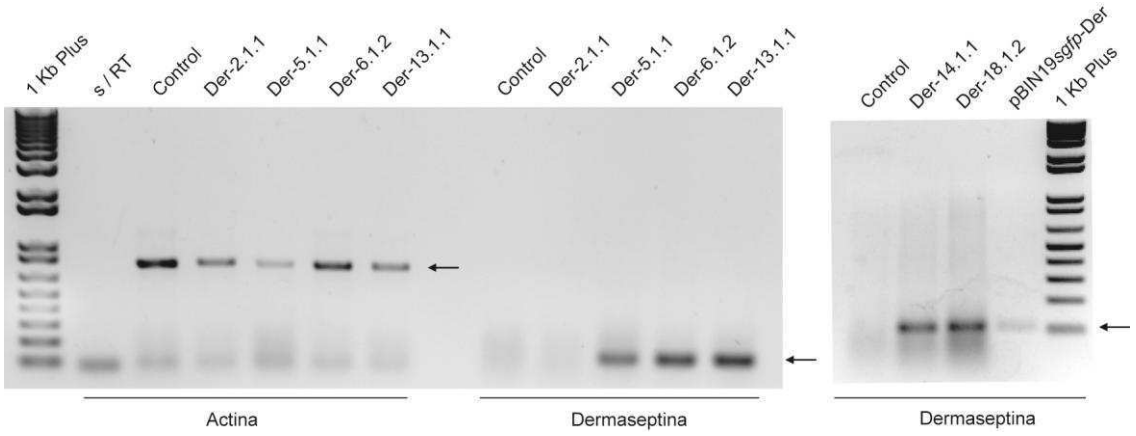



**Figura 26. RT-PCR de plantas de la generación F2 de N. benthamiana transformadas con la construcción pBIN19sgfp-Der.** Fotografía de geles de agarosa 1,5% teñidos con bromuro de etidio. Se señalan los fragmentos de ADN de 104 y de 750 pb correspondientes a dermaseptina y a actina, respectivamente. s/RT: control de contaminación de ADN sin agregado de transcriptasa reversa. Control: N. benthamiana no transformada. Der-2.1.1, -5.1.1, -6.1.2, -13.1.1, -14.1.1 y -18.1.2: plantas de N. benthamiana transformadas genéticamente (F2) con la construcción pBIN19sgfp-Der. 1kb Plus: marcador de peso molecular de Invirogen.

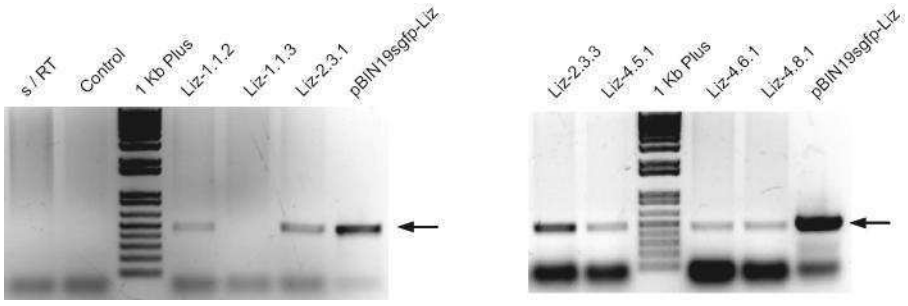



**Figura 27. RT-PCR de plantas de la generación F2 de N. benthamiana transformadas con la construcción pBIN19sgfp-Liz.** Fotografía del geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio. Se señala el fragmento de ADN de 482 pb correspondiente a lisozima. s/RT: control de contaminación de ADN sin agregado de transcriptasa reversa. Control: N. benthamiana no transformada. Liz-1.1.2, -1.1.3, -2.3.1, -4.5.1, -4.6.1 y -4.1.8: plantas de N. benthamiana transformadas genéticamente (F2) con la construcción pBIN19sgfp-Liz. El transgen de lisozima de la planta Liz-1.1.3 se silenció luego de la rusticación.

Las plantas de N. benthamaiana transformadas con la construcción pBIN19sgfp-Der que resultaron positivas en los ensayos de RT-PCR (Tabla 3), fueron utilizadas para preparar extractos proteicos totales a partir de hoja sobre los cuales se realizaron ensayos de dot-blot con el fin de detectar la presencia de dermaseptina (Sección 13.3.2. de Materiales y Métodos). Para ello, se utilizó un anticuerpo anti-dermaseptina obtenido a partir de péptido sintético conjugado al carrier KLH. En ninguno de los ensayos realizados se logró detectar al péptido antimicrobiano en los extractos de las plantas transformadas. Sin embargo, el antisuero utilizado pudo detectar diluciones de dermaseptina sintética de hasta 1 ng.

Por otro lado, utilizando las plantas de N. benthamaiana transformadas con la construcción pBIN19sgfp-Liz que resultaron positivas en los ensayos de RT-PCR, se obtuvieron extractos proteicos totales a partir de hoja con los que se realizaron ensayos de Western blot con el fin de detectar la enzima (Sección 13.2. de Materiales y Métodos). Para ello, se utilizó un anticuerpo anti-lisozima comercial. Luego de varios intentos, se descartó la utilización de este anticuerpo comercial por el elevado nivel de background observado en los extractos de las plantas no transformadas y por su baja afinidad a la lisozima comercial. Los ensayos se repitieron con un anticuerpo anti-lisozima obtenido en el Instituto Leloir por el Lic. Rodrigo Pagano. Como puede observarse en la Figura 26, los ensayos de Western blot con este anticuerpo revelaron una proteína del tamaño esperado para lisozima (14,7 kDa) en todas las muestras de plantas analizadas.

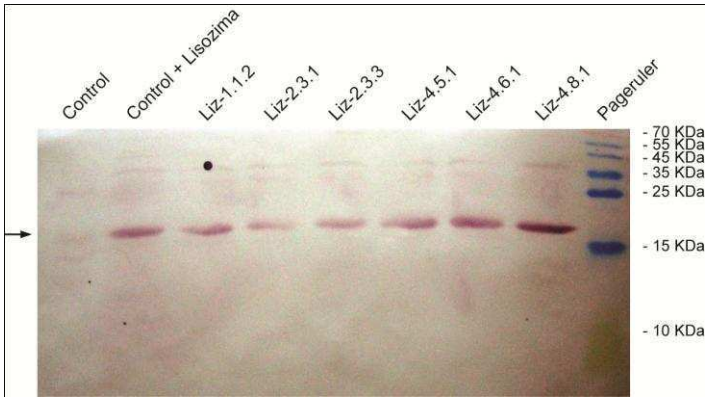



**Figura 28. Western blot de plantas de la generación F2 de N. benthamiana transformadas con la construcción pBIN19sgfp-Liz.** Se utilizaron extractos de plantas de la generación F2 que resultaron positivas en el ensayo de RT-PCR. Control: Extracto de planta no transformada (control negativo). Control+Lisozima: extracto de planta no transformada con el agregado de lisozima comercial (control positivo). Liz-1.1.2, -1.1.3, -2.3.1, -4.5.1, -4.6.1 y -4.1.8: plantas de N. benthamiana transformadas genéticamente (F2) con la construcción pBIN19sgfp-Liz. Los ensayos se revelaron utilizado el sistema de fosfatasa alcalina. El antisuero anti-lisozima fue producido en conejos en el bioterio del Instituto Fundación Leloir.

## 7. Transformación de C. sinensis con la construcción pBIN19sgfp-Der.

La transformación genética de C. sinensis se efectuó empleando un protocolo basado en A. tumefaciens (Sección 8.2. de Materiales y Métodos) utilizando la construcción pBIN19sgfp-Der[7], la que codifica una versión de dermaseptina de secuencia aminoacídica idéntica (Sección 7.1. de Materiales y Métodos) a la utilizada en los ensayos de inhibición in vitro (Sección 1.1.). Luego de la selección en medio de cultivo suplementado con kanamicina, se confirmó la expresión de la proteína GFP mediante exposición a luz U.V. y observación bajo lupa de los brotes regenerantes (Figuras 29 y 30). La expresión del transgen reportero permitió descartar algunos brotes quimera. Los controles de selección correspondientes a explantos no transformados, no regeneraron en medio selectivo.

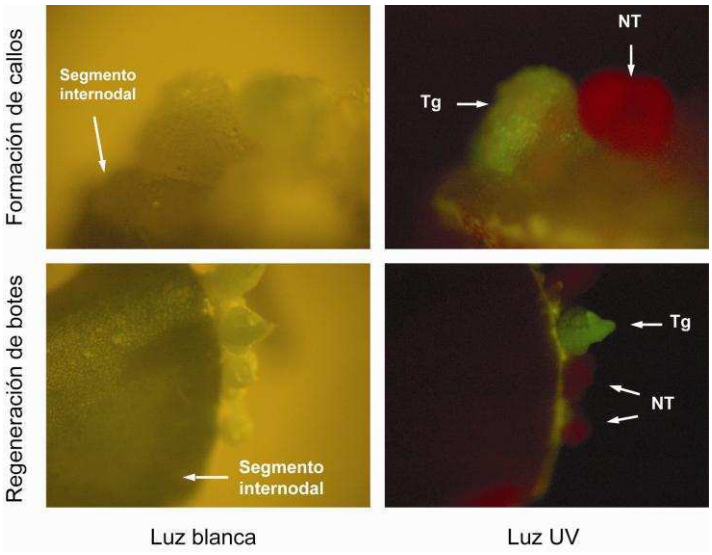



**Figura 29. Regeneración y selección visual de brotes C. sinensis transformados genéticamente.** Primeros estadíos en la regeneración de brotes transformados (Tg) y no transformados (NT) desarrollados sobre un segmento internodal utilizado como explanto para la transformación de C. sinensis. A la izquierda, se observan los brotes con exposición a luz blanca; a la derecha se observa la misma fotografía con exposición a la luz UV. La fluorescencia verde se debe a la excitación característica de la proteína GFP cuando se la ilumina con luz UV (pico de emisión a 509 nm). Las células no transformadas genéticamente se ven de color rojo como consecuencia de la excitación de la clorofila por la luz UV (pico de emisión de 690 y 740 nm).

[7] Por cuestiones de tiempo y presupuesto, las plantas de C. sinensis no fueron transformadas con la construcción pBIN19sgfp-Liz.

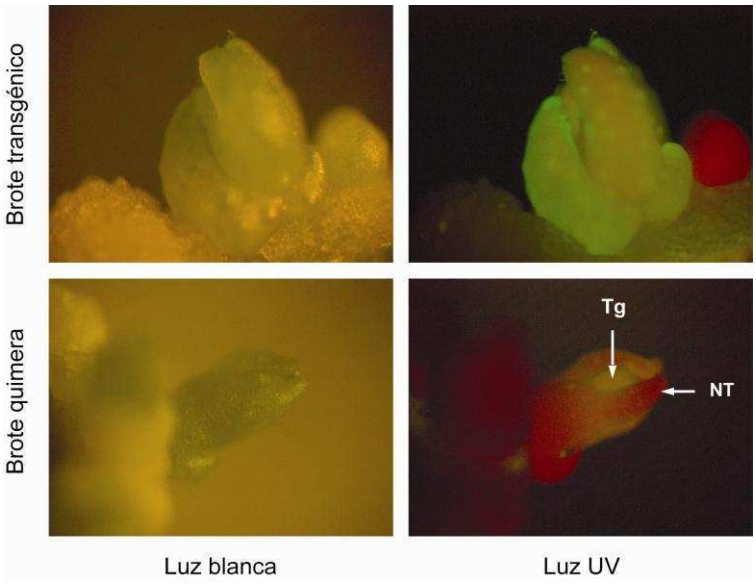



**Figura 30. Selección visual de un brotes de C. sinensis transformados genéticamente.** Fotografías representativas de un brote de C. sinensis transformado que expresa el gen reportero sgfp (línea Der-1; fila superior). En la fila inferior se observa un brote quimérico que fue descartado. A la izquierda se observan los brotes con exposición a luz blanca; a la derecha se observa la misma fotografía con exposición a la luz UV. Las células modificadas genéticamente (Tg) del brote quimera se ven verdes por la expresión de GFP (pico de emisión a 509 nm), mientras que las células no transformadas (NT) se ven rojas debido a la excitación de la clorofila frente la luz UV (pico de emisión de 690 y 740 nm).

Luego de la regeneración en medio conteniendo antibiótico y de la selección visual, los brotes que resultaron positivos en ambos casos se injertaron in vitro sobre un pie etiolado de Citrange Troyer (ver Sección 10.1. de Materiales y Métodos). Una vez que desarrollaron las primeras hojas, se exploró la presencia de los transgenes que expresaban dermaseptina y GFP mediante la técnica de PCR (Figura 31) utilizando para ello ADN genómico extraído de plántulas transformados genéticamente. De esta forma, se caracterizaron 7 plantas candidatas que fueron denominadas Der-1, -2, -3, -4, -5, -6 y -7. La Figura 32 muestra a 6 de estas plantas desarrollándose en el invernáculo.

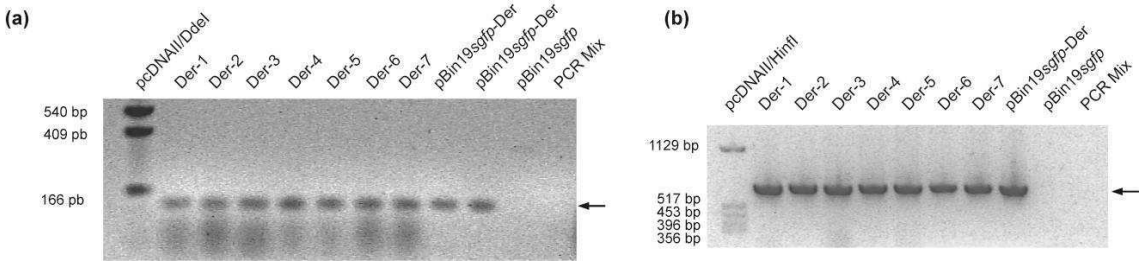



**Figura 31. Análisis de PCR de plantas de C. sinensis seleccionadas e injertadas.** Las plantas de C. sinensis incluidas en el análisis fueron seleccionadas por su capacidad para regenerar en medio conteniendo kanamicina y por examen visual de la expresión del gen reportero sgfp**. (a)** Amplificación por PCR de la secuencia codificante

de dermaseptina (104 pb). **(b)** Amplificación por PCR de la secuencia codificante de GFP (600 pb). Las muestras de ADN analizadas corresponden a las plantas mencionadas en cada panel (Der-1 a Der-7), a la construcción pBin19sgfp-Der (control positivo) y al vector vacío pBin19sgfp (control negativo). pcDNAII/DdeI y pcDNAII/HinfI: marcadores de peso molecular. PCR Mix: mezcla de reactivos utilizados para la PCR sin el agregado de ADN (control negativo).

**Figura 32. Plantas transgénicas cultivadas en el invernáculo.**

## 8. Caracterización genético-molecular de plantas de C. sinensis transformadas.

Mientras las plantas de C. sinensis alcanzaban un tamaño adecuado para realizar los ensayos de infección, se efectuaron distintos ensayos de caracterización molecular y los primeros ensayos de infección en hojas aisladas. Estas mismas plantas fueron también la fuente de yemas para la multiplicación del material transformado genéticamente.

### 8.1. Análisis de Southern blot.

Se extrajo ADN genómico de hojas de C. sinensis cultivadas durante 12 meses en el invernadero y se lo digirió con la enzima Bgl II. La Figura 17 muestra la región donde hibrida la sonda y el lugar donde corta la enzima de restricción Bgl II. La enzima fue elegida por poseer un solo sitio de restricción en el inserto integrado al genoma vegetal, por lo que el número de bandas observado es, al menos, equivalente al número de copias presente. Por lo tanto, a partir de este ensayo puede concluirse que la planta Der-1 tiene al menos 4 copias del transgén (bandas de 8 kb; 5,8 kb; 5kb; 3,9 kb), la Der-2 al menos 3 copias (bandas de 5,9 kb; 4,8 kb; 4,3 kb), la Der-3 al menos 5 copias (bandas de 5,9 kb; 5 kb; 3,7 kb; 3 kb; 2,8 kb), la Der-4 al menos 4 copias (bandas de 8 kb; 4,9 kb; 4,3 kb; 3,6 kb), la Der-5 al menos 5 copias (bandas de 5,9 kb; 4,6 kb; 4 kb; 3,4 kb; 2,5 kb),la Der-6 al menos una copia (banda de 8 kb) y

la Der-7 al menos 4 copias (bandas de 6,2 kb; 5,4 kb; 4,4 kb; 3,8 kb). Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 33.

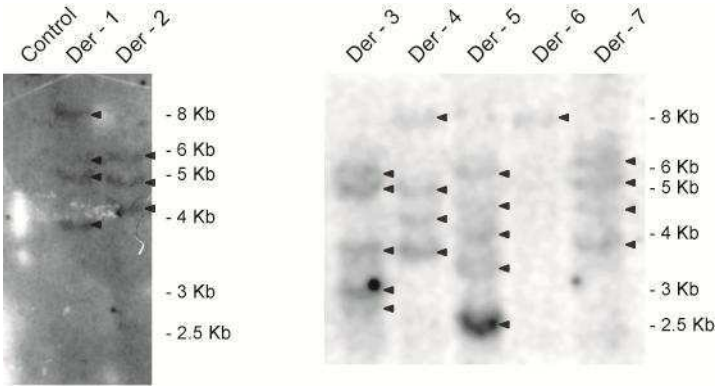



**Figura 33. Análisis de Southern blot de las siete plantas de C. sinensis transformadas con la construcción pBin19sgfp-Der.** La imagen de la izquierda muestra una autorradiografía convencional y la de la derecha una imagen obtenida con el sistema Storm 840 PhosphorImager. En cada caso, se indican los perfiles correspondientes a las distintas plantas. De acuerdo con el patrón de bandas obtenido, las plantas Der-1 a Der-7 poseerían, al menos, 4, 3, 5, 4, 5, 1 y 4 copias del transgén, respectivamente. Control: ADN genómico de una planta no transformada de C. sinensis.

## 8.2. RT-PCR.

Con el fin de confirmar la transcripción del transgen de dermaseptina, se realizó una extracción de ARNm total a partir de hojas de las plantas transgénicas de C. sinensis y se obtuvo ADNc. Éste fue empleado como molde para amplificar por PCR la secuencia de dermaseptina. Como control de carga se incluyó la amplificación del gen de actina B de C. sinensis. Se realizaron controles de contaminación de ADN genómico sin el agregado de transcriptasa inversa.

En las 7 plantas transgénicas evaluadas se detectaron fragmentos del tamaño esperado para la secuencia de dermaseptina (104 pb) y para la actina B (195 pb). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 34.

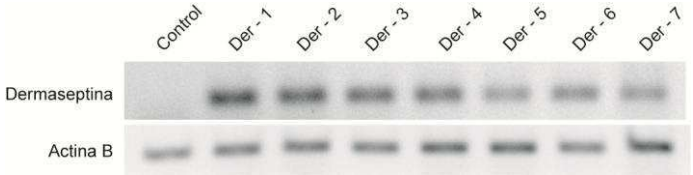


**Figura 34. RT-PCR de plantas transgénicas de C. sinensis obtenidas con la construcción pBin19sgfp-Der.** Se muestran los productos de amplificación correspondientes al ADNc de la secuencia de dermaseptina (104 pb; fila superior) y de actina B (195 pb; fila inferior). Se muestran imágenes de un mismo gel de agarosa de 2% teñido con bromuro de etidio. Control: C. sinensis sin transformar. Der-1, -2, -3, -4, -5, -6 y -7: plantas transgénicas de C. sinensis.

## 8.3. Obtención del anticuerpo anti-dermaseptina.

Con el fin de obtener un anticuerpo apropiado para la detección de dermaseptina, se produjeron anticuerpos anti-dermaseptina en colaboración con el personal especializado del Bioterio de la FCEyN-UBA. Para ello, se mandó sintetizar un péptido de secuencia idéntica a la codificada en la construcción pBin19sgfp-Der acoplado a la proteína carrier KLH (hemocianina del gasterópodo Megathura crenulata). Luego de dos inmunizaciones a cada ratón, se realizó el primer sangrado y se obtuvieron antisueros que se utilizaron para confirmar la detección del péptido en un ensayo de dot-blot que permitió establecer la detección de un mínimo de 10 ng de dermaseptina-KLH. Se continuó con el protocolo de inmunización y al finalizar el mismo se realizó un ensayo de dot-blot para estimar la afinidad de los antisueros obtenidos (Figura 35), siguiendo lo descrito Materiales y Métodos Sección 13.3.1. De esta forma, pudo establecerse que el mínimo nivel de detección de los anticuerpos fue de 1 ng de péptido, lo que refleja un título relativamente bajo.

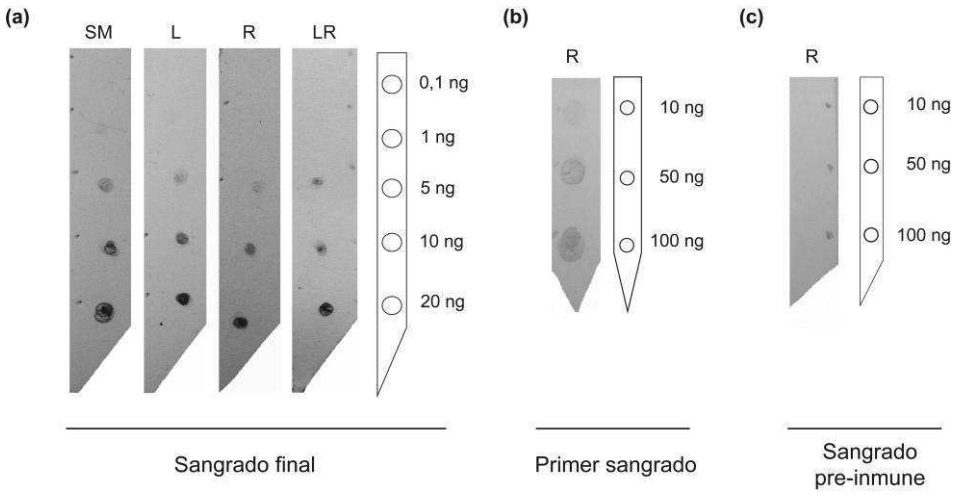



**Figura 35. Ensayos de dot-blot con antisueros de ratones inmunizados con dermaseptina-KLH. (a)** Se muestran cuatro tiras de nitrocelulosa sembrada con diluciones de dermaseptina sintética (0,1-20 ng), utilizadas para determinar el nivel de detección de cada antisuero. Las membranas de fueron incubadas con los antisueros obtenidos de los 4 ratones utilizados en los ensayos de inmunización (sangrado final). SM; L; R; LR: identificadores de los ratones utilizados. **(b)** Se muestra una tira de nitrocelulosa sembrada con diluciones del péptido dermaseptina acoplado a KLH, incubada con un antisuero R del primer sangrado. **(c)** Se muestra una tira

de nitrocelulosa sembrada con diluciones del péptido dermaseptina acoplado a KLH, incubada con el antisuero R del sangrado pre-inmune. Los ensayos fueron revelados con el sistema de fosfatasa alcalina.

## 8.4. Detección de dermaseptina en plantas transgénicas.

Con el propósito de evaluar la presencia de dermaseptina en las plantas transgénicas de C. sinensis, se realizó un nuevo ensayo de dot blot empleando extractos de hojas de las 7 plantas obtenidas. En este caso, sólo se obtuvieron resultados negativos.

Asumiendo que el nivel de dermaseptina se hallaba en todos los casos por debajo del nivel de detección de los anticuerpos obtenidos, se realizó un nuevo ensayo de dot blot concentrando el extracto obtenido de la planta Der-5. Con esta finalidad, se utilizó una columna de filtrado Amicon Ultra-4, cuyo poro de exclusión es de 10 KDa. Este procedimiento permitió enriquecer el extracto vegetal en péptidos de bajo peso molecular, entre los que se cuenta dermaseptina (3,5 kDa). De esta forma, a partir de 1 g de tejido foliar fresco, se logró detectar al péptido en la planta transgénica mencionada. Siguiendo el mismo protocolo de preparación del extracto, no se detectó dermaseptina en tejido foliar de una planta no transformada. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 36.

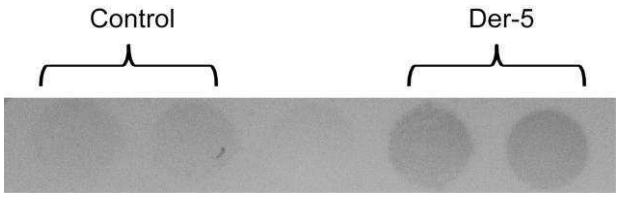



**Figura 36. Ensayo de dot-blot de la planta Der-5 utilizando un extracto filtrado de tejido foliar.** Se muestra una tira de nitrocelulosa sembrada con extractos proteicos totales de una planta sin transformar (Control) y de la planta transgénica Der-5. Cada muestra está sembrada por duplicado, utilizando 1 g de tejido foliar tratados previamente con una columna de exclusión de 10 kDa, lo que permitió obtener un extracto enriquecido en proteínas de bajo peso molecular. Los ensayos fueron revelados con el sistema de fosfatasa alcalina.

Si bien el nivel del background en los spot realizados con los extractos de la planta control es alto, la intensidad del spot correspondiente a la línea Der-5 es mayor. Por lo tanto, se puede inferir que la línea transgénica Der-5 expresa dermaseptina. En el momento de la escritura de la Tesis, se aguardaba la importación de las columnas Amicon Ultra-4 (Millipore), para realizar los ensayos con todas las líneas transgénicas, y confirmar los resultados obtenidos.

## 9. Ensayos de infiltración y titulación de X. campestris en plantas de N. benthamiana.

El ensayo de titulación bacteriana se basó en reportes previos que demuestran que, en ensayos de infiltración de hojas de N. benthamiana sin transformar, X. campestris se multiplica en el apoplasto durante los primeros 4-6 d.p.i. (Matthew Metz et al., 2005 y Yun et al., 2006). Con la finalidad de establecer el efecto de la expresión in planta de dermaseptina y lisozima sobre la multiplicación de X. campestris, se puso a punto un ensayo de infiltración y titulación en hojas de N. benthamiana sin transformar (Sección 16. de Materiales y Métodos). Los resultados de los ensayos se muestran en la Figura 37.

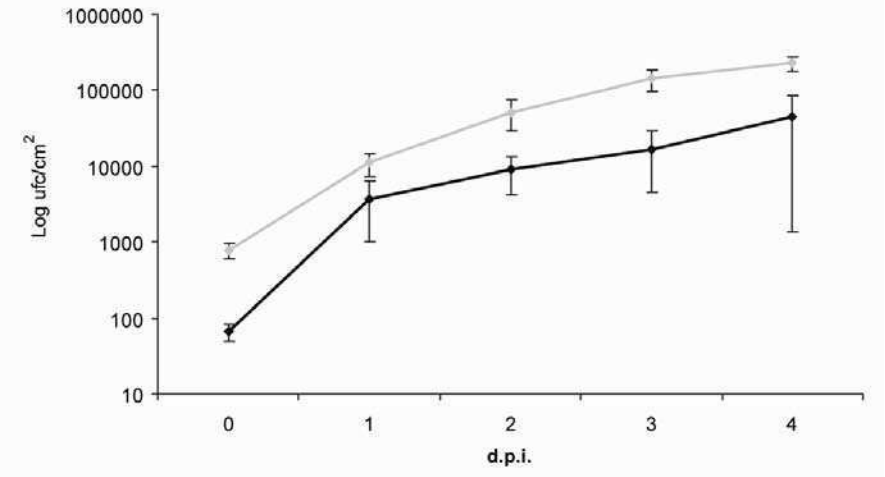



**Figura 37. Ensayo de infiltración y titulación de X. campestris en hojas no transformadas de N. benthamiana.** Se infiltraron hojas de N. benthamiana utilizando inóculos de $1x10^3$ (gris) y $1x10^2$ (negro) u.f.c./mL. Se observa el crecimiento de la población bacteriana por $cm^2$ de área foliar en función de los días. Cada punto de la curva se obtuvo calculando la media de tres hojas independientes. El gráfico mostrado es representativo de 3 ensayos independientes, con resultados similares.

En los ensayos de infiltración efectuados con concentraciones bajas de inóculo, la población de X. campestris aumentó con un patrón de crecimiento similar al reportado en la literatura. Si bien en la Figura 37 se muestra el patrón de crecimiento bacteriano in planta con dos inóculos de baja concentración ($1x10^3$ y $1x10^2$ u.f.c./mL), el patrón de crecimiento bacteriano en experimentos de infiltración realizados con altas concentraciones de inóculo ($1x10^7$ y $1x10^5$ u.f.c./mL) fue similar (resultados no mostrados).

Una vez establecidos los ensayos de infiltración con X. campestris en hojas no transformadas, se efectuaron ensayos de infiltración en hojas de N. benthamiana de las

distintas líneas transformadas obtenidas (plantas de la generación F2). Considerando que los niveles de expresión alcanzados en plantas transgénicas nucleares son generalmente bajos, y que las bacterias se infiltran directamente en el apoplasto, evadiendo así las barreras de defensa mecánica de la planta (principalmente la cutícula y el cierre de los estomas), los ensayos de infiltración se realizaron con concentraciones bajas de inóculo ($1x10^3$ y $1x10^2$ u.f.c./mL). La metodología empleada fue idéntica a los ensayos con plantas sin transformar, utilizando hojas de tres líneas transgénicas de N. benthamiana transformadas con la construcción pBIN19sgfp-Der (Der-6.1.2, Der-13.1.1 y Der-14.1.1) y de plantas no transformadas como control. Los resultados se muestran en la Figura 38.

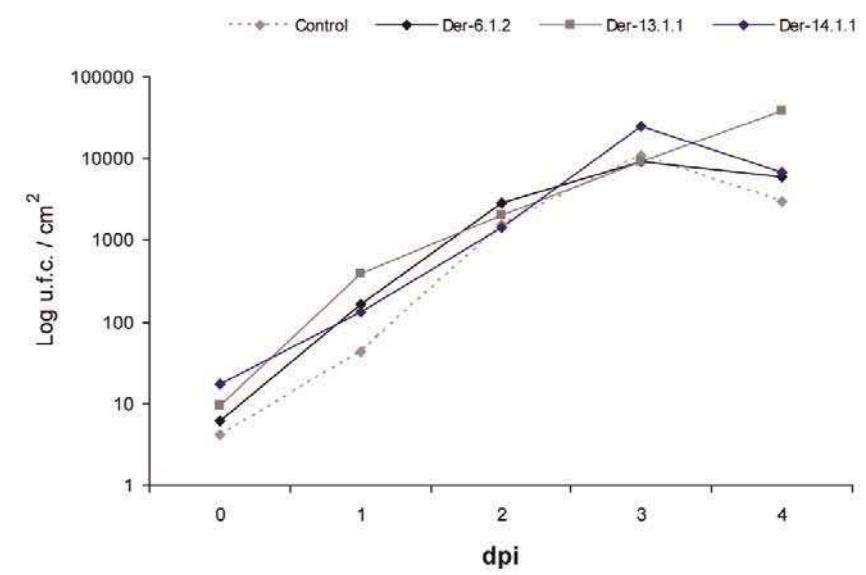



**Figura 38. Ensayo de infiltración y titulación de X. campestris en hojas de N. benthamiana transformadas con la construcción pBIN19sgfp-Der.** Se infiltraron hojas de N. benthamiana transformadas y hojas de plantas no transformadas como control utilizando un inóculo de $1x10^2$ u.f.c./mL. Se grafica el crecimiento de la población bacteriana por $cm^2$ de área foliar en función de los días. Cada punto de la curva se obtuvo calculando la media de tres hojas independientes. No se muestran las barras de error para facilitar la interpretación de los resultados. El gráfico mostrado es representativo de 3 ensayos independientes, con resultados similares.

Como muestran las curvas de crecimiento de la Figura 38, no hubo diferencias significativas en el crecimiento de la población de X. campestris entre hojas de N. benthamiana transformadas y sin transformar. Se obtuvieron resultados similares en el caso de las infiltraciones realizadas con un inóculo $1x10^3$ u.f.c./mL (resultados no mostrados).

Se realizaron también ensayos de infiltración de hojas en dos líneas de N. benthamiana transformadas con la construcción pBIN19sgfp-Liz (Liz 1.1.2. y Liz 4.81.) Los resultados correspondientes a estos ensayos se muestran en la Figura 39.

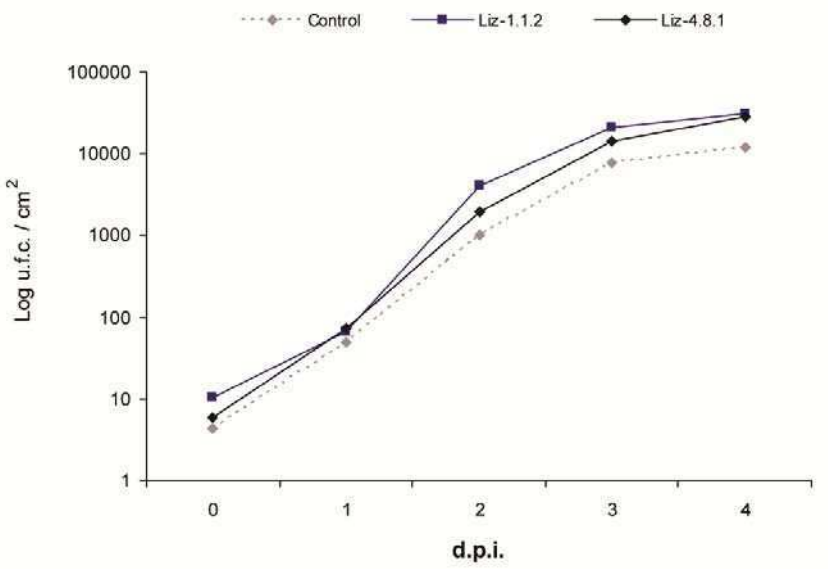



**Figura 39. Ensayo de infiltración y titulación de X. campestris en hojas de N. benthamiana transformadas con la construcción pBIN19sgfp-Liz.** Se infiltraron hojas de N. benthamiana transformadas y hojas de plantas no transformadas como control utilizando un inóculo de $1x10^2$ u.f.c./mL. Se grafica el crecimiento de la población bacteriana por $cm^2$ de área foliar en función de los días. Cada punto de la curva se obtuvo calculando la media de 3 hojas independientes. No se muestran las barras de error para facilitar la interpretación de los resultados. El gráfico mostrado es representativo de 3 ensayos independientes, con resultados similares.

De manera similar a lo ocurrido con las plantas transformadas con la secuencia de dermaseptina, no hubo diferencias significativas entre las hojas de plantas transformadas con la secuencia de lisozima y el control, en cuanto al crecimiento de la población de X. campestris. Se obtuvieron resultados similares en el caso de las infiltraciones realizadas con un inóculo $1x10^3$ u.f.c./mL (resultados no mostrados).

A partir de los resultados de infiltración y titulación de X. campestris en hojas de N. benthamiana transformadas, se descartó este tipo de experimentos para analizar el efecto inhibitorio in planta de los distintos transgenes de interés, sobre la bacteria.

## 10. Ensayos de inhibición in vitro de Xanthomonas spp. con extractos totales de N. benthamiana transformadas genéticamente.

Como una alternativa a los ensayos de infiltración y titulación bacteriana, y con el objetivo de probar el efecto in vitro de la expresión de los transgenes, se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano utilizando extractos totales de plantas adultas de N. benthamiana transformadas con las secuencias de dermaseptina y lisozima. Los ensayos se realizaron en medio líquido y en medio sólido, según se describe en las Secciones 14.3. y 14.4. de Materiales y Métodos, respectivamente. En ninguno de los dos tipos de experimentos desarrollados se observó la inhibición del crecimiento de X. axonopodis y X. campestris con los extractos de las plantas transformadas, respecto al control.

Teniendo en cuenta que: 1) no se observaron diferencias significativas en el crecimiento in planta de X. campestris en los ensayos de infiltración y titulación bacteriana utilizando plantas transformadas de N. benthamiana (Sección 9.) y 2) no hubo diferencias en los ensayos de inhibición in vitro entre extractos de plantas adultas transformadas y el control (experimentos en medio líquido y en medio sólido), se descartó el patosistema N. benthamiana-X. campestris para probar el efecto de los transgenes sobre el crecimiento de la bacteria en ensayos realizados in planta, y se descartó la utilización de extractos totales de plantas transformadas genéticamente para probar el efecto in vitro de los transgenes.

Por último, con el fin de comprobar si la etapa de desarrollo de la planta interfería en la actividad antimicrobiana, se efectuaron ensayos de inhibición utilizando extractos de plantas jóvenes de N. benthamiana transformadas genéticamente. En este caso, los ensayos se realizaron únicamente con la bacteria X. axonopodis siguiendo la metodología descripta en la Sección 14.5. de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 40 y 41.

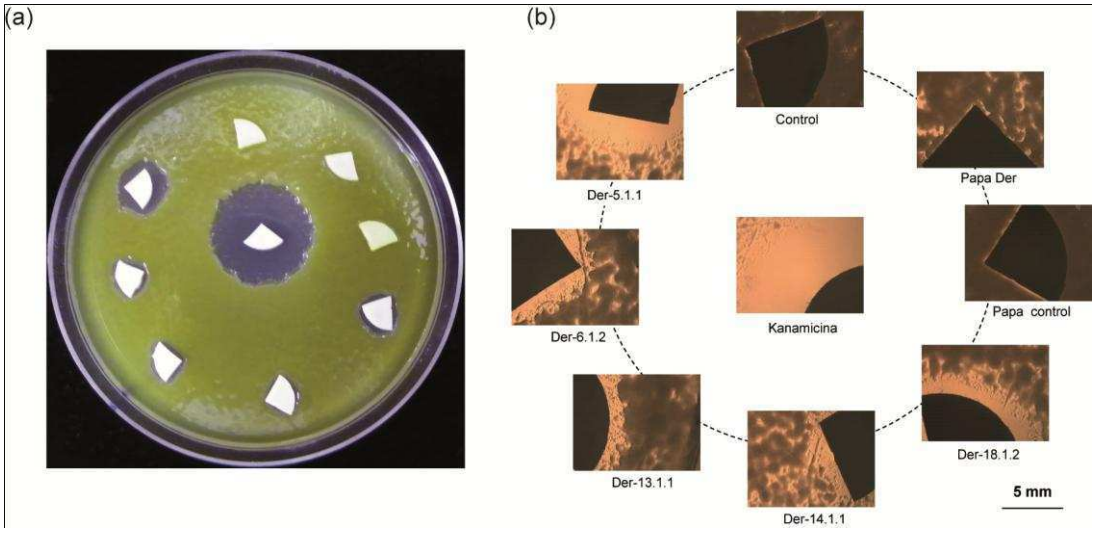



**Figura 40. Ensayo de inhibición de X. axonopodis con extractos de plántulas de N. benthamiana transformadas con la construcción pBIN19sgfp-Der.** Los extractos vegetales se prepararon a partir de plantas de 10 d de edad cultivadas in vitro. **(a)** Fotografía del ensayo a las 72 h de incubación a 28ºC. Se utilizaron extractos de N. benthamiana obtenidos de las plantas transformadas (generación F2) Der-5.1.1, -6.1.2, -13.1.1, -14.1.1 y -18.1.2 y de una planta no transformada (Control). Se incluyeron extractos de una línea transgénica de S. tuberosum que expresa dermaseptina (Papa Der) y de una planta control no transformada (Papa control). En el filtro localizado en posición central se sembró una solución de 50 µg/mL de kanamicina. **(b)** Detalles de los halos de inhibición de los distintos extractos incluidos en **(a)** fotografiados bajo una lupa de campo claro. Los ensayos se repitieron 3 veces con resultados similares.

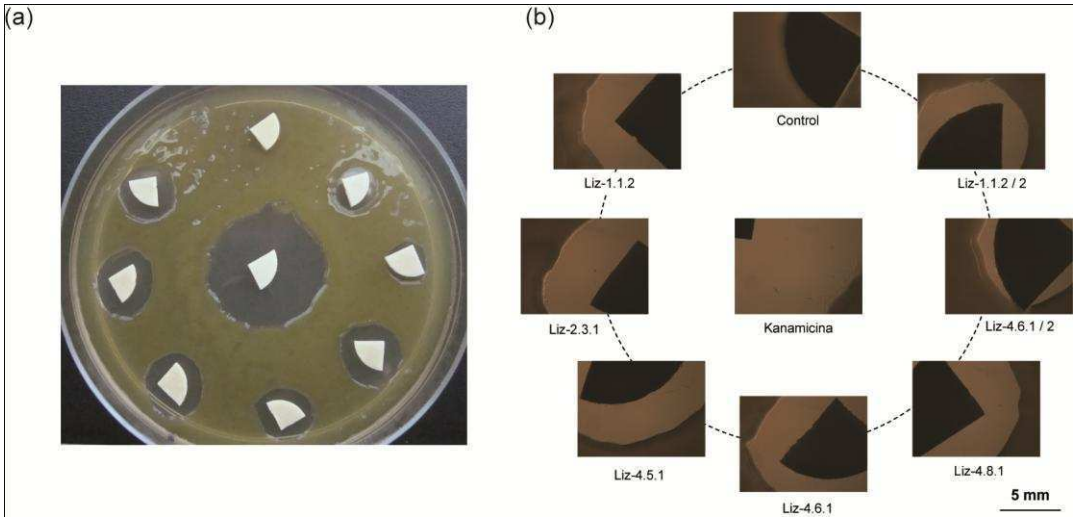



**Figura 41. Ensayo de inhibición de X. axonopodis con extractos vegetales de plántulas de N. benthamiana transformadas con la construcción pBIN19sgfp-Liz.** Los extractos vegetales se prepararon a partir de plantas de 10 d de edad cultivadas in vitro. **(a)** Fotografía del ensayo a las 72 h de incubación a 28ºC. Se utilizaron extractos de N. benthamiana obtenidos de las plantas transformadas (generación F2) Liz-1.1.2, -2.3.1, -4.5.1, -4.6.1 y -4.8.1 y de una planta no transformada (Control). 1.1.2/2 y 4.6.1/2 contienen diluciones al medio de los extractos de las líneas 1.1.2 y 4.6.1, respectivamente. En el filtro localizado en posición central se sembró una solución de 50 µg/mL de kanamicina. **(b)** Detalles de los halos de inhibición de los distintos extractos incluidos en **(a)** fotografiados bajo una lupa de campo claro. Los ensayos se repitieron 3 veces con resultados similares.

Los ensayos mostrados en las Figuras 40 y 41 permitieron concluir que los extractos de plantas jóvenes de N. benthamiana transformadas genéticamente (generación F2) exhiben actividad antimicrobiana contra X. axonopodis.

**11. Ensayos de infección en hojas escindidas de C. sinensis con X. axonopodis.**

Mientras las plantas transgénicas de C. sinensis alcanzaban un tamaño adecuado para realizar ensayos de infección, se realizaron pruebas con hojas escindidas mediante dos técnicas distintas: a) realizando punciones en la lámina foliar y pulverizaciones subsiguientes del inóculo bacteriano y; b) por inmersión de la hoja entera intacta en una suspensión bacteriana.

En primera instancia, se realizaron 3 ensayos de infección independientes con X. axonopodis sobre hojas aisladas de C. sinensis, utilizando muestras de todas las plantas de transgénicas obtenidas. Para ello, se adaptó el protocolo reportado por Alves de Azevedo (2005) según se describe en la Sección 18.1. de Materiales y Métodos, consistente en realizar punciones sobre la hoja seguida de la pulverización de una suspensión bacteriana. En los 3 ensayos realizados, se observó formación de cancros a los 5 d.p.i. Sin embargo, en ninguno de los ensayos se observaron diferencias en cuanto al número y tamaño de los cancros entre las líneas transgénicas y las plantas C. sinensis no transformadas utilizadas como control. Por otro lado, se observó que en la mayoría de las hojas, incluyendo los controles no inoculados con la bacteria, aparecían infecciones secundarias de patógenos oportunistas sobre las punciones en la lámina, y en el corte efectuado sobre el pecíolo. Cabe remarcar que las infecciones secundarias se observaban incluso antes de la aparición de los síntomas típicos producidos por Xanthomonas, interfiriendo así con el ensayo de infección. A partir de estas observaciones, se concluyó que esta metodología no era adecuada para establecer diferencias de resistencia entre las plantas transgénicas y el control.

Como alternativa de los ensayos anteriores, se realizaron 2 experimentos con hojas escindidas de la planta, seguido de la inmersión de la hoja entera e intacta en una suspensión bacteriana (Sección 18.2. de Materiales y Métodos). Los resultados se expresaron de acuerdo con la severidad de la infección de la hoja (Tabla 4).

| Nivel de infección | Control | Der-1 | Der-2 | Der-3 | Der-4 | Der-5 | Der-6 | Der-7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Alta ( > 20 cancros ) | 0,00 | 0,00 | 16,67 | 0,00 | 23,08 | 60,00 | 71,43 | 16,67 |
| Medio (5-20 cancros) | 60,00 | 33,33 | 33,33 | 22,22 | 7,69 | 0,00 | 0,00 | 25,00 |
| Bajo ( < 5 cancros ) | 30,00 | 50,00 | 50,00 | 66,67 | 7,69 | 40,00 | 28,57 | 41,67 |
| Sin cancros | 10,00 | 16,67 | 0,00 | 11,11 | 61,54 | 0,00 | 0,00 | 16,67 |
| Total | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |

**Tabla 4. Resultados del ensayo de infección con hojas aisladas sumergidas en una suspensión bacteriana.** Se muestran los resultados de uno de los dos ensayos de infección realizados con hojas sin transformar (control) y las 7 plantas transgénicas de C. sinensis. Se expresa el porcentaje de hojas con severidad alta (> 20 cancros), media (20-5 cancros) y baja (< 5 cancros). Ambos ensayos de infección arrojaron resultados similares.

Las mediciones realizadas en ambos ensayos mostraron que las hojas de las plantas transgénicas presentaron síntomas más severos que los controles sin transformar. En la Figura 42 se muestra una hoja representativa de la severidad de la infección bacteriana en hojas transgénicas durante los ensayos de inmersión.

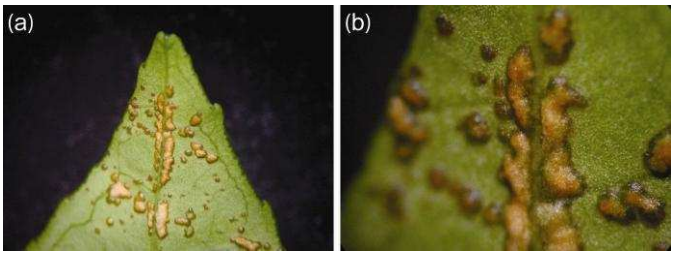



**Figura 42. Ensayo de infección con hojas aisladas sumergidas en una suspensión bacteriana. (a)** Fotografía representativa de la severidad de la infección de una hoja de la planta transgénica Der-6 de C. sinensis a los 10 d.p.i. **(b)** Detalle de los cancros sobre la cara abaxial de la hoja. El inóculo utilizado para los ensayos de inmersión contenía $1x10^4$ u.f.c./mL.

Otra observación reiterada en estos ensayos fue que las hojas jóvenes resultaban más afectadas que las maduras, probablemente como consecuencia del menor desarrollo de su cutícula (Graham et al., 2004). Los porcentajes de hojas afectadas según su estado de desarrollo se muestran en la Figura 43.

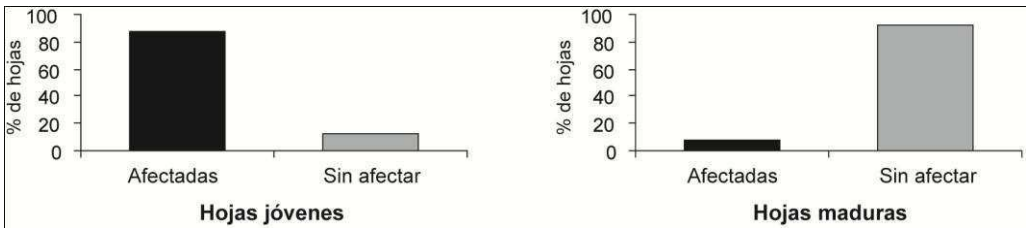



**Figura 43. Formación de cancros en hojas jóvenes y hojas maduras.** Se muestran los porcentajes de hojas de C. sinensis que desarrollaron cancros (afectadas) y hojas en las que no hubo formación de cancros (sin afectar) luego de un ensayo de inmersión. Para el cálculo de los porcentajes se consideraron todas las hojas utilizadas en

el ensayo (transgénicas y controles). Los resultados son representativos de los 2 ensayos de infección cuyos resultados fueron similares.

Debido al deterioro observado en las hojas durante los ensayos de infección realizados con ambas metodologías de inoculación, se concluyó que los ensayos de infección con hojas aisladas (por una u otra técnica) no eran apropiados para evaluar los niveles de resistencia en plantas transgénicas. A partir de esto, se decidió concentrar los esfuerzos en la realización de ensayos de infección in planta.

## 12. Ensayos de infección in planta en hojas de C. sinensis con X. axonopodis.

Con la finalidad de explorar la dinámica del proceso de infección in planta, se realizaron 3 ensayos independientes de infección con X. axonopodis sobre hojas de C. sinensis no transformadas. La metodología de infección se adaptó de Yang et al. (2010), y consistió en la realización de punciones sobre la hoja seguido de la pulverización de una suspensión bacteriana (Sección 19. de Materiales y Métodos).

En los 3 ensayos se observó formación de cancros a los 7-10 d.p.i. No se observaron diferencias en cuanto al número y al tamaño de los cancros formados entre las plantas utilizadas. En la Figura 44, se muestra la evolución de una lesión producida por la bacteria en la cara abaxial de la hoja, a los 7, 14 y 21 d.p.i.

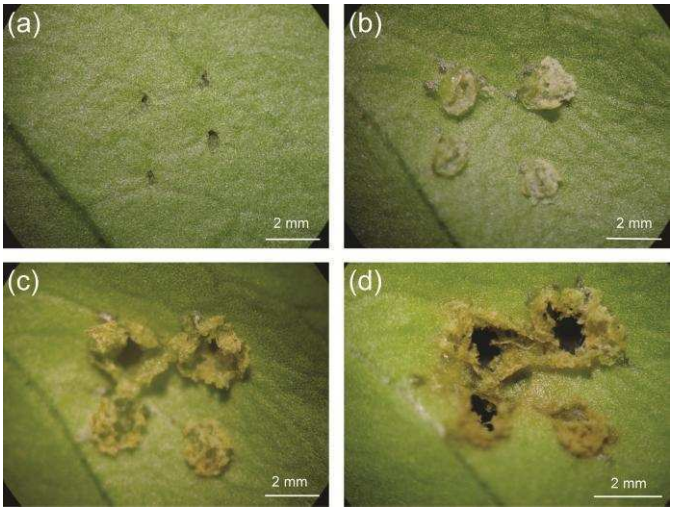



**Figura 44. Desarrollo de cancros en hojas de C. sinensis inoculadas con X. axonopodis.** Las fotografías son representativas de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de infección y en las distintas hojas inoculadas. **(a)** Inoculación con una solución 10 mM de $MgCl_2$ a los 7 d.p.i.; **(b)** Desarrollo de cancros a los 7 d.p.i.; **(c)** Desarrollo de cancros a los 14 d.p.i.; **(d)** Desarrollo de cancros a los 21 d.p.i. Se utilizó un inóculo de X. axonopodis de $1x10^5$ u.f.c./mL.

Luego de lograr la reproducción de los síntomas en los ensayos de infección utilizando las plantas sin transformar, se realizaron 3 ensayos preliminares de infección in planta utilizando las plantas transgénicas Der-2 y Der-3 de C. sinensis. El protocolo utilizado fue idéntico al realizado con las plantas sin transformar. Los resultados obtenidos en uno de estos ensayos se muestran en las Figuras 45 y 46.

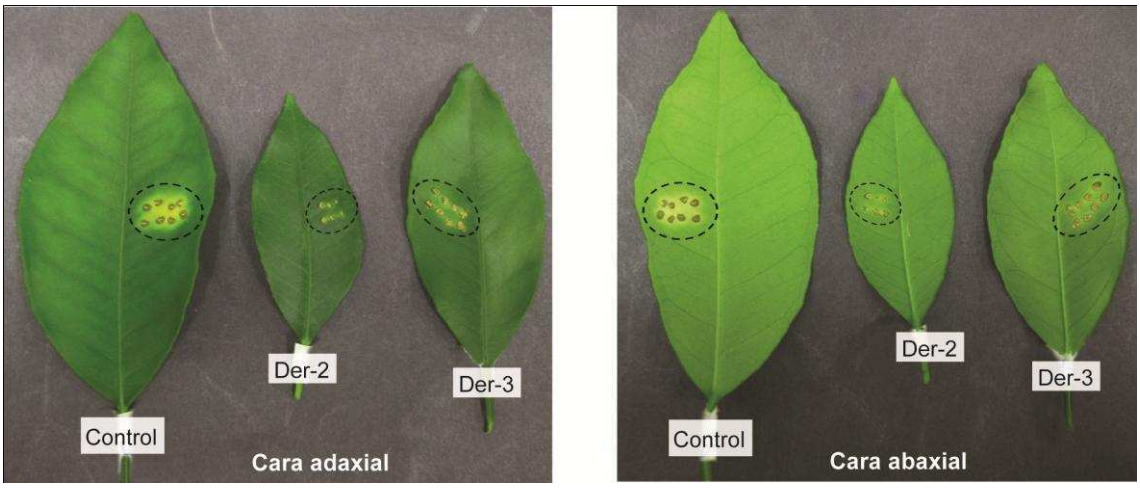



**Figura 45. Ensayo de infección in planta con las plantas transgénicas Der-2 y Der-3 de C. sinensis.** En las fotografías puede observarse la reducción de síntomas en las hojas de las plantas transgénicas (Der-2 y Der-3) respecto de la planta control sin transformar. Las fotografías son representativas de los tres ensayos de infección independientes realizados, con similares resultados. Se utilizó un inóculo de X. axonopodis de $1x10^5$ u.f.c./mL.

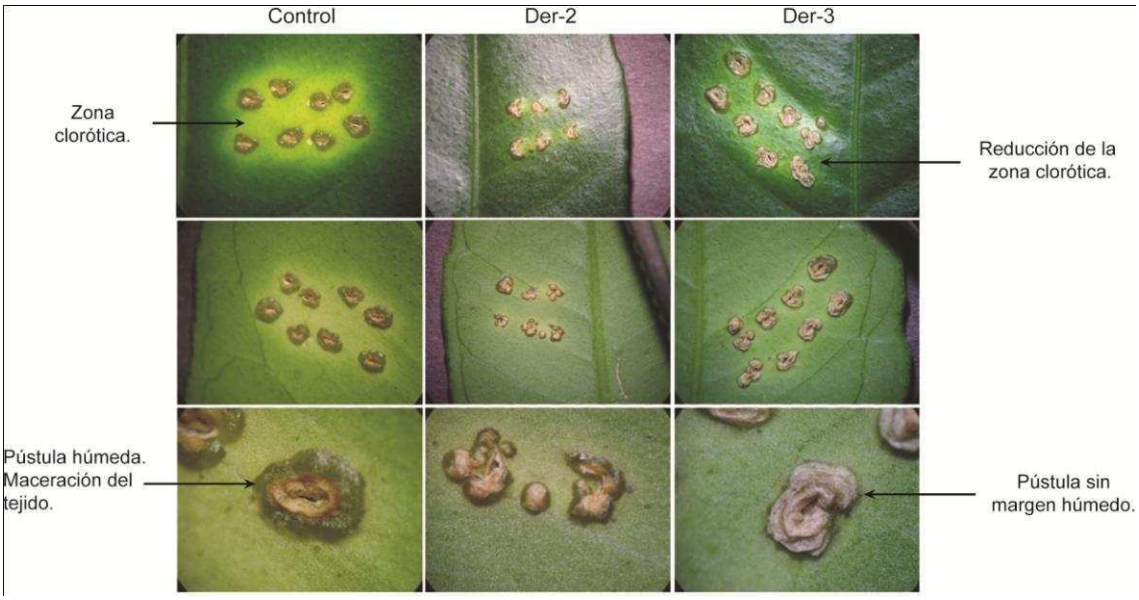



**Figura 46. Detalles del desarrollo de cancros en un ensayo de infección in planta con las plantas transgénicas Der-2 y Der-3 de C. sinensis.** Imágenes de las lesiones producidas por X. axonopodis a los 35 d.p.i. Detalles de las lesiones que se muestran en la Figura 45. Las fotografías fueron tomadas con lupa estereoscópica (filas superior y media: aumento 10x; fila inferior: aumento 40x).

Como se puede observar en las Figuras 45 y 46, las hojas transgénicas inoculadas con X. axonopodis mostraron una menor severidad de la infección respecto del control sin transformar. Las principales diferencias observadas entre las plantas transgénicas y el control sin transformar fueron la disminución del halo clorótico alrededor de la zona de inoculación, la reducción del margen húmedo que rodea la pústula (water soaking), y la cicatrización de las heridas o cancros sin margen húmedo alrededor.

La Figura 47 muestra para cada planta utilizada, los porcentajes de las punciones correspondientes a los distintos tipos de síntomas, agrupados en categorías según la severidad de la infección.

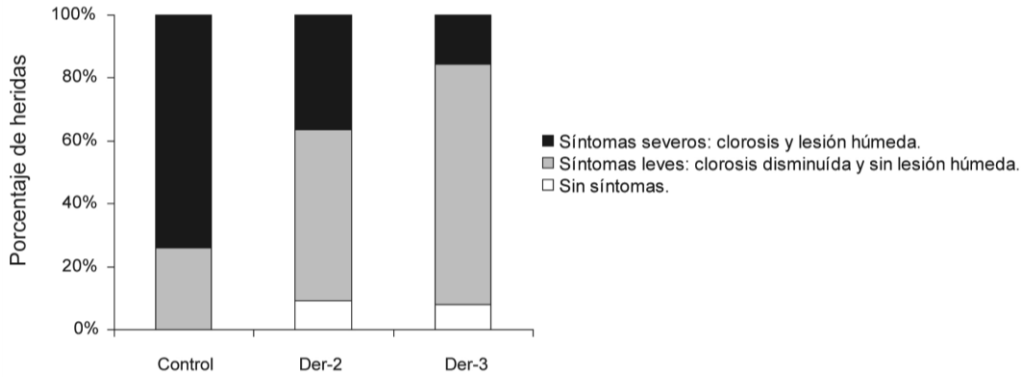



**Figura 47. Distribución porcentual según el tipo de síntomas en heridas de plantas transgénicas y sin transformar (control).** Se representan el porcentaje de heridas con los distintos síntomas de cada planta ensayada, en función de la severidad de la infección desarrollada: heridas sin síntomas (barra blanca), heridas con síntomas leves (clorosis disminuida y sin lesión húmeda; barra gris) y heridas con síntomas severos (clorosis y lesión húmeda; barra negra). Los resultados son representativos de 3 ensayos independientes con resultados similares.

En los 3 ensayos de infección preliminares se observó mayor resistencia a X. axonopodis en las plantas transgénicas Der-2 y Der-3, respecto de la planta control sin transformar. La disminución de la severidad de la infección en las plantas transgénicas se evidenció por la reducción del número de lesiones con sintomatología severa y por la visualización de punciones sin síntomas. A partir de estos resultados, se elaboró un diseño experimental para evaluar el nivel de resistencia de las 7 plantas transgénicas obtenidas.

## 13. Ensayos de infección in planta con plantas transgénicas de C. sinensis.

La evaluación de la susceptibilidad/resistencia de las plantas transformadas se realizó considerando los siguientes aspectos: a) severidad de los síntomas de la enfermedad (dimensión del halo clorótico, presencia del margen húmedo o water soaking alrededor de la herida, y dimensión de los cancros); b) retraso en la aparición de cancros; c) frecuencia de la formación de cancros en plantas transformadas y sin transformar.

Los dos primeros criterios fueron utilizados para establecer diferencias de orden cualitativo entre las plantas transgénicas y control, y para caracterizar patrones de comportamiento frente a la infección. Por lo tanto, los resultados se presentarán en forma descriptiva. En cuanto al tercer criterio, se realizó, para cada uno de los tres ensayos de infección, el análisis estadístico de la frecuencia de formación de cancros.

Los resultados de esta Sección serán presentados del siguiente modo: a) primeros ensayos de infección realizados entre enero-marzo de 2012, utilizando 9-12 hojas por planta ensayada; b) último ensayo de infección realizado entre junio-julio de 2012, utilizando 20 hojas por cada planta ensayada.

### 13.1. Primeros ensayos de infección in planta.

En todas las hojas de plantas transgénicas ensayadas, la magnitud de los síntomas desarrollados fue menor que en las hojas de la planta control, tanto en relación al tamaño de los cancros, como a la dimensión del halo clorótico y margen húmedo alrededor de las lesiones. En la Figuras 48 y 49 se pueden observar detalles del desarrollo de síntomas en hojas representativas de las dos líneas transgénicas que mostraron los mejores fenotipos de resistencia a X. axonopodis en los dos primeros ensayos de infección.

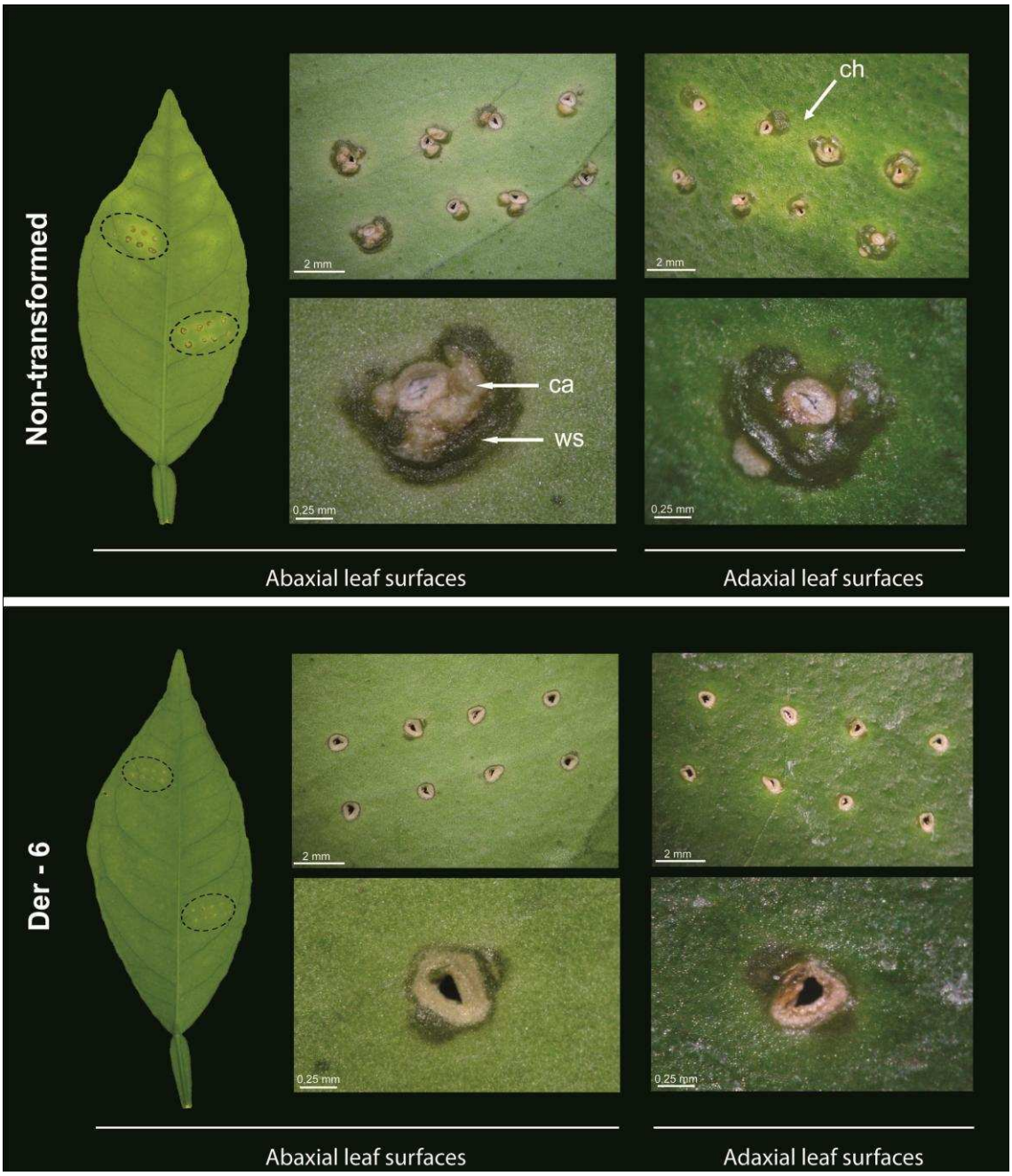



**Figura 48. Fenotipo resistente de la planta transgénica Der-6 de C. sinensis.** En el panel superior de la figura se muestra una hoja no transformada de C. sinensis infectada con X. axonopodis. En el panel inferior, se muestra una hoja de la planta transgénica Der-6. A la izquierda de cada panel, se muestran las hojas infectadas, cuyas áreas de inoculación están marcadas por círculos de trazos. Las columnas muestran detalles de una de las áreas de inoculación, vista desde la cara abaxial (columna izquierda) o adaxial (columna derecha) de las hojas. Se pueden observar las diferencias en el tamaño y aspecto de los cancros (ca), el margen húmedo de la herida o water soaking (ws), y el tejido clorótico (ch). Las fotografías fueron tomadas a los 24 d.p.i. y los resultados son representativos de lo observado en ambos ensayos de infección realizados en los que se incluyeron 9-12 hojas por planta. Se utilizó un inóculo de X. axonopodis de $1x10^5$ u.f.c./mL.

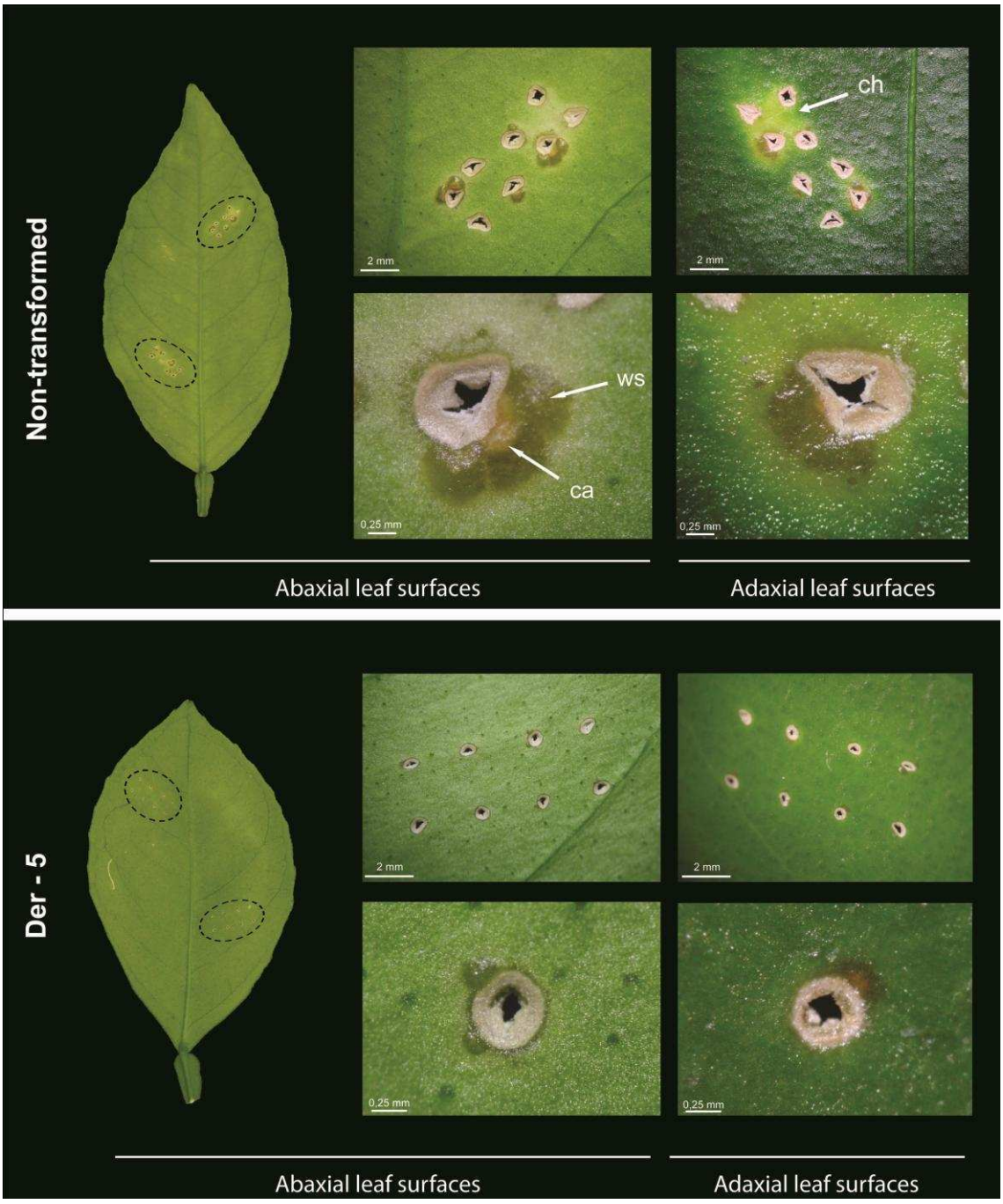
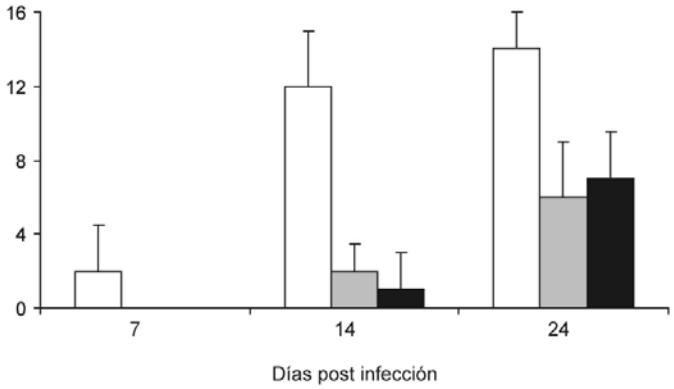



**Figura 49. Fenotipo resistente de la planta transgénica Der-5 de C. sinensis.** En el panel superior de la figura se muestra una hoja no transformada de C. sinensis infectada con X. axonopodis. En el panel inferior, se muestra una hoja de la planta transgénica Der-5. A la izquierda de cada panel, se muestran las hojas infectadas, cuyas áreas de inoculación están marcadas por círculos de trazos. Las columnas muestran detalles de una de las áreas de inoculación, vista desde la cara abaxial (columna izquierda) o adaxial (columna derecha) de las hojas. Se pueden observar las diferencias en el tamaño y aspecto de los cancros (ca), el margen húmedo de la herida o water soaking (ws), y el tejido clorótico (ch). Las fotografías fueron tomadas a los 24 d.p.i. y los resultados son representativos de lo observado en ambos ensayos de infección realizados en los que se incluyeron 9-12 hojas por planta. Se utilizó un inóculo de X. axonopodis de $1x10^5$ u.f.c./mL.

A partir de la observación periódica de las lesiones en las 7 plantas transgénicas, se pudo observar que éstas exhibían un retardo en la aparición de síntomas variable, pero consistente, respecto de las plantas control. Este retraso fue considerablemente mayor en las plantas transgénicas Der-5 y Der-6. La evolución de las lesiones en estas dos plantas transgénicas y en la planta control se muestra en la Figura 50.




| Linea | 7 d.p.i. | | 14 d.p.i. | | 24 d.p.i | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Mediana* | *RI* | *Mediana* | *RI* | *Mediana* | *RI* |
| Control | 2 | 2,5 | 12 | 3 | 14 | 2 |
| Der5 | 0 | 0 | 2 | 1,5 | 6 | 3 |
| Der6 | 0 | 0 | 1 | 2 | 7 | 2,5 |

**Figura 50. Retraso de la aparición de cancros en dos líneas transgénicas.** Desarrollo de la formación de cancros en una planta sin transformar (barras blancas) y en dos líneas transgénicas, Der-5 (barras grises) y Der-6 (barras negras) a los 7, 14 y 24 d.p.i. En la tabla se indican las medianas del número de cancros por hoja correspondiente a cada planta. Las barras verticales indican el rango intercuartílico (RI), medida de dispersión de la mediana. El gráfico mostrado es representativo de los resultados obtenidos en los dos primeros ensayos de infección realizados que incluyeron 9-12 hojas por planta, cuyos resultados fueron similares.

El retraso en la aparición de los síntomas se evidencia por el hecho de que, a los 7 d.p.i., ninguna de las dos plantas transgénicas había desarrollado cancros, contrariamente a lo ocurrido con la planta control. Además, a los 24 d.p.i., las dos plantas transgénicas mostraban marcadas diferencias en cuanto al número de cancros por hoja respecto del control. Estas diferencias serán analizadas exhaustivamente más adelante. Dado que entre los 21-24 d.p.i. no hubo cambios en el número de cancros formados, las hojas fueron cosechadas para su documentación y se dio por finalizado el ensayo.

El número de cancros por hoja desarrollado en las plantas transgénicas y en la planta control se muestra en la Tabla 5. A partir de estos valores, se calcularon la media y la mediana de los datos obtenidos para cada planta.

| Linea / Hoja | Número de cancros por hoja 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | Media | Desvío Estándar | Mediana | Rango Intercuatílico |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | 11 | 14 | 7 | 14 | 15 | 15 | 14 | 9 | 15 | 14 | 13 | 15 | 13,00 | 2,63 | 14,00 | 4,00 |
| Der-1 | 3 | 7 | 3 | 3 | 16 | 16 | 4 | 8 | 8 | 6 | 12 | 9 | 7,92 | 4,68 | 7,50 | 6,00 |
| Der-2 | 9 | 11 | 12 | 8 | 3 | 6 | 9 | 4 | 12 | 3 | 13 | - | 8,18 | 3,71 | 9,00 | 8,00 |
| Der-3 | 12 | 5 | 7 | 8 | 5 | 3 | 9 | 13 | 8 | - | - | - | 7,78 | 3,27 | 8,00 | 4,00 |
| Der-4 | 13 | 12 | 12 | 13 | 6 | 13 | 11 | 14 | 9 | 11 | 5 | - | 10,82 | 2,96 | 12,00 | 4,00 |
| Der-5 | 8 | 6 | 9 | 14 | 8 | 3 | 1 | 2 | 2 | - | - | - | 5,89 | 4,28 | 6,00 | 6,00 |
| Der-6 | 13 | 12 | 8 | 9 | 10 | 3 | 6 | 6 | 5 | 3 | - | - | 7,50 | 3,50 | 7,00 | 5,00 |
| Der-7 | 2 | 5 | 5 | 6 | 2 | 7 | 9 | 14 | 5 | 15 | 16 | - | 7,82 | 5,04 | 6,00 | 9,00 |

**Tabla 5. Número de cancros por hoja en ensayos de infección in planta de C. sienensis.** Se informan los valores del número de cancros por hoja, como así también la media y la mediana para cada planta. Los valores informados son representativos de los dos primeros ensayos de infección, los que incluyeron entre 9-12 hojas por planta. El número de cancros informado se contabilizó a los 24 d.p.i. "-" indica hoja no muestreada. Se utilizó un inóculo de X. axonopodis de $1x10^5$ u.f.c./mL.

Como puede observarse en la Tabla 5, existen diferencias considerables entre las plantas ensayadas en cuanto al número de cancros por hoja. Si bien los valores de la media y la mediana de la planta control son mayores respecto a los de las plantas transgénicas, se observa una alta variabilidad de valores (cancros por hoja). A partir de esta observación, se estimó la dispersión de las mediciones utilizando los datos de la Tabla 5. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 51.

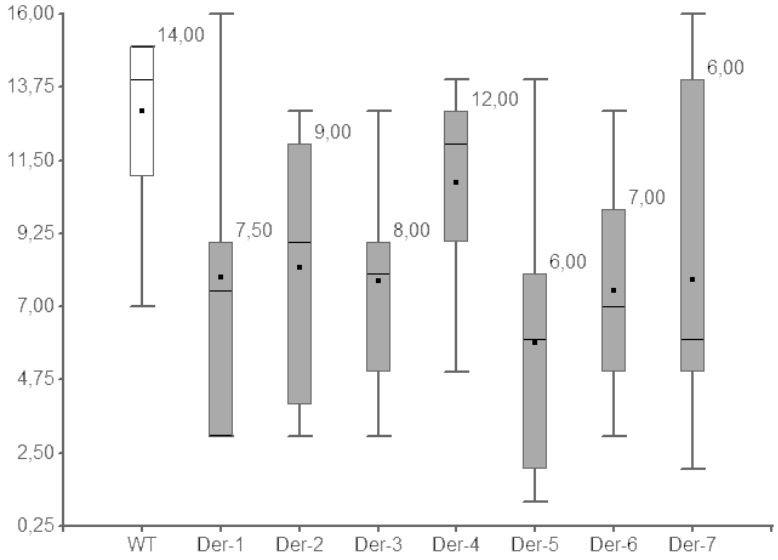



**Figura 51. Analisis de dispersión del número de cancros por hoja para plantas transgénicas y el control.** El análisis se presenta bajo la forma de box plot (o gráfico de cajas y bigotes). Cada caja representa el 50% de los valores analizados, mientras que las barras verticales indican la desviación de los valores atípicos. Dentro de las cajas se indica el valor de mediana como una línea horizontal (valor indicado a la derecha de la caja) y el valor de la media con un punto negro.

Como se observa en el gráfico de la Figura 51, los datos correspondientes a las plantas transgénicas muestran una gran dispersión, sobre todo los de las líneas Der-1, Der-2, Der-5 y Der-7. Debido a esta variabilidad, y para facilitar la interpretación de los resultados, las hojas ensayadas se categorizaron de acuerdo a una escala de frecuencia. La misma consistió en tres categorías: a) baja frecuencia (1-4 cancros por hoja); frecuencia media/moderada (5-8 cancros por hoja) y; alta frecuencia (9-16 cancros por hoja). La Figura 52 muestra una representación gráfica del porcentaje de hojas en cada categoría para cada planta transgénica y la planta control.

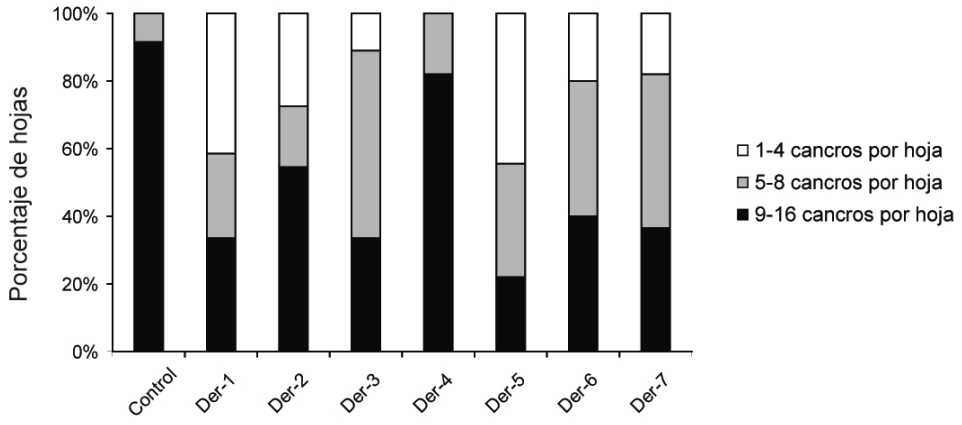



**Figura 52. Porcentaje de hojas por categoría de frecuencia de formación de cancros.** Cada hoja fue clasificada según la frecuencia de formación de cancros, en categoría baja (blanco), moderada (gris) o alta (negro). El gráfico mostrado es representativo de los resultados obtenidos en los dos primeros ensayos de infección realizados que incluyeron 9-12 hojas por planta, cuyos resultados fueron similares.

Como puede observarse en la Figura 52, el 92% de las hojas control presentan una frecuencia de formación de cancros alta (9-16 cancros por hoja) y el 8% restante una frecuencia media (5-8 cancros por hojas). Por el contrario, excepto la planta Der-4 que presenta un patrón similar al control, el resto de las plantas transgénicas mostraron entre 11-44% de hojas con una baja frecuencia de formación de cancros (1-4 cancros por hojas). Además, las plantas transgénicas mostraron entre 18-45% de hojas con frecuencia de formación de cancros intermedia (5-8 cancros por hoja) y 22-54% de hojas con formación de cancros alta (9-16 cancros por hoja).

En relación al análisis estadístico, el resultado del test aplicado (ANOVA no parámetrico de Kruskal-Wallis) indicó que existen diferencias significativas entre las distintas

plantas ensayadas en cuanto a la cantidad de cancros desarrollados por hoja (P=0,0034; Tabla 6). A partir del análisis de comparaciones múltiples de Dunn (dms) se pudo concluir que, excepto la planta Der-4, el resto de las plantas transgénicas mostraron diferencias significativas respecto del control, en el número de cancros por hoja desarrollados (Tabla 7). A su vez, se comprobó que, excepto entre las plantas Der-4 y Der-5, no hubo diferencias significativas entre las plantas transgénicas ensayadas (Tabla 7).

**Kruskal-Wallis ANOVA por Rangos**

| Línea | Control | Der-1 | Der-2 | Der-3 | Der-4 | Der-5 | Der-6 | Der-7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| n | 12,00 | 12,00 | 11,00 | 9,00 | 11,00 | 9,00 | 10,00 | 11,00 |
| Σ R | 817,00 | 457,00 | 436,50 | 333,50 | 598,00 | 243,00 | 358,50 | 411,50 |
| R promedio | 68,08 | 38,08 | 39,68 | 37,06 | 54,36 | 27,00 | 35,85 | 37,41 |
| Mediana | 14,00 | 7,50 | 9,00 | 8,00 | 12,00 | 6,00 | 7,00 | 6,00 |

Kruskal-Wallis ANOVA por Rangos
Variable independiente (de agrupamiento): Línea
Variable dependiente: Cancros
H ( 7, N= 85) = 21,24569
*P* = 0,0034

**Tabla 6. Análisis estadístico del número de cancros por hoja en las plantas ensayadas.** Los datos informados en la Tabla se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico por rangos). El análisis estadístico se efectuó utilizando el número de cancros por hoja para cada una de las plantas ensayadas. Los cálculos se realizaron con el software Statistica 7.0 (valor de P = 0,0034). Los resultados son representativos de los dos ensayos de infección realizados con 9-12 hojas por planta, los que en ambos casos arrojaron resultados similares.

| Comparación | $\bar{R}1-\bar{R}2$ | *dms* | S / NS |
|---|---|---|---|
| Control vs. Der-1 | 30,00 | 24,69 | S |
| Control vs. Der-2 | 28,40 | 25,24 | S |
| Control vs. Der-3 | 31,03 | 26,66 | S |
| Control vs. Der-4 | 13,72 | 25,24 | NS |
| Control vs. Der-5 | 41,08 | 26,66 | S |
| Control vs. Der-6 | 32,23 | 25,89 | S |
| Control vs. Der-7 | 30,67 | 25,24 | S |
| Der-1 vs. Der-2 | 1,60 | 25,24 | NS |
| Der-1 vs. Der-3 | 1,03 | 26,66 | NS |
| Der-1 vs. Der-4 | 16,28 | 25,24 | NS |
| Der-1 vs. Der-5 | 11,08 | 26,66 | NS |
| Der-1 vs. Der-6 | 2,23 | 25,89 | NS |
| Der-1 vs. Der-7 | 0,67 | 25,24 | NS |
| Der-2 vs. Der-3 | 2,63 | 27,18 | NS |
| Der-2 vs. Der-4 | 14,68 | 25,78 | NS |
| Der-2 vs. Der-5 | 12,68 | 27,18 | NS |
| Der-2 vs. Der-6 | 3,83 | 26,42 | NS |
| Der-2 vs. Der-7 | 2,27 | 25,78 | NS |
| Der-3 vs. Der-4 | 17,31 | 27,18 | NS |
| Der-3 vs. Der-5 | 10,06 | 28,51 | NS |
| Der-3 vs. Der-6 | 1,21 | 27,78 | NS |
| Der-3 vs. Der-7 | 0,35 | 27,18 | NS |
| Der-4 vs. Der-5 | 27,36 | 27,18 | S |
| Der-4 vs. Der-6 | 18,51 | 26,42 | NS |
| Der-4 vs. Der-7 | 16,95 | 25,78 | NS |
| Der-5 vs. Der-6 | 8,85 | 27,78 | NS |
| Der-5 vs. Der-7 | 10,41 | 27,18 | NS |
| Der-6 vs. Der-7 | 1,56 | 26,42 | NS |

**Tabla 7. Análisis de comparación múltiple de la frecuencia de formación de cancros por hoja.** Para el análisis de los datos se utilizó el método de contrastes de Dunn (dms), realizando comparaciones de a pares entre las plantas transgénicas y el control, y entre las distintas plantas transgénicas. El análisis estadístico se realizó con los datos mostrados en la Tabla 5. Los resultados informados son representativos de los dos ensayos de infección realizados con 9-12 hojas por línea, los que en ambos casos arrojaron resultados similares. S: diferencias significativas; NS: sin diferencias significativas.

## 13.2. Tercer ensayo de infección in planta.

En forma similar a lo observado en los dos primeros ensayos de infección in planta, la magnitud de los síntomas característicos provocados por X. axonopodis fue menor en las hojas de plantas transgénicas que en las hojas de la planta control. En la Figuras 53 y 54 se pueden observar hojas representativas de las dos plantas transgénicas que mostraron mejores niveles de resistencia a la infección bacteriana.

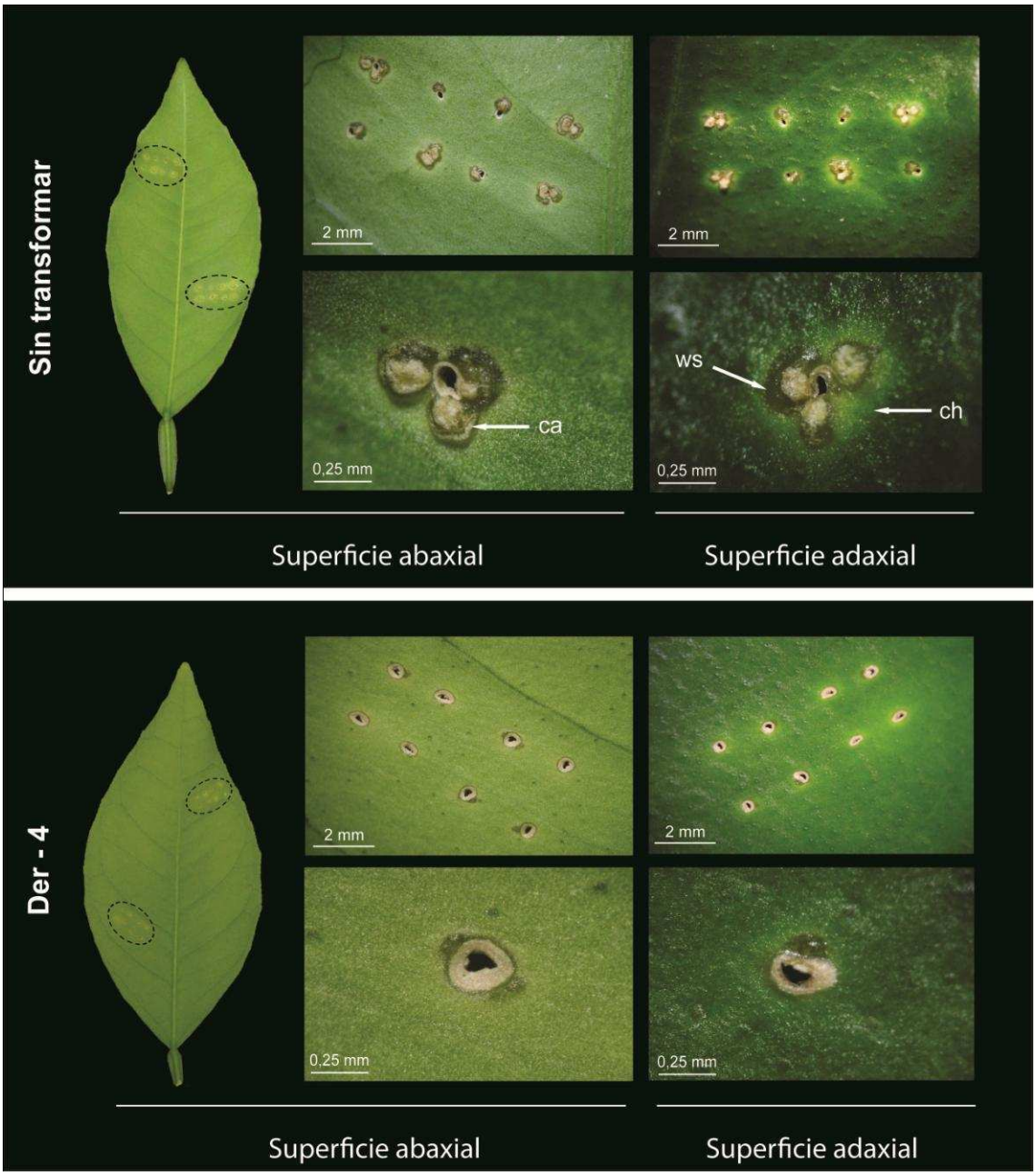



**Figura 53. Fenotipo resistente de la planta transgénica Der-4 de C. sinensis.** En el panel superior de la figura se muestra una hoja no transformada de C. sinensis infectada con X. axonopodis. En el panel inferior, se muestra una hoja de la planta transgénica Der-4. A la izquierda de cada panel, se muestran las hojas infectadas, cuyas áreas de inoculación están marcadas por círculos de trazos. Las columnas muestran detalles de una de las áreas de inoculación, vista desde la cara abaxial (columna izquierda) o adaxial (columna derecha) de las hojas. Se pueden observar las diferencias en el tamaño y aspecto de los cancros (ca), el margen húmedo de la herida o water soaking (ws), y el tejido clorótico (ch). Las fotografías fueron tomadas a los 40 d.p.i. y los resultados son representativos del ensayo que comprendió 20 hojas de cada planta. Se utilizó un inóculo de X. axonopodis de $1x10^5$ u.f.c./mL.

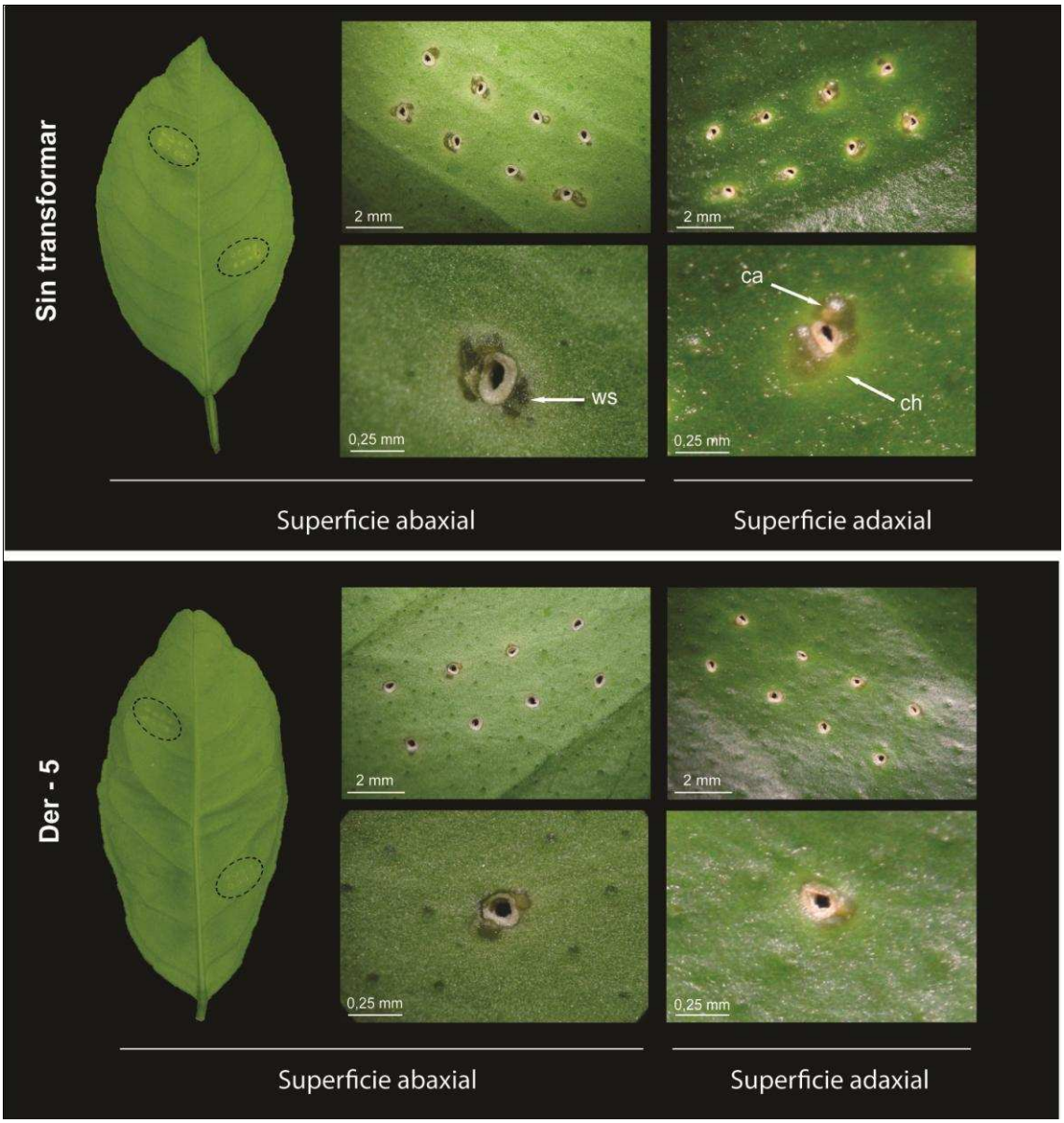
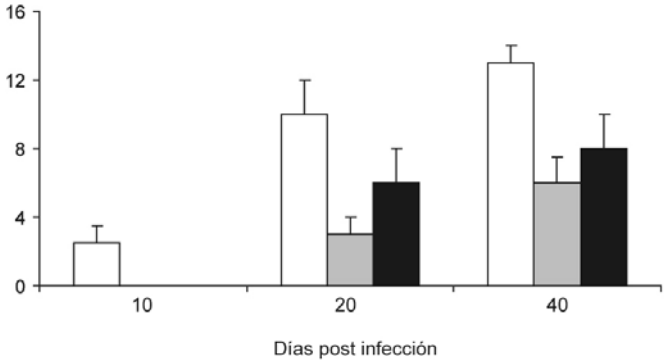



**Figura 54. Fenotipo resistente de la planta transgénica Der-5 de C. sinensis.** En el panel superior de la figura se muestra una hoja no transformada de C. sinensis infectada con X. axonopodis. En el panel inferior, se muestra una hoja de la planta transgénica Der-5. A la izquierda de cada panel, se muestran las hojas infectadas, cuyas áreas de inoculación están marcadas por círculos de trazos. Las columnas muestran detalles de una de las áreas de inoculación, vista desde la cara abaxial (columna izquierda) o adaxial (columna derecha) de las hojas. Se pueden observar las diferencias en el tamaño y aspecto de los cancros (ca), el margen húmedo de la herida o water soaking (ws), y el tejido clorótico (ch). Las fotografías fueron tomadas a los 40 d.p.i. y los resultados son representativos del ensayo que comprendió 20 hojas de cada planta. Se utilizó un inóculo de X. axonopodis de $1x10^5$ u.f.c./mL.

Al igual que en los primeros ensayos de infección, se observó un retardo variable en la aparición de los síntomas en las plantas transgénicas respecto a la planta control. La evidencia más consistente se observó en las plantas transgénicas Der-4 y Der-5. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 55.




| Linea | 10 d.p.i. | | 20 d.p.i. | | 40 d.p.i | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Mediana* | *RI* | *Mediana* | *RI* | *Mediana* | *RI* |
| Control | 2,5 | 1 | 10 | 2 | 13 | 1 |
| Der-4 | 0 | 0 | 3 | 1 | 6 | 1,5 |
| Der-5 | 0 | 0 | 6 | 2 | 8 | 2 |

**Figura 55. Retraso de la aparición de cancros en dos líneas transgénicas.** Desarrollo de la formación de cancros en una planta sin transformar (barras blancas) y en dos plantas transgénicas, Der-4 (barras grises) y Der-5 (barras negras) a los 10, 20 y 40 d.p.i. En la tabla se indican las medianas del número de cancros por hoja correspondiente a cada planta. Las barras verticales indican el rango intercuartílico (RI), medida de dispersión de la mediana. En el ensayo de infección se incluyeron 20 hojas de cada planta transgénica y 20 hojas de la planta control.

Confirmando la evidencia recogida en los ensayos anteriores, las plantas transgénicas Der-4 y Der-5 no habían desarrollado cancros a los 10 d.p.i., mientras que éstos eran ya evidentes en la planta control. En forma similar, a los 40 d.p.i. ambas plantas transgénicas mostraban marcadas diferencias respecto de la planta control respecto del número de cancros por hoja. Dado que entre los 35-40 d.p.i. no hubo variaciones en cuanto al número de cancros formados, las hojas fueron cosechadas para su documentación y se dio por finalizado el ensayo.

La Tabla 8 muestra el número de cancros por hoja desarrollado en las plantas transgénicas y en la planta control. A partir de estos valores, se calcularon la media y la mediana de los datos obtenidos para cada planta.

| | *Número de cancros por hoja* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | *Media* | *Desvío Estándar* | *Mediana* | *Rango Intercuatílico* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Linea / *Hoja*** | *1* | *2* | *3* | *4* | *5* | *6* | *7* | *8* | *9* | *10* | *11* | *12* | *13* | *14* | *15* | *16* | *17* | *18* | *19* | *20* | | | | |
| Control | 11 | 13 | 14 | 13 | 10 | 10 | 12 | 11 | 13 | 15 | 13 | 12 | 14 | 15 | 16 | 14 | 13 | 10 | 10 | 12 | 12,55 | 1,82 | 13,00 | 2,00 |
| Der-1 | 9 | 8 | 12 | 10 | 14 | 12 | 9 | 10 | 12 | 7 | 9 | 6 | 6 | 7 | 8 | 4 | 7 | 8 | 12 | 8 | 8,90 | 2,53 | 8,50 | 3,00 |
| Der-2 | 8 | 9 | 9 | 8 | 8 | 7 | 9 | 7 | 8 | 12 | 10 | 9 | 9 | 9 | 10 | 10 | 15 | 15 | 11 | 14 | 9,85 | 2,41 | 9,00 | 2,00 |
| Der-3 | 3 | 8 | 1 | 7 | 6 | 4 | 10 | 9 | 10 | 4 | 8 | 6 | 8 | 7 | 6 | 9 | 9 | 8 | 9 | 7 | 6,95 | 2,42 | 7,50 | 3,00 |
| Der-4 | 12 | 11 | 4 | 12 | 6 | 5 | 8 | 12 | 6 | 6 | 6 | 4 | 6 | 6 | 4 | 7 | 6 | 5 | 4 | 4 | 6,70 | 2,81 | 6,00 | 3,00 |
| Der-5 | 9 | 9 | 8 | 10 | 9 | 3 | 5 | 6 | 9 | 11 | 11 | 8 | 2 | 2 | 8 | 10 | 9 | 5 | 5 | 5 | 7,20 | 2,86 | 8,00 | 4,00 |
| Der-6 | 10 | 12 | 10 | 14 | 15 | 11 | 15 | 15 | 8 | 7 | 11 | 9 | 4 | 14 | 15 | 9 | 10 | 13 | 10 | 10 | 11,10 | 3,02 | 10,50 | 5,00 |
| Der-7 | 10 | 9 | 10 | 10 | 7 | 7 | 14 | 11 | 11 | 13 | 9 | 7 | 8 | 9 | 8 | 11 | 12 | 8 | 7 | 12 | 9,65 | 2,11 | 9,50 | 3,00 |

**Tabla 8. Número de cancros por hoja en ensayos de infección in planta de C. sienensis.** Se informan los valores del número de cancros por hoja, como así también la media y la mediana para cada planta. El ensayo de infección incluyó 20 hojas de cada línea transgénica y 20 hojas de la planta control. El número de cancros informado se contabilizó a los 40 d.p.i. Se utilizó un inóculo de X. axonopodis de $1x10^5$ u.f.c./mL.

Del mismo modo que en los ensayos anteriores, en la Tabla 8 se observan diferencias considerables entre las plantas ensayadas respecto del número de cancros por hoja. Sin embargo, a pesar de que los valores de la media y la mediana en todas las líneas transgénicas ensayadas son menores respecto al control, se observa una alta variabilidad de los datos (cancros por hoja). A partir de la repetición de estas observaciones, se estimó la dispersión de las mediciones utilizando los valores que se informan en la Tabla 8. El resultado de este análisis se muestra en la Figura 56.

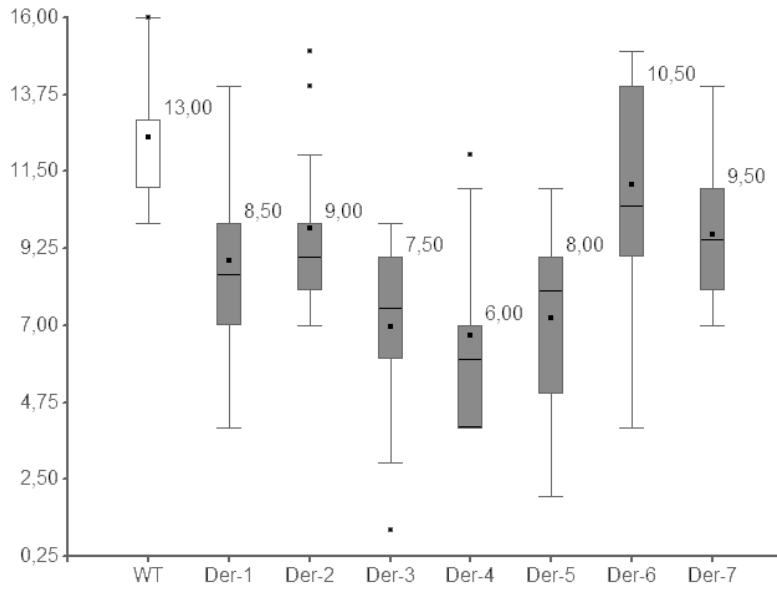



**Figura 56. Analisis de dispersión del número de cancros por hoja para plantas transgénicas y el control.** El análisis se presenta bajo la forma de box plot (o gráfico de cajas y bigotes). Cada caja representa el 50% de los valores analizados, mientras que las barras verticales indican la desviación de los valores atípicos. Dentro de las cajas se indica el valor de mediana como una línea horizontal (valor indicado a la derecha de la caja) y el valor de la media con un punto negro.

Los datos muestran una alta dispersión, aunque menor a la observada en los dos primeros ensayos de infección, debido en gran parte al aumento del n de la muestra. Como en el caso de los ensayos previos, se utilizó una escala de frecuencia de formación de cancros (contemplando las mismas categorías de frecuencia) para facilitar la interpretación de los resultados (Figura 57).

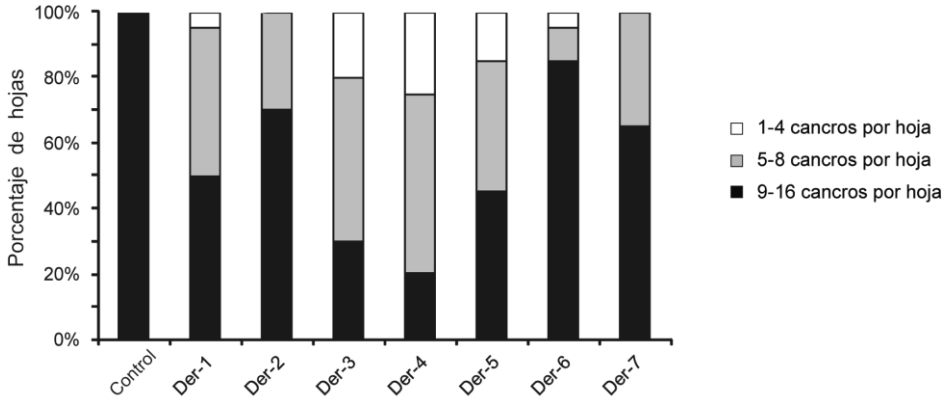



**Figura 57. Porcentaje de hojas por categoría de frecuencia de formación de cancros.** Cada hoja fue clasificada, según la frecuencia de formación de cancros, en categoría baja (blanco), moderada (gris) o alta (negro). En el ensayo de infección se incluyeron 20 hojas de cada línea transgénica y 20 hojas de la planta control.

Como se puede observar en la Figura 57, el 100% de las hojas del control presentan una frecuencia de formación de cancros alta (9-16 cancros por hoja). Por el contrario, cinco de las plantas transgénicas (Der-1, Der-3, Der4, Der-5 y Der-6) mostraron entre 5-25% de hojas con una baja frecuencia de formación de cancros (1-4 cancros por hojas), y entre 10-55% de hojas con una moderada frecuencia de formación de cancros (5-8 cancros por hojas).

En relación al análisis estadístico, el resultado del test aplicado (ANOVA no parámetrico de Kruskal-Wallis) indicó que existen diferencias significativas entre las distintas plantas ensayadas en cuanto a la cantidad de cancros por hoja ($P<0,00001$; Tabla 9). A partir del análisis de comparaciones múltiples de Dunn (dms) se pudo concluir que las plantas transgénicas Der-3, Der-4 y Der-5 mostraron diferencias significativas respecto de la planta control, en cuanto al número de cancros por hoja (Tabla 10). Por el contrario, las plantas transgénicas Der-1, Der-2, Der-6 y Der-7 no mostraron diferencias significativas respecto al control. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las distintas plantas transgénicas (Tabla 10).

**Kruskal-Wallis ANOVA por Rangos**

| Línea | Control | Der-1 | Der-2 | Der-3 | Der-4 | Der-5 | Der-6 | Der-7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| n | 20,00 | 20,00 | 20,00 | 20,00 | 20,00 | 20,00 | 20,00 | 20,00 |
| Σ R | 2636,50 | 1520,50 | 1793,50 | 976,00 | 877,50 | 1110,00 | 2193,00 | 1773,00 |
| R promedio | 131,83 | 76,03 | 89,68 | 48,80 | 43,88 | 55,50 | 109,65 | 88,65 |
| Mediana | 13,00 | 8,50 | 9,00 | 7,50 | 6,00 | 8,00 | 10,50 | 9,50 |

Kruskal-Wallis ANOVA por Rangos
Variable independiente (de agrupamiento): Línea
Variable dependiente: Cancros
H ( 7, N= 160) = 62,35013
*P* < 0,00001

**Tabla 9. Análisis estadístico del número de cancros por hoja en las plantas ensayadas.** Los datos informados en la Tabla se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico por rangos). El análisis estadístico se efectuó utilizando el número de cancros por hoja para cada una de las plantas ensayadas. Los cálculos se realizaron con el software Statistica 7.0 (valor de P < 0,00001). El ensayo de infección incluyó 20 hojas de cada planta transgénica y 20 hojas de la planta control.

| Comparación | $\bar{R}1-\bar{R}2$ | *dms* | S / NS |
|---|---|---|---|
| Control vs. Der-1 | 55,80 | 71,68 | NS |
| Control vs. Der-2 | 42,15 | 71,68 | NS |
| Control vs. Der-3 | 83,03 | 71,68 | S |
| Control vs. Der-4 | 87,95 | 71,68 | S |
| Control vs. Der-5 | 76,33 | 71,68 | S |
| Control vs. Der-6 | 22,18 | 71,68 | NS |
| Control vs. Der-7 | 43,18 | 71,68 | NS |
| Der-1 vs. Der-2 | 13,65 | 71,68 | NS |
| Der-1 vs. Der-3 | 27,23 | 71,68 | NS |
| Der-1 vs. Der-4 | 32,15 | 71,68 | NS |
| Der-1 vs. Der-5 | 20,53 | 71,68 | NS |
| Der-1 vs. Der-6 | 33,63 | 71,68 | NS |
| Der-1 vs. Der-7 | 12,63 | 71,68 | NS |
| Der-2 vs. Der-3 | 40,88 | 71,68 | NS |
| Der-2 vs. Der-4 | 45,80 | 71,68 | NS |
| Der-2 vs. Der-5 | 34,18 | 71,68 | NS |
| Der-2 vs. Der-6 | 19,98 | 71,68 | NS |
| Der-2 vs. Der-7 | 1,02 | 71,68 | NS |
| Der-3 vs. Der-4 | 40,88 | 71,68 | NS |
| Der-3 vs. Der-5 | 6,70 | 71,68 | NS |
| Der-3 vs. Der-6 | 60,85 | 71,68 | NS |
| Der-3 vs. Der-7 | 39,85 | 71,68 | NS |
| Der-4 vs. Der-5 | 11,63 | 71,68 | NS |
| Der-4 vs. Der-6 | 65,78 | 71,68 | NS |
| Der-4 vs. Der-7 | 44,78 | 71,68 | NS |
| Der-5 vs. Der-6 | 54,15 | 71,68 | NS |
| Der-5 vs. Der-7 | 33,15 | 71,68 | NS |
| Der-6 vs. Der-7 | 21,00 | 71,68 | NS |

**Tabla 10. Análisis de comparación múltiple de la frecuencia de formación de cancros por hoja.** Para el análisis de los datos se utilizó el método de contrastes de Dunn (dms), realizando comparaciones de a pares entre las plantas transgénicas y el control, y entre las distintas plantas transgénicas. El análisis estadístico se realizó con los datos mostrados en la Tabla 8. El ensayo de infección incluyó 20 hojas de cada planta transgénica y 20 hojas de la planta control. S: diferencias significativas; NS: sin diferencias significativas.

## 14. Ensayos de infección de plantas transgénicas de C. sinensis en condiciones de invernadero.

Al momento de la presentación de esta Tesis, no se habían realizado aún los ensayos de infección en invernadero previstos inicialmente en el Plan de Trabajo. Para poder efectuarlos, se estableció un convenio de colaboración entre la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC-CONICET, provincia de Tucumán), el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (IBBM-FCE-UNLP) y el Laboratorio de Agrobiotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEyN-UBA). El convenio de colaboración forma parte del expediente N ° S01: 0397274/2011, presentado al Instituto Nacional de la Semilla (INASE) y a la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA). El traslado de las plantas fue aprobado en la Resolución 360 del MAGyP, 18 de julio de 2012. Cuestiones de calendario de trabajo y dificultades administrativas retrasaron el inicio de los ensayos. Sin embargo, se estima que las plantas transgénicas de C. sinensis serán transportadas a Tucumán en marzo-abril de 2013 para iniciar la propagación del material vegetal. Sobre esta base, los ensayos de infección en los invernaderos de la EEAOC se efectuarían durante el segundo semestre de 2013.

# Discusión

La Cancrosis de los cítricos es una enfermedad de relevancia económica, presente en la mayoría de las zonas productoras de cítricos de todo el mundo a excepción de Europa. El agente causal de la enfermedad es la bacteria X. axonopodis pv. citri. Dado que hasta el momento no se dispone de especies de cítricos resistentes a la infección, y que no existen además procedimientos eficaces y sustentables para prevenir la infección bacteriana, más allá de aplicación sistemática de bactericidas a base de cobre en las plantaciones afectadas, el desarrollo de resistencia mediante ingeniería genética resultaría de gran utilidad para controlar eficazmente el desarrollo de la enfermedad.

Hace algunos años, a partir de la aparición o re-emergencia de la Cancrosis en las zonas de cultivo extensivo de los principales países productores de cítricos, los estados libres de Xanthomonas establecieron barreras para-arancelarias a los frutos de regiones consideradas endémicas. Esta situación, sumada a los avances de la ingeniería genética, la biología molecular y la bioinformática, desató una carrera por el control de la enfermedad utilizando diferentes estrategias biotecnológicas para introducir resistencia a la enfermedad. Una de ellas, cuyo resultado fue favorable, es el desarrollo de Yang et al. (2010), en el que expresaron constitutivamente en plantas de naranjo la proteína truncada PthA de X. axonopodis pv. citri, interfiriendo en el desarrollo de la infección bacteriana. No obstante, como en otros casos de resistencia derivada del patógeno, la protección brindada por esta estrategia podría limitarse a la especie donante, pudiendo ser superada por la aparición de cepas resistentes en condiciones de selección prolongada en el campo. Más recientemente, Fu et al. (2011) reportaron la atenuación de la enfermedad mediante la transformación genética de plantas de naranjo con espermidina sintasa de manzano (Malus sylvestris), como resultado de una mayor acumulación de $H_2O_2$ a nivel intracelular. Aunque esta estrategia tiene la ventaja de inducir resistencia de amplio espectro contra patógenos microbianos, el hecho de interferir en la producción de $H_2O_2$ endógeno puede afectar varias funciones fisiológicas importantes de la planta, como el inicio de la maduración de la fruta, la latencia de las semillas, el cierre de los estomas producido por ácido abscísico (ABA), e incluso puede provocar la muerte celular programada (Brennan et al., 1977; Pei et al., 2000; Neill et al., 2001; Gechev et al., 2006; Gadjev et al., 2008).

Un enfoque más prometedor que combina protección de amplio espectro y mecanismos antibacterianos específicos, es el uso de secuencias peptídicas antimicrobianas. Este enfoque ha sido aplicado con éxito en diferentes especies de plantas de interés

agronómico (Ko et al., 2000; Boscariol et al., 2006; Osusky et al., 2005; Almasia et al., 2008; Rivero et al., 2012). En el caso particular de cítricos, Cardoso et al. (2010) expresaron constitutivamente el péptido antimicrobiano attacina A del lepidóptero Tricloplusia ni, logrando una reducción del 22-40% del "área de la hoja afectada" (LDA, leaf diseased area) por X. axonopodis en plantas transgénicas de naranjo.

En base a estos antecedentes y a la experiencia previa en el Laboratorio de Agrobiotecnología (FCEyN-UBA) con el péptido antimicrobiano dermaseptina y la enzima bacteriolítica lisozima expresados en plantas de S. tuberosum (Rivero et al., 2012), se decidió evaluar el efecto del péptido y de la enzima sobre el crecimiento de Xanthomonas spp. En comparación con otros péptidos líticos, dermaseptina exhibe actividad antibacteriana y antifúngica a niveles micromolares y no es tóxico para los seres humanos (Amiche and Galanth, 2011; Mor et al., 1994; Nicolas and Amiche 2006). Por otro lado, la lisozima proveniente de distintos organismos ha sido utilizada para conferir resistencia a bacterias fitopatógenas Gram-negativas en distintas especies de plantas, obteniéndose resultados favorables (Düring et al., 1993; Nakajima et al., 1997; Ko et al., 1999; Rivero et al., 2012).

Dado que la actividad de dermaseptina y de lisozima frente a Xanthomonas spp. no se había demostrado previamente, se llevaron a cabo una serie de ensayos in vitro que permitieron establecer una C.I.M. de 10 µg/mL para X. axonopodis y una C.I.M. de 20 µg/mL para X. campestris. A su vez, se demostró que a concentraciones mayores a 10 ng/mL lisozima inhibe el crecimiento de la cepa X. campestris, mientras que el crecimiento de X. axonopodis comienza a inhibirse a concentraciones mayores a 50 ng/mL. Debe remarcarse que las concentraciones a las cuales se produce la inhibición por efecto del péptido y de la enzima no son comparables, ya que la metodología empleada en los ensayos fue diferente (Secciones 14.1. y 14.2. de Materiales y Métodos). A partir de la demostración del efecto bactericida del péptido y de la enzima sobre Xanthomonas, se desarrollaron dos construcciones genéticas que permiten la expresión constitutiva y la exportación a apoplasto de dermaseptina y de lisozima. A su vez, la reducción de la sintomatología de X. axonopodis por el efecto de dermaseptina expresada en forma transitoria en ensayos in planta, permitió convalidar la elección de dermaseptina y lisozima como genes de interés para conseguir resistencia a este patógeno.

Con la idea de utilizar el patosistema N. benthamiana-X. campestris como un modelo más flexible de ensayo de las construcciones, se obtuvieron plantas transgénicas en esta

especie y se las empleo en ensayos de agroinfiltración y de titulación de Xanthomonas. Llamativamente, no se observaron diferencias significativas respecto de los controles en ninguno de los ensayos realizados, tanto con plantas transformadas con dermaseptina como con lisozima. Las causas de estos resultados no resultan claras y podrían atribuirse a distintos factores. Una posible hipótesis para explicar la ausencia de diferencias podrían ser los bajos niveles de expresión del péptido y de la enzima en las plantas transformadas a lo que, en los ensayos de infiltración, se suma el hecho de que las bacterias ingresan directamente al apoplasto de la planta, evadiendo así las barreras mecánicas de defensa. A partir de esta situación, se descartó el patosistema N. benthamiana-X. campestris para evaluar el efecto de los transgenes sobre el crecimiento de la Xanthomonas en ensayos in planta. Como alternativa a estos experimentos, y con el fin de probar el efecto in vitro de los transgenes antibacterianos, se realizaron experimentos de inhibición utilizando extractos totales de las mismas plantas. Sin embargo, en ninguna de las dos variantes del experimento de inhibición in vitro (en medio líquido y en medio sólido) se observaron diferencias significativas entre los extractos de las plantas control y los de las plantas transformadas genéticamente. Para entender lo sucedido, se propusieron dos alternativas posibles: 1) los niveles de dermaseptina y lisozima presentes en los extractos vegetales de plantas adultas son insuficientes para inhibir la concentración de bacteria utilizada como inóculo; 2) la metodología utilizada para realizar los extractos vegetales de plantas adultas no permite aislar el péptido y la enzima en el buffer de extracción. Como resultado de estos ensayos, se descartó también la utilización de extractos totales de plantas transformadas de N. benthamiana para probar el efecto in vitro de los transgenes antibacterianos. Por último, se realizaron ensayos de inhibición utilizando extractos de plantas transformadas jóvenes de N. benthamiana, con el fin de comprobar si la etapa de desarrollo de la planta interfería en la actividad antimicrobiana de los transgenes. En contraste con los resultados obtenidos con plantas adultas, los extractos totales de estas plantas inhibieron el crecimiento de X. axonopodis en ensayos in vitro. Para explicar esto, existen al menos tres alternativas posibles: 1) el tamaño celular en hojas jóvenes es considerablemente menor al de las hojas maduras por lo que, a igual masa de tejido, la cantidad de células correspondiente a las primeras es mayor. Por lo tanto, la cantidad de péptido o enzima liberada al buffer de extracción a partir de un número mayor de células, permitirían la inhibición bacteriana; 2) la metodología utilizada para realizar los extractos vegetales a partir de plantas jóvenes permite aislar en el buffer de extracción al péptido y la enzima (lo cual no ocurre al utilizar hojas de plantas adultas); 3) en las hojas de las plantas

adultas de N. benthamiana existen componentes inhibitorios de la actividad de dermaseptina y de lisozima que son liberados al buffer durante la extracción. Si bien estas hipótesis permitirían proponer nuevos experimentos para explorar mejor estas observaciones, debido a la falta de tiempo y recursos para abordarlos se decidió no seguir profundizando en esta dirección. Sin embargo, fueron suficientes para demostrar la inhibición in vitro del crecimiento de X. axonopodis por efecto de la expresión de los transgenes antimicrobianos en las plántulas transformadas genéticamente.

En cuanto al patosistema principal de la Tesis, durante la trasformación de C. sinensis surgieron complicaciones por contaminación con levaduras endógenas presentes en el material de partida. Esta dificultad repercutió en la eficiencia del proceso de transformación, dado que el crecimiento de estos microorganismos provocaba senescencia y pudrición de los explantos a las semanas de iniciados los ensayos. Una vez solucionado este inconveniente, se logró la regeneración de brotes transformados a partir de explantos y luego de las etapas de multiplicación in vitro y en porta-injertos, se obtuvieron 7 plantas de C. sinensis transformadas con la secuencia de dermaseptina. Se evaluó la integración del transgen en cada una de las plantas mediante un análisis de Southern blot, y se estimó el número de copias insertadas en el genoma de cada planta. Adicionalmente, se confirmó la expresión del ARNm del transgen mediante RT-PCR. Sin embargo, no se pudo establecer el nivel de dermaseptina expresada mediante pruebas inmunológicas ya que, a pesar de los repetidos intentos de obtener anticuerpos de alta afinidad, el nivel inferior del péptido detectado por el antisuero generado fue del orden de 1 ng. A pesar de ello, la purificación parcial de los extractos de la planta transgénica Der-5 y del control sin transformar mediante una columna de filtración molecular, permitieron detectar la presencia de dermaseptina en el extracto de una de las plantas transgénicas. Si bien este resultado es aún preliminar y sería necesario extenderlo a las otras plantas obtenidas, permite inferir que dermaseptina se acumula en bajas concentraciones en el tejido vegetal.

Una vez alcanzado el desarrollo adecuado, las plantas transgénicas de C. sinensis se sometieron a ensayos de infección controlados con X. axonopodis. Considerando la magnitud de los síntomas de la enfermedad, determinada por la dimensión del halo clorótico, la presencia del margen húmedo o water soaking alrededor de la herida, y la dimensión de los cancros, todas las plantas transgénicas mostraron una menor severidad de infección y un retraso variable de la aparición de los cancros respecto del control sin transformar. En los dos

primeros ensayos de infección (realizados con 9-12 hojas por planta), el retraso en la aparición de síntomas fue más notorio en las plantas transgénicas Der-5 y Der-6, plantas que mostraron el fenotipo de resistencia más evidente. Sin embargo, la alta variabilidad del número de cancros por hoja desarrollados en una misma planta, indujo a elaborar una escala de frecuencia de formación de cancros para clasificar las hojas y de esta manera detectar patrones de resistencia en las distintas plantas que facilitaran la interpretación de los resultados. El control mostró más del 92% de hojas con una frecuencia de formación de cancros alta (9-16 cancros/hoja), contrariamente a lo ocurrido en las plantas transgénicas, en las que este valor no superó el 54%. Por otra parte, excepto la planta Der-4, que se comportó de forma similar al control sin transformar, las plantas transgénicas mostraron entre 11-44% de hojas con una baja frecuencia de formación de cancros (1-4 cancros por hoja), mientras que el control no tuvo hojas dentro de esta categoría.

En el tercer y último ensayo de infección (realizado con 20 hojas por planta), las plantas transgénicas que mostraron el fenotipo de resistencia más evidente y el retraso en la aparición de síntomas más notorio fueron Der-4 y Der-5. En cuanto a la escala de frecuencia de formación de cancros para clasificar las hojas, el control mostró el 100% de las hojas con una frecuencia de formación de cancros alta, frente al 20-80% de las plantas transgénicas. A su vez, las plantas transgénicas mostraron un 5-20% de hojas con una baja frecuencia de formación de cancros (excepto las líneas Der-2 y Der-7), mientras que el control no tuvo hojas dentro de esta categoría. El hecho que las plantas hayan presentado mayores porcentajes de hojas con alta frecuencia de formación de cancros en el último ensayo de infección realizado, tanto en los controles como en las plantas transgénicas, pudo deberse a un aumento del nivel de deterioro general de las plantas originado por la permanencia durante varios meses en cuartos de crecimientos pequeños que, por limitaciones de espacio y de recursos, no resultan adecuados para el crecimiento de plantas de este tipo. Sin embargo, para cada uno de los ensayos realizados, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de cancros por hoja entre las plantas transgénicas y el control, lo que indica que las plantas evaluadas no se comportaron de la misma forma frente a la infección con *X. axonopodis*. El análisis de contrastes posterior permitió establecer que en los ensayos de infección realizados con 9-12 hojas por planta, excepto la planta Der-4, todas las plantas transgénicas mostraron un número de cancros por hoja significativamente menor que el control sin transformar. En cambio, en el ensayo de infección realizado con 20 hojas por

planta, sólo las plantas Der-3, Der-4 y Der-5 mostraron diferencias significativas respecto del control en términos de cancros por hoja, mientras que las plantas Der-1, Der-2, Der-6 y Der-7 no mostraron diferencias significativas respecto del control. En relación con este resultado, pueden hacerse dos observaciones. La primera es que la resistencia disímil de las mismas plantas en un mismo tipo de ensayo está determinada por diversos factores independientes de la transgénesis, entre los cuales el estado fisiológico de las plantas antes de ser desafiadas es uno de los más influyentes. En segundo lugar, enfatiza la necesidad de considerar, para cada planta, el conjunto de los criterios definidos para evaluar susceptibilidad/resistencia: magnitud de los síntomas, retraso en su aparición y número de cancros formados por hoja. Considerados en conjunto, estos criterios muestran que todas las plantas transgénicas, incluso en el tercer ensayo, muestran una menor susceptibilidad a la infección con X. axonopodis respecto del control, lo que puede explicarse por el tratamiento común a todas ellas (transformación genética).

Debido a la falta de anticuerpos eficaces, no se pudo establecer una relación directa entre los niveles de acumulación de dermaseptina y el grado de resistencia de las plantas transgénicas. Por otro lado, dado que los resultados de los ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano y los ensayos de infección in planta no son comparables, la concentración de dermaseptina mínima necesaria para conferir resistencia en las plantas transgénicas de C. sinensis no puede ser estimada. Sin embargo, las diferencias en los fenotipos de resistencia de las plantas transgénicas fueron observados consistentemente a nivel de la intensidad de la sintomatología y del retraso en la aparición de los síntomas, tanto en los ensayos preliminares como en los ensayos generales de infección que incluyeron a todas las plantas transgénicas. Por todo esto, puede concluirse taxativamente que la expresión de dermaseptina indujo resistencia parcial a la infección con X. axonopodis de las plantas transgénicas de C. sinensis.

Teniendo en cuenta la actividad antimicrobiana de amplio espectro que mostró la dermaseptina (Osusky et al., 2005; Rivero et al., 2012), este péptido podría ser empleado para introducir la resistencia a otras bacterias y hongos fitopatógenos que afectan a los cítricos. En este sentido, sería de interés probar la susceptibilidad de las plantas transgénicas que expresan dermaseptina frente a Ca. Liberibacter spp., agente causal de la enfermedad HLB (Huanglongbing; Bové 2006), y frente a X. fastidiosa, agente causal de la enfermedad CVC (Clorosis Variegada de los Cítricos; Hartung et al., 1994). Se ha demostrado, en ensayos de

inhibición in vitro con dermaseptina S1, un homólogo del péptido utilizado en este trabajo, se ha demostrado un efecto inhibitorio sobre X. fastidiosa (Kuzina et al., 2006). Cabe aclarar que la secuencia de dermaseptina utilizada en esta Tesis difiere solamente en un residuo N-terminal de metionina adicional, respecto de la S1.

Dado que los ensayos de infección controlados no pueden extrapolarse directamente a las condiciones reales de la agricultura, los resultados obtenidos en esta Tesis de Doctorado deben ser confirmados en ensayos de invernadero y de campo. Si la reducción de la frecuencia de formación de cancros y la disminución en la severidad de los síntomas descriptos en este trabajo se mantuvieran en tales condiciones, la estrategia utilizada aquí se podría emplear para restringir la propagación de Xanthomonas y para mejorar la eficiencia en el manejo de la Cancrosis. Para ello, se logró la aprobación por parte de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) y del Instituto Nacional de la Semilla (INASE) para realizar los ensayos de infección en los invernaderos de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC-CONICET, provincia de Tucumán). Durante 2013 se llevarán a cabo los ensayos de infección en invernadero y, en función de los resultados, se solicitará autorización para realizar posteriormente los ensayos a campo.

# Conclusiones y Perspectivas

## Conclusiones

1) Se demostró el efecto inhibitorio del péptido dermaseptina sobre X. axonopodis pv. citri y sobre X. campestris pv. campestris cepa 8004.
2) Se demostró el efecto inhibitorio de lisozima (HEWL) sobre sobre X. axonopodis pv. citri y sobre X. campestris pv. campestris cepa 8004.
3) Se obtuvieron mediante ingeniería genética las construcciones pBIN19sgfp-Der y pBIN19sgfp-Liz, que permiten la expresión constitutiva de los transgenes y la exportación de los productos génicos hacia el apoplasto.
4) La co-infiltración de A. tumefaciens (portando la construcción genética pBIN19sgfp-Der) y X. axonopodis pv. citri en hojas de N. benthamiana permitió disminuir los síntomas conspicuos (clorosis) que produce la bacteria.
5) Se descartó a N. benthamiana–X. campestris pv. campestris cepa 8004 como patosistema modelo para realizar ensayos preliminares de infección in planta.
6) Los extractos de plántulas de N. benthamiana transformadas genéticamente (generación F2) con la secuencia de dermaseptina, inhiben el crecimiento in vitro de X. axonopodis pv. citri.
7) Los extractos de plántulas de N. benthamiana (generación F2) transformadas genéticamente con la secuencia de lisozima, inhiben el crecimiento in vitro de X. axonopodis pv. citri.
8) Las plantas transgénicas de C. sinensis (L) Osbeck para la secuencia de dermaseptina mostraron resistencia parcial a la infección con X. axonopodis pv. citri.

## Perspectivas

El trabajo desarrollado durante la presente Tesis de Doctorado constituye una prueba de concepto sólida sobre el efecto bactericida de dermaseptina y de lisozima sobre Xanthomonas spp. A su vez, se demostró la factibilidad de la utilización del péptido antimicrobiano para lograr resistencia parcial frente a la Cancrosis de los cítricos en plantas transgénicas de C. sinensis. Sin embargo, la estrategia biotecnológica desarrollada puede ser

mejorada para incrementar los niveles de resistencia obtenidos, a través del apilamiento de genes antimicrobianos con distintos mecanismos de acción dentro de una misma planta (por ejemplo lisozima, para la cual se demostró el efecto sobre Xanthomonas). También se podrían diseñar nuevas construcciones genéticas que permitan la eliminación de los marcadores de selección y/o los transgenes del fruto, evitando los inconvenientes generados por la opinión pública sobre los alimentos genéticamente modificados. A su vez, se plantea la posibilidad de la utilización de las plantas transgénicas de C. sinensis obtenidas durante la Tesis para desafiarlas frente a otros patógenos de de interés, tales como X. fastidiosa y Ca. Liberibacter, responsables de la CVC y el HLB, respectivamente. En lo inmediato, se prevee realizar ensayos de infección en invernadero en la Estación Experimental Agroindustria Obispo Colombres (Tucumán), utilizando un número de plantas superior al utilizado en los ensayos llevados a cabo en cámaras de crecimiento. Por último, en el futuro deberán realizarse ensayos a campo que permitan demostrar que la estrategia biotecnológica escogida puede ser empleada para obtener resistencia frente a X. axonopodis pv. citri en las condiciones reales de la agricultura.

# Bibliografía

- Agrios, G.N. (1997). Plant Pathology. Academic Press, 1997.
- Almasia, N.I., Bazzini, A.A., Hopp, H.E., and Vazquez-Rovere, C. (2008). Overexpression of snakin-1 gene enhances resistance to Rhizoctonia solani and Erwinia carotovora in transgenic potato plants. Molecular plant pathology 9, 329-338.
- Amiche, M., and Galanth, C. (2011). Dermaseptins as models for the elucidation of membrane-acting helical amphipathic antimicrobial peptides. Curr Pharm Biotechnol 12, 1184-1193.
- Abramovitch, R.B., Janjusevic, R., Stebbins, C.E., and Martin, G.B. (2006). Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 2851-2856.
- Alfano, J.R., and Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. Annual Review of Phytopathology 42, 385-414.
- Behlau, F., Canteros, B.I., Minsavage, G.V., Jones, J.B., and Graham, J.H. (2011). Molecular characterization of copper resistance genes from Xanthomonas citri subsp. citri and Xanthomonas alfalfae subsp. citrumelonis. Applied and environmental microbiology 77, 4089-4096.
- Beintema J. J. and Terwisscha van Scheltinga A. C. (1996). Plant Lysozyme. In: Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology. Jollès, P. (Ed.). pp. 75–87. ISBN 978-3-7643-5121-2.
- Bespalhok Filho J. K., Kobayashi A. K., Protásio Pereira L. F., Esteves Vie L. G. (2001). Laranja Transgênica. Biotecnologia Ciência and Desenvolvimento, Nº 23, Novembro/Dezembro 2001.
- Boscariol, R.L., Monteiro, M., Takahashi, E.K., Chabregas, S.M., Vieira, M.L.C., Vieira, L.G.E., Pereira, L.F.P., Mourão Filho, F.d.A.A., Cardoso, S.C., Christiano, R.S.C., et al. (2006). Attacin A Gene from Tricloplusia ni Reduces Susceptibility to Xanthomonas axonopodis pv. citri in Transgenic Citrus sinensis `Hamlin'. Journal of the American Society for Horticultural Science 131, 530-536.
- Bové, J.M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology 88, 7-37.

- Braeken K., Daniels R., Ndayizeye M., Vanderleyden J., Michiels J. (2008). Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence. Chapter 11: Quorum Sensing in Bacteria-Plant Interactions. DOI: 10.1007/978-3-540-75575-3.
- Brennan, T., and Frenkel, C. (1977). Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. Plant physiology 59, 411-416.
- Brlansky, R. H., Davis C. L., Lee, R. F., Timmer L. W. (1993). Immunogold Localization of Xylem-Inhabiting Bacteria Affecting Citrus in Argentina and Brazil. Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. http://www.ivia.es/iocv/archivos/proceedingsXII/12th311_319.pdf.
- Brunings, A.M., and Gabriel, D.W. (2003). Xanthomonas citri: breaking the surface. Molecular plant pathology 4, 141-157.
- Canteros, B. I. (2004). Management of citrus canker in Argentina. A review. Proceedings International Society of Citriculture 2004 International Citrus Congress, Agadir, Morocco 2, 696-704.
- Canteros, B. I. (2009a). Programa de exportación de cítricos a la Unión Europea de zonas con presencia de cancro en argentina: generación y desarrollo de tecnología para superar las restricciones cuarentenarias. Taller Internacional sobre Plagas Cuarentenarias de los Cítricos. Villahermosa, Tabasco, México (2009). http://www.calcitrusquality.org/wp-content/uploads/2009/05/mexico-2009-canteros-bi-manuscript-taller-cuarentenarias-v.pdf.
- Canteros, B. I. (2009b). Guía para la identificación y manejo de las enfermedades fúngicas y bacterianas en Citrus. Programa de Fortalecimiento de la Citricultura Correntina. 2009-2010. INTA, SENASA, Gob. de la Prov. de Corrientes, Corporación del Mercado Central, Consejo Federal de Inversiones. ISBN 978-987-05-6059-3.
- Canteros, B. I. et al., 2010. Management and characterization of plasmid encoded copper resistance in Xanthomonas axonopodis pv. citri (p. 145). In Proceedings of the 12th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. INRA-CIRAD, Reunion Island, France.
- Cardoso, S., Barbosa-Mendes, J., Boscariol-Camargo, R., Christiano, R., Filho, A., Vieira, M., Mendes, B., and Mourão Filho, F.d. (2010). Transgenic Sweet Orange (Citrus sinensis L. Osbeck) Expressing the attacin A Gene for Resistance to Xanthomonas citri subsp. citri. Plant Mol Biol Rep 28, 185-192.

- Carmona, M.J., Molina, A., Fernandez, J.A., Lopez-Fando, J.J., and Garcia-Olmedo, F. (1993). Expression of the alpha-thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. Plant J 3, 457-462.
- Chakrabarti, A., Ganapathi, T.R., Mukherjee, P.K., and Bapat, V.A. (2003). MSI-99, a magainin analogue, imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana. Planta 216, 587-596.
- Chiu, W., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., and Sheen, J. (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. Curr Biol 6, 325-330.
- Collinge, D.B., Jorgensen, H.J., Lund, O.S., and Lyngkjaer, M.F. (2010). Engineering pathogen resistance in crop plants: current trends and future prospects. Annu Rev Phytopathol 48, 269-291.
- Coote, P.J., Holyoak, C.D., Bracey, D., Ferdinando, D.P., and Pearce, J.A. (1998). Inhibitory action of a truncated derivative of the amphibian skin peptide dermaseptin s3 on Saccharomyces cerevisiae. Antimicrob Agents Chemother 42, 2160-2170.
- Damsteegt, V.D., Brlansky, R.H., Phillips, P.A., and Roy, A. (2006). Transmission of Xylella fastidiosa, Causal Agent of Citrus Variegated Chlorosis, by the Glassy-Winged Sharpshooter, Homalodisca coagulata. Plant disease 90, 567-570.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411, 826-833.
- Daniels, M.J. (1992). Bacteria. In: Molecular Plant Pathology. A Practical Approach. Vol. I. Gurr, S.J., McPherson, M.J. and Bowles, D.J. (Eds.). ISBN: 9780199631025.
- De Lucca, A.J., Bland, J.M., Grimm, C., Jacks, T.J., Cary, J.W., Jaynes, J.M., Cleveland, T.E., and Walsh, T.J. (1998). Fungicidal properties, sterol binding, and proteolytic resistance of the synthetic peptide D4E1. Can J Microbiol 44, 514-520.
- DeGray, G., Rajasekaran, K., Smith, F., Sanford, J., and Daniell, H. (2001). Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. Plant physiology 127, 852-862.
- Dong, Y.H., and Zhang, L.H. (2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. J Microbiol 43 Spec No, 101-109.
- Dow, J.M., and Daniels, M.J. (2000). Xylella genomics and bacterial pathogenicity to plants. Yeast 17, 263-271.

- Düring, K., Porsch, P., Fladung, M., and Lörz, H. (1993). Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium Erwinia carotovora. The Plant Journal 3 (4), 587-598.
- FederCitrus (2011). La Actividad Citrícola Argentina 2011. Federación Argentina del Citrus. www.federcitrus.org.ar/actividad-citricola-2011.pdf.
- Flor, H.H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. Annu Rev Phytopathol 9, 275-296.
- Fu, X.-Z., Chen, C.-W., Wang, Y., Liu, J.-H., and Moriguchi, T. (2011). Ectopic expression of MdSPDS1 in sweet orange (Citrus sinensis Osbeck) reduces canker susceptibility: involvement of $H_2O_2$ production and transcriptional alteration. BMC Plant Biology 11, 55.
- Fuqua, C., Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. Annual review of genetics 35, 439-468.
- Futterer, J., Gisel, A., Iglesias, V., Kloti, A., Kost, B., Mittelsten Sceid, O., Neuhaus-Url, G., Schrott, M., Shillito, R., Spangenber, G., Wang, Z.Y. (1995). Standard molecular techniques for analysis of trangenic plants. In: Potrykus, I., Spangenberg, G. (Eds.), Gene Transfer to Plants. Springer Lab Manual, 25, p. 215.
- Gadjev, I., Stone, J.M., and Gechev, T.S. (2008). Chapter 3: Programmed Cell Death in Plants: New Insights into Redox Regulation and the Role of Hydrogen Peroxide. In International Review of Cell and Molecular Biology, W.J. Kwang, ed. (Academic Press), pp. 87-144.
- Gechev, T.S., and Hille, J. (2005). Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. The Journal of cell biology 168, 17-20.
- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I., and Laloi, C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. BioEssays 28, 1091-1101.
- Goto, M. and Yaguchi, Y. (1979) Relationship between defoliation and disease severity in citrus canker (Xanthomonas citri). Ann. Phytopathol. Soc. Japan, 45, 689–694.
- Goto, M. and Hyodo, H. (1985) Role of extracellular polysaccharides of Xanthomonas campestris pv. citri in the early stage of infection. Ann.Phytopathol. Soc. Japan, 51, 22–31.

- Gottwald, T. R., Graham J. H. And Shubert T. S. (2002). Citrus canker: The pathogen and its impact. Online. Plant Health Progress doi: 10.1094/PHP-2002-0812-01-RV. https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/citruscanker/
- Graham, J.H. (2001). Varietal susceptibility to citrus canker: Observations from southern Brazil. Citrus Ind. 82 (6): 15-17.
- Graham, J.H., Gottwald, T.R., Cubero, J., and Achor, D.S. (2004). Xanthomonas axonopodis pv. citri: factors affecting successful eradication of citrus canker. Molecular plant pathology 5, 1-15.
- Hain, R., Reif, H.J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stocker, R.H., et al. (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature 361, 153-156.
- Hammerschmidt, R. (1999). PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? Annu Rev Phytopathol 37, 285-306.
- Hartung, J.S., Beretta, J., Brlansky, R.H., Spisso, J., and Lee, R.F. (1994). Citrus Variegated Chlorosis Bacterium: Axenic Culture, Pathogenicity, and Serological Relationships with Other Strains of Xylella fastidiosa. The American Phytopathological Society 84, 591-597.
- Hernandez, C., Mor, A., Dagger, F., Nicolas, P., Hernandez, A., Benedetti, E.L., and Dunia, I. (1992). Functional and structural damage in Leishmania mexicana exposed to the cationic peptide dermaseptin. Eur J Cell Biol 59, 414-424.
- Hofius, D., Tsitsigiannis, D.I., Jones, J.D., and Mundy, J. (2007). Inducible cell death in plant immunity. Seminars in cancer biology 17, 166-187.
- Horsch R. B., Fry J. E., Hoffmann N. L., Eichholtz D., Rogers S. G., and Fraley R. T. (1985). A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. Science 227, 1229-1231.
- Huerga, M., and San Juan, S. (2005). El control de las plagas en la agricultura argentina. Estudio Sectorial Agrícola Rural - Banco Mundial/Centro de Inversiones-FAO. http://siteresources.worldbank.org/INTARGENTINAINSPANISH/Resources/InformeDEF14.pdf.
- Justo A. M. and Rivera I. (2009). Inserción de Argentina en el mercado mundial de cítricos. Estudios Socioeconomicos de los Sistemas Agroalimentarios y Agroindustriales. Instituto de Economía y Sociología Rural, INTA. ISSN 1852-4605.

- Ko, K. 2000. Using antimicrobial proteins to enhance plant resistance. DOI: 10.1094/APSnetFeature-2000-0500C.
- Ko, K., Norelli, J.L., Reynoird, J.-P., Aldwinckle, H.S., and Brown, S.K. (2002). T4 Lysozyme and Attacin Genes Enhance Resistance of Transgenic `Galaxy' Apple against Erwinia amylovora. Journal of the American Society for Horticultural Science 127, 515-519.
- Kousik, C. S. y Ritchie, D. F. (1996). Disease potential of pepper bacterial spot pathogen races that overcome the Bs2 gene for resistance. Phytopathology 86:1336-1343.
- Kuzina, L.V., Miller, T.A., and Cooksey, D.A. (2006). In vitro activities of antibiotics and antimicrobial peptides against the plant pathogenic bacterium Xylella fastidiosa. Lett Appl Microbiol 42, 514-520.
- Llacer, G., López, M.M. Trapero, A. y Bello, A. (Eds.). Patología Vegetal. Sociedad Española de Fitopatología, 1996.
- Lee, J.H. Hong, J.B. Hong, S.B. Choi, M.S. Jeong, K.Y. Park, H.J. Hwang, D.J. Lee, S. Ra, D. Heu, S. (2008). Disease-resistant transgenic Arabidopsis carrying the expI gene from Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum SL940. Plant Pathology J, 24 (2), 183-190.
- Loh, J., Pierson, E.A., Pierson Iii, L.S., Stacey, G., and Chatterjee, A. (2002). Quorum sensing in plant-associated bacteria. Current Opinion in Plant Biology 5, 285-290.
- López, A., Zaldúa, Z., Pimentel, E., García, M., García, R., Mena, J., Morán, R., Selman, G. (1996). Modificación del gen de la esporamina de boniato con un fragmento de AND sintético. Secuencia nucleotídica y expresión en Escherichia coli. Biotecnol. Apl. 13, 265–270.
- Mae, A., Montesano, M., Koiv, V., and Palva, E.T. (2001). Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen Erwinia carotovora. Molecular plant-microbe interactions : MPMI 14, 1035-1042.
- Mangussi J. (2008). El impacto económico en Brasil. Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (Candidatus Liberibacter spp.) y el psílido asiático de los cítricos (Diaphorina citri). Hermosillo, México. http://www.concitver.com/huanglongbingYPsilidoAsiatico/Memor%C3%ADa-11%20Mangussi.pdf.

- Marshall, S.H., and Arenas, G. (2003). Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. Electronic Journal of Biotechnology: 6 (3), 2003. DOI: 10.2225/vol6-issue3-fulltext-1.
- McDowell, J.M., and Woffenden, B.J. (2003). Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. Trends in biotechnology 21, 178-183.
- McGarvey P. B. and Kaper (1991). A simple and rapid method for screening transgenic plants using the PCR. BioTechniques 11:428-432.
- Metz, M., Dahlbeck, D., Morales, C.Q., Al Sady, B., Clark, E.T., and Staskawicz, B.J. (2005). The conserved Xanthomonas campestris pv. vesicatoria effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in Nicotiana benthamiana. Plant J 41, 801-814.
- Mitsuhara, I., Matsufuru, H., Ohshima, M., Kaku, H., Nakajima, Y., Murai, N., Natori, S., and Ohashi, Y. (2000). Induced expression of sarcotoxin IA enhanced host resistance against both bacterial and fungal pathogens in transgenic tobacco. Molecular plant-microbe interactions: MPMI 13, 860-868.
- Mor, A., Hani, K., and Nicolas, P. (1994). The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. J Biol Chem 269, 31635-31641.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15, 473-497.
- Nakajima, H., Muranaka, T., Ishige, F., Akutsu, K., and Oeda, K. (1997). Fungal and bacterial disease resistance in transgenic plants expressing human lysozyme. Plant Cell Reports 16, 674-679.
- Nakatsuji, T., and Gallo, R.L. (2012). Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. The Journal of investigative dermatology 132, 887-895.
- Navon-Venezia, S., Feder, R., Gaidukov, L., Carmeli, Y., and Mor, A. (2002). Antibacterial Properties of Dermaseptin S4 Derivatives with In Vivo Activity. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46, 689-694.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., and Hancock, J.T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. Journal of Experimental Botany 53, 1237-1247.
- Nguyen, L.T., Haney, E.F., and Vogel, H.J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends in biotechnology 29, 464-472.

- Nicolas P. and Amiche M. (2006). The Dermaseptins. In: Handbook of Biologically Active Peptides. Kastin, A. J. (Ed). ISBN: 978-0-12-369442-3.
- Ohshima, M., Mitsuhara, I., Okamoto, M., Sawano, S., Nishiyama, K., Kaku, f., Natori, S., and Ohashi, Y. (1999). Enhanced Resistance to Bacterial Diseases of Transgenic Tobacco Plants Overexpressing Sarcotoxin IA, a Bactericidal Peptide of Insect. Journal of Biochemistry 125, 431-435.
- Osusky, M., Osuska, L., Kay, W., and Misra, S. (2005). Genetic modification of potato against microbial diseases: in vitro and in planta activity of a dermaseptin B1 derivative, MsrA2. TAG Theoretical and Applied Genetics 111, 711-722.
- Pei, Z.-M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., and Schroeder, J.I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. Nature 406, 731-734.
- Ramos Méndez C. (2008). Huanglongbing ("citrus greening") y el psílido asiático de los cítricos, una perspectiva de su situación actual. Organismo Internacional Regional de SanidadAgropecuaria.http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/BibliotecaVirtual/CaracterizacionHLB.pdf.
- Rivero, M., Furman, N., Mencacci, N., Picca, P., Toum, L., Lentz, E., Bravo-Almonacid, F., and Mentaberry, A. (2012). Stacking of antimicrobial genes in potato transgenic plants confers increased resistance to bacterial and fungal pathogens. J Biotechnol 157, 334-343.
- Schob H., Kunz C. y Meins F. Jr. (1997). Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. Molecular and General Genetics: 256(5), 581-585.
- Serrano, C., Arce-Johnson, P., Torres, H., Gebauer, M., Gutiérrez, M., Moreno, M., Jordana, X., Venegas, A., Kalazich, J., Holuigue, L., 2000. Expression of the chicken lysozyme gene in potato enhances resistance to infection by Erwinia carotovora subsp. atroseptica. Am. J. Potato Res. 77, 191–194.
- Scnaad, N.W., Jones, J. and Chun, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press.
- Sharma, A., Sharma, R., Imamura, M., Yamakawa, M., and Machii, H. (2000a). Corrigendum to: Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from Bombyx mori, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice (FEBS 24213). FEBS Lett 485, 208.

- Siciliano, F., Torres, P., Sendín, L., Bermejo, C., Filippone, P., Vellice, G., Ramallo, J., Castagnaro, A., Vojnov, A., and Marano, M.R. (2006). Analysis of the molecular basis of Xanthomonas axonopodis pv. citri pathogenesis in Citrus limon. Electronic Journal of Biotechnology 9.
- Stark-Lorenzen, P., Nelke, B., Hänßler, G., Mühlbach, H.P., and Thomzik, J.E. (1997). Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (Oryza sativa L.). Plant Cell Reports 16, 668-673.
- Tai, T.H., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Gajiwala, P., Pasion, R., Whalen, M.C., Stall, R.E. and Staskawicz, B.J. Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. Proceedings National Academy of Science U.S.A., 96:14153-14258, 1999.
- Thomzik, J.E., Stenzel, K., Stocker, R., Schreier, P.H., Hain, R., and Stahl, D.J. (1997). Synthesis of a grapevine phytolexin in transgenic tomatoes (Lycopersicon esculentum mill.) conditions resistance against Phytophthora infestans. Physiological and molecular plant pathology 51, 265-278.
- Torres, P.S., Malamud, F., Rigano, L.A., Russo, D.M., Marano, M.R., Castagnaro, A.P., Zorreguieta, A., Bouarab, K., Dow, J.M., and Vojnov, A.A. (2007). Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in Xanthomonas campestris. Environmental microbiology 9, 2101-2109.
- Wang, G., Li, X., and Wang, Z. (2009). APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. Nucleic Acids Res 37, D933-D937.
- Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Levine, E.B., Fitzsimmons, K.C., and Shah, D.M. (1995). Disease resistance conferred by expression of a gene encoding $H_2O_2$-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. The Plant Cell Online 7, 1357-1368.
- Yang, L., Hu, C., Li, N., Zhang, J., Yan, J., and Deng, Z. (2010). Transformation of sweet orange [Citrus sinensis (L.) Osbeck] pthA-nls for acquiring resistance to citrus canker disease. Plant Molecular Biology 75, 11-23.
- Yaron, S., Rydlo, T., Shachar, D., and Mor, A. (2003). Activity of dermaseptin K4-S4 against foodborne pathogens. Peptides 24, 1815-1821.
- Yun, M.H., Torres, P.S., El Oirdi, M., Rigano, L.A., Gonzalez-Lamothe, R., Marano, M.R., Castagnaro, A.P., Dankert, M.A., Bouarab, K., and Vojnov, A.A. (2006). Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. Plant physiology 141, 178-187.

- Zhang S., Song W. Y., Chen L., Ruan D., Taylor N., Ronald P., Beachy R., Fauquet C. (1998). Transgenic elite Indica rice varieties, resistant to Xanthomonas oryzae pv. oryzae. Molecular Breeding 4: 551–558.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 415, 389-395.
- Zhu, Y.J., Agbayani, R., Jackson, M.C., Tang, C.S., and Moore, P.H. (2004). Expression of the grapevine stilbene synthase gene VST1 in papaya provides increased resistance against diseases caused by Phytophthora palmivora. Planta 220, 241-250.
- Zurbriggen, M.D., Carrillo, N., and Hajirezaei, M.R. (2010). ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? Plant signaling and behavior 5, 393-396.

# Anexo Estadístico

Dado que se pretendía evaluar el efecto del tratamiento aplicado sobre la infección por Xanthomonas en las plantas, el test estadístico elegido fue un Análisis de la Varianza (ANOVA). La variable independiente o factor del ANOVA es la transgénesis, con 8 niveles (cada una de las plantas transgénicas y el control) mientras que la variable dependiente es el número de cancros/hoja desarrollados.

Para decidir si debía aplicarse un test de ANOVA paramétrico o no paramétrico, y considerando que el n fue menor a 30 en todos los ensayos (lo que impide suponer que las distribución de la variable se aproxima a una distribución normal por el Teorema Central del Límite), se evaluaron los supuestos normalidad y homocedacea para el ensayos en que se utilizaron entre 9-12 hojas (representativo de los dos ensayos realizados en enero-marzo) y para el ensayo el que se utilizaron 20 hojas (junio-julio).

Cada uno de los supuestos se evaluó por un método analítico y uno gráfico utilizando el programa estadístico Infostat. En particular, se evaluó la normalidad a través del test de Shapiro Wilks y un gráfico Cuantil-Cuantil (Q-Q Plot) y la homocedacea a través de un ANOVA sobre los residuos absolutos de la variable y un gráfico de dispersión de los residuos (eje y) versus los predichos (eje x).

**Ensayos de 9 – 12 hojas/planta**

Pruebas de normalidad

**Método analítico: Shapiro Wilks**

Las hipótesis para el test Shapiro Wilks son las siguientes:

$H_0$: las observaciones de cada tratamiento proceden de una población con distribución normal.
$H_1$: las observaciones de cada tratamiento no proceden de una población con distribución normal.

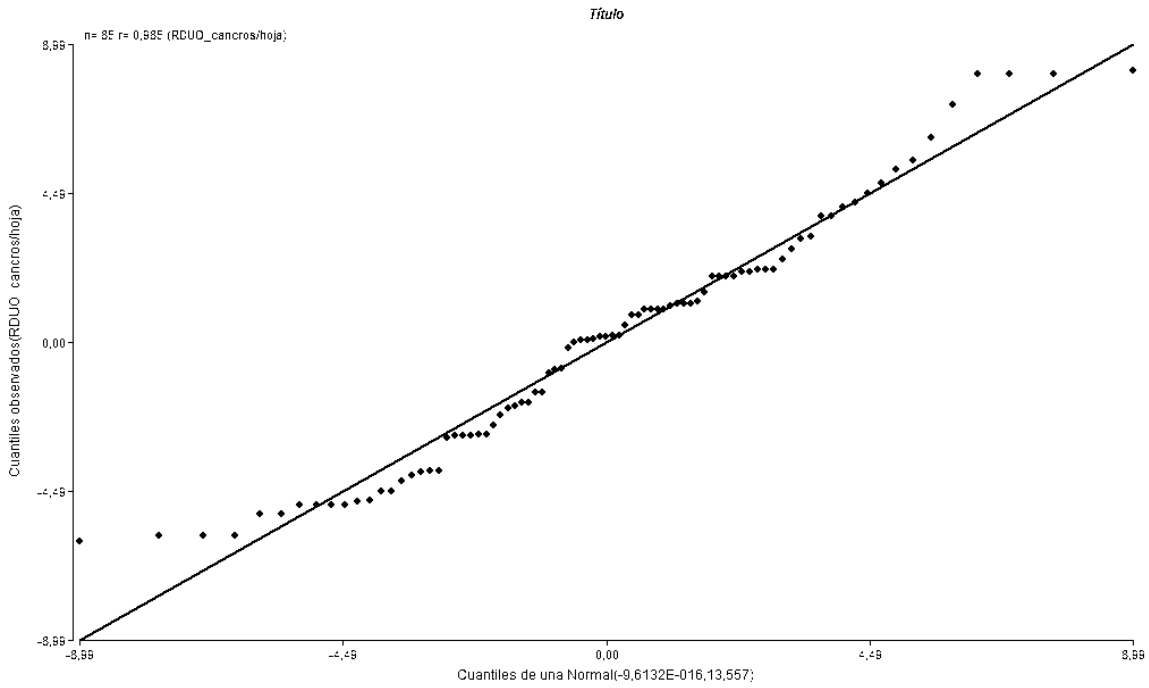
Resultado

| Variable | n | Media | D.E. | W* | p(Unilateral D) |
|---|---|---|---|---|---|
| cancros/hoja | 85 | 8,75 | 4,26 | 0,92 | <0,0001 |

Considerando que el valor de p obtenido fue menor a 0,05, se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, las subpoblaciones de las que provienen los datos no siguen una distribución normal.

**Método gráfico de Q-Q plot.**

Se realizó un grafico Cuantil-Cuantil (Q-Q plot) de los residuos observados (eje y) versus los esperados si la distribución fuera normal (eje x).




Como los puntos se desvían considerablemente de la recta, sobre todo en los extremos, se infiere que no hay normalidad, resultado que coincide con el obtenido en la prueba analítica.

Pruebas de Homocedacea (u homogeneidad de varianzas)

**Método analítico: ANOVA de los Residuos Absolutos**

Se realizó la prueba de forma analítica haciendo un ANOVA sobre los residuos absolutos (sin signo).

$H_0$: las varianzas de las subpoblaciones son homogéneas.
$H_1$: las varianzas de las subpoblaciones NO son homogéneas.

Resultados

| Variable | N | $R^2$ | $R^2$Aj | CV |
|---|---|---|---|---|
| RABS_cancros/hoja | 85 | 0,11 | 0,03 7 | 0,66 |

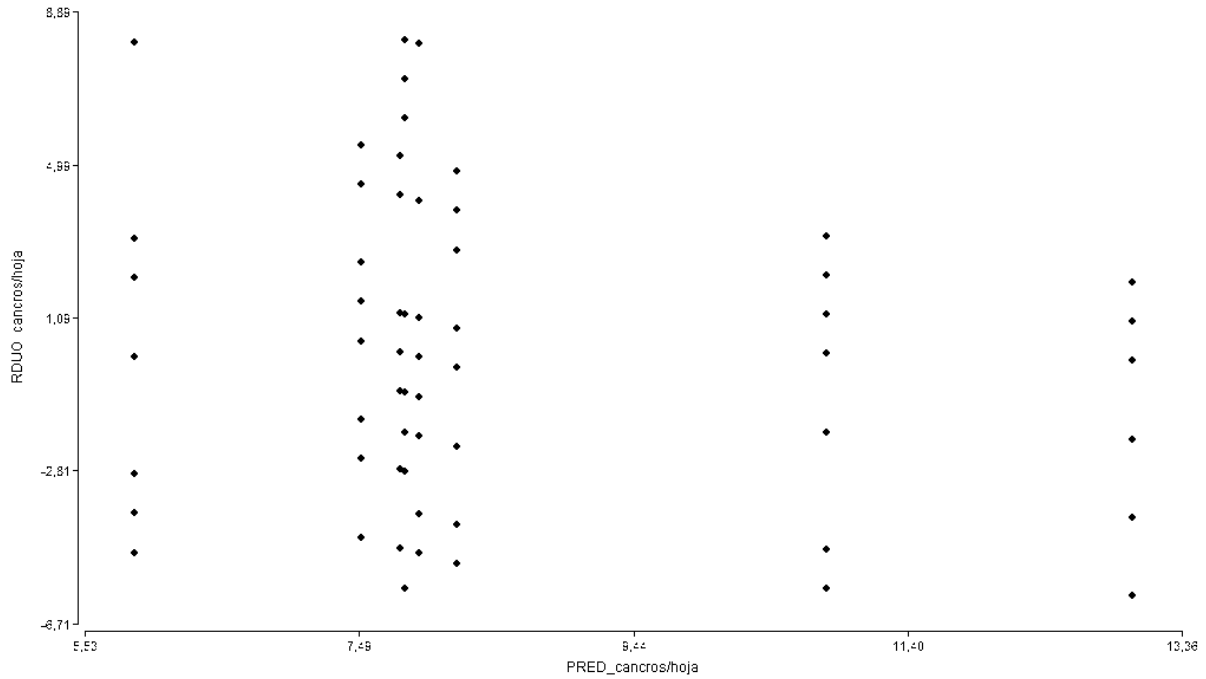
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---|---|---|---|---|---|
| Modelo. | 40,69 | 7 | 5,81 | 1,31 | 0,2576 |
| # | 40,69 | 7 | 5,81 | 1,31 | 0,2576 |
| Error | 341,97 77 | 4,44 | | | |
| Total | 382,65 84 | | | | |

Dado que el valor de p es mayor a 0,05, no se rechaza la hipótesis nula por lo tanto, no se descarta que las varianzas de las subpoblaciones sean homogéneas.

**Metodo gráfico: diagrama de dispersión de residuos (eje y) versus predichos (eje x).**

Resultados




Como se ve en el gráfico, a través de este método los grupos de datos parecen no ser homocedásticos ya que la dispersión es menor cuanto mayor es el valor de los predichos. Por

lo tanto, dado que los métodos dan resultados discordantes, no se podría asegurar que los datos de estos ensayos sean homocedásticos.

De todo lo anterior se concluye que los datos no son normales ni homocedásticos, por lo que no puede aplicarse un test de ANOVA paramétrico.

**Ensayo de 20 hojas/planta**

Pruebas de normalidad

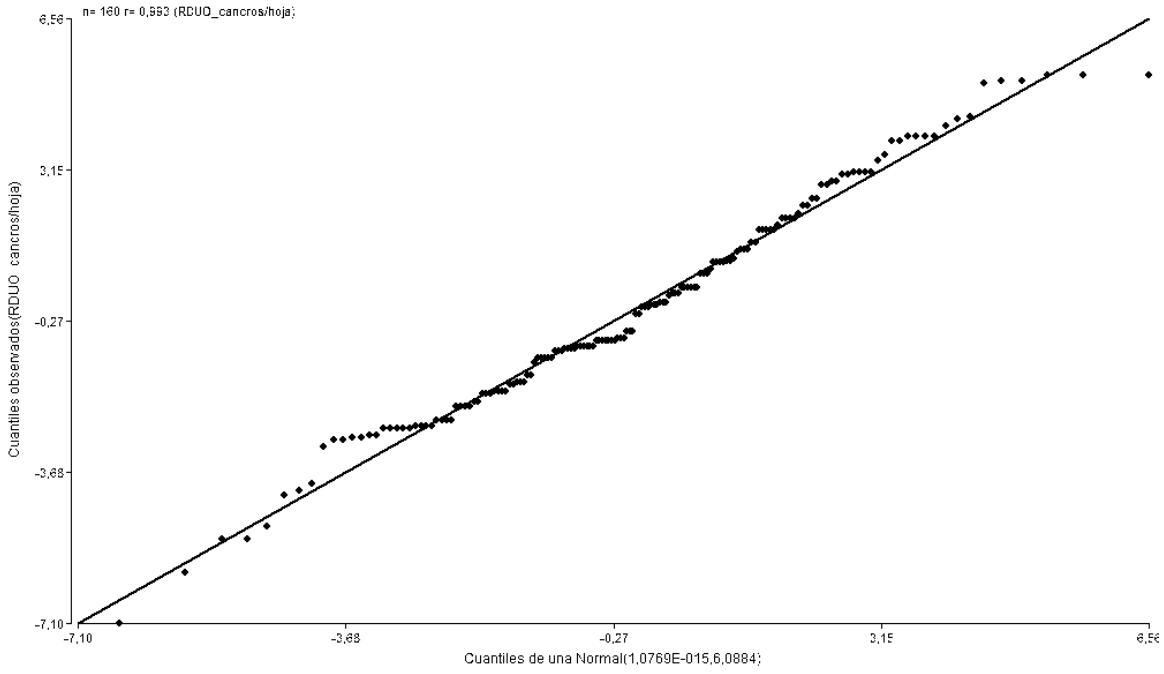
**Método analítico: Shapiro Wilks**

Resultados

| Variable | n | Media | D.E. | W* | p(Unilateral D) |
|---|---|---|---|---|---|
| RDUO cancros/hoja | 160 | 0,00 | 2,47 | 0,98 | 0,0811 |

El valor de p obtenido permite conservar la hipótesis nula, es decir, no descartar la normalidad de los datos, si se utiliza un punto de corte de 0,05 para el valor de p.

Método gráfico del Q-Q plot



En el gráfico se observa que la mayoría de los valores están sobre la recta, es decir, que no hay desviaciones sustanciales respecto de los cuantiles esperados si la distribución fuera normal, excepto en los extremos de la distribución.

Considerando en conjunto los resultados del método analítico y del método gráfico, puede concluirse que el ajuste de este conjunto de datos a una distribución normal es limitado y deberá ser evaluado en conjunto con la homocedasticidad para definir la aplicación de un ANOVA paramétrico.

Pruebas de Homocedacea (u homogeneidad de varianzas)

**Método analítico: ANOVA de los Residuos Absolutos**

Resultados

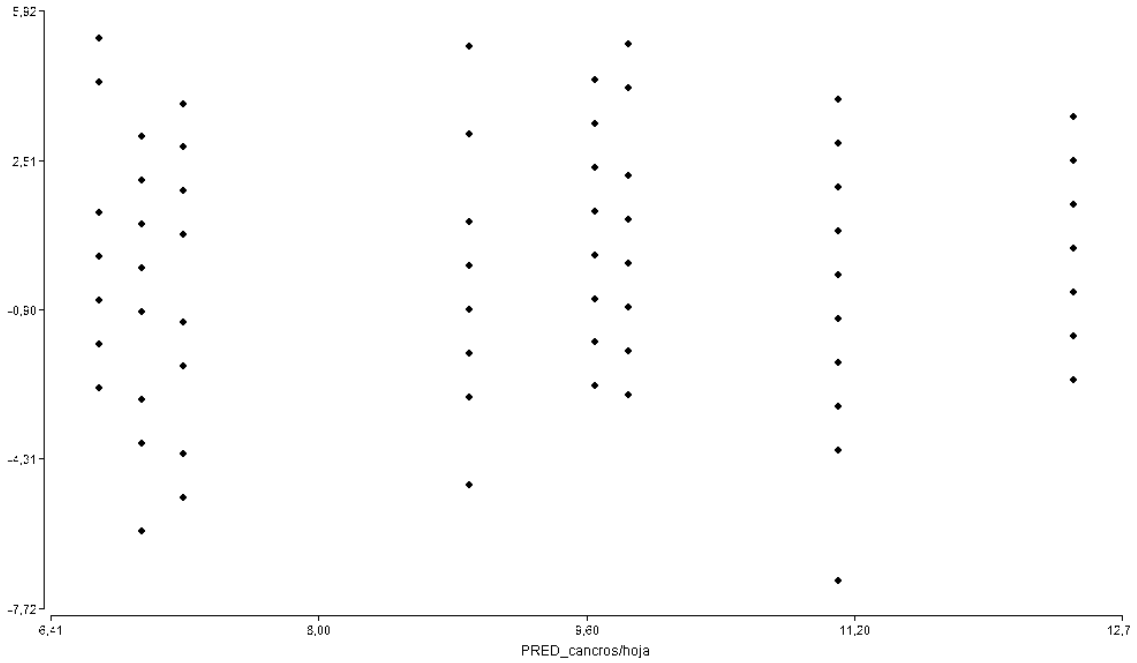
| Variable | N | $R^2$ | $R^2$Aj | CV |
|---|---|---|---|---|
| RABS cancros/hoja | 160 | 0,05 | 0,01 | 72,31 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---|---|---|---|---|---|
| Modelo. | 16,71 | 7 | 2,39 | 1,15 | 0,3354 |
| # | 16,71 | 7 | 2,39 | 1,15 | 0,3354 |
| Error | 315,73 | 152 | 2,08 | | |
| Total | 332,44 | 159 | | | |

Dado que el valor de p es mayor a 0,05, no se rechaza la hipótesis nula por lo tanto, no se descarta que las varianzas de las subpoblaciones sean homogéneas.

Gráfica (diagrama de dispersión)




Como se ve en el gráfico, a través de este método los grupos de datos parecen no ser homocedásticos ya que la dispersión es variable. De igual modo que para los primeros ensayos, dado que los métodos dan resultados discordantes, no se podría asegurar que los datos de estos ensayos sean homocedásticos.

En conclusión, los datos de este ensayo son normales, pero no homocedásticos.

La conclusión general de estos tests respecto de los datos de ambos ensayos fue que no cumplían satisfactoriamente los supuestos que permitirían realizar un ANOVA de un factor paramétrico. Por lo tanto, el análisis de los datos se realizó con test no paramétrico.