



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Análisis de la inmunidad específica y de amplio espectro:
caracterización y evaluación funcional de genes candidatos para
la obtención de cultivos resistentes a bacterias fitopatógenas.**

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

Lic. Florencia Nicole Bekier

Director: Dr. Esteban Hopp
Directora adjunta: Dra. Gabriela Conti
Consejero de Estudios: Dr. Gustavo Gudesblat

Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO)
CICVyA, INTA Castelar

15 de Octubre del 2025

A mi padre Daniel Bekier,

Quien me enseñó lo que Spinoza llamó “Amor Intelectual de Dios” (*Amor Dei Intellectualis*, del latín), manifestado en la genuina felicidad y libertad que genera la comprensión de la naturaleza y el saber.

Agradecimientos

Este trabajo de tesis es fruto de un trabajo colaborativo, que además de brindarme una sólida formación científica, me aportó muchísima motivación y entusiasmo en especial la parte de cítricos y la redacción de la tesis. A continuación, quiero agradecer a quienes la hicieron posible.

A mi director, Prof. Dr. Esteban Hopp, quien, sin saberlo, me guió rumbo a este doctorado. Primero, como tutor de la orientación en Biotecnología durante la carrera de grado, aconsejándome sobre materias clave como Fitopatología y Agrobiotecnología, pilares de esta tesis. Luego, como jurado de mi tesis de grado, y más tarde, al permitirme incorporarme al grupo BioCiF del INTA con un proyecto en cítricos, un cultivo con el que siempre quise trabajar y en un tema que tiene un objetivo con perspectivas claras a futuro. Finalmente, por su labor como director, especialmente en la redacción de esta tesis, y por motivarme siempre con sus comentarios.

A mi directora adjunta Dra. Gabriela Conti, por darme la oportunidad de sumarme a su grupo, y por enseñarme formas de trabajo que aliviaron mucho el camino y por saber transmitirme calma cuando las cosas no salían como esperaba.

A Nati Almasia, la polaca, Ceci y Ana Julia, a quienes les he consultado sobre los ensayos. En especial Nati, quien contestó cada uno de mis mensajes, compartió valiosas charlas sobre la discusión de la familia SNAKIN/GASA, me facilitó bibliografía y estuvo siempre muy presente, haciendo tiempo para ayudarme, por ejemplo para practicar la tesis.

A Caro Martínez, por su generosidad al dedicarme su tiempo, sentarse conmigo a ver la presentación y ayudarme a organizarla para que se entendiera mejor.

A los compañeros del labo Juanpi y Nadia, y en especial Lour y Marian, compañeras fundamentales en esta tesis, siempre dispuestas a dar una mano, a discutir resultados, responder consultas o simplemente compartir mates.

A Mati y Laurita, porque sus labores son esenciales y gracias a ellos pude realizar un ensayo grande de plantas por semana y así obtener buenos resultados poco tiempo.

A la comisión de seguimiento de tesis, por sus valiosos aportes en cada reunión.

Al CONICET, al INTA y a la ANPCYT por la beca y el financiamiento.

A Meli del INFIVE, quien estuvo muy presente en un momento muy difícil de mi vida y con quien, aún a la distancia compartimos nuestros avances, charlas sobre la política y el futuro, festejos ahora ella desde el exterior.

A Diana del INFIVE, compañera y amiga, con quien compartimos muchos momentos en el laboratorio y festejos los fines de semana.

A los chicos del locutorio: Caro Martínez, Cinti, Martín, Gabi, Nati Aguirre, Pame, Emi, Flavi, Laura, Dami y Mel, que me escucharon cantar y “desafinar” mientras escribía la tesis.

A las chicas de SENASA: Gi, Marian, Marie, Mari, Romi y Yani que siempre me estimularon a ir por el camino de la investigación, aun con sus incertidumbres, incluso cuando ya tenía trabajo estable allí.

A todos los chicos del IABIMO, con quienes compartimos las frustraciones y logros al compás de unos buenos mates o vinos en las salidas enológicas: Mel, Flor Olivari, Dami, Raúl, Lu, Caro, Cati, Mica, Cami, Pablo, Pili, Román, Javi, Rodri y Juan.

A mi nuevo lugar de trabajo que me abrió las puertas para continuar en la investigación y darme el espacio para terminar los últimos detalles de la tesis: Gabi, Marcos, Stella, Mauri, Andrea y Raúl, Dai, Silvia y Carla.

A Mari y Mati, por su amistad, con quienes compartimos muchos momentos tan alegres

Al jardín del INTA y en especial a las señas: Dani, Pau, Marce, María Rosa, Cinti y Laurita responsables de que Maia sea feliz viniendo al INTA, lo que me permitió trabajar con tranquilidad y alegría.

A las mamis y papis del jardín y, en especial a Sole, Ale, Romi, Maru, Cristián, Vicky, Cristina, Ailín que me acompañaron y alentaron mientras Maialita se enfermaba.

A la gente con la que compartí cursos y compartimos cursadas: Gabi, Jesi, Nati, Mati, Charlotte y Cami.

A los chicos de “Petróleo”: Ren, Ale, Fedelino, Pau, Fede Dos, Lio, Gi, Marce, Ana, Javi y la Negra y los nuevos petrolitos: Lauti, Emi, Mati, Migue, Juli con quienes transité esta etapa y fueron un gran apoyo y compañía.

A las chicas de exactas: Eli, Yami, Marian, y Lu, siempre muy presente en todo este camino, y nos escuchamos mutuamente. En especial a Lu y su familia (Emi, Rafita y Fer), con quien también compartimos cursos de posgrado y transitamos gran parte de esta etapa.

A mi familia: Shir, Clarita, Anita, Marian, Gadi, Caro, Olguita, el tío Carlitos.

A Haydee, Carlos, Mabel, Emi, Pablo, Ale y Ceci que estuvieron siempre, ayudando en todos los momentos fáciles y difíciles y teniendo bellos momentos familiares.

A mi Fernando, a mi hermano, Fedi y a mi mamá, , que siempre estuvieron para escucharme y aconsejarme, incluso en los momentos más desafiantes. Al principio en compañía de unos ricos vinos y más recientemente transformando la escena familiar en meriendas de juego y risas.

A mi papá con quien compartí innumerables charlas sobre ciencia y medicina, y quizás, sin quererlo, despertó mi interés por la Biología y luego por la investigación. En su último tiempo, nuestras conversaciones diarias se volvieron un refugio, donde podía contarle mis avances en el laboratorio, mis sueños y hasta las ideas locas de irnos a China o, más cerquita, a Mendoza a hacer un postdoc. Su escucha y compañía fueron un sostén fundamental en este camino.

Un muy especial agradecimiento a la hermosa familia que formamos con Martu. A nuestro gatito Pichu que llegó en momentos personales difíciles que coincidieron con la tesis y que, con la “gatoterapia”, me ayudó a atravesarlos. A Maialita, quien “conoció el laboratorio” desde antes de nacer, y me acompañó desde la panza durante los últimos ensayos de la tesis, y me enseñó a detenerme cuando hacía más de lo que podía, y quién me enseñó día a día a ser más feliz. Con sus apenas dos añitos estuvo en la defensa y me apoyó, aunque no entendiera demasiado por qué le aplaudían a su mamá. A Martu, por soñar y planear nuestra vida conmigo, por generar las condiciones para que pudiera terminar el doctorado, estar más que presente en los momentos de mayor dificultad personal para continuar, además de hacer cosas locas como mudarnos en el medio de la pandemia o pensar en “postdoquear” en distintos lugares del mundo, y por estar siempre. Gracias a su apoyo incondicional es que logré esta hermosa meta que es doctorarme.

Resumen

Análisis de la inmunidad específica y de amplio espectro: caracterización y evaluación funcional de genes candidatos para la obtención de cultivos resistentes a bacterias fitopatógenas.

Los agentes fitopatógenos son uno de los principales desafíos que afectan la producción agrícola. Bacterias como *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*) y *Candidatus Liberibacter* (*Ca. Liberibacter*) son dos de los principales agentes bacterianos que afectan los rindes agrícolas. En la actualidad existen pocos métodos económicamente viables para controlar a los agentes bacterianos. Entre las estrategias disponibles se encuentra el mejoramiento genético mediante la introgresión de genes de resistencia (ya sean de origen exógeno o endógeno), con una expresión aumentada. En este punto es importante resaltar que las bacterias co-evolucionan con sus hospedadores, por lo cual es deseable desarrollar cultivos mediante el apilamiento de genes y que generen tolerancia o resistencia durable y que afecte a una gran proporción de agentes fitopatógenos.

A partir de este trabajo, se analizaron genes de inmunidad específica, así como genes de amplio espectro ya que, de poder generarse el apilamiento de genes, sería interesante hacer un uso combinado de ambas estrategias inmunitarias.

Para evaluar la inmunidad específica se seleccionaron genes a partir de una aproximación experimental derivada de la transcriptómica. Específicamente, se seleccionó (para su evaluación) la familia de proteínas ATG1 (*Autophagy Related Gene 1*, del inglés). Se determinó que dos genes candidatos de esta familia se encuentran inducidos durante la respuesta inmune frente a *P. syringae* en plantas de *Solanum lycopersicum* (*S. lycopersicum*, tomate). La familia ATG1 consta de tres y cinco miembros en *S. lycopersicum* y en *N. benthamiana*, respectivamente. Por lo que es una familia pequeña de proteínas, lo que la hace óptima para hacer su caracterización funcional mediante silenciamiento génico transitorio. A partir de plantas silenciadas de *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*), especie modelo, se estudió la respuesta de ATG1 dependiente de la interacción AvrPto-Pto. Esta interacción de proteínas, que ocurre en grandes concentraciones debido a su sobreexpresión, permite magnificar la Respuesta Hipersensible para poder visualizarla (HR, del inglés *Hypersensitive Response*). A partir de ello, se determinó que las plantas silenciadas con distintas construcciones presentan retrasada esta respuesta. Luego, en plantas *N. benthamiana* sobreexpresando Pto se infectó con *P. syringae* pv. *tabaci* (*Ps tab*) expresando o no el efector AvrPto, en condiciones similares a las naturales. No se observó el correspondiente adelanto de la sintomatología de enfermedad (como era de esperar en un patosistema incompatible dependiente de la misma interacción entre el efector y la proteína de reconocimiento). Adicionalmente, se observó un retraso de la sintomatología de enfermedad en un sistema compatible. Para agregar complejidad, se evaluó el crecimiento bacteriano empleando las mismas infecciones con *Ps tab*. Y a partir del recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en plantas silenciadas, utilizando las mismas condiciones de infección que en el ensayo de enfermedad, el sistema incompatible no presentó diferencias con respecto al control, comparable a lo observado en el ensayo de enfermedad. En contraposición, en el sistema compatible, se observó un aumento de la concentración bacteriana en las plantas silenciadas. Además, los resultados indican que podría verse afectada la senescencia. Tomados como conjunto, estos hallazgos sugieren fuertemente una hipótesis que implicaría un proceso simultáneo de autofagia que podría estar interviniendo en paralelo, lo que explicaría razonablemente los resultados observados.

En relación con los genes de amplio espectro, se han descrito en la bibliografía diversos péptidos antimicrobianos (AMPs). Una familia de proteínas que presenta propiedades de AMPs es la familia de SNAKIN/GASA. Esta familia consta de tres subfamilias y cuenta con múltiples miembros cuya actividad ha sido probada en diversas especies vegetales frente a fitopatógenos de origen bacteriano, viral y fúngico. Previo a esta tesis, se construyó un árbol filogenético a partir de secuencias obtenidas de siete híbridos de cítricos, con el objetivo de identificar las subfamilias SNAKIN/GASA reportadas en la bibliografía. De este análisis se confirmó la presencia de los dominios de esta familia y clasificó según las tres subfamilias descritas. Para completar el mismo, en esta tesis se incluyeron las secuencias de *Solanum tuberosum* (*S. tuberosum*), dado que han sido ampliamente estudiadas en el instituto. A partir de ello, se encontró un alto grado de identidad de secuencias y se confirmó la relación de ortología. En particular, los miembros de cítricos GASA6, GASA8 y GASA10, son ortólogos de StSN1, StSN2 y StSN3, respectivamente. Cada uno correspondiente a una de las tres subfamilias. Bajo la hipótesis de que los tejidos juveniles, más aún los reproductivos, presentan mayor tolerancia a enfermedades y asegurar la descendencia fértil, se analizó la expresión absoluta de diez genes de la familia SNAKIN/GASA de los tejidos de flor, hoja joven y madura, provenientes de cinco variedades de cítricos con distinto grado de tolerancia/resistencia a enfermedades, obtenidas de una estación experimental. En el mismo se incluyó al menos un representante de cada subfamilia, para realizar un análisis de expresión génica en distintos tejidos, entre ellos los previamente mencionados GASA6, GASA8 y GASA10. A partir de ello, se seleccionaron estos tres genes para realizar la caracterización funcional. Con este objetivo, se sobreexpresaron transitoriamente en *N. benthamiana* los genes *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10*, provenientes de *Poncirus trifoliata* (*P. trifoliata*), una variedad de portainjerto reconocida por su mayor grado de tolerancia a enfermedades. Se desarrollaron sistemas novedosos de infección que permitieran sobreexpresar los genes y poder vislumbrar sintomatología de enfermedad y de HR utilizando plantas de *N. benthamiana*. Con ese enfoque se emplearon dos bacterias: *Ps. tab* y *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*), de forma de obtener un patosistema compatible, así como otro incompatible, respectivamente, y permitir una evaluación integral de la respuesta inmunitaria. A su vez, *Xcc*, es la bacteria modelo de estudio en cítricos. Dos de estos genes presentaron resultados muy alentadores, *PtGASA6* y *PtGASA10*. Luego de su sobreexpresión, ambos genes produjeron un retraso en la sintomatología de enfermedad, así como un adelanto de la HR. Esto indicaría que la expresión incrementada de estos genes podría intervenir reduciendo la enfermedad, así como adelantando la HR. No obstante, cabe resaltar que *PtGASA6* tuvo un efecto más marcado en el adelanto de la HR, mientras que *PtGASA10* causó un mayor efecto en el retraso de la enfermedad. Debido a que ambos presentaron resultados alentadores, pero con distintos grados de influencia sobre la inmunidad, es probable que el mecanismo de acción difiera entre ellos. Sería interesante evaluar sus efectos dentro de la planta y determinar si tienen la capacidad de desplazarse fuera de la célula vegetal, considerando que *Ca. Liberibacter* se encuentra en el sistema vascular. A partir de estos resultados, se puede hipotetizar que ambos genes serían candidatos prometedores para ser introgresados en cítricos por cruzamiento genómicamente asistido o mediante ingeniería genética con el fin de desarrollar cultivos intragénicos.

Palabras claves: interacción planta – patógeno, inmunidad específica, inmunidad de amplio espectro, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas citri*, *Citrus* sp., *Solanum* sp., genes ATG1, SNAKIN/GASA

Abstract

Analysis of specific and broad-spectrum immunity: characterization and functional evaluation of candidate genes for the development of crops resistant to phytopathogenic bacteria.

Phytopathogenic bacteria are among the main challenges affecting agricultural production. Bacteria such as *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*) and *Candidatus Liberibacter* (*Ca. Liberibacter*) are two of the most significant bacterial agents impacting crop yields. Currently, there are few economically viable methods to control bacterial pathogens. Among the available strategies is genetic breeding through the introgression of resistance genes (whether of exogenous or endogenous origin) with enhanced expression. It is important to mention that bacteria co-evolve with their hosts. This is the reason why it is desirable to develop crops by stacking genes to confer durable tolerance or resistance against a wide range of phytopathogens.

This work focused on analyzing both specific immunity and broad-spectrum genes, with the objective of exploring the potential benefits of combining both immune strategies.

To evaluate specific immunity candidate genes were selected based on a transcriptomics-derived experimental approach. Specifically, the ATG1 (Autophagy Related Gene 1) protein family was chosen for evaluation. Two candidate genes from this family are induced during the immune response to *P. syringae* in *Solanum lycopersicum* (*S. lycopersicum*, tomato). The ATG1 family comprises three and five members in *S. lycopersicum* and *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*), respectively. As a small protein family, it is suitable for functional characterization via transient gene silencing. Using gene-silenced *N. benthamiana* plants (a model species), the response of ATG1 dependent on the AvrPto–Pto interaction was studied. This protein interaction, which occurs at high concentrations due to overexpression, amplifies the hypersensitive response (HR), making it visible. It was found that different silencing constructs exhibited delayed HR. Subsequently, *N. benthamiana* plants overexpressing *Pto* were infected with *P. syringae* pv. *tabaci* (*Ps tab*), either expressing or not the AvrPto effector, under conditions similar to those in nature. The anticipated acceleration of disease symptoms did not occur (as would be expected for an incompatible pathosystem dependent on the same effector- recognition protein interaction). Moreover, a delay in disease symptoms was observed in this compatible system. To add complexity, bacterial growth was assessed using the same *Ps tab* infections. Based on the colony-forming unit (CFU) counts in silenced plants, using the same infection conditions as in the disease assay, no differences were observed in the incompatible system compared to the control, consistent with the results of the disease assay. In contrast, in the compatible system, silenced plants showed increased bacterial concentrations. Results also indicated that senescence might be affected. Taken together, these findings strongly support a hypothesis involving a simultaneous autophagy process occurring in parallel, which could reasonably explain the observed results.

Regarding broad-spectrum immunity genes, various antimicrobial peptides (AMPs) have been described in the literature. One protein family with AMP-like properties is the SNAKIN/GASA family. This family comprises three subfamilies with multiple members which activity has been demonstrated in various plant species against bacterial, viral, and fungal pathogens. Before this thesis, a phylogenetic tree was constructed using sequences from seven citrus hybrids, with the aim of identifying the SNAKIN/GASA subfamilies reported in the literature. This analysis confirmed the presence of conserved domains and classified the sequences into the three known subfamilies. To complete this analysis, sequences from *Solanum tuberosum* (*S. tuberosum*) were included in this thesis, as they have been extensively studied at the institute. A high degree of sequence identity was found, confirming orthologous relationships. In particular, citrus genes GASA6, GASA8 and GASA10 showed similarity to *StSN1*, *StSN2*, and *StSN3*, respectively, each representing one of the three

subfamilies. Based on the hypothesis that juvenile, especially reproductive, tissues show greater disease tolerance to ensure fertile offspring, the absolute expression of ten SNAKIN/GASA genes was analyzed in floral, young leaf, and mature leaf tissues from five citrus varieties with varying levels of disease tolerance/resistance, obtained from an experimental station. At least one representative from each subfamily was selected, including the previously mentioned GASA6, GASA8, and GASA10, to perform gene expression analysis in different tissues. Based on these results, these three genes were selected for functional characterization. For this purpose, the genes *PtGASA6*, *PtGASA8* and *PtGASA10*, derived from *Poncirus trifoliata* (*P. trifoliata*), a rootstock variety known for its higher level of disease tolerance, were transiently overexpressed in *N. benthamiana*. Novel infection systems were developed to allow overexpression and the observation of disease symptoms and HR in *N. benthamiana*. Two bacteria were used: *Ps tab* and *Xcc*, to establish both a compatible and an incompatible pathosystem, respectively, enabling a comprehensive evaluation of immune responses. Additionally, *Xcc* is the model bacterium used in citrus research. Two of these genes, *PtGASA6* and *PtGASA10*, showed very promising results. After overexpression, both genes delayed disease symptoms and accelerated the HR. This would suggest that increased expression of these genes may help reduce disease progression and induce HR. Notably, *PtGASA6* had the strongest effect on advancing HR, while *PtGASA10* had the greatest impact on delaying disease symptoms. Since both genes produced encouraging results but affected immunity to different extents, it is plausible their modes of action differ. It would be interesting to investigate their behavior within the plant and whether they can move outside the plant cell, considering that *Ca. Liberibacter* resides in the vascular system. Based on these results, it can be hypothesized that both genes are promising candidates for introgression into citrus through genomics-assisted breeding or genetic engineering to develop intragenic crops.

Keywords: plant–pathogen interaction, specific immunity, broad-spectrum immunity, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas citri*, *Citrus* sp., *Solanum* sp., ATG1 and SNAKIN/GASA genes

Trabajos publicados en conexión con esta tesis

Rosli, Hernán Guillermo; Sirvent, Emilia; Bekier, Florencia Nicole; Ramos Romina Nahir; Pombo, Marina Alejandra. Genome-wide analysis uncovers tomato leaf lncRNAs transcriptionally active upon *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* challenge. Scientific Reports; Año: 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04005-0>

Organización de congresos

Coordinadora del comité organizador de oradores del 2° SIMPOSIO DE CIENCIAS AGRARIAS INTA "*Un futuro sostenible: Integrando ciencia y producción en la agronomía moderna*" - <https://simposiomejoramien.wixsite.com/simposiointa2024/comit%C3%A9-organizador>

Resúmenes ampliados de congresos realizados durante el doctorado

- **Overexpression of *Poncirus trifoliata* SNAKIN6 and SNAKIN10 decreases disease symptoms and enhances immunity response in *Nicotiana benthamiana* as plant model system.** Bekier, Florencia^{1,2}; Conte, Mariana¹; Machado, Rodrigo^{1,5}; Frias, Nadia^{1,4}; Hopp, Esteban^{1,2}; Nahirñak, Vanesa¹; Almasia, Natalia¹; Vazquez Rovere, Cecilia¹; Conti Gabriela^{1, 3}. 2do Simposio INTA de Ciencias Agropecuarias, Córdoba 2024.
- **Estudio funcional de proteínas antimicrobianas de la familia Snakin-GASA de cítricos frente a bacterias fitopatógenas.** Bekier, Florencia; Conte, Mariana; Machado, Rodrigo; Frias, Nadia; Hopp, Esteban; Canteros, Blanca I.; Nahirñak, Vanesa; Almasia, Natalia; Vazquez Rovere, Cecilia; Conti, Gabriela. X Congreso Argentino de Citricultura, Concordia, Entre Ríos, Argentina 2023. **Trabajo seleccionado a mi cargo para ser presentado en el simposio de "Protección Vegetal"**.
- **Proteínas cítricas de la familia SNAKIN/GASA como posibles péptidos antimicrobianos contra bacterias fitopatógenas.** Bekier Florencia, Conte Mariana, Frias Nadia, Hopp Esteban, Conti Gabriela. 1er Simposio INTA de Ciencias Agropecuarias, Argentina 2022. Virtual.
- **Mejoramiento asistido por estrategias biotecnológicas para conferir protección contra enfermedades de los cítricos.** Conti G., M. Conte, F.N. Bekier, N. Frias, R. Machado, A. Badaracco, C.A. Reyes, A.M. Gochez, C. Lezcano, R. Escobar, N. Almasia, V. Nahirñak, C. Vázquez-Rovere, B.I. Canteros, H.E. Hopp. I Congreso De Genética, Corrientes, Argentina 2022
- **Detección De *Xanthomonas Axonopodis* pv. *phaseoli* en frijoles (*Phaseolus vulgaris*) para exportación.** Landa Marianela.; Bekier Florencia; Malinverni Julieta; Lanfranchi Rita. Coordinación de Plagas, Enfermedades de las Plantas y Bioinsumos. SENASA. 1er Congreso Argentino de Semillas. En línea, 2020.
- **ATG1 role in the immunity of tomato against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.** Bekier, Florencia; Rosli, Hernan; Pombo, Marina. Laboratorio de Interacciones Planta-Patógeno del Instituto de Fisiología Vegetal - INFIVE, UNLP-CONICET, La Plata, Argentina. Congreso Conjunto LV SAIB-XIV PABMB. 2019, Salta, Argentina. Resumen pág. 118.
- **Tomato ATG1 is implicated in the development of cell death associated with bacterial speck disease and hypersensitive response.** Bekier, Florencia; Rosli, Hernan; Pombo, Marina. Laboratorio de Interacciones Planta-Patógeno del Instituto de Fisiología Vegetal - INFIVE, UNLP-CONICET, La Plata, Argentina. **Trabajo seleccionado a mi cargo para ser presentado en el simposio "Autofagia y**

Muerte Celular" (Presentación realizada en idioma inglés). XXXII Encuentro Argentino de Fisiología Vegetal-XVI Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal (RAFV). 2018, Córdoba, Argentina. Resumen pág. 32.

ÍNDICE

Agradecimientos	III
Resumen	V
Abstract	VII
Trabajos publicados en conexión con esta tesis	IX
Organización de congresos	IX
Resúmenes ampliados de congresos realizados durante el doctorado	IX
Índice	XI
Abreviaturas	XVI
I - Introducción general	1
I Introducción general	2
I.1 La fitopatología y su relevancia en la historia	2
I.1.1 Los fitopatógenos y la interacción con las plantas	3
I.1.2 Los fitopatógenos bacterianos y su relevancia económica en la producción agrícola	4
I.2 Inmunidad Vegetal	4
I.2.1 Inmunidad específica	5
I.2.2 Inmunidad de amplio espectro: Péptidos antimicrobianos propios de las plantas como estrategia para mitigar enfermedades	7
I.3 Estrategias biotecnológicas de control de enfermedades	8
I.3.1 Estrategias de control y su regulación	8
I.3.2 Modificaciones genéticas para la obtención de cultivos resistentes a patógenos	9
I.4 Abordaje de la tesis y presentación de hipótesis de trabajo	9
I.4.1 Presentación del problema que origina las hipótesis de trabajo:	9
I.4.2 Prospección rápida de genes (“ <i>screening de genes</i> ”) para el manejo biotecnológico de enfermedades: <i>Nicotiana benthamiana</i> como especie modelo para la evaluación experimental	10
I.5 Objetivo general	11
I.5.1 Objetivos específicos	11
I.5.2 Hipótesis de trabajo	12
II - Inmunidad específica	14
II Inmunidad específica: <i>Solanum</i> sp. – <i>Pseudomonas syringae</i>	15
II.1 Introducción	15
II.1.1 <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) como cultivo de relevancia	15

II.1.2 Enfermedades que afectan al tomate	15
II.1.3 <i>Solanum lycopersicum</i> como modelo para la identificación de genes de la respuesta inmune	16
II.1.4 <i>Pseudomonas syringae</i> como modelo para el estudio de enfermedades	16
II.1.5 Inmunidad vegetal específica: <i>Solanum</i> sp. – <i>Pseudomonas syringae</i>	17
II.1.5.1 Inmunidad vegetal: un proceso en interrelación con la autofagia y la senescencia	17
II.1.5.2 Familia de proteínas ATG1: Inmunidad y autofagia	18
II.1.5.3 Silenciamiento génico transitorio como metodología para la caracterización funcional de genes	19
II.1.5.4 Uso del patosistema <i>Nicotiana benthamiana</i> – <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> para evaluar la enfermedad	20
II.1.5.5 Sobreexpresión de los genes Pto – AvrPto como estrategia para evaluar la HR y análisis de los factores moleculares asociados a la aparición de síntomas causados por esta respuesta	22
II.1.6 Resultados con las construcciones <i>Sl</i> ATG1 y <i>Nb</i> ATG1 indicarían que el silenciamiento de estas proteínas afectaría la inmunidad vegetal	23
II.2 Materiales y Métodos	25
II.2.1 Material vegetal empleado	25
II.2.1.1 <i>Nicotiana benthamiana</i>	25
II.2.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	25
II.2.3 Protocolos generales de biología molecular y análisis bioinformático	26
II.2.3.1 Análisis filogenético	26
II.2.3.2 Diseño de oligonucleótidos	27
II.2.3.2.1 Oligonucleótidos diseñados o empleados en esta tesis	27
II.2.3.2.2 Diseño de oligonucleótidos para medir la eficiencia de silenciamiento mediante RT-qPCR	28
II.2.3.3 Técnicas para clonados	29
II.2.3.3.1 Extracción de ARN para cuantificación de la expresión mediante RT-qPCR	29
II.2.3.3.2 Síntesis de ADN copia (ADNc) mediante la reacción de retrotranscripción (RT)	29
II.2.3.3.3 Preparación y transformación de células quimiocompetentes de <i>A. tumefaciens</i>	29
II.2.3.3.4 Transformación de células quimiocompetentes <i>E. coli</i> DH5 α	30
II.2.3.3.5 Reacción BP	30
II.2.3.3.6 Reacción LR	30
II.2.3.3.7 RT-qPCR para cuantificar la expresión o la eficiencia de silenciamiento	30
II.2.4 Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)	31
II.2.4.1 PCR para la amplificación de los fragmentos	31
II.2.4.2 Incorporación de secuencias GateAttB	31
II.2.4.3 Clonado de los fragmentos <i>Nb</i> ATG1, <i>Nb</i> ATG1-1, <i>Nb</i> ATG1-2 construcción del vector para VIGS	31
II.2.4.4 Diseño de las construcciones para VIGS	32

II.2.4.5 Ensayos de silenciamiento mediante VIGS	34
II.2.5 Ensayos en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	35
II.2.5.1 Ensayos de muerte celular programada (MCP)	35
II.2.5.2 Ensayos de enfermedad utilizando <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	35
II.2.5.3 Ensayos de crecimiento bacteriano	35
II.2.5.4 Ensayos de <i>elicitors</i> mediados por <i>Agrobacterium</i>	36
II.2.5.5 Ensayos de senescencia	36
II.2.6 Análisis estadísticos	37
II.2.6.1 Cuantificación de la expresión de genes	37
II.2.6.2 Ensayos en plantas de síntomas	37
II.2.6.3 Ensayos en plantas con SPAD	37
II.3 Resultados	38
II.3.1 Análisis filogenético de la familia ATG1 en <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>Solanum lycopersicum</i>	38
II.3.2 Caracterización funcional de los genes de la familia de proteínas ATG1 utilizando <i>Nicotiana benthamiana</i> como planta modelo	39
II.3.3 El fenotipo de las plantas silenciadas en <i>Nicotiana benthamiana</i> presenta un fenotipo normal	40
II.3.4 La respuesta hipersensible se retrasa en plantas silenciadas <i>NbATG1-1</i> , <i>NbATG1-2</i> , <i>NbATG1</i>	40
II.3.5 La sintomatología asociada a enfermedad se retrasa con las construcciones <i>NbATG1-1</i> , <i>NbATG1-2</i> , <i>NbATG1</i> en el patosistema compatible	42
II.3.6 El silenciamiento de <i>NbATG1</i> inhibe el crecimiento bacteriano en un patosistema compatible	44
II.3.7 La respuesta HR–MCP es modulada por proteínas R y su par <i>elicitor</i> en plantas <i>NbATG1</i>	45
II.3.8 La senescencia se compromete mediante el silenciamiento con <i>NbATG1-1</i> , <i>NbATG1-2</i> , <i>NbATG1</i> .	47
II.3.9 Eficiencia del silenciamiento de los genes ATG1	50
II.4 Resumen de los principales resultados	53
II.5 Discusión	54
II.5.1 Análisis filogenético de la familia ATG1	54
II.5.2 Eficiencia del silenciamiento	55
II.5.3 Inmunidad vegetal	55
II.5.3.1 La autofagia como proceso que afecta la inmunidad y la senescencia	56
II.5.3.2 ATG1: autofagia en la senescencia	57
II.5.3.3 ATG1: autofagia en la inmunidad	59
II.5.4 Modelo de interacción H-P propuesto	60
II.5.4.1 Conclusiones Generales del Modelo H-P	63
II.5.5 Perspectivas a futuro	65

III - Inmunidad de amplio espectro <i>Citrus</i> sp. – <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	66
III Inmunidad de amplio espectro <i>Citrus</i> sp. – <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	67
III.1 Introducción	67
III.1.1 Cítricos y su relevancia económica	67
III.1.2 HLB	69
III.1.2.1 Agente bacteriano causante de HLB y su impacto	70
III.1.2.2 Estatus fitosanitario en Argentina	71
III.1.2.2.1 Estrategias de control de HLB	72
III.1.3 Cancrosis de los Cítricos	73
III.1.3.1 Agente causante de la cancrrosis de los cítricos.	73
III.1.3.2 Estatus fitosanitario en Argentina	74
III.1.3.2.1 Estrategias de control de la cancrrosis de los cítricos	75
III.1.4 Inmunidad de amplio espectro como estrategia para controlar la enfermedad	75
III.1.5 Antecedentes particulares: Péptidos antimicrobianos de la familia SNAKIN/GASA	76
III.1.5.1 Análisis bioinformático y filogenético de la familia de genes SNAKIN/GASA de cultivares de cítricos	77
III.2 Materiales y Métodos	86
III.2.1 Materiales vegetales utilizados	86
III.2.1.1 <i>Citrus</i> sp.	86
III.2.1.2 <i>Nicotiana benthamiana</i>	86
III.2.2 Técnicas de Biología Molecular	86
III.2.2.1 Extracción de ARN	86
III.2.2.2 Síntesis de ADN copia (ADNc) mediante la reacción de Retrotranscripción (RT)	87
III.2.2.3 Diseño de cebadores	87
III.2.2.4 PCR para chequeo	88
III.2.2.5 PCR para clonado con sistema de corrección	88
III.2.2.6 Clonados del vector pGEM-T para la qPCRa	88
III.2.2.7 Clonados para la sobreexpresión	89
III.2.2.8 Cuantificación de la sobreexpresión de los genes SNAKIN/GASA mediante RT-qPCR relativa (RT-qPCRr)	89
III.2.2.9 Cuantificación de la expresión de los genes mediante RT-qPCR absoluta (RT-qPCRa)	90
III.2.3 Ensayos en plantas	90
III.2.3.1 Sobreexpresión de genes SNAKIN/GASA	90
III.2.3.2 Ensayo de enfermedad con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> en plantas sobreexpresando los genes de interés de manera transitoria	91
III.2.3.3 Ensayo de HR con <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> en plantas sobreexpresantes	91

III.2.4 Análisis estadístico	92
III.2.4.1 Análisis estadístico para medir la sobreexpresión de plantas	92
III.2.4.2 Análisis estadístico de los ensayos en plantas	92
III.2.5 Estructura tridimensional de proteínas	93
III.3 Resultados	94
III.3.1 Expresión relativa de genes SNAKIN/GASA	94
III.3.2 Expresión absoluta de genes SNAKIN/GASA	98
III.3.3 Selección de genes SNAKIN/GASA para la caracterización funcional	100
III.3.4 Caracterización funcional: Ensayo <i>in vivo</i> en plantas modelo de <i>Nicotiana benthamiana</i>	101
III.3.5 Las plantas sobreexpresan los genes <i>PtGASA6</i> , <i>PtGASA8</i> y <i>PtGASA10</i>	102
III.3.6 Puesta a punto de ensayos HR y enfermedad	104
III.3.7 La sobreexpresión de los genes <i>PtGASA6</i> y <i>PtGASA10</i> retrasa la enfermedad causada por la infección de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> en el ensayo de enfermedad	105
III.3.8 La sobreexpresión de los genes <i>PtGASA6</i> y <i>PtGASA10</i> adelanta la Respuesta Hipersensible generada por la infección de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	110
III.3.9 Análisis de la sobreexpresión de <i>StSN1</i> , <i>StSN3</i> y <i>PtGASA10</i>	115
III.3.10 Estructura tridimensional <i>in silico</i> de las proteínas SNAKIN/GASA de cítricos y papa	118
III.4 Resumen de los principales resultados	121
III.5 Discusión	122
III.5.1 La familia SNAKIN/GASA como genes promisorios para disminuir infecciones bacterianas	122
III.5.2 Expresión de los genes candidatos y criterios para la selección de <i>PtGASA6</i> , <i>PtGASA8</i> y <i>PtGASA10</i>	123
III.5.3 <i>PtGASA6</i> , <i>PtGASA8</i> y <i>PtGASA10</i> frente a infecciones bacterianas: respuesta en un patosistema compatible y en otro incompatible	126
III.5.4 Mecanismo de acción	127
III.5.5 Perspectivas a futuro	130
IV - Conclusiones	132
IV Conclusiones	133
V - Información suplementaria	134
V Información suplementaria	135
VI - Referencias	137
VI Referencias	138

Abreviaturas

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AMP	Péptido antimicrobiano
ARN	Ácido Ribonucleico
ATG1t	versión trunca de ATG1
CaMV35S	Promotor del virus del mosaico de la coliflor35S
DI	Índice de enfermedad (del inglés, <i>disease index</i>)
dNTPs	Mezcla de deoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
DO600	Densidad óptica a longitud de onda 600 nm
dpi	días luego de la infección (“days post-infection”)
dsRNA	doble hebra de ácido desoxirribonucleico
ETI	Inmunidad mediada por efectores (del inglés, <i>effector-triggered immunity</i>)
ETS	Susceptibilidad mediada por efector (del inglés, <i>effector-triggered susceptibility</i>)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
fliC	Gen que codifica para la flagelina de Pst
GASA	“Gibberellic Acid Stimulated In Arabidopsis”, Inducible Por Ácido Giberélico
Group-PI-3	Familia de proteínas quinasas Grupo de planta específica 3
HLB	Huanglongbing - enfermedad del enverdecimiento de los cítricos
H-P	Huésped–Patógeno
HR	Respuesta hipersensible
HR – MCP	Muerte celular programada dependiente de la Respuesta Hipersensible
HRI	Índice de HR
LRR	Dominio de repeticiones rico en leucina (del inglés, <i>Leucine rich repeats</i>)
MCP	Muerte celular programada
MDC	amina autofluorescente monodansilcadaverina
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>

<i>N. benthamiana</i> WT	<i>N. benthamiana</i> salvaje
<i>N. benthamiana</i> -35S::Pto	<i>N. benthamiana</i> expresando la proteína Pto bajo el promotor 35S
<i>NbATG1</i>	Construcción para silenciar la familia ATG1 basada en <i>N. benthamiana</i>
<i>NbATG1-1</i>	Construcción para silenciar al par de genes Niben101Scf02085g06008 y Niben101Scf05404g04007
<i>NbATG1-2</i>	Construcción para silenciar al par de genes Niben101Scf05137g01011 y Niben101Scf07477g02010
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>N. tabacum</i>
nt	nucléotidos
<i>P. trifoliata</i>	<i>Poncirus trifoliata</i>
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, Pathogen-associated molecular patterns)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, polymerase chain reaction)
Proteínas R	Proteínas de Resistencia
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares (del inglés, Pattern-recognition receptors)
<i>Ps tab</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>
<i>Ps tab</i> AvrPto	<i>Ps tab</i> expresando al efector AvrPto bajo un promotor constitutivo35S
<i>Ps tab</i> vv	<i>Ps tab</i> portando el vector vacío
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
<i>Pst</i> DC3000 Δ avrPto	<i>Pst</i> DC3000 con el gen que codifica para el efector AvrPto deletado
<i>Pst</i> DC3000 Δ AvrPtoB	<i>Pst</i> DC3000 con el gen que codifica para el efector AvrPtoB deletado
<i>Pst</i> DC3000 Δ fliC	<i>Pst</i> DC3000 con el gen que codifica para flagelina (fliC) deletado
<i>PtGASA10</i>	GASA10 de <i>P. trifoliata</i>
<i>PtGASA6</i>	GASA6 de <i>P. trifoliata</i>
<i>PtGASA8</i>	GASA8 de <i>P. trifoliata</i>
PTI	Inmunidad mediada por patrones moleculares (del inglés, <i>Pattern-triggered immunity</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés, <i>Reactive Oxygen Species</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RT-qPCRa	RT-qPCR absoluta
RT-qPCRr	RT-qPCR relativa

<i>S. lycopersicum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate)
<i>S. tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i> (papa)
SNAKIN/GASA	Familia de proteínas SNAKIN/GASA
SSTIII	Sistema de secreción tipo III (del inglés, <i>Secretion system type III</i>)
<i>StSN1</i>	SNAKIN 1 de <i>S. tuberosum</i>
<i>StSN2</i>	SNAKIN 2 de <i>S. tuberosum</i>
<i>StSN3</i>	SNAKIN 3 de <i>S. tuberosum</i>
TRV	Tobacco rattle virus
ufc	Unidades formadoras de colonias
VIGS	Silenciamiento de genes inducido por virus (del inglés, <i>Virus-induced gene silencing</i>)
vv	Vector vacío
xATG1t	Indicando ATG1t de todas las especies analizadas

1 - INTRODUCCIÓN GENERAL

“La emoción más hermosa que podemos experimentar es el misterio.
Es la fuente de toda verdadera ciencia y arte.” Albert Einstein

I Introducción general

I.1 La fitopatología y su relevancia en la historia

Desde que la humanidad desarrolló la agricultura para cultivar sus propias plantas con fines alimenticios, de vestimenta, vivienda, entre otros, es que se domesticaron e instalaron de forma mayoritaria la utilización de unos pocos cultivos. Si bien, llevó a un crecimiento más rápido de la población al independizarse del efecto aleatorio de recolectar alimentos, las propiedades agronómicamente deseables seleccionadas se realizaron por selección (mejoramiento) a costa de una reducción de la variabilidad genética lo que hizo a los cultivos más susceptibles a la propagación de distintos tipos de enfermedades (Agrios, 2005). La historia está repleta de ejemplos de hambrunas debidas a la aparición de nuevas variantes patogénicas que generaban la desaparición rápida de un cultivo (Agrios, 2005), siendo la hambruna de Irlanda a fines del siglo XIX debida al tizón tardío de la papa un ejemplo emblemático de inexistencia de diversidad genética del cultivo causado por la naturaleza clonal de la papa y evolución de una raza novedosa del patógeno compatible con el único genotipo cultivado, como se detalla a continuación.

Estas enfermedades han sido documentadas por su relevancia en libros de mucha antigüedad como la propia biblia, no obstante, su falta de comprensión en aquel entonces llevaba a asociarlas a castigos divinos o fuerzas místicas, interpretaciones que fueron modificadas con el avance del método científico. La aparición del equipamiento y tecnología apropiada llevó al campo que actualmente se conoce como Fitopatología (Agrios, 2005) y la interacción entre plantas y sus fitopatógenos es la subdisciplina de interés para esta tesis. Entre los casos más destacados de enfermedades vegetales, se pueden nombrar el ergotismo causada por el organismo *Claviceps purpurea*, que infecta al centeno, un cereal utilizado en la elaboración del pan negro. Debido a la síntesis de micotoxinas con efectos alucinógenos y neurotóxicos, el consumo de pan negro era evitado por las clases altas y se consideraba un alimento de menor categoría, reservado para los sectores más pobres. Los efectos del ergotismo fueron tan severos que hay registros históricos de personas que, en medio de la locura provocada por la enfermedad, llegaron a amputarse extremidades e incluso a decapitarse (Agrios, 2005).

O, más recientemente en el siglo XIX, la famosa hambruna de la papa que ocurrió en Irlanda. Debido a que la papa es un cultivo subterráneo, su producción era favorecida por las clases bajas, ya que permitía ocultar parte de la cosecha de los impuestos excesivos impuestos por los británicos, quienes castigaban con la quema de campos a quienes no podían pagar. Sin embargo, un cambio en las condiciones climáticas favoreció la proliferación del oomicete *Phytophthora infestans*, que arrasó con las cosechas durante varios años, provocando una crisis alimentaria extrema que resultó en la muerte de aproximadamente un millón de personas y la emigración masiva de otro millón principalmente a EEUU y Canadá (Agrios, 2005; Wang et al., 2024b).

En las últimas décadas y con mayor relevancia a nivel local, a pesar de los avances tecnológicos, enfermedades como el HLB causado por el fitopatógeno *Candidatus Liberibacter*, o las denominadas enfermedades “fastidiosas”, causadas por bacterias no cultivables, han provocado estragos en cultivos cítricos (Caserta et al., 2019). En particular, la enfermedad conocida como el “Greening” o enfermedad del enverdecimiento de los cítricos y también conocida como HLB (HuangLongBing), ha generado drásticas pérdidas en múltiples países como EEUU, Brasil, México, entre otros (Graham et al., 2020). En particular, en Florida, EEUU, esto llevó a generar pérdidas de hasta el 74% de la producción con un máximo 100% de las plantas infectadas (Graham et al., 2020). Asimismo, por presentar periodos de latencia seguido de un periodo de incubación que puede durar meses o de desarrollarse infección sin sintomatología visible, así como una distribución errática en las plantas en las hojas por verse afectada de forma heterogénea la planta es que para cuando se observaron síntomas en una planta, hay una probabilidad muy alta de que la mayoría

de las plantas alrededor se vean afectadas también (da Graça et al., 2016; Graham et al., 2020; Hu et al., 2021). Debido a su impacto devastador, esta enfermedad ha ganado rápida notoriedad, impulsando esfuerzos urgentes para mitigar sus efectos a nivel mundial y en particular en nuestro país se desarrolló el Programa Nacional de Prevención del HLB (PNPHLB) (<https://www.argentina.gob.ar/senasa/micrositios/hlb>).

Con la mejora de las prácticas agrícolas, la producción tuvo una etapa exponencial que permitió el gran crecimiento poblacional mundial (Michalk et al., 2019), sin embargo, la diferencia en las tecnologías a las que acceden los distintos países, así como los productores con distinta economía, llevan a que la eficiencia en la producción sea muy dispar (Zoveda et al., 2014). Se estima que la población mundial llegue 9,3 billones de personas para el año 2050 (Zoveda et al., 2014; Leeuwis et al., 2021; Wang et al., 2024b). No obstante, para disminuir el hambre en el mundo, es necesario mejorar las tecnologías disponibles, así como garantizar su distribución adecuada (Leeuwis et al., 2021; Moscona y Sastry, 2025). Es por esto que es de gran relevancia poder comprender las bases de las enfermedades que afectan cultivos que generan pérdidas que van desde 20-100% de las producciones (Wang et al., 2024b; <https://croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/dragon-amarillo>).

I.1.1 Los fitopatógenos y la interacción con las plantas

Como se mencionó previamente, las plantas se ven afectadas por múltiples organismos. El tipo de relación que mantienen con los mismos fue clasificado como parasíticos o causado por agentes patogénicos (Agrios, 2005; Geeta y Mishra, 2018). Las relaciones parasíticas están causadas principalmente por malezas e insectos, y entre los agentes patogénicos se encuentran los virus, bacterias, hongos, oomicetes y nemátodos, entre otros (Agrios, 2005; Geeta y Mishra, 2018).

Una relación parasítica se diferencia de una patogénica en que, en el primer caso, el organismo utiliza a la planta para alojarse por fuera o por dentro de la misma. En cambio, un organismo patogénico, además de nutrirse de la planta, afecta su fisiología al liberar proteínas, fitohormonas y así como otros compuestos que interfieren con procesos esenciales. Es decir que, a diferencia de una relación estrictamente parasítica, el daño causado por el fitopatógeno no depende únicamente de los nutrientes removidos, sino al grado en que interfiere con las funciones esenciales de la planta (Agrios, 2005).

En particular, los patógenos como los hongos, los oomicetes y bacterias se clasifican como biotróficos, hemibiotróficos o necrotróficos. Esta clasificación se debe a la forma en la que los fitopatógenos manipulan la maquinaria de las plantas. Los biotróficos dependen de la presencia de tejido viable para poder continuar multiplicándose, en tanto que, en el extremo opuesto los necrotróficos requieren inducir la muerte del tejido para poder extraer los recursos que requieren de estos. Asimismo, esta clasificación suele estar asociado al nicho que ocupan. Los biotróficos suelen ser organismos especializados que afectan pocos cultivos con los que coevolucionan y dependen de un reconocimiento específico con la planta para establecer la infección. Por el contrario, los necrotróficos suelen ser generalistas u oportunistas (Brettell y Pryor, 1986; Geeta y Mishra, 2018).

Sin embargo, estas categorías no son absolutas, dado que existen transiciones y gradientes entre ellas. Por ejemplo, algunos pueden tener una fase biotrófica y luego otra que genere mayor daño en el tejido, por lo que son considerados hemibiotróficos (Brettell y Pryor, 1986; Dodds y Rathjen, 2010). Los organismos que son más fácilmente clasificados son los necrotróficos que suelen liberar toxinas y llevan a desarrollar un rápido daño en el tejido que conlleva a la muerte celular (Brettell y Pryor, 1986; Agrios, 2005; Dodds y Rathjen, 2010).

En este trabajo se analizaron dos patógenos bacterianos, *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, con interacciones semejantes durante la infección ya que ambas son bacterias hemibiotróficas (Kraiselburd et al., 2013; Xu et al., 2013).

I.1.2 Los fitopatógenos bacterianos y su relevancia económica en la producción agrícola

Los agentes fitopatógenos son uno de los principales problemas en la producción agrícola (Verma y Dev, 2022), en particular lo son los agentes bacterianos (Islam et al., 2024; Mulungu, 2024). A escala global las bacterias fitopatógenas suelen generar pérdidas de aproximadamente el 10% de los rindes (Agrios, 2005; Sigee, 2005). No obstante, esto es una generalización de un promedio de la afectación por agentes bacterianos a todos los cultivos agrícolas relevantes y, que además se encuentra desactualizada, hay ciertos agentes bacterianos que pueden llegar a generar pérdidas del 100% de la producción agrícola (Mulungu, 2024). Entre los patógenos bacterianos de mayor relevancia económica a nivel mundial se encuentran *Pseudomonas syringae*, con más de 60 patovares que afectan múltiples cultivos en regiones con condiciones climáticas diversas (Islam et al., 2024) y *Candidatus Liberibacter* con cuatro variantes encontradas según la región geográfica (Keremane et al., 2015; da Graça et al., 2016; Munir et al., 2017), que presentan distintos grados de virulencia (Hu et al., 2021). Este último ha causado pérdidas totales de la producción en países como EEUU (Graham et al., 2020). Dado que el cultivo de cítricos, que por su característica arbolada requiere de varios años de inversión para producir frutos y cantidad suficiente para ser comercialmente rentable, por presentar etapas muy prolongadas en su estado juvenil (Palacios, 2005; Raveh et al., 2020).

Por ello, es fundamental explorar alternativas para el control de los fitopatógenos, con el fin de poder desarrollar estrategias que reduzcan el impacto en la producción, y contribuyan en generar alimentos de forma más sustentable. En este sentido, las buenas prácticas agrícolas, que incluyen medidas como la aplicación de agroquímicos, son estrategias de las más empleadas. Sin embargo, presentan efectos adversos a largo plazo.

Asimismo, la aplicación de compuestos antibióticos a campo no han generado la reducción de las infecciones esperada, mostrando una escasa efectividad (Munir et al., 2017; Islam et al., 2024). Además, su empleo conlleva a un riesgo para la salud animal y humana por la reciente y creciente problemática de la resistencia antimicrobiana (Odintsova y Egorov, 2012; Wang et al., 2024c). Por todo ello, es deseable el desarrollo de nuevas herramientas que permitan reducir el impacto de las enfermedades en la producción agrícola.

I.2 Inmunidad Vegetal

Las plantas se encuentran en continua interacción coevolutiva con los agentes patógenos y es por esto que presentan barreras para impedir el ingreso de los mismos.

Las primeras barreras para evitar este ingreso son las barreras constitutivas, las cuales impiden la entrada de microorganismos de forma inespecífica y general mediante la epidermis, cera, regulación de cierre de estomas (Agrios, 2005; Shafikova y Omelichkina, 2020). Del mismo modo, los órganos de almacenamiento de las plantas, como frutos y tejidos reproductivos, que a su vez son los tejidos jóvenes, y por lo tanto con mayor protección contra patógenos, presentan un alto contenido de metabolitos secundarios y péptidos. Entre estos compuestos se encuentran cocteles de péptidos antimicrobianos (AMP, del inglés *antimicrobial peptides*), que son de interés principalmente por cumplir un rol esencial en la inmunidad al actuar contra una amplia gama de microorganismos, es decir de modo generalista o de amplio espectro y proveyendo tolerancia duradera (Agrios, 2005; Meneguetti et al., 2017; Campos et al., 2018; Shafikova y Omelichkina, 2020; Bakare et al., 2022), de forma adicional, estos compuestos son beneficiosos para la salud humana por ej. por presentar actividad antioxidante.

I.2.1 Inmunidad específica

La inmunidad vegetal ha sido ampliamente estudiada y los modelos que analizan la interacción planta – patógeno se encuentra aún hoy en continua evolución (Flor, 1942; Jones y Dangl, 2006; Singh y Singh, 2018; Shafikova y Omelichkina, 2020). Como se mencionó previamente, las recurrentes catástrofes alimentarias que aparecieron en la historia gatillaron un intenso análisis de la interacción entre los patógenos y las plantas. En particular, con los avances de la genética y la aparición de instrumentos para visibilizar microorganismos, es que se desarrolló el primer modelo ideado por Harold Flor en 1942. Este primer modelo planteó que las plantas poseen genes de resistencia (R), mientras que los fitopatógenos presentan genes de avirulencia (Avr). Flor denominó “sistema compatible” a aquel en el que el patógeno puede desarrollar la enfermedad debido a la ausencia de reconocimiento entre una proteína R de la planta con un factor de avirulencia. En cambio, un “sistema incompatible” es aquel en el que dicho reconocimiento sí ocurre, impidiendo el desarrollo de la infección (Flor, 1942; Shafikova y Omelichkina, 2020).

Con el avance de la biología molecular, este modelo fue incorporando una mayor complejidad (van der Hoorn y Kamoun, 2008; Shafikova y Omelichkina, 2020). Primero surgió la hipótesis del guardián, que luego se profundizó con el modelo del señuelo (van der Hoorn y Kamoun, 2008). Esto se debió a que el modelo planteado por Flor no podía explicar ciertos casos en los que la interacción directa no era suficiente para justificar la respuesta observada (van der Hoorn y Kamoun, 2008). Además, la presencia de múltiples interacciones y combinaciones entre proteínas R y factores de avirulencia indicaba que el sistema era más complejo que una simple interacción de una proteína R con un factor de avirulencia, y que además no necesariamente desarrollaba resistencia (van der Hoorn y Kamoun, 2008; Shafikova y Omelichkina, 2020). Por otro lado, los genes R están organizados en conjuntos de familias multigénicas que son altamente polimórficos (Pan et al., 2000; Bakker et al., 2006; Wei et al., 2016). Además, el modelo de Flor no contempla una coevolución temporal entre estos genes/alelos de la planta y los de patogenicidad del patógeno, lo que lo convertía en un modelo estático (van der Hoorn y Kamoun, 2008). En este contexto, el modelo guardián-señuelo permitió integrar la complejidad de múltiples interacciones entre proteínas R y factores de avirulencia (Shafikova y Omelichkina, 2020). Este modelo buscó explicar las interacciones entre las proteínas de los agentes patogénicos y las inmunitarias de las plantas, las cuales están organizadas en múltiples capas de reconocimiento que, directa o indirectamente, pueden desencadenar o no una respuesta inmune. Asimismo, estas interacciones pueden provocar otros efectos, ya que los genes asociados a la inmunidad actúan en múltiples vías, generando efectos pleiotrópicos asociados a otros procesos (van der Hoorn y Kamoun, 2008).

A partir del estudio de diversos patosistemas y gracias a los avances en este campo, se desarrolló el modelo denominado “Zig-Zag”(Jones y Dangl, 2006). Este modelo recibe su nombre al describir la dinámica de la respuesta inmune vegetal como una secuencia de etapas sucesivas que alternan entre el reconocimiento y la evasión, cuyo comportamiento, al ser representado gráficamente, adoptan un patrón en zig-zag (Jones y Dangl, 2006; Shafikova y Omelichkina, 2020; Ngou et al., 2022).

Dentro de este marco, se analiza la inmunidad de no huésped (NHR, del inglés *non-host resistance*), en la cual la enfermedad no se desarrolla debido a diversas barreras preformadas y mecanismos de defensa, entre ellos se incluye el reconocimiento de moléculas altamente conservadas del patógeno (Oh y Choi, 2022). Este reconocimiento activa una primera capa de defensa conocida como inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos (PTI, del inglés *PAMP-Triggered Immunity*).

No obstante, ciertos patógenos (en esta “lucha” coevolutiva) han desarrollado proteínas conocidas como efectores, que poseen, entre otras funciones, la capacidad de interrumpir esta primera etapa inmune, permitiendo el establecimiento de la infección. Del mismo modo, algunas especies o variedades de plantas también han evolucionado y desarrollaron una segunda capa inmune a partir de proteína de Resistencia, que

no son otras que las proteínas R que describe el modelo “Gene for Gene” de Flor, y que algunas de ellas tienen la capacidad de reconocer alguno de los efectores para desencadenar una segunda etapa de inmunidad más fuerte que pueden impedir la progresión de la enfermedad. Esta segunda capa es conocida como inmunidad activada por efectores (ETI, del inglés *Effector-Triggered Immunity*).

Finalmente, algunos fitopatógenos en este proceso han evolucionado sus efectores suprimiendo o interfiriendo con la inmunidad vegetal, en un proceso conocido como susceptibilidad activada por efectores (ETS, del inglés *Effector-Triggered Susceptibility*). Mediante este mecanismo, se debilita la inmunidad basal, favoreciendo la susceptibilidad de la planta y fomentando la progresión de la infección (Jones y Dangl, 2006).

En particular, en la ETS pueden intervenir procesos como la autofagia ya que se regula finamente la ubiquitinación de proteínas, en algunas situaciones estimulándola y en otros reprimiéndola, entre ellas proteínas de la inmunidad vegetal en un proceso dual muerte-vida que puede generar la muerte celular asociada a la enfermedad (necrosis), como la muerte celular programada (MCP) asociada a la respuesta hipersensible (HR, del inglés *Hypersensitive Response*) (Üstün et al., 2017; Üstün et al., 2018; Han et al., 2025).

Recientemente, se ha cuestionado el modelo Zig-Zag, porque postula que las capas de inmunidad PTI, ETI y ETS son claramente identificables. Actualmente, se ha demostrado que estos procesos inmunitarios están entrelazados, ya que comparten la activación de grandes procesos como la deposición de calosa, producción de ROS, la respuesta dependiente de MAPK, regulación de las fitohormonas y activación y represión de genes, muchos de los cuales se regulan de la misma forma en ambas capas de la inmunidad (Ngou et al., 2021; Yuan et al., 2021; Ramírez-Zavaleta et al., 2022; Dodds et al., 2024). En particular, ROS desempeña un rol tanto en PTI como en ETI, contribuyendo a la restricción de los microorganismos exógenos. Sin embargo, el patrón de aparición de ROS difiere según se active durante la PTI o ETI, e incluso se ha demostrado que la respuesta en la ETI es potenciada si previamente se activó la PTI (Ngou et al., 2021; Yuan et al., 2021). Esto indica que la magnitud de la ETI requiere tanto de la primera presentación de los PAMPs como del posterior reconocimiento de los efectores, conllevando a la amplificación de la resistencia (Ngou et al., 2021; Yuan et al., 2021).

Frente a este escenario, se ha propuesto un nuevo modelo, denominado modelo integrado de las respuestas PTI-ETI, el cual plantea que ambas respuestas inmunes se encuentran integradas y actúan de manera coordinada (Ngou et al., 2021; Yuan et al., 2021; Ramírez-Zavaleta et al., 2022; Dodds et al., 2024). Según este enfoque, luego de la supresión inicial de la respuesta PTI a causa de los efectores, dicha respuesta se restablece y potencia, lo que sugiere que la capa inmune más efectiva contra la propagación del fitopatógeno no sería la ETI en sí misma, sino la reactivación fortalecida de la respuesta PTI, lo que indicaría que la respuesta ETI no sería otra cosa que una respuesta particular dentro de la respuesta PTI, como se ilustra en la figura I.1 (Ngou et al., 2021; Yuan et al., 2021; Dodds et al., 2024). Una de las proteínas que llevó a este cambio de paradigma es el co-receptor BAK1, del cual depende la interacción flg22-FLS2 para activar la primera respuesta PTI, como se describe en la [sección II.1.5.4](#) (Yuan et al., 2021).

En particular, se planteó que los receptores NLR que se encuentran activos principalmente en la ETI, que podrían inducir la fosforilación de proteínas de la ruta de las MAPK, y activar genes que dependen de la respuesta ETI. Este mecanismo, podría compensaría la ETS, mediante la activación de la síntesis y reactivación de proteína llevando a reestablecer la activación de la PTI (Ngou et al., 2021; Han et al., 2025).

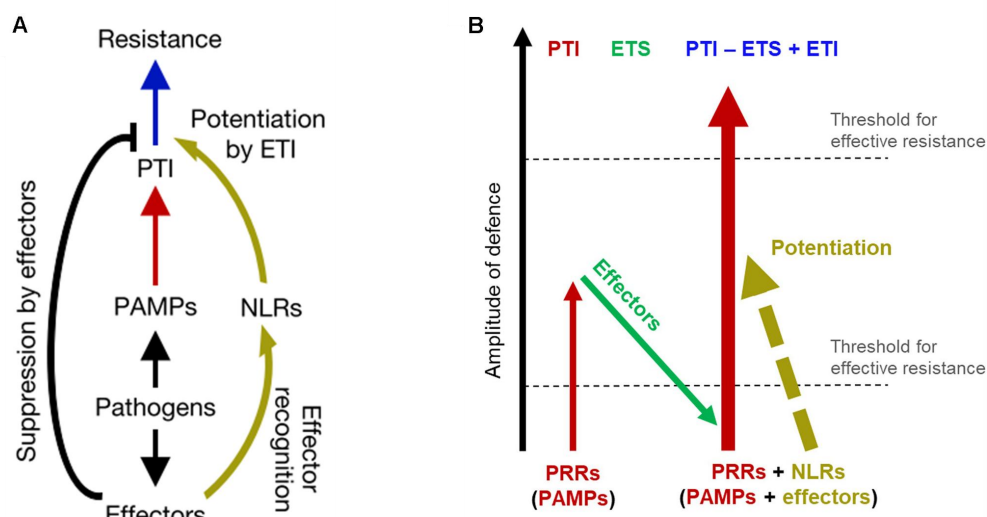


Figura 1.1. Modelo de integración de la respuesta PTI-ETI tomado de Ngou et al., 2021. **(A)** Los fitopatógenos presentan los PAMPs que pueden ser reconocidos, activando la respuesta PTI. Por el contrario, si la infección es compatible, los efectores generan susceptibilidad del mismo modo que en el modelo de Zig-Zag, que en el caso de ser un patógeno incompatible se desarrolla resistencia (Jones y Dangl, 2006). A menos que el reconocimiento de los efectores reactive mediante NLRs, inducción de genes, así como la inducción de la respuesta ROS potenciando la respuesta PTI. **(B)** Adaptación del modelo de zig-zag de la inmunidad en el que se considera la ETI como una respuesta inducida de la respuesta PTI, luego de un estado ETS.

1.2.2 Inmunidad de amplio espectro: Péptidos antimicrobianos propios de las plantas como estrategia para mitigar enfermedades

Desde hace ya un tiempo que se ha empezado a analizar la posibilidad no solo de apilar genes, sino también que el apilamiento incluya genes codificantes de péptidos antimicrobianos (AMPs, del inglés *Antimicrobial peptides*) (Odintsova y Egorov, 2012; Rivero et al., 2012; Furman et al., 2013; Furman, 2013; Tikunov, 2018; Conti et al., 2020).

Dado el potencial biotecnológico que los AMPs al conferir resistencia contra una gran diversidad de fitopatógenos, es fundamental comprender sus mecanismos de acción y, por ello, es relevante comprender sus estructuras funcionales. Los mismos pueden ser diferenciados en función de su estructura primaria, secundaria o terciaria, así como también en función de los motivos aminoacídicos (Kulaeva et al., 2020). Entre los motivos que los diferencian, se encuentran el grupo de mayor tamaño que es rico en cisteínas, entre estos se encuentra la familia de proteínas SNAKIN/GASA que fue caracterizado en diversos cultivos (Kulaeva et al., 2020; Nahirñak et al., 2024).

Los AMPs han demostrado tener funciones en diversos procesos, como el crecimiento y desarrollo vegetal, colaboración con el establecimiento de simbiosis planta-microbio y fundamentalmente en mejorar el rendimiento frente al estrés biótico y abiótico, al afectar directamente a los fitopatógenos y alterar el balance fitohormonal en beneficio de la planta (Iqbal et al., 2019; Nahirñak et al., 2019; Kulaeva et al., 2020).

En particular, los AMPs son de gran interés en cuanto a su efecto frente una diversa gama de microorganismos por presentar una actividad de amplio espectro. La baja presión de selección y la consecuente baja tasa de co-evolución caracterizan a estos genes, por formar parte de grandes entramados

de genes intervinientes en reforzar las barreras defensivas y la inmunidad vegetal. Esta característica disminuye la probabilidad de que los patógenos desarrollen resistencia prolongando la efectividad de los mismos (Iqbal et al., 2019; Iqbal, 2023).

Por estas razones, el apilamiento de genes que codifican AMPs representa una estrategia prometedora para el mejoramiento vegetal, ya que permitiría incrementar la resistencia de las plantas frente a diversos patógenos y mejorar el rendimiento de los cultivos de manera sustentable.

I.3 Estrategias biotecnológicas de control de enfermedades

I.3.1 Estrategias de control y su regulación

Con el avance de la biología molecular, la genómica y más recientemente la inteligencia artificial (IA), se desarrollaron nuevas estrategias para el control de enfermedades, que incluye las modificaciones genéticas tales como intragénesis, la cisgénesis y la transgénesis (Wang et al., 2024b; Han et al., 2025). Más recientemente, con el surgimiento de la tecnología CRISPR, surgieron enfoques de edición génica que permitieron desarrollar modificaciones genéticas focalizadas de forma más sencilla (Han et al., 2025).

Debido a la visión sesgada y negativa en la percepción pública hacia los organismos genéticamente modificados (OGM), en particular la transgénesis, han cobrado mayor relevancia nuevas tecnologías de mejoramiento molecular (NBT, del inglés *New Breeding Techniques*), entre las que se incluye la intragénesis, por ser considerados genes endógenos de las plantas (European Council of European Union; Goberna et al., 2023; Koshariya et al., 2024).

En particular, la República Argentina determina caso por caso si una obtención NBT se regula o no un evento OGM, o si se debe considerar como equivalente a una obtención realizada por mejoramiento convencional como podría ser la mutagénesis, poniendo el énfasis en el análisis del producto final y no la tecnología utilizada (Lema, 2019; Goberna et al., 2023; Zarate et al., 2023). Algunas de estas obtenciones podrían ser considerados OGM según la regulación de la UE que prioriza el procedimiento de obtención por sobre el producto final (Lema, 2019; Goberna et al., 2023; Zarate et al., 2023).

En Argentina, para ser considerado OGM, el evento final debe presentar una conspicua inserción de ADN exógeno. En otras palabras, un organismo se clasifica como OGM cuando presenta “nuevas combinaciones de material genético insertado mediante biotecnología moderna” es decir, haber incorporado ADN de forma estable en cualquier región del genoma (Goberna et al., 2023). Por esto, es que, si no es considerado OGM la obtención debe ser considerada equivalente a la obtenida por mejoramiento convencional (Goberna et al., 2023).

Asimismo, Argentina al haber aprobado para su liberación comercial más de ochenta OGMs (<https://www.argenbio.org/12740-cultivos-transgenicos-aprobados-en-argentina>) y haber analizado ya más de quinientas consultas de mejoramientos obtenidos mediante edición génica, cuya conclusión fue que no deben ser regulados como OGM, la tramitación suele ser más expeditiva en comparación con la UE (Lema, 2019; Goberna et al., 2023; Zarate et al., 2023).

1.3.2 Modificaciones genéticas para la obtención de cultivos resistentes a patógenos

El estudio de las áreas como fitopatología molecular, inmunidad vegetal en interacción con herramientas de la biología molecular, y las denominadas “ómicas” con la asistencia de IA, permiten la obtención de genes potenciales de interés para incorporar en cultivos masivos y poder obtener cultivos resistentes a patógenos (Wang et al., 2024b). Las metodologías previamente mencionadas como transgénesis, intragénesis, cisgénesis, mutagénesis y edición génica permiten modificar los genomas de los cultivos algunos con genes específicos y otros de forma aleatoria (Conti et al., 2021; Wang et al., 2024b).

Para mejorar la resistencia de las plantas contra patógenos, se pueden incorporar genes de la respuesta inmune como proteínas receptoras de reconocimiento de patrones (PRRs) factores de transcripción vinculados a la inmunidad, genes R y enzimas involucradas en la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, como fitoalexinas y polifenoles, entre otras alternativas (Saurabh y Prasad, 2021; Tyagi et al., 2021; Kaur et al., 2022; Zhang et al., 2022; Chai et al., 2023; Li et al., 2023; Koshariya et al., 2024; Zdrzałek et al., 2024). Otras alternativas implican el uso de la incorporación de ARNs no codificantes que pueden afectar la expresión de los genes afectando así la inmunidad vegetal en favor de la planta (Sticklen, 2015; Koshariya et al., 2024).

Por último, sería fundamental la planificación de estrategias que permitan la implementación de estos genes en programas de mejoramiento. Esto implica decidir si se los debe sobreexpresar o silenciar, así como considerar la posibilidad de apilar genes para desarrollar una resistencia más duradera (Rivero et al., 2012; Han et al., 2025). También se puede incluir genes de amplio espectro, como los péptidos antimicrobianos, que poseen características de resistencia de amplio espectro y ser más durable en el tiempo (Han et al., 2025).

1.4 Abordaje de la tesis y presentación de hipótesis de trabajo.

1.4.1 Presentación del problema que origina las hipótesis de trabajo:

Actualmente, entre las formas más empleadas para controlar las enfermedades bacterianas, se realizan aplicaciones químicas, principalmente basadas en el uso de compuestos cúpricos, los cuales generan algún tipo de impacto ambiental y/o disminución de la microbiota del suelo. De hecho, los agentes bacterianos como *Xanthomonas citri* subsp *citri*, agente infeccioso de la enfermedad de la Cancrosis de los Cítricos, son controlados por control químico en base a compuestos cúpricos (Palacios, 2005) que, además, no previenen otras enfermedades bacterianas como el HLB. Sería de gran relevancia para nuestro país poder desarrollar alternativas a los controles químicos para poder reducir el impacto ambiental de los mismos e incrementar la productividad de los cultivos.

Es por ello, que sería de mucho interés investigar la inmunidad vegetal y de esta forma poder encontrar posibles genes que confieran tolerancia/resistencia, ya sea parcial o completa frente a este tipo de estrés biótico. Para este estudio, se plantearon hacer dos tipos de investigaciones para evaluar, por un lado la inmunidad innata y por el otro la específica. Se conoce que las plantas poseen varios mecanismos de defensa contra agentes patógenos. Un mecanismo de la inmunidad conocido como resistencia horizontal (“durable”) permite generar defensa contra múltiples patógenos por lo que se dice que es de amplio espectro (Agrios, 2005; Kou y Wang, 2010), generar este tipo de defensa es deseable ya que, en general, suelen ser más sustentables al ser gobernada por múltiples genes (Kou y Wang, 2010; Li et al., 2020). Su principal problema,

es que no suelen ser resistencias de distribución continua (carácter cuantitativo) y que, al ser multigénicas, son más difíciles de seleccionar. Por otro lado, se encuentran las específicas que operan a partir del reconocimiento especie/variedad específica de proteínas por proteínas de resistencia (proteínas R) de las plantas generando una mayor resistencia contra patógenos planta-específico, como se explica a continuación (Agrios, 2005; Tariq y Saleem, 2018; Li et al., 2020). Para el mejoramiento vegetal actualmente la mejor estrategia es poder combinar genes de inmunidad específica e inespecífica (o innata) para obtener resistencia contra múltiples patógenos y que sea durable, disminuyendo la probabilidad de seleccionar resistencia en los patógenos frente a los mismos (Li et al., 2020). Por ello es de relevancia analizar ambos tipos de inmunidad, para lo cual se seleccionaron dos patosistemas: *Solanum* sp. – *Pseudomonas syringae* y Cítricos – *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, donde se analizan la inmunidad específica e innata, respectivamente.

I.4.2 Prospección rápida de genes (“*screening de genes*”) para el manejo biotecnológico de enfermedades: *Nicotiana benthamiana* como especie modelo para la evaluación experimental

Nicotiana benthamiana (*N. benthamiana*) ha sido ampliamente utilizada tanto para la expresión como silenciamiento de genes (Senthil-Kumar y Mysore, 2014; Derevnina et al., 2019; Golubova et al., 2024). Su genoma se encuentra completamente secuenciado con identificación de sus cromosomas, ensamblado y anotado, y presenta varias revisiones recientemente actualizadas (Bombarely et al., 2012; Kourelis et al., 2018a; Kourelis et al., 2018b; Derevnina et al., 2019; Ranawaka et al., 2023; Ko et al., 2024).

Asimismo, *N. benthamiana* es de gran interés para esta tesis por formar parte de la familia de las solanáceas, en la cual se encuentran los cultivos de tomate (*S. lycopersicum*), berenjena (*S. melongena*), papa (*S. tuberosum*), pimiento (*Capsicum spp.*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*), que son cultivos de interés agronómico (Goodin et al., 2008).

A su vez se han desarrollado diversos métodos para expresar genes de forma estable como transitoria, incluso para ser utilizada como biofactoría de proteínas ya que, al no ser una especie comestible, se pueden realizar modificaciones genéticas sin generar problemas éticos (Velásquez et al., 2009; Senthil-Kumar y Mysore, 2014; Bally et al., 2018; Derevnina et al., 2019; Ranawaka et al., 2023; Golubova et al., 2024).

N. benthamiana ha permitido la evaluación de genes de forma eficiente empleando el silenciamiento de forma transitoria mediante el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, del inglés *Virus-induced gene silencing*) sin la necesidad de desarrollar plantas transgénicas, lo que es de mucha utilidad para la evaluación rápida de los mismos (Baulcombe, 1999b; Brigneti et al., 2004; Senthil-Kumar y Mysore, 2014; Bally et al., 2018).

A diferencia de un silenciamiento completo, como ocurre en plantas *knockout*, el silenciamiento parcial que se logra a partir de la expresión transitoria de fragmentos de genes de aproximadamente 300 pb, con este sistema se permite observar fenotipos incluso en genes esenciales, cuyo silenciamiento total podría comprometer la viabilidad de la planta (Brigneti et al., 2004; Xu et al., 2007; Hayward et al., 2011; Senthil-Kumar y Mysore, 2014; Bally et al., 2018; Kourelis et al., 2018a; Kourelis et al., 2018b; Senthil-Kumar et al., 2018).

También, como se mencionó previamente, *N. benthamiana* es una excelente especie para sobreexpresar genes endógenos como exógenos mediante agroinfiltración (Goodin et al., 2008; Ma et al., 2012), para los cuales hay un amplio abanico de vectores así como distintas cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) para poder incorporar genes de interés e incluso métodos de agroinfiltración (por jeringa o por vacío) (Goodin et al., 2008; Ma et al., 2012; Norkunas et al., 2018). Ha sido ampliamente utilizada para

evaluar genes que confieren resistencia frente a patógenos ya que permite visualizar las respuestas de interacción proteína – proteína (Goodin et al., 2008; Ma et al., 2012; Norkunas et al., 2018). Incluso se encuentra en continua mejoría los métodos para la expresión transitoria para poder evaluar la inmunidad mediante la agroinfiltración de esta especie vegetal modelo (Beritz et al., 2024)

Por último, es una especie muy estudiada y empleada como modelo para analizar la relación entre plantas y fitopatógenos de distinto origen (bacteriano, viral, fúngico, etc.), con lo cual esto lo lleva como una planta de interés para analizar muchos patosistemas y poder trasladar esta información a otros cultivos de interés (Brigneti et al., 2004; Goodin et al., 2008; Senthil-Kumar y Mysore, 2014; Bally et al., 2018; Derevnina et al., 2019; Pombo et al., 2020).

En este sentido *N. benthamiana* presenta una eficiencia mayor de silenciamiento relativa con respecto a *S. lycopersicum*, que se encuentra en el rango de 85-95%, ya que suele tener un mayor desvío estándar en la frecuencia de silenciamiento y resulta más dependiente de factores como el estadio de las hojas y de la planta (Senthil-Kumar et al., 2007; Velásquez et al., 2009; Hayward et al., 2011). Del mismo modo, la sobreexpresión en *N. benthamiana* no requiere métodos complejos ni poco eficientes, a diferencia de los cítricos, donde es necesaria la generación de plantas modificadas estables (Conti et al., 2020).

En virtud de ello, *N. benthamiana* fue empleada en el presente trabajo como estrategia para realizar la caracterización funcional de genes candidatos para evaluar genes que promueven la defensa vegetal contra fitopatógenos bacterianos. Esta especie fue seleccionada como sistema modelo integrador para probar las hipótesis que se plantean en esta tesis.

I.5 Objetivo general

En este trabajo de tesis se propone estudiar procesos inmunitarios en especies vegetales durante infecciones bacterianas. Por un lado, se analizan genes que poseen inducida su expresión durante la inmunidad vegetal específica en *S. lycopersicum*, evaluándolos en *N. benthamiana* – *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*Ps tab*). Por otro lado, se estudian genes vegetales con posibles efectos antimicrobianos de amplio espectro provenientes de *Citrus* sp. y ensayando su funcionalidad en *N. benthamiana* desafiada con *Ps tab* y *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*). A partir de este trabajo, se pretende contribuir al avance del conocimiento con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias para el mejoramiento vegetal.

I.5.1 Objetivos específicos

1. Realizar un análisis bioinformático para seleccionar gen/es candidato/s codificante/s para proteínas quinasas y/o factores de transcripción que participan en la inmunidad contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) y evaluarlos funcionalmente.
 - a) Se caracterizará su contribución en las respuestas PTI y/o ETI.
 - b) Se evaluará si los genes candidatos participan en la respuesta inmune asociada a patógenos no bacterianos.
2. Generar una búsqueda bioinformática de genes de cítricos de la familia de proteínas SNAKIN/GASA, con el fin de seleccionar candidatos que resultaran interesantes para ser evaluados funcionalmente como péptidos antimicrobianos. Se ha demostrado que algunos genes ortólogos en especies como la papa presentaban poder antimicrobiano frente a distintos patógenos bacterianos y fúngicos. Tal fue el caso de la proteína SNAKIN (Almasia

et al., 2008; Faccio et al., 2011; Nahirñak et al., 2012b; Almasia et al., 2017; Almasia et al., 2020)

- a) A partir de la búsqueda de genes que poseen dominios GASA en *C. sinensis*, especie secuenciada (Xu et al., 2013), se caracterizará estructuralmente la familia de genes ortólogos de dicha familia en cítricos.
- b) Se clonarán y secuenciarán dichos genes e identificarán posibles variantes que posean los dominios GASA, y se analizarán las relaciones filogenéticas entre los miembros de esta familia de proteínas en las especies cítricas.
- c) Se analizará su expresión mediante RT-qPCR en distintas variedades de cítricos para determinar aquellos con potencial efecto antimicrobiano de amplio espectro.
- d) Se clonarán y evaluarán funcionalmente los genes candidatos seleccionados mediante desafíos frente a patógenos bacterianos tales como *Xcc*. Los genes seleccionados fueron evaluados en ensayos de sobreexpresión transitoria en *N. benthamiana* como sistema modelo vegetal, con el fin de determinar si presentan poder antimicrobiano.

I.5.2 Hipótesis de trabajo

1. Los genes inducidos en las respuestas PTI y/o ETI pueden estar involucrados en inducir la inmunidad, en particular los genes que codifican para proteínas quinasas, cuya función ha sido demostrada en las cascadas de señalización dependientes de MAPK. Del mismo modo, los factores de transcripción podrían contribuir mediante la retroalimentación de las vías de señalización asociadas a la respuesta inmune, considerando que la expresión génica se modula en los distintos procesos inmunes.
 - a) Los genes seleccionados se puede predeterminar su posible identidad a partir de un análisis filogenético incluyendo los genes de *A. thaliana*, especie vegetal más estudiada.
 - b) Los genes que se inducen durante la inmunidad en tomate pueden ser caracterizados funcionalmente en *N. benthamiana* como planta modelo mediante VIGS, especialmente aquellos de familias de proteínas pequeñas, cuya baja redundancia génica facilita el silenciamiento eficiente de los genes blanco.
 - c) El silenciamiento en plantas de *N. benthamiana*, permite caracterizar funcionalmente los genes mediante ensayos de muerte celular programada (MCP), como de enfermedad.
 - d) El silenciamiento permitiría evaluar otros efectos pleiotrópicos, como puede ser el proceso de senescencia.
2. La familia de proteínas SNAKIN/GASA ha sido descrita en cultivos muy diversos. El análisis filogenético en cítricos permite identificar los genes de esta familia en cítricos. Los genes que SNAKIN/GASA de cítricos presentan función antimicrobianos que pueden ser de interés para evaluar frente a enfermedades bacterianas, en particular aquellas que afecten la producción citrícola.

- a) La búsqueda de genes SNAKIN/GASA en cítricos presentan los mismos dominios en cítricos, que permite su identificación y agrupan en las mismas tres subfamilias descritas.
- b) Los genes clonados pueden ser sobreexpresados de forma transitoria en plantas de *N. benthamiana*.
- c) La sobreexpresión permite caracterizar funcionalmente su efecto en la inducción de la inmunidad y de retraso en la enfermedad, ambos componentes de péptidos antimicrobianos.
- d) Mediante sobreexpresión transitoria se puede evaluar la afectación en la enfermedad mediante patosistemas compatibles e incompatibles en *N. benthamiana*, tales como los producidos por *Ps tab* y *Xcc*, respectivamente.
- e) El patosistema compatible genera sintomatología de enfermedad que permite su cuantificación.
- f) El patosistema incompatible permite evaluar la inducción de la inmunidad mediante su cuantificación.

II - INMUNIDAD ESPECÍFICA

Solanum sp. - Pseudomonas syringae

“Nada en este mundo debe ser temido, solo entendido.

Ahora es el momento de entender más,

para poder temer menos.”

Marie Slodowska-Curie

II Inmunidad específica: *Solanum* sp. – *Pseudomonas syringae*

II.1 Introducción

II.1.1 *Solanum lycopersicum* (tomate) como cultivo de relevancia

A nivel mundial, el tomate se encuentra junto con los pimientos en el segundo de mayor producción de los cultivos hortícolas luego de la papa (FAOSTAT, 2023), mientras que en Argentina se ubica en el primer lugar junto con la papa. El mismo aporta una gran cantidad de antioxidantes, lo que lo hace de mucha relevancia nutricional (Bergougnoux, 2014). A nivel mundial la producción de tomates se consume tanto en fresco como pastas, jugos, salsas, en polvo, concentrado o entero, lo que indica distintos grados de procesamiento e industrialización (Bergougnoux, 2014).

Debido a que no tiene requerimientos especiales, se produce en ambientes con temperaturas tanto tropicales como templadas, es producido en mayor o menor medida en todo el mundo en épocas del año con las condiciones apropiadas de luz y temperatura (Bergougnoux, 2014). Argentina se encuentra entre los primeros 20 productores mundiales de tomate (FAOSTAT, 2023). El tomate es destinado principalmente a consumo fresco (tomate fresco) y tomate para la industria (tomate industria), siendo aproximadamente 65% destinado a la fresco y 35% a industria (Dirección de Producción Agrícola La Producción de Tomate en Argentina, 2020; Secretaría de Agricultura, 2023).

Debido a la extensión del país, Argentina presenta diversas condiciones agroclimáticas que permiten una producción de tomate de forma continua a lo largo del año (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca, 2023). Esto se debe a que las regiones productoras se alternan según las variaciones estacionales de humedad y temperatura (Dirección de Producción Agrícola La Producción de Tomate en Argentina, 2020).

II.1.2 Enfermedades que afectan al tomate

Las plagas y enfermedades representan un desafío significativo para la horticultura, afectando especialmente al cultivo de tomate. Entre las enfermedades se destacan los nemátodos del género *Meloidogyne* (Villasanti y Pantoja, 2013). Diversas infecciones causados por diversos complejos de oomicetes u hongos causados por agentes de *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Botrytis cinérea* generan putrefacción del sistema vascular y la caída del vástago a consecuencia de ello (Villasanti y Pantoja, 2013). Entre las enfermedades virales se encuentran *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), el *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), el *Groundnut ring spot virus* (GRSV) y el *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), entre otras (Villasanti y Pantoja, 2013).

Las enfermedades bacterianas son las que originan el interés en este trabajo. En este cultivo, algunas de las que presentan mayor relevancia son las causadas por bacterias Gram positivas, tales como: *Clavibacter michiganensis*, que causa la enfermedad del Cancro bacteriano, *Ralstonia solanacearum* que causa la putrefacción de sistema vascular en la enfermedad causada por el marchitamiento bacteriano (Villasanti y Pantoja, 2013). Asimismo, diversas bacterias Gram negativas pueden infectar este cultivo, entre las que se destacan *Xanthomonas axonopodis* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, agentes causales de la mancha bacteriana y *Pst*, responsable de la peca bacteriana (Villasanti y Pantoja, 2013). Estas enfermedades

afectan principalmente hojas y frutos, comprometiendo la calidad y el valor comercial de la producción (Villasanti y Pantoja, 2013).

La baja tecnificación, en particular dependiendo mayoritariamente de la labor manual (~ 53%) que presenta el sector hortícola en Argentina, siendo un sistema poco sustentable (Piastrellini et al., 2024), lleva a que todas estas enfermedades sean de suma importancia. En este sentido, la comprensión de las relaciones planta-patógeno, en particular en la inmunidad vegetal, podrían brindar oportunidades para la optimización de los sistemas productivos en el sector hortícola, particularmente en el cultivo de tomate.

II.1.3 *Solanum lycopersicum* como modelo para la identificación de genes de la respuesta inmune

La especie *S. lycopersicum* pertenece a la familia *Solanaceae*. Las solanáceas, son un género vegetal que incluye múltiples cultivos de interés agrícola para consumo y producción de alimentos, entre los que se encuentra la papa, berenjena, tabaco y numerosas especies medicinales (Bergougnoux, 2014; Causse et al., 2016). Asimismo, muchas de las enfermedades que afectan al cultivo de tomate, afectan a varias de las otras especies del género (Arie et al., 2007; Villasanti y Pantoja, 2013).

El estudio de la inmunidad vegetal podría proveer una mejor comprensión de las enfermedades que afectan a estas especies de alto consumo local, brindando información clave y herramientas aplicables a programas de mejoramiento genético. También, el tomate ha sido objeto de un minucioso proceso de secuenciación y re-secuenciación, lo que ha permitido disponer de un genoma de alta calidad, exhaustivamente anotado y respaldado por secuencias confiables (Causse et al., 2016; Kim et al., 2017), convirtiéndolo en un recurso valioso para investigaciones en inmunidad vegetal.

II.1.4 *Pseudomonas syringae* como modelo para el estudio de enfermedades

P. syringae, es una bacteria Gram negativa, aerobia, perteneciente al grupo de las γ -proteobacteria de la familia de las *Pseudomonadaceae* (Singh et al., 2016). Es un fitopatógeno que afecta la parte aérea de la planta, en particular hojas y frutos, y afecta muchos cultivos agrícolas de interés económico, entre ellos cultivos de las solanáceas, como el tomate y del género *Nicotiana* (Xin y He, 2013a; García-Valdés y Lalucat, 2016). Se han identificado al menos 67 patovares, cada uno con capacidad para infectar distintas especies o variedades específicas de cultivos (García-Valdés y Lalucat, 2016). En particular, *Pst* es el agente causal de la peca bacteriana en tomate (Xin y He, 2013a). Se comporta como un patógeno hemibiotrófico, presentando inicialmente una breve fase epífita en la filósfera (Xin y He, 2013a). Posteriormente, penetra en la planta a través de estomas o heridas, donde se multiplica en el apoplasto, provocando finalmente la formación de manchas necróticas en hojas y frutos (Xin y He, 2013a).

Este género es un excelente modelo ya que ha sido muy estudiado, por la gran cantidad de cultivos que afecta, así como *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) se encuentra completamente secuenciada (Buell et al., 2003). Diversas mutaciones se han generado en esta bacteria con el objetivo de incorporar o eliminar efectores, de forma de *disectar* las distintas etapas de la respuesta inmune (Martin, 2011; Rosli et al., 2013; Pombo et al., 2014). Estas aproximaciones experimentales han sido aplicadas en el estudio de patosistemas compatibles e incompatibles, mediante el uso de distintas especies vegetales modelo como *N. benthamiana*, *S. lycopersicum*, *A. thaliana*, entre otras especies (Whalen et al., 1991; Preston, 2000; Wei et al., 2007; Martin, 2011; Xin y He, 2013a).

II.1.5 Inmunidad vegetal específica: *Solanum* sp. – *Pseudomonas syringae*

Como se expuso en la [sección I.2](#), la inmunidad es un proceso muy complejo que consta de interacciones en constante co-evolución entre el fitopatógeno y el hospedador. Mediante la expresión de efectores que conducen a una interacción incompatible como ocurre con el patosistema *S. lycopersicum* – *Pst* DC3000, es posible estudiar distintos aspectos de la interacción planta-bacteria. A partir de genes inducidos durante esta interacción incompatible, se puede realizar la evaluación funcional de los mismos empleando como patosistema modelo *N. benthamiana* – *Ps tab*.

Pst DC3000 se multiplica en el apoplasto (Xin y He, 2013a), y al igual que todos los microorganismos, presenta moléculas muy conservadas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés por *pathogen-associated molecular patterns*) (Jones y Dangl, 2006; Thomma et al., 2011; Zipfel, 2014; Alhoraibi et al., 2019; Shafikova y Omelichkina, 2020; Yuan et al., 2021). Entre los PAMPs de esta bacteria se destacan flg22 y flgII-28, dos epítopes de la proteína la flagelina (Ciarroni et al., 2018), los cuales son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *pattern-recognition receptors*), FLS2 y FLS3, respectivamente (Gómez-Gómez y Boller, 2000; Zipfel, 2014; Hind et al., 2016; Roberts et al., 2020). Ambas interacciones activan la respuesta PTI (Gómez-Gómez y Boller, 2000; Hind et al., 2016; Boutrot y Zipfel, 2017; Roberts et al., 2020). Dado que la interacción flg22-FLS2, mediada por el PRR FLS2, ha sido previamente identificada y está presente en numerosas especies, entre las que se incluyen *A. thaliana*, *S. lycopersicum* y *N. benthamiana*, el mecanismo de acción es mejor comprendido (Gómez-Gómez y Boller, 2000; Zipfel, 2014; Ciarroni et al., 2018). Se sabe que el epítope flg22 es reconocido por las plantas, mientras que flgII-28 es reconocido exclusivamente por algunas solanáceas, como el tomate y la papa, pero no por *N. benthamiana* (Clarke et al., 2013; Hind et al., 2016; Roberts et al., 2020).

El reconocimiento por parte de la proteína LRR FLS2 de la bacteria depende de la interacción con el co-receptor BAK1 (Boutrot y Zipfel, 2017; Ngou et al., 2022; Ramírez-Zavaleta et al., 2022). De esta forma se activa la cascada de señalización dependiente de MAPK llevando a activar la expresión génica (Chakravarthy et al., 2010; Boutrot y Zipfel, 2017; Ngou et al., 2021; Yuan et al., 2021). Luego, se desencadena la primera respuesta PTI, en contraste con la PTI inducida por la ETI (PTI inducida) para impedir la infección. Esta respuesta incluye refuerzo de la pared celular mediante la deposición de calosa, producción de ROS y cambios en la concentración de calcio intracelular (Yuan et al., 2021; Ngou et al., 2022; Dodds et al., 2024). El incremento de calcio intracelular que activa la señalización de las vías de MAPK, es causado por la activación de la señalización de ROS (Bhattacharjee, 2019), que a su vez termina desencadenando la expresión de genes de la inmunidad.

II.1.5.1 Inmunidad vegetal: un proceso en interrelación con la autofagia y la senescencia

En términos generales, los fitopatógenos establecen dos tipos principales de relaciones con sus hospedadores: necrotróficas y biotróficas. Los primeros suelen ser patógenos oportunistas que dependen de la muerte celular del tejido vegetal, por lo que liberan toxinas para inducir muerte celular necrótica (Liu y Bassham, 2012). En cambio, los biotróficos mantienen un delicado equilibrio que les permite vivir dentro de las células vegetales procurando mantener los tejidos vivos el mayor tiempo posible (Liu y Bassham, 2012).

En este contexto, la muerte celular vegetal emerge como un proceso clave durante la interacción hospedador-patógeno.

La muerte celular en plantas puede clasificarse principalmente en dos tipos: necrosis y muerte celular programada (MCP) (Kalra y Bhatla, 2018; Bhattacharjee, 2019). La necrosis se define como un proceso de muerte celular inespecífico, en el proceso infeccioso es la causante de la sintomatología de enfermedad en un sistema compatible, donde el patógeno genera daño como consecuencia del daño celular por el mismo (Kalra y Bhatla, 2018; Bhattacharjee, 2019). Esto lleva a la destrucción de membranas, y liberación del contenido celular, y fundamentalmente no se encuentra regulado genéticamente por la planta (Kalra y Bhatla, 2018; Bhattacharjee, 2019). En tanto que la MCP desarrollada dentro de la HR, esta diagramada de forma muy fina mediante la expresión de genes y activación/inactivación de proteínas y es un proceso de la inmunidad vegetal para restringir al patógeno (Bhattacharjee, 2019).

Un proceso clave involucrado en estas formas de muerte celular es la autofagia, un mecanismo catabólico conservado, con un rol central en el control de la homeostasis celular y que participa activamente tanto en procesos fisiológicos como en respuestas al estrés (Seay y Patel, 2006; Liu y Bassham, 2012; Kalra y Bhatla, 2018; Ali et al., 2024). La autofagia, cuyo nombre proviene del griego “auto” (αὐτό): que significa *uno mismo*, “phagein” (φαγεῖν): que significa *comer*, es decir *comerse a uno mismo* (Seay y Patel, 2006; Liu y Bassham, 2012; Kalra y Bhatla, 2018; Wang y Schippers, 2019), cumple funciones esenciales en el reciclado de componentes celulares, y se activa en situaciones de estrés, desarrollo, inmunidad, senescencia y germinación (Seay y Patel, 2006; Liu y Bassham, 2012; Kalra y Bhatla, 2018; Ali et al., 2024).

Durante la interacción planta-patógeno, hay un complejo entramado de la muerte celular y en todos ellos interviene de forma central la autofagia. Esta interviene fomentando tanto la MCP-HR que se desarrolla para prevenir la infección de un agente (hemi) biótrofo (Liu y Bassham, 2012; Üstün et al., 2017; Petersen et al., 2024), así como la MCP que se desarrolla durante un proceso senescente (Liu y Bassham, 2012; Kalra y Bhatla, 2018; Petersen et al., 2024), como en la muerte celular desarrollada durante la necrosis por el proceso infeccioso (Liu y Bassham, 2012; Üstün et al., 2017; Petersen et al., 2024).

Esto se debe a que en estos procesos hay una interacción (*crosstalk*) en las vías metabólicas que las desencadenan, las cuales pueden ser pro-bacteria o anti-bacteria, ya sea fomentando la MCP-HR o la necrosis (Üstün et al., 2017), o incluso actuar de ambas formas (Üstün et al., 2018). Este comportamiento se explica en parte por la co-evolución entre fitopatógenos y plantas (van der Hoorn y Kamoun, 2008).

En particular, se han descrito procesos pro-bacteria y anti-bacteria en el que participa la autofagia, empleándose el patosistema compatible de *A. thaliana* desafiada con *Pst* DC3000 (Üstün et al., 2018).

En este sentido, la inmunidad específica fue evaluada mediante el enfoque del patosistema *N. benthamiana* – *Ps tab*, aprovechando la capacidad de esta bacteria para establecer interacciones compatibles, por ser su patógeno natural, como incompatibles a partir de la expresión de efectores de *Pst* DC3000 (Kang et al., 2004). Esto permitió evaluar la aparición de sintomatología relacionada con enfermedad o con inmunidad, observando visualmente las formas de muerte celular como indicadores clave. Así, se busca contribuir a la comprensión de la inmunidad vegetal, con especial énfasis en el rol que podría desempeñar la autofagia en este proceso.

II.1.5.2 Familia de proteínas ATG1: Inmunidad y autofagia

Como se explicará a continuación, se evaluó la familia de proteínas ATG1, proteína que interviene en el proceso de autofagia. Como el proceso de la autofagia se encuentra muy conservado y dada la relevancia de

ATG1 (ULK1, en animales) en iniciar la formación del autofagosoma, esta proteína se encuentra presente en la mayoría organismos estudiados, desde bacterias, hongos, animales y plantas (Noda y Fujioka, 2015; Batoko et al., 2017; Demeter et al., 2020; Zhang et al., 2021)

El proceso entre animales y plantas presenta algunas diferencias, una de las principales divergencias radica en el destino final del autofagosoma: en animales, éste se fusiona con el lisosoma, mientras que en plantas y levaduras lo hace con la vacuola (Bassham et al., 2006; Lv et al., 2014; Noda y Fujioka, 2015; Zhang et al., 2021).

En este contexto, las proteínas ATG (del inglés *Autophagy Related Gene*) son fundamentales para conducir el proceso autofágico. Una de las proteínas con especial interés es la ATG1, que en levaduras, organismos en los que más se ha estudiado dicho proceso, presenta un dominio quinasa (KD, del inglés *kinase domain*) en el extremo C-terminal y un dominio de unión a microtúbulos (MIT, del inglés *microtubule-interacting and transport*) (Stjepanovic et al., 2014).

Recientemente, algunos autores evaluaron los dominios de la proteína *AthATG1a* en un patosistema compatible con *Pst* DC3000 y demostraron una interacción proteína – proteína con AvrPto y AvrPtoB (Lal et al., 2020). En particular, AvrPto presenta una interacción fuerte con el dominio KD de *AthATG1a* y AvrPtoB presenta una interacción moderada con el dominio MIT de *AthATG1a*.

Lal et al. (2020) plantean que, *AthATG1a* al no interactuar con el dominio de ubiquitinación de AvrPtoB, este efector probablemente no marca a *AthATG1a* para su degradación a través del proteasoma. Asimismo, pudieron detectar que *AthATG1a* presentó seriamente afectada su capacidad de autofosforilación en presencia de AvrPtoB. Y, teniendo en cuenta que *Pst* DC3000 es compatible en *A. thaliana*, en un ensayo con *Pst* DC3000 Δ AvrPto Δ AvrPtoB, es decir con estos dos efectores mutados, disminuyó la virulencia.

Los autores discuten que los efectores AvrPto y AvrPtoB podrían manipular el proceso de la autofagia mediante la interacción con las proteínas centrales de este proceso, tal como ATG1, lo que podría llevar a modular la respuesta inmunitaria del hospedador.

II.1.5.3 Silenciamiento génico transitorio como metodología para la caracterización funcional de genes

Para realizar la caracterización funcional de los genes de la familia de proteínas ATG1, se decidió utilizar al silenciamiento génico experimental en plantas de *N. benthamiana* por ser una excelente especie modelo (sección I.4.2). Para ello se empleó la metodología VIGS (sección II.2.5), que permite el silenciamiento transitorio de forma eficiente en esta especie debido a su alta susceptibilidad a la infección por virus (Goodin et al., 2008). Como se detalló previamente (sección I.4.2), esta metodología emplea el silenciamiento postranscripcional vegetal a partir de la incorporación en el virus de una secuencia de aproximadamente 200 - 300pb complementaria al ARN del gen blanco deseado para su silenciamiento (Liu y Page, 2008). Estos virus modificados, son virus atenuados que tienen minimizados la sintomatología en la planta (Liu y Page, 2008).

Los virus son utilizados como vehículos para generar una infección sistémica en la planta, lo que permite la dispersión del ARN complementario a lo largo de todo el tejido vegetal. Luego, la planta detecta las moléculas de ARN de doble cadena formadas, a partir de las cuales se sintetizan moléculas complementarias al ARNm, mediando así el silenciamiento postranscripcional a través de la degradación específica del ARNm del gen endógeno (Baulcombe, 1999a; Liu et al., 2002b; Liu et al., 2002a; Brigneti et al., 2004; Senthil-Kumar y Mysore, 2014).

II.1.5.4 Uso del patosistema *Nicotiana benthamiana* – *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* para evaluar la enfermedad

En las bacterias fitopatógenas, como *P. syringae*, se liberan efectores al citoplasma por el sistema de secreción de tipo III (SST3) (Lindeberg et al., 2012; Xin et al., 2018). En particular, como se ilustra en la figura II.1, *Pst* DC3000 libera aproximadamente 30 efectores mediante este sistema, que alteran el metabolismo de la célula vegetal en favor de la bacteria, algunos de ellos interrumpen la PTI y, entre ellos, se encuentran AvrPto y AvrPtoB (Sessa y Martin, 2000; Cohn y Martin, 2005; Mucyn et al., 2006; Mucyn et al., 2009; Martin, 2011; Oh y Martin, 2011; Lindeberg et al., 2012; Xin y He, 2013a; Ntoukakis et al., 2014; Sheikh et al., 2023).

Ambos interactúan con la proteína Pto, presente en algunas variedades de tomate, la cual, junto con la proteína Prf, desencadena la respuesta ETI. Esta respuesta, entre otros mecanismos, activa la HR – MCP, restringiendo al patógeno que requiere tejido vivo para su multiplicación (Gutierrez et al., 2010; Martin, 2011; Xin y He, 2013a; Zhang et al., 2024b). Es relevante destacar que, debido a que hay un *crosstalk* entre las respuestas inmunes, muchas cascadas de señalización son compartidas (ver [sección 1.2.1](#)). Esto ocurre, principalmente, porque ciertos genes son inducidos en ambas respuestas (PTI/ETI) (Ngou et al., 2022; Dodds et al., 2024). Por ello, se hipotetizó que ciertos genes que codifican para proteínas quinasas inducen su expresión en etapas específicas de la respuesta inmune, para ser seleccionadas y hacer la caracterización funcional de los mismos.

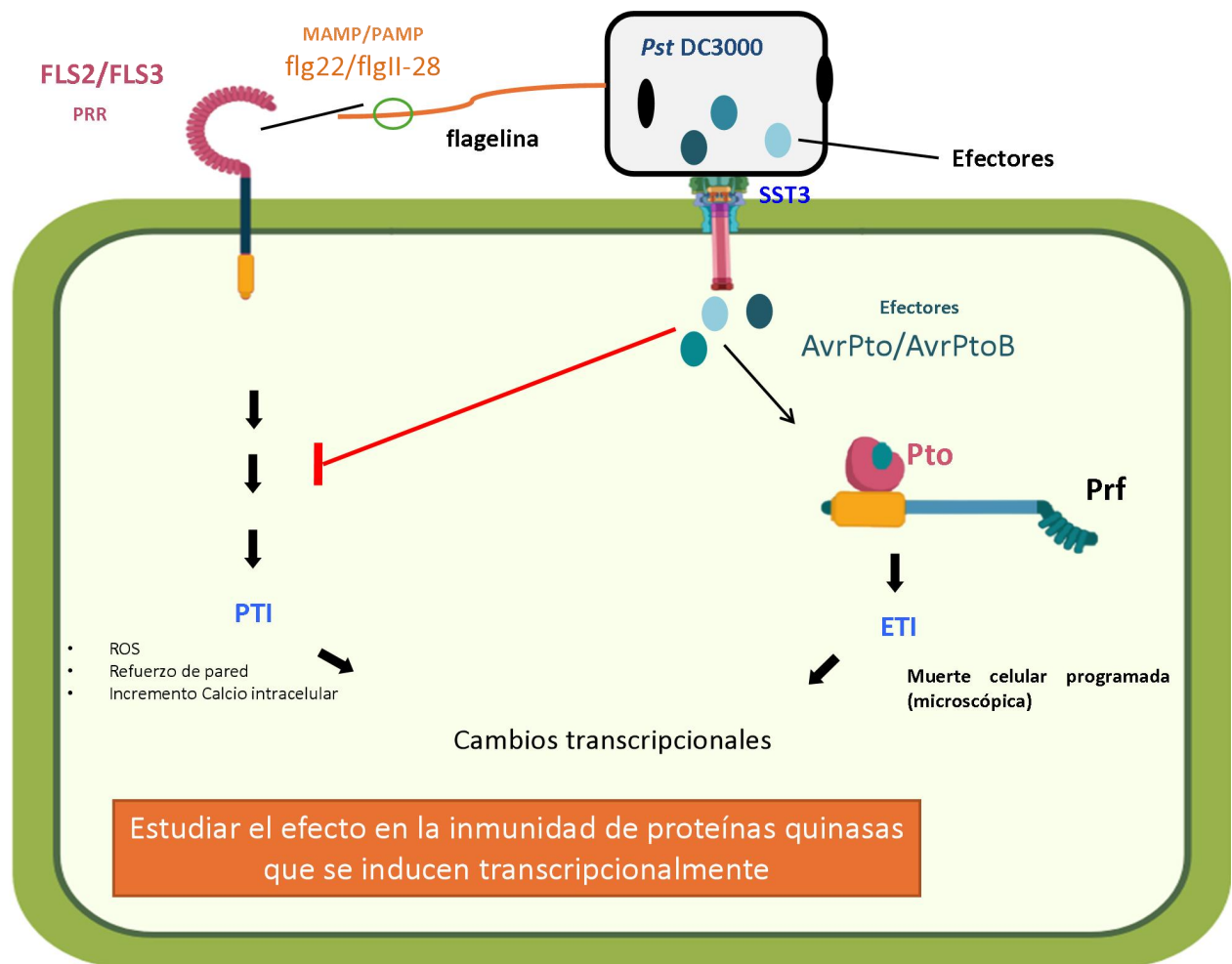


Figura II.1. Modelo ilustrativo representativo de la interacción de la bacteria *Pst* DC3000 con la célula vegetal de *S. lycopersicum* Río Grande expresando la proteína R Pto. La bacteria flagelada presenta los epítopes flg22 y flgII-28 reconocidas por los PRR FLS2 y FLS3 respectivamente. Este reconocimiento desencadena la primera respuesta PTI, sintetizando ROS, reforzando la pared celular con calosa e incrementando el calcio intracelular, el cual es un segundo mensajero y activa múltiples respuestas inmunes. Asimismo, este agente presenta en su interior proteínas efectoras que son secretadas al citoplasma de la célula vegetal a partir de un sistema de secreción de tipo III. Las mismas manipulan la maquinaria celular, y en particular, los efectores AvrPto y AvrPtoB, interrumpen la PTI. No obstante, esta variedad de tomate, a partir de la proteína Pto, se produce un reconocimiento y que en conjunto con la proteína Prf conlleva a generar la ETI, que se destaca por la HR – MCP. Ambas respuestas generan a su vez, cambios transcripcionales de genes que participan en la inmunidad vegetal. Por lo que se decidió analizar algunos de estos genes con dominios proteínas quinasas que se inducen.

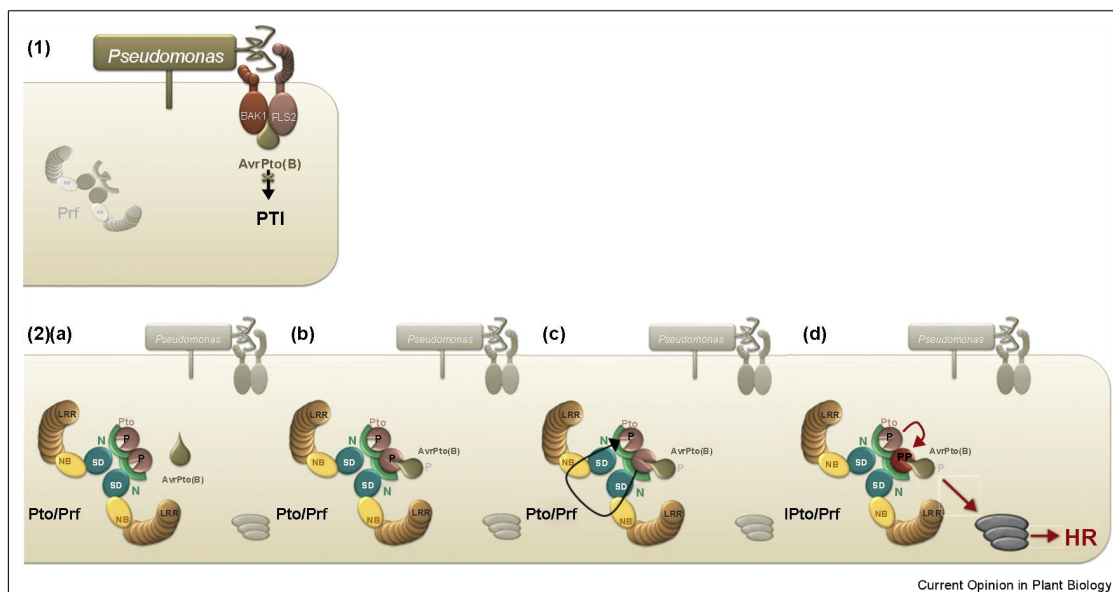
II.1.5.5 Sobreexpresión de los genes Pto – AvrPto como estrategia para evaluar la HR y análisis de los factores moleculares asociados a la aparición de síntomas causados por esta respuesta

Para realizar la caracterización funcional de los genes de la familia de proteínas ATG1, se realizó un ensayo de HR – MCP. El fundamento de esta estrategia se basa en la sobreexpresión del efector AvrPto de *Pst* DC3000 que es reconocido por la proteína Pto y en conjunto con Prf desencadena la respuesta ETI. La interacción entre estas proteínas, que al ser sobreexpresadas alcanzan una concentración elevada, permite visualizar de forma macroscópica la sintomatología de HR – MCP (Sessa y Martin, 2000; Mucyn et al., 2006; Mucyn et al., 2009; Martin, 2011; Oh y Martin, 2011; Ntoukakis et al., 2014; Sheikh et al., 2023).

Como se ilustra en la figura II.2A, se ha demostrado que, en ausencia de los efectores AvrPto/AvrPtoB, las proteínas Pto y Prf se encuentran en un oligómero conformado por dos proteínas Pto y dos proteínas Prf (Mucyn et al., 2006; Gutierrez et al., 2010; Ntoukakis et al., 2013; Ntoukakis et al., 2014; Saur et al., 2015; Sheikh et al., 2023). Una de las proteínas Pto funciona como asistente (*helper*) y la otra actúa como sensora (*sensor*) (Ntoukakis et al., 2014). Las proteínas Pto se encuentran fosforiladas previamente al sensado de los efectores (Mucyn et al., 2006; Gutierrez et al., 2010; Ntoukakis et al., 2013; Sheikh et al., 2023). Cuando la presencia de alguno de los dos efectores previamente nombrados, interactúa la Pto-sensora, promueve un cambio conformacional en la misma (Ntoukakis et al., 2013; Sheikh et al., 2023). Este cambio, junto con la estructura terciaria en bucle previamente fosforilada, provoca la separación de la Pto-sensora del oligómero, lo que deshabilita la regulación negativa y permite que la Pto-sensora transfosforile a la Pto-asistente. Esta, a su vez, genera una retroalimentación positiva al transfosforilar nuevamente a la Pto-sensora (Ntoukakis et al., 2013; Ntoukakis et al., 2014; Sheikh et al., 2023). Tras la transfosforilación de la Pto-sensora, el complejo Pto/Prf/AvrPto(B) se activan la cascada de señales dependiente de MAPK que culmina en el desarrollo de la muerte celular programada dentro de la HR (HR – MCP) (Tang et al., 1996; Ntoukakis et al., 2014; Sheikh et al., 2023).

Es de interés mencionar que, si bien AvrPto y AvrPtoB tienen funciones parcialmente redundantes, ya que tienen la capacidad de interactuar con las proteínas FLS2 y BAK1 para interrumpir la inmunidad, y también ambas poseen un dominio que permite el reconocimiento de la proteína Pto de tomate, el dominio PID (del inglés *Pto-interaction domain*), las dos proteínas presentan distintos dominios (Martin, 2011), como se observa en la figura II.2B. Brevemente, la proteína AvrPto presenta tres dominios: (1) la región de secreción/translocación tipo III (T3S, del inglés *the type III secretion/translocation*), que también contiene el motivo de miristilación; (2) PID, que abarca el lazo CD; y (3) el dominio C-terminal (CTD, del inglés *C-terminal domain*). Si bien AvrPtoB presenta el dominio PID, también tiene la capacidad de interactuar con la proteína Bti9, a diferencia de AvrPto (Cheng et al., 2011; Martin, 2011), lo que indicaría que este dominio difiere funcionalmente entre los efectores mencionados. Del mismo modo, AvrPtoB también cuenta con el dominio T3S, aunque no posee el motivo de miristilación y presenta otros tres dominios: el dominio de interacción con Fen/BID (FID, del inglés *Fen-interaction domain*; BAK 1 *interaction domain*), una región que contiene un motivo de interacción con ubiquitina (UIM, del inglés *region containing a ubiquitin interaction motif*); y la ligasa de ubiquitina tipo E3 (E3ub3, del inglés *E3 ubiquitin ligase domain*). Por lo que, si bien, ambas proteínas debido a la interacción con FLS2 Y BAK1 interrumpen la primera respuesta PTI, AvrPtoB tiene dominios que AvrPto no posee.

A



B

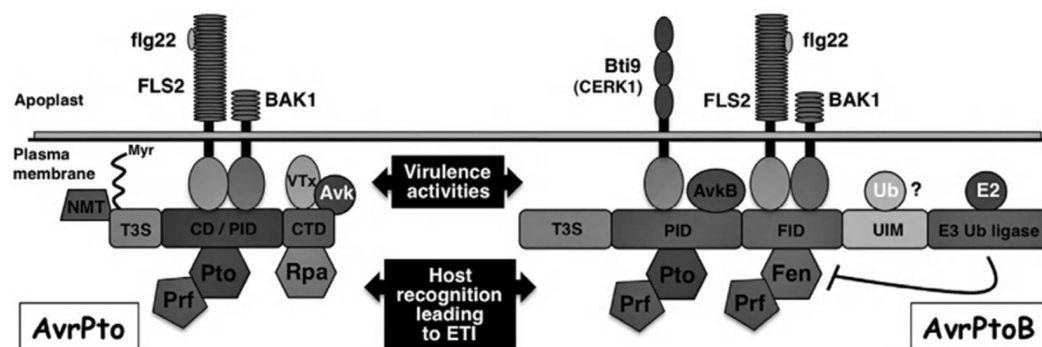


Figura II.2. (A) Imagen ilustrativa de la interacción en el oligómero conformado por Pto/Prf cuando se encuentra presente algunos de los efectores AvrPto o AvrPtoB tomada de Ntoukakis et. al (2014) **(B)** Imagen ilustrativa de los dominios de los efectores AvrPto y AvrPtoB con sus respectivas interacciones tomada de Martin et. al (2011).

Por todo lo expuesto, la sobreexpresión de las proteínas AvrPto y Pto en hojas de *N. benthamiana* permite observar la muerte celular de la respuesta hipersensible (HR – MCP) de forma macroscópica., permitiendo cuantificar esta sintomatología y realizar la caracterización funcional de los genes de interés (Brigneti et al., 2004; Goodin et al., 2008; Chakravarthy et al., 2010; Oh y Martin, 2011; Senthil-Kumar et al., 2018). A este tipo de experimento lo denominamos ensayo de HR.

II.1.6 Resultados con las construcciones *S*/ATG1 y *Nb*ATG1 indicarían que el silenciamiento de estas proteínas afectaría la inmunidad vegetal

Se emplearon los resultados de un RNAseq previamente realizado para comenzar la caracterización funcional de genes de la familia de proteínas ATG1 de la especie *Solanum lycopersicum* (*S. lycopersicum*, tomate) (Rosli et al., 2013; Pombo et al., 2014). Como se ilustra, a partir de ensayos en plantas de *S. lycopersicum* Rio

Grande, que presentaban la proteína de resistencia Pto, con distintas mutantes de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), *Pst* Δ fliC, *Pst* Δ avrPto Δ avrPtoB, *Pst* Δ avrPto Δ avrPtoB Δ fliC, el epítipo flg22 y el epítipo flgII-28, se obtuvo la información transcriptómica asociada a la inmunidad tal como fue descrito previamente (Miller y Tanksley, 1990; Pedley y Martin, 2003; Martin, 2011; Rosli et al., 2013; Pombo et al., 2014). Al realizar comparaciones con respecto a la triple mutante *Pst* Δ avrPto Δ avrPtoB Δ fliC, se pudo vislumbrar la expresión diferencial de genes durante las respuestas PTI como ETI, ya sea su inducción como su represión (Rosli et al., 2013; Pombo et al., 2014).

Debido a su rol en la señalización de mecanismos inmunitarios frente a diversos patógenos, se decidió analizar proteínas quinasas (Yuan et al., 2021; Zhang et al., 2024a). Se seleccionaron dos genes de proteínas quinasas de esta especie vegetal que mostraban inducción durante la respuesta ETI, identificados por un análisis transcriptómico (Rosli et al., 2013; Pombo et al., 2014; Bekier, 2018). Además, uno de ellos también se inducía en presencia del epítipo flgII-28, epítipo reconocido por la proteína FLS3 presente solanáceas con algunas excepciones entre las que se encuentra *N. benthamiana* (Cai et al., 2011; Clarke et al., 2013; Hind et al., 2016; Roberts et al., 2020). Estos genes fueron identificados como Solyc09g011320 y Solyc10g084930, (*SIATG1a* y *SIATG1b* (Wang et al., 2015)) respectivamente. Luego, durante la tesis de licenciatura como modelo experimental se empleó la especie *N. benthamiana* que permite eficientemente realizar el silenciamiento de forma transitorio mediante el silenciamiento inducido por virus (VIGS) (Liu y Page, 2008; Bekier, 2018). Durante ese trabajo se observó que luego de realizar VIGS con las construcciones *SIATG1*, construcción basada en *S. lycopersicum* y *N. benthamiana* *ATG1*, como se explicará en la [sección II.3.1](#) basada en los genes ortólogos en *N. benthamiana*, presentó tanto retraso en la sintomatología asociada a la muerte celular programada (MCP) que se genera dentro de la HR (HR – MCP), así como en la sintomatología de enfermedad (Bekier, 2018).

A partir del silenciamiento mediante VIGS empleando una construcción basada en el gen Solyc10g084930, a la que se denominó *SIATG1*, que en estudios previos fue utilizada para silenciar los genes Solyc10g084930 y Solyc09g011320 en *S. lycopersicum* y durante el trabajo de tesina se empleó para silenciar los cuatro ortólogos de *N. benthamiana* (Niben101Scf02085g06008, Niben101Scf05404g04007, Niben101Scf05137g01011 y Niben101Scf07477g02010), teniendo en cuenta que ambas especies pertenecen a la familia de las solanáceas tienen clara ortología, como se detalla en la [sección II.1.4](#). De ello, se obtuvo un retraso en la sintomatología causada por enfermedad, como un retraso en la sintomatología de la HR (Bekier, 2018). Asimismo, se realizó a su vez una construcción a la que se denomina a continuación *NbATG1*, basada en Niben101Scf07477g02010 que tendría mayor homología de secuencias, con la posibilidad de incrementar la eficiencia de silenciamiento en esta especie.

II.2 Materiales y Métodos

II.2.1 Material vegetal empleado

II.2.1.1 *Nicotiana benthamiana*

Para los ensayos en *N. benthamiana* de HR – MCP, y de *elicitores* no bacterianos se emplearon plantas WT (*N. benthamiana* WT). En los ensayos de desarrollo de enfermedad, y curvas de crecimiento bacteriana se emplearon plantas transgénicas sobreexpresando la proteína de resistencia (R) Pto de tomate bajo el promotor constitutivo del virus del mosaico del coliflor35S (*N. benthamiana*-35S::Pto) (Pombo et al., 2014).

Las plantas se silenciaron mediante VIGS por infiltración con jeringa, como se detalla en el [sección II.1.2.4.5](#), luego de 2 semanas aproximadamente. Los desafíos fueron realizados a las 6 semanas desde su siembra. Los resultados se observaron en el transcurso de 7 días posteriores aproximadamente.

II.2.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas empleadas se detallan en la tabla II.1. Las bacterias *Pseudomonas syringae* (*tomato* y *tabaci*) fueron cultivados en medio King's B (KBM) a 28 °C. Para *A. tumefaciens* (*A. tumefaciens*) y *Escherichia coli* (*E. coli*) se realizaron cultivos en medio Luria-Bertani (LB) a 28 °C y 37 °C, respectivamente. Se adicionó agar 1,5% p/v para la obtención de los respectivos medios semisólidos. El crecimiento de las bacterias utilizando medios semisólidos se realizó en placas de Petri de 10 cm de diámetro. Los cultivos líquidos se crecieron en tubos cónicos de 15 mL con agitación a 250 rpm. Los antibióticos utilizados fueron ampicilina (100 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL), rifampicina (50 µg/mL) y tetraciclina (10 µg/mL), espectomicina (100 µg/mL) como se indica en la tabla II.1.

Tabla II.1: Cepas bacterianas empleadas

Cepa	Características ^a	Referencia
<i>A. tumefaciens</i> GV. 3101	Plásmido desarmado Ti, Rif ^R , para emplearse en <i>S. lycopersicum</i>	(Koncz y Schell, 1986)
<i>A. tumefaciens</i> GV. 2260	Plásmido desarmado Ti, Rif ^R , para emplearse en <i>N. benthamiana</i>	(McBride y Summerfelt, 1990)
<i>A. tumefaciens</i> GV. 2260 Pto	pBETX, Kan ^R	(Oh et al., 2010)
<i>A. tumefaciens</i> GV. 2260 AvrPto	pBETX, Kan ^R	(Oh et al., 2010)
<i>A. tumefaciens</i> GV. 2260 Rx2	pBETX, Kan ^R , Tet ^R	(Oh et al., 2010)
<i>A. tumefaciens</i> GV. 2260 Cp	pBETX, Kan ^R , Tet ^R	(Oh et al., 2010)
<i>A. tumefaciens</i> GV. 2260 RPP13	pBETX, Kan ^R , Tet ^R , Rif ^R	(Oh et al., 2010)
<i>A. tumefaciens</i> GV. 2260 ATR31Δ41	pBETX, Kan ^R , Tet ^R , Rif ^R	(Oh et al., 2010)
<i>A. tumefaciens</i> GV. 2260 Gpa2	pBETX, Kan ^R , Rif ^R	(Oh et al., 2010)
<i>A. tumefaciens</i> GV. 2260 RBP-1	pBETX, Tet ^R , Rif ^R	(Oh et al., 2010)
<i>A. tumefaciens</i> GV. 2260 Bax	pBETX, Kan ^R , Rif ^R	(Oh et al., 2010)
<i>E. coli</i> DH5α	F– Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK–, mK+) <i>phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
<i>Pst</i> AvrPto	pDSK519: <i>avrPto</i> ; Rif ^R Kan ^R	(Thilmony et al., 1995)
<i>Ps tab</i> EV	pDSK519; Rif ^R Kan ^R	(Yeom et al., 2010)
<i>Pst</i> DC3000 Δ <i>avrPto</i> Δ <i>avrPtoB</i>	Mutante deficiente en los efectores AvrPto y AvrPtoB, Rif ^R , Kan ^R , Spec ^R	(Wei et al., 2007)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 55	Wild type, Amp ^R	(Huang et al., 1988)

^a Rif: rifampicina; Amp: ampicilina; Kan: kanamicina, Tet: tetraciclina, Spec: espectomicina

II.2.3 Protocolos generales de biología molecular y análisis bioinformático

II.2.3.1 Análisis filogenético

Los genes seleccionados, codificantes para proteínas quinasas, fueron analizados mediante la base de datos ITAK (Zheng et al., 2016), a partir del cual se obtuvo su clasificación según Shiu (Lehti-Shiu et al., 2015). La misma permitió identificar todos los miembros de la familia de proteínas para las tres especies analizadas: *A. thaliana*, *N. benthamiana*, *S. lycopersicum*.

Empleando las bases de datos TAIR (Berardini et al., 2015), ITAK (Zheng et al., 2016) y Solgenomics (Fernandez-Pozo et al., 2015a) se obtuvieron las secuencias aminoacídicas de los miembros de la familia de proteínas en estudio, se generó el archivo fasta con las mismas. El árbol fue realizado utilizando el programa

SeaView 4.4.2 (Gouy et al., 2010), bajo el cual se emplea el programa Clustal Omega que realiza el alineamiento (Sievers et al., 2011). De esta forma, se generó el árbol filogenético empleando el algoritmo PhyML (Guindon et al., 2010) y el modelo JTT usando 100 réplicas aleatorias (“bootstrap”) y mediante el programa FigTree-v1.4.3 (Rambaut, 2014) se generó una versión a color de dicho árbol.

II.2.3.2 Diseño de oligonucleótidos

II.2.3.2.1 Oligonucleótidos diseñados o empleados en esta tesis

Para evaluar la expresión de los genes mediante PCR se diseñaron oligonucleótidos específicos mediante el programa en línea *Primer3*, como se detalla en la [sección II.2.5.1](#) (Koressaar y Remm, 2007; Untergasser et al., 2012; Kõressaar et al., 2018). La lista de oligonucleótidos utilizados para la amplificación se detalla a continuación en la tabla II.2.

Tabla II.2: Oligonucleótidos empleados

Nombre	Id del Gen	Secuencia (5'3')	Longitud del amplicón (bp)	Propósito Comentarios
KanF		CTGCCTCGGTGAGTTTCTC	552	Linealización del vector pDONR221
KanR		GATGGTCGGAAGAGGCATAA		
GateVN. <i>benthamiana</i> ATG1F	Niben101Scf07477g02010	AAAAAGCAGGCTATGCAGAGGAACCTGCCAAA	291	Construcción VIGS <i>N. benthamiana</i> ATG1
GateVN. <i>benthamiana</i> ATG1R		AGAAAGCTGGGTTTGAAACGCTTGCCTGTTA		
V10g084930F	Niben101Scf02085g06008	AAAAAGCAGGCTTCGATTTCGAGCTGAT	301	Construcción VIGS <i>N. benthamiana</i> ATG12
V10g084930R		AGAAAGCTGGGTTTCTGACAATGCCAGCAGTC		
V09g011320F	Niben101Scf05137g01011	AAAAAGCAGGCTTTTGGGAAATTCGATTAGGG	291	Construcción VIGS <i>N. benthamiana</i> ATG11
V09g011320R		AGAAAGCTGGGTATTTTCCACCTCCTCGAT		
<i>N. benthamiana</i> 6008/4007qPCRF	Niben101Scf02085g06008 y <i>N. benthamiana</i> 101Scf05404g04007	TTCAACGGTGTGGCACGGGT	82	Eficiencia de silenciamiento
<i>N. benthamiana</i> 6008/4007qPCRR		CGGGTCAAGCCGAGCAGTAGC		
<i>N. benthamiana</i> 1011/2010qPCRF	Niben101Scf07965g02018	TTGCAGCCTAGGGGCCTTGC	118	Eficiencia de silenciamiento
<i>N. benthamiana</i> 1011/2010qPCRR		TGGCACCAACGCTCCAGAGAT		
<i>N. benthamiana</i> OffATG12_F	Niben101Scf13429g04022	TGGCGCCACTGATCCAACCT	86	Eficiencia de silenciamiento fuera del objetivo
<i>N. benthamiana</i> OffATG12_R		GGAACACAGCACTGGTCCAACCT		

II.2.3.2.2 Diseño de oligonucleótidos para medir la eficiencia de silenciamiento mediante RT-qPCR

Se alinearon las secuencias correspondientes a los fragmentos *NbATG1*, *NbATG1-1*, *NbATG1-2*, con el programa SeaView (Gouy et al., 2010), que integra el algoritmo Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Posteriormente, se generó un dendrograma, (“árbol filogenético hipotético”) mediante el modelo de evolución de nucleótidos reversible en el tiempo (GTR, por sus siglas en inglés: *General Time Reversible*) (Waddell y Steel, 1997; Pombo et al., 2014). A partir de un RNAseq previo de *N. benthamiana* se obtuvieron los datos de expresión de cada gen y así seleccionar en base a cuáles de ellos generar el par de cebadores (tabla II.3).

La eficiencia de los cebadores se determinó mediante diluciones seriadas de sus concentraciones, seguido de la cuantificación de los valores de Ct. Con estos datos, se construyó una curva estándar mediante regresión lineal, a partir de la cual se obtuvo la pendiente. La eficiencia (*E*) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$E = \quad (\text{Pfaffl, 2001; Peters et al., 2004})$$

donde la pendiente corresponde al valor obtenido de la línea de tendencia en la curva de calibración. Se emplearon cebadores con eficiencias porcentuales con un rango de 85 % y el 117 %.

Tabla II.3: Datos de expresión de RNAseq de los genes de la familia de proteínas ATG1 de la especie *N. benthamiana*

GenelD	mock
Niben101Scf02085g06008.1	3,29
Niben101Scf05137g01011.1	2,82
Niben101Scf05404g04007.1	1,65
Niben101Scf07477g02010.1	1,94
Niben101Scf01349g03014.1	0,34
Niben101Scf07965g02018.1	709,23

Se realizó una búsqueda empleando la herramienta “VIGS tools” (Fernandez-Pozo et al., 2015b) flexibilizando las condiciones a 2 desalineamientos (“missmatches”) y buscando genes que solapan en alguna región con los fragmentos diseñados de VIGS y los cuales podrían ser en realidad los que se están expresando.

Se realizó un alineamiento con Clustal Omega (Sievers et al., 2011) en la base de datos EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/>) para identificar las regiones de coincidencia entre los cuatro genes y así evitarlas en el diseño de cebadores. Posteriormente, los cebadores fueron diseñados utilizando la herramienta de GenScript (<https://www.genscript.com/tools/pcr-primers-designer/advanced>) con la configuración predeterminada. Para su selección, a partir del resultado (*output*), se evaluó si los cebadores amplificaban exclusivamente el gen de interés mediante *BLASTn* utilizando las bases de datos de NCBI (Benson et al., 2005) y Solgenomics (Fernandez-Pozo et al., 2015a). Se empleó la versión 1.0.1 del genoma de *N. benthamiana* (Kourelis et al., 2018a; Kourelis et al., 2019) con el fin de descartar aquellos cebadores que pudieran amplificar otros genes ATG1.

II.2.3.3 Técnicas para clonados

II.2.3.3.1 Extracción de ARN para cuantificación de la expresión mediante RT-qPCR

Para medir la eficiencia de silenciamiento y para la medición de los marcadores de autofagia se empleó la técnica de RT-qPCR. Se extrajeron entre 50 y 200 mg de tejido vegetal de plantas de *N. benthamiana* previamente silenciadas, con aproximadamente dos meses de edad. El tejido vegetal fue procesado en nitrógeno líquido en presencia del reactivo *TriReagent* (Molecular Research Center, MRC, EE. UU.), siguiendo las especificaciones del fabricante. El ARN total extraído fue resuspendido en 25 µL de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC), libre de ARNasas. Para evaluar la calidad del ARN se tomó 1 µL de la extracción, se incubó por un minuto a 70 °C para su desnaturalización y, luego se lo corrió en electroforesis mediante gel de agarosa 1% m/v. Posteriormente fue tratada con la enzima ADNasa RQ1 (Promega, USA) durante 60 min a 37 °C. Se realizó la purificación del ARN mediante separación de fases utilizando una mezcla de cloroformo:octanol (24:1). A partir de la separación de la fase acuosa conteniendo el ARN purificado, se lo resuspendió en 200 µL de etanol absoluto a 0 °C y 20 µL de NaAc 3 M (pH 6,0). Se incubó por un mínimo de 2 h hasta una noche entera a -80 °C. Se centrifugó 12.000 rpm por 20 min a 4 °C. Luego de dos lavados con etanol 70% se lo resuspendió en 20 µL de agua DEPC y almacenadas a -80 °C. Para confirmar la presencia del ARN y su calidad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa, como se describió previamente. Para evaluar la concentración del ARN se cuantificó mediante el equipo CLARIOstar Plus (BMG Labtech).

II.2.3.3.2 Síntesis de ADN copia (ADNc) mediante la reacción de retrotranscripción (RT)

El ADNc se sintetizó con la enzima retro transcriptasa MMLV (Promega), a partir de 900-2000 ng de ARN y oligonucleótidos en una concentración de 200 ng/µl al azar siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, a partir de 100 U de enzima se lo mezcló con 10mM de cada uno de los dNTPs, y su correspondiente buffer 1X. Se incubó 1 h a 37 °C y luego para desnaturalizar la enzima, se incubó por 15 minutos a 95 °C. Luego este ADNc fue almacenado a -20 °C para su uso. La presencia de ADNc fue corroborado mediante PCR convencional y gel de agarosa 1% utilizando los primers NbUbe35 y NbNQO que fueron previamente validados para su uso en patosistemas que incluyen bacterias en *N. benthamiana* (Pombo et al., 2019).

II.2.3.3.3 Preparación y transformación de células quimiocompetentes de *A. tumefaciens*

Se cultivaron colonias aisladas de *A. tumefaciens* GV. 2260 en medio LB semi-sólido con rifampicina a 28 °C por 2 días. Luego, se inocularon 2 mL de LB líquido con el mismo antibiótico a partir de una colonia aislada y se incubó a 28 °C durante una noche con agitación. Los 2 mL del cultivo se utilizaron para inocular 50 mL de LB líquido con rifampicina. El mismo se creció a 28 °C con agitación (250 rpm) hasta alcanzar una DO₆₀₀ que se encontrara entre 0,5 y 1. Cuando el cultivo llegó a la DO₆₀₀ esperada se enfrió en hielo y se lo centrifugó a 3000g por 8 min a 4 °C. Las células se lavaron con 10 mL de CaCl₂ 20 mM por centrifugación, para finalmente resuspenderse en 1 mL de la misma solución. Posteriormente se repartió la suspensión en alícuotas de 100 µL, que se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación, se descongelaron 100 µL de *A. tumefaciens* GV. 2260 quimiocompetentes en hielo y se les agregó 1 µg de ADN plasmídico. Luego, las células se incubaron en nitrógeno líquido por 5 min, seguido de otros 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se recuperaron con 750 mL de medio SOC a 28 °C durante 4 h con agitación. Se sembraron 100 µL en LB semi-sólido suplementado con kanamicina y rifampicina.

II.2.3.3.4 Transformación de células quimiocompetentes *E. coli* DH5α

Las células quimiocompetentes que se encontraban almacenadas a -80 °C (50 µL de células/tubo) se colocaron en hielo y se les agregó el volumen total de la reacción BP o LR (2,5 µL), descritas en las secciones [II.2.3.4.5](#) y [II.2.2.4.6](#). Se incubaron las células por 30 minutos en hielo y se procedió a realizar el choque térmico (heat shock) a 42 °C por 45 seg. Inmediatamente los tubos se colocaron en hielo por 2 minutos. Luego, se recuperaron las bacterias en 250 µL de medio SOC a 37 °C durante 1 h con agitación (250 rpm). Al cabo de este tiempo, se sembró en medio LB semi-sólido con kanamicina y se incubó a 37 °C durante aproximadamente 15 h.

II.2.3.3.5 Reacción BP

Se recombinaron los fragmentos de interés en el vector de entrada Gateway™ pDONR™221 (Invitrogen) a través de una reacción BP con 25-65 ng del producto de PCR purificado, 16 ng/µL de vector pDONR221 con la enzima Gateway™ BP Clonase™ II (Thermo Fisher Scientific), según las especificaciones del fabricante. La reacción agregando 0,25 µL de Proteinasa K 2 µg/µL (Thermo Fisher Scientific) a 37 °C por 10 min. Con el total del volumen de reacción se transformaron células de *E. coli* DH5α™ (Invitrogen) quimiocompetentes.

II.2.3.3.6 Reacción LR

Para la recombinación de los fragmentos entre el vector de entrada pDONR221 y el de destino pQ11 (Liu et al., 2002a) con 110-130 ng del producto de la tercera PCR purificado, pQ11 150 ng/µL finales y la enzima Gateway™ LR clonase™ II (Thermo Fisher Scientific), según especificaciones del fabricante. Con el total del volumen de reacción se transformaron células de *E. coli* DH5α™ (Invitrogen) quimiocompetentes. Se realizó PCR en colonia y se seleccionaron clones positivos para realizar la miniprep.

II.2.3.3.7 RT-qPCR para cuantificar la expresión o la eficiencia de silenciamiento

Para evaluar la expresión de genes marcadores de autofagia y la eficiencia del silenciamiento, se infiltraron hojas de *N. benthamiana*-35S:Pto silenciadas (7 semanas de edad) con 1×10^4 cfu/mL de *Ps. tabaci* (VV) o *P. s. tabaci* (AvrPto). En la infección compatible se tomaron muestras a las 17, 24 y 41 h, mientras que en la incompatible se hizo a las 4, 8 y 24 h.

El ARN total se aisló con TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Su calidad fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, y con las relaciones 260/230 y 260/280, medidas en un lector de microplacas CLARIOstar (BMG LABTECH). Se trataron 800-900 ng de ARN total con 0,5 µL/µg de RNA RQ1 RNase-Free DNase (Promega, EE. UU.) durante 1 h a 37 °C.

Para determinar la eficiencia del silenciamiento y la expresión de genes marcadores de autofagia, se utilizó RT-qPCR con SybrGreen Master Mix (PB-L, Bio-Logic Products) en un equipo StepOnePlus System (Applied Biosystem). Las reacciones se realizaron con cebadores 0,2 µM, ROX 1X y H₂O MQ, bajo las siguientes condiciones de ciclado: 5 min a 95 °C, 45 ciclos de 92 °C por 15 seg, 60-62 °C por 20 seg y 72 °C por 15 seg. Como genes de referencia se utilizaron NbUbe35 y NbNQO (Pombo et al., 2019).

II.2.4 Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)

II.2.4.1 PCR para la amplificación de los fragmentos

Los fragmentos seleccionados fueron amplificados mediante PCR convencional con un ciclo de amplificación de 3 min 95 °C, 35 ciclos de 30s 95 °C, 53-57 °C 30 s, 72 °C 30 s, y un paso final luego de los 35 ciclos de 72 °C por 5 min. Chequeo mediante gel de agarosa 1%.

II.2.4.2 Incorporación de secuencias GateAttB

Se realizaron dos PCRs consecutivas empleando ADNc de *N. benthamiana* desafiadas con *Pst* DC3000 por 6 h. Con una primera PCR se incorporaron 12 nt de las secuencias attB y 20 nt de apareamiento con el fragmento utilizado para realizar el silenciamiento. Con la segunda PCR, se incorporaron las secuencias completas attB, como se ilustra en la figura II.3.

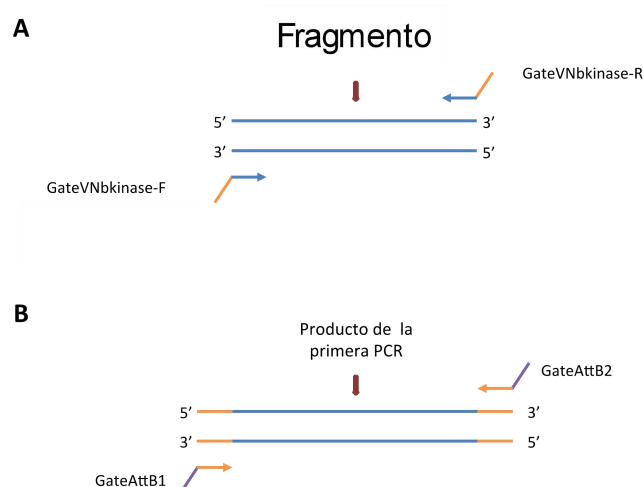


Figura II.3. Representación esquemática de los pasos de amplificación por PCR para la generación de fragmentos compatibles con el clonado en el vector de entrada pDONR221. (A) En la primera PCR, se emplearon cebadores que aparean en el fragmento de NbPQ o NbFT y que contienen parte la región attB. (B) En el caso de la segunda PCR, se utilizaron cebadores universales que aparean en el producto de la primera PCR y que contienen la región faltante attB.

II.2.4.3 Clonado de los fragmentos *NbATG1*, *NbATG1-1*, *NbATG1-2* construcción del vector para VIGS

Se seleccionaron fragmentos de entre 291-324 pb (tabla II.4) utilizando la herramienta VIGS (Fernandez-Pozo et al., 2015b) y se diseñaron cebadores dentro de esta región utilizando Primer3 web v4.1.0 (Koressaar y Remm, 2007; Untergasser et al., 2012; Koressaar et al., 2018). La amplificación por PCR se realizó utilizando ADNc de *N. benthamiana* infiltrado con x cfu/mL de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*), muestreado a las 6 h post infiltración (hpi). Los productos de PCR se clonaron en Gateway™ pDONRTM221 (Invitrogen). Después de la linealización para eliminar la resistencia a kanamicina, los plásmidos se recombinaron en un vector TRV2 compatible con Gateway (pQ11) (Liu et al., 2002a). La identidad de los fragmentos se confirmó por secuenciación y los plásmidos se transformaron en *A. tumefaciens* GV2260 competente químicamente. Las plantas de dos semanas de edad fueron silenciadas como se describió previamente (Velásquez et al., 2009). Se empleó un fragmento basado en un gen de *E. coli* (*Ec1*) como

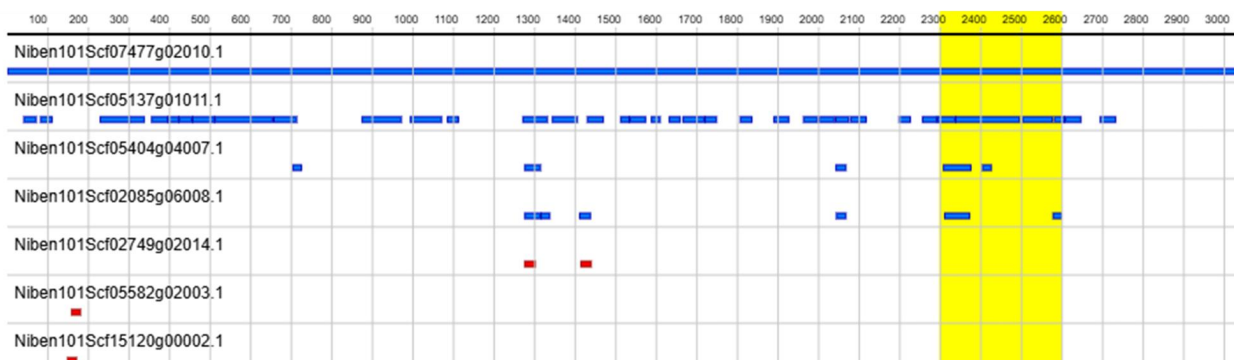
control negativo (Rosli et al., 2013). Además, se utilizaron construcciones de VIGS basadas en Prf y M3Ka como controles positivos en diferentes experimentos (Pombo et al., 2014).

II.2.4.4 Diseño de las construcciones para VIGS

Para evaluar mediante Silenciamiento Inducido por Virus (VIGS, por sus siglas en inglés: *Virus-Induced Gene Silencing*) se emplearon tres construcciones basadas en secuencias de genes de *N. benthamiana*. El diseño de las construcciones se realizó empleando la herramienta VIGS Tools (Fernandez-Pozo et al., 2015b). Brevemente, con las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de la base de datos Solgenomics (Fernandez-Pozo et al., 2015a) de los genes Niben101Scf07477g02010, Niben101Scf02085g06008, Niben101Scf05137g01011, se incorporaron de forma individual en la herramienta VIGS tools (Fernandez-Pozo et al., 2015b).

Para la construcción *NbATG1* se empleó la secuencia del gen Niben101Scf07477g02010 (pos. 2294-2584), previamente desarrollada (Bekier, 2018), mientras que para los genes *NbATG1-1* y *NbATG1-2*, las secuencias empleadas fueron diseñada a partir de los genes Niben101Scf02085g06008 (pos.1277-1576), y Niben101Scf05137g01011 (pos. 326-616), respectivamente, según se observa en la figura II.4 La construcción *NbATG1-1* tiene como objetivo silenciar los genes ortólogos del gen Solyc10g084930, es decir, Niben101Scf02085g06008 y Niben101Scf05404g04007; del mismo modo *NbATG1-2* tiene como blanco el silenciamiento de los genes ortólogos al gen Solyc09g011320, Niben101Scf05137g01011 y Niben101Scf07477g02010 (figura II.4). Por último, *NbATG1* tiene como blanco los cuatro genes de *N. benthamiana* previamente nombrados (figura II.4) (Bekier, 2018).

NbATG1



NbATG1-1



NbATG1-2

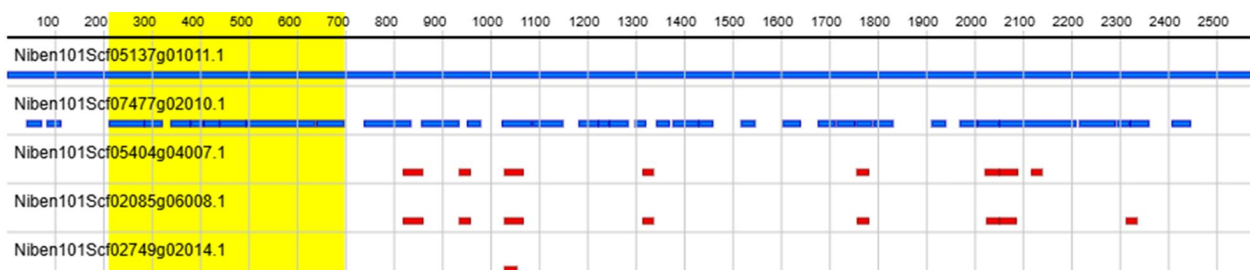


Figura II.4. Imágenes representativas de las regiones blanco a silenciar mediante las construcciones *NbATG1*, *NbATG1-1*, *NbATG1-2*, empleando la herramienta VIGS tool (Fernandez-Pozo et al., 2015b). Las líneas en azul representan las secuencias compartidas entre los genes seleccionados para ser silenciados, en rojo aquellas secuencias con secuencias similares de los genes no blanco. En el borde superior se indica la posición relativa al gen que se incluyó como el input, y el borde izquierdo se indican las identidades de los genes, el primero en todos los casos es el que se utilizó como insumo ("input").

Tabla II.4: Secuencias de los fragmentos amplificados para VIGS

Gen	Secuencia de ADN
<i>Ec1</i>	CGGCGTGATTGCGCAAAGCTATCATCAGTCTGAGAAATCGGCCTCCGAGTTCGATGCCATTGTTGCGCAAACGGAGCAGT TCCTTGCCGACAATGGTCGTCGCCCGCGCATTCTGATCGCTAAGATGGGCCAGGATGGACACGATCGCGGCGCGAAAGT GATCGCCAGCGCCTATTCCGATCTCGGTTTCGACGTAGATTTAAGCCCGATGTTCTCTACACCTGAAGAGATCGCCGCGCT GGCCGTAGAAAACGACGTTACGTAGTGGGCGCATCCTCACTGGCTGCCGGTCATAAACGCTGATCCCGAACTGGTC GAAGCGCTGAAAAAATGGGGACGCGAAGATATCTGCGTGGTGGCGGGTGGCGTCATTCCGCCGCGAGGATTACGCCTTCC TGCAAGAGCGCGCGCTGGCGGCGATTATGGTCCAGGTACACCTATGCTCGACAGTGTGCGCGACGTACTGAATCTGATA AGCCAGCATCATGATTAATGAAGCCACGCTGGCAGAAAGTATTCG
<i>NbMAPKKKα</i>	CAAGGTCTACAAAAGTTACTCATGTTGGTGTAACCAACGAAGCATATCCTCGTTCCTTTGATGAAACCGGACGCCGCCAG TGTTGGATTCCGGTGGAAGGAATATTTCTCCAATAAGGAAATATGCAAGCCATCCAGTGATCACCATCTCTAGACCATT GAGCTGCCAAAGGGAAATTGTAAAAACCATAACATCTTTACCAGTATCCCCCACTTCTAGCCCATTAAGACAGTATGAACCT GCACGTAGGAGCTGTTATCTTTCTCTTCCCAACCCAGCTTATGGTATTGGGGTGCATAGTGGATATGATGAGAATGATTACT TAATGTTTCAAGCCAGACCCACCACAAGAAACACACTAGAACCATGGCTTGAAATCCCTCAATTTAAAGTTCAGACACCGT CTAGATCGCCAAACTAAGACCAATCTTTAGTACCTCGGCCGCGACACCGTACCCAGCTTTCTTGACAAAGTGGTGAT ATCGTCGACCGCCGATGAACGGTTAAGTTTCATTGATACTCGAAAGATGTCAGCACCAGCTAGCACAAACACAGCCCATAG GGTCAACTACCTCAACTACCACAAAACTGCAGGCGGCAACTCCNTGCCACAGCTTCAGGCCTGTTCACTATCCCGGATG GGGGATTTCTTTA
<i>Prf</i>	TGTCATCTCAATCGTTGGCATGCCAGGATTGGGCAAGACTACACTAGCAAAGAAGATTTACAATGATCCAGAAGTCACCTC TCGCTTCGATGTCCATGCTCAATGTGTTGTGACTCAATTATATTCATGGAGAGAGTTGTTGCTCACCATTGGAATGATGTG CTTGAGCCTTCTGATCGCAATGAAAAAGAAGATGGAGAAATAGCTGATGAGCTACGCCGATTTTTGTTGACCAAGAGATTC TTGATTCTCATTGATGATGTGTGGGAC
<i>PDS</i>	AAGGCACTCAACTTTATAAACCTGACGAACCTTCAATGCAGTGCATTTTGATCGCATTGAACAGGTTTCTTCAGGAGAAAC ATGTTTCAAAAATGGCCTTTTATAGTGGTAATCCTCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTTGAACACATTGAGTCAAAAGG TGGCCAAAGTCAGACTGAACACGAATAAAAAAGATTGAGCTGAATGAGATGGAAGTGTCAAGAGTTTATACTGAGTGA CGGTAGTGAATCGAGGGAGATGCTTTTGTGTTGCCGCTCCAGTGGATATTTCAAGCTTCTATTGCCTGAAGACTGGAA AGAGATTCCATATTTCCAAAAGTTGGAGAAGTTAGTCGGAGTACCTGTGATAAATGTACATATATGGTTTGACAGAAAACTGA AG
<i>NbATG1</i>	ATGCAGAGGAACTTGCCAAACATATAGAGCCTGGAATACAGAGGTGCCAGATGCAATGGAGATGATATTTCAATCTGCCC TGGCTTTGGGTAGAAAGGGAGCTGTTGATGAGTACATGGGTGGGACTGAAAATGCAGTGGTATTTATTCAAAAGCTGTGC GTTTGTTAAAATTCCTACAAGTGGGAAGCACCATCTCTGATTTAAATCCTCCATTTCTCTAACAACTCGGATCGTTATAGG CTTCAAAATTACATTGATGTCTCAATAACAGGCAAAAGCGTTTCAA
<i>NbATG1-1</i>	TCGGATTCATTGAGCTGATTGAGAAGGAATATGTCCTGTATCTAGGTCCTCATGGACTCATCTTCTTCAGCAGGTGCAT CTAGGCTTAGCAATATGCAATTCAGATCAAGTTTTTCTCTGCAAGCCTCTGGGAACATAGAACTATAGTAAGTGAGCCGGT GCTTACTGTTGGTCTGCAACTAATAGAATAGGTCTGTGGGAAGGTTGGAAAGTTCTCTTTTGGCCAGGAGCTTCAC AAGGATCCGAGATATTATAGACCTCTGGAGCTGCGGACTGCTGGCATTGTCAGAA
<i>NbATG1-2</i>	TTTGGGAAATTCGATTAGGGTTTTGATGGCTCAATCGATGAGCAGAGGAGGGGGGAGGAGTGTGGTAGGGAACTATGTAG TAGGGAAGCAAATCGGCGCCGGCTCTTCTCGACCGTGTGGCATGCTCGGCACCGAGCTCACGGAACCGAAGTGCGCTAT TAAAGAGATCATCAGGCTCGGCTTAATAAAGCTTCAGGATAGTCTCAAGTCCGAAATTGTAATTTACAGAAGATCAATC ATCCTAATATCATTCGCTCCACGACATGATCGAGGAGGTGGGAAAAAT

II.2.4.5 Ensayos de silenciamiento mediante VIGS

Tal como se describió previamente se realizaron los silenciamientos en plantas mediante la técnica de VIGS (Velásquez et al., 2009; Senthil-Kumar y Mysore, 2014). Brevemente, en 3 mL de LB líquido con kanamicina y rifampicina se crecieron las cepas bacterianas a utilizar a 28 °C con agitación durante una noche. Se realizaron dos lavados con MgCl₂ 10 mM y MES 10 mM y se llevaron a DO₆₀₀ = 0,15. Luego se realizó una mezcla 1:1 de de *A. tumefaciens* GV2260 con pTRV1 y pQ11 (versión GatewayTM de TRV2), este último conteniendo el fragmento de para el silenciamiento. Luego de adicionar acetosiringona a concentración final 200 µM, se infiltraron con jeringa sin aguja cotiledones y primeras hojas de plantas de *N. benthamiana* de

dos semanas de edad (*Nb WT* o *Nb-35S::pto*). En cada ensayo se silenciaron cuatro a 6 plantas por construcción. Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas de luz y temperatura por 4-5 semanas hasta su uso.

Como control positivo de silenciamiento se empleó al gen codificante para la fitoeno desaturasa (*S/PDS*) de tomate (Liu et al., 2002a). Como controles del ensayo se emplearon las construcciones *Ec1*, basadas en la secuencia de la bacteria *E. coli* (accesión KEL85043.1), que no induce silenciamiento génico en *N. benthamiana* al presentar un porcentaje GC distinto al de esta especie vegetal y no presentar una identidad como mínimo de 17 pb del 100% con la misma (Rosli et al., 2013). Como control positivo de silenciamiento de la inmunidad específica, se empleó *Prf*, que permite el silenciamiento del gen *Prf* (Pombo et al., 2014).

II.2.5 Ensayos en plantas de *Nicotiana benthamiana*

II.2.5.1 Ensayos de muerte celular programada (MCP)

Las cepas de *A. tumefaciens* GV. 2260 que portan los vectores pBTEx:Pto o pBTEx:avrPto se cultivaron durante la noche en medio LB sólido (rifampicina y kanamicina) y al día siguiente se incubaron a temperatura ambiente durante 4 h en 10 mM MES, 10 mM MgCl₂ con 200 µM de acetosiringona. Después de dos lavados con la misma solución, las suspensiones se combinaron en una relación 1:1 con una DO₆₀₀ final = 0,1 y se infiltraron con jeringa en hojas de *N. benthamiana* salvaje de 7 semanas de edad. La evaluación se realizó visualmente durante varios días de la siguiente manera: MCP, más del 80% del área infiltrada (dentro de un círculo marcado) con muerte celular macroscópica; MCP parcial, entre 80 y 25% del área infiltrada con muerte celular macroscópica; No MCP, menos del 25% del área infiltrada con muerte celular macroscópica. Se usó una hoja por planta, infiltrando en 6 círculos por hoja para cada uno de los 4 replicados biológicos para calcular el porcentaje de MCP en cada categoría. Se utilizó la prueba exacta de Fisher (p-valor < 0,05) para determinar diferencias significativas.

II.2.5.2 Ensayos de enfermedad utilizando *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

A partir de una única colonia de *Ps tab* que expresa AvrPto o que lleva un vector vacío (EV) se cultivó en medio sólido King's B (rifampicina y kanamicina) durante 24 h. Al día siguiente, una fracción del inóculo se lavó con 10 mM MgCl₂. Las hojas de *N. benthamiana*-35S:Pto silenciadas por VIGS se infiltraron con 5 x 10⁴ cfu/mL de cada cepa. Las plantas se evaluaron de manera similar a lo descrito anteriormente (ensayo de MCP), pero por la presencia de muerte celular asociada a la enfermedad. Se infiltraron tres círculos por hoja con cada cepa en cada uno de los 4 replicados biológicos y se utilizaron para calcular el porcentaje de enfermedad en cada categoría. Se utilizó la prueba exacta de Fisher (p-valor < 0,05) para determinar diferencias significativas.

II.2.5.3 Ensayos de crecimiento bacteriano

Las plantas silenciadas de siete semanas de edad se infiltraron con una suspensión de 1 x 10⁴ ufc/mL de *Ps tab* expresando AvrPto (*Ps tab* AvrPto) o *Ps tab* vector vacío (*Ps tab* vv). Para medir las poblaciones bacterianas, se tomaron tres discos de 0,43 cm² del área infiltrada y se procesaron con 0,25 mL de 10 mM MgCl₂. El volumen se ajustó a 1 mL y se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en medio LB sólido (rifampicina y kanamicina). Se utilizaron 6 réplicas biológicas por construcción, considerando como réplica

biológica a cada planta. Se utilizó la prueba de Dunnett (p -valor $< 0,05$) para determinar diferencias significativas contra las plantas de control silenciadas *Ec1*.

II.2.5.4 Ensayos de *elicitores* mediados por *Agrobacterium*

Se expresaron de manera transitoria inductores (elicitores) en plantas silenciadas de *N. benthamiana* para inducir MCP. Pto/AvrPto, *Solanum tuberosum* Rx2/proteína de cubierta de PVX, *Arabidopsis* RPP13/ATR13Emco5- Δ 41aa del oomycete *Hyalosporonospora arabidopsis* y *Gpa2/RBP-1* del nematodo quístico de la papa (Sacco et al., 2009) se expresaron bajo el promotor35S (pBTEx). Bax, una proteína X asociada a Bcl-2 murino, se expresó utilizando un sistema inducible por dexametasona (Lacomme et al., 1999). La expresión de Bax se indujo a las 48 h con 10 μ M de dexametasona junto con 0,02% de Tween 20. Se infiltró un círculo por hoja con cada par de elicitores de MCP. Se utilizaron ocho replicados biológicos para evaluar el progreso de la MCP como se describió anteriormente. Se utilizó la prueba exacta de Fisher (p -valor $< 0,05$) para determinar diferencias significativas.

II.2.5.5 Ensayos de senescencia

A partir de dieciséis plantas de *N. benthamiana* que fueron silenciadas con *NbATG1-1*, *NbATG1-2*, *NbATG1* o *Ec1* luego de 21 días, se extrajeron hojas de cuatro estadios distintos de madurez como se indicó previamente, (figura II.5). Las mismas fueron colocadas en bandejas plásticas que previamente fueron desinfectadas y se las sumergió en agua destilada estéril en oscuridad tapadas con media sombra en la cámara de cría con las mismas condiciones que en los ensayos de enfermedad y HR. Las plantas fueron numeradas para que el ensayo sea ciego.

Para la cuantificación de la senescencia se evaluó con SPAD y colorímetro. Para ello las hojas fueron cuidadosamente retiradas de las cajas plásticas y secadas para evitar que la humedad afecte la medición. Se midió en los mismo cuatro puntos de la hoja para poder obtener valores para normalizar por planta (figura II.5). Se hizo la medición hasta aproximadamente dos semanas después de extraídas las hojas.

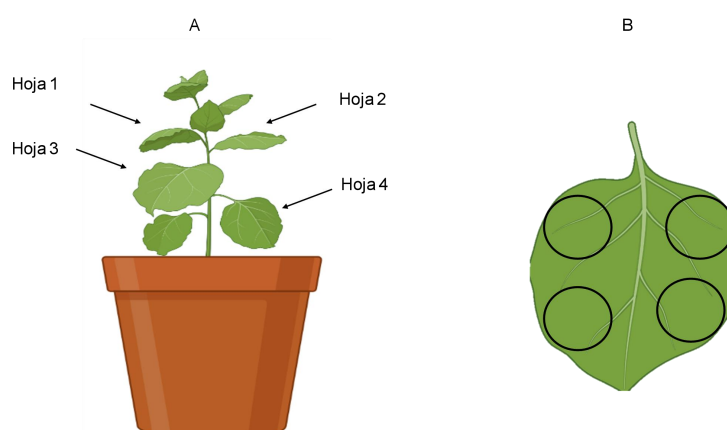


Figura II.5 Representación ilustrativa de la realización del ensayo para evaluar la senescencia. **(A)** Se extrajeron hojas de cuatro estadios madurativos, siendo la denominada 1 la más joven y 4 la más madura. **(B)** A cada hoja se le hicieron cuatro mediciones en los mismos puntos para realizar una normalización por planta, esta medición se realizó empleando tanto SPAD como colorímetro.

II.2.6 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos empleados fueron de dos tipos, según si fueron ensayos en plantas o si se evaluaron datos de expresión, ya que en el primer caso las variables en estudios fueron cualitativas y en el segundo fueron cuantitativas.

II.2.6.1 Cuantificación de la expresión de genes

Para analizar los resultados de la expresión de los genes, se empleó el análisis estadístico Dunnet, que es una versión del ANOVA que permite hacer comparaciones de todos contra el control, en este caso *Ec1*. Este fue empleado para la medición de la expresión de genes mediante RT-qPCR y el recuento bacteriano, seguida de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey utilizando el paquete emmeans (Lenth, 2023) mediante programa R y la interfaz Rstudio (<https://www.r-project.org/>).

II.2.6.2 Ensayos en plantas de síntomas

En función de lo expuesto, las variables en estudio fueron cualitativas ya que la sintomatología se clasificó en tres categorías: síntomas positivos (+), tenues (+/-) y negativos (-). Esta se definió como mayor al 75%, entre 25–75%, y menor al 25%, respectivamente. Debido a que se realizaron 6 infiltraciones por hoja/planta, se cuantificó la sumatoria total de cada categoría para cada construcción. A partir de estos datos, se generaron gráficos de columnas apiladas porcentuales y se realizó un análisis estadístico comparando la frecuencia de síntomas positivos (+) y tenues (+/-) frente a negativos (-), en relación con el control *Ec1*. Para ello, se aplicó una prueba no paramétrica de Fisher, utilizando el programa Statistica v.7 (Hilbe, 2007).

II.2.6.3 Ensayos en plantas con SPAD

Los análisis estadísticos de senescencia fueron realizados a partir de valores absolutos de SPAD, por lo cual fueron variables cuantitativas, pero al no cumplir los supuestos para el ANOVA, se realizó mediante la estadística no paramétrica Wilcoxon bajo un paquete de R que permite realizar comparaciones múltiples de pares con el método de ajuste del p-valor de Bonferroni y empleando el p-valor > 0,05 como significativo.

II.3 Resultados

II.3.1 Análisis filogenético de la familia ATG1 en *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* y *Solanum lycopersicum*

Para realizar un análisis filogenético, se incluyeron los genes pertenecientes a las especies de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) y *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*). Esto se debe a que *A. thaliana* es la especie vegetal más ampliamente estudiada, lo que aporta más información sobre la potencial funcionalidad de los genes de interés. A su vez, *N. benthamiana*, es la especie en la que se decidió realizar el silenciamiento de los genes candidatos para la caracterización funcional tal como se expresa en la [sección I.4.2](#).

Se seleccionaron los genes Solyc10g084930 y Solyc09g011320 como objeto de estudio. Como se mencionó en los antecedentes particulares de la tesis ([sección II.1.6](#)), ambos genes presentan inducida su expresión en la respuesta ETI asociada a los efectores AvrPto y AvrPtoB (Pombo et al., 2014). Además, Solyc10g084930 presentó inducida su expresión frente al PAMP flg28 (Rosli et al., 2013).

Mediante este análisis se reveló que ambos genes candidatos de tomate Solyc10g084930 y Solyc09g011320, con características similares en cuanto a su expresión en la inmunidad generada por *Pst*, forman parte de la misma familia de proteínas quinasas, el Grupo-PI-3 (Lehti-Shiu y Shiu, 2012; Zheng et al., 2016). De este análisis, se obtuvo que el gen Solyc10g084930 de *S. lycopersicum* agrupó con Niben101Scf05404g04007 y Niben101Scf02085g06008 de *N. benthamiana*, así como Solyc09g011320 lo hizo con Niben101Scf07477g02010 y Niben101Scf05137g01011. Asimismo, en *S. lycopersicum* se identificó un tercer gen, Solyc11g005660, que forma un clado específico en el árbol filogenético. Este miembro muestra una relación de ortología 1:1:1 con un único gen ortólogo en *N. benthamiana* y *A. thaliana*, siendo la única ramificación del árbol con esta correspondencia directa entre las tres especies, es notable mencionar que esta versión de ATG1 se encuentra trunca (Suttangkakul et al., 2011). Esto sugiere, por un lado, una alta relevancia evolutiva, dado que esta conservado entre linajes distantes. Por otro lado, indica que no hubo eventos de duplicación o divergencia evolutiva en este gen entre solanáceas y brasicáceas, lo que podría deberse a que su duplicación no es favorecida por selección. Es posible que un aumento en la carga proteica de esta proteína tenga un efecto perjudicial para la planta, limitando así su expresión génica. Del mismo modo, fue observado en múltiples especies de diversos géneros vegetales (Wang y Hou, 2022). Las proteínas *AthATG1a* y *AthATG1b* presentan un dominio de unión ATG8, marcador esencial en la autofagia (Yoshimoto et al., 2004; Contento et al., 2005; Yoshimoto et al., 2010; Suttangkakul et al., 2011; Leary et al., 2018; Li et al., 2018; Mine et al., 2018; Mizushima, 2018; Tang y Bassham, 2018; Leary et al., 2019; Pan et al., 2020; Petersen et al., 2024), así como se encuentran presentes en Solyc10g084930 y Solyc09g011320, pero ausente en Solyc11g005660, en la que falta el dominio de unión a ATG8 (AIM, del inglés *ATG8-interacting motif*) (Nakatogawa et al., 2012; Wang y Hou, 2022).

A partir de la incorporación de los datos genómicos de *A. thaliana* al análisis, es que se pudo determinar que ambos genes pertenecen a la familia de proteínas *Autophagy Related Gene 1* (ATG1, por sus siglas en inglés) que, como indica su nombre, cumple un rol esencial en la autofagia en diversos procesos asociados a estrés biótico y abiótico (Suttangkakul et al., 2011; Li et al., 2014; Lal et al., 2020; Wang y Hou, 2022). Por pertenecer a la misma familia de proteínas, presentar una inducción de la expresión génica en *S. lycopersicum* durante la inmunidad (Rosli et al., 2013; Pombo et al., 2014; Bekier, 2018), y no haberse encontrado publicaciones asociadas a esta familia de proteínas que hubieran realizado ensayos con patógenos, al momento de iniciar esta tesis, se decidió realizar la caracterización funcional de los mismos empleando el patosistema *N. benthamiana* – *Ps tab*.

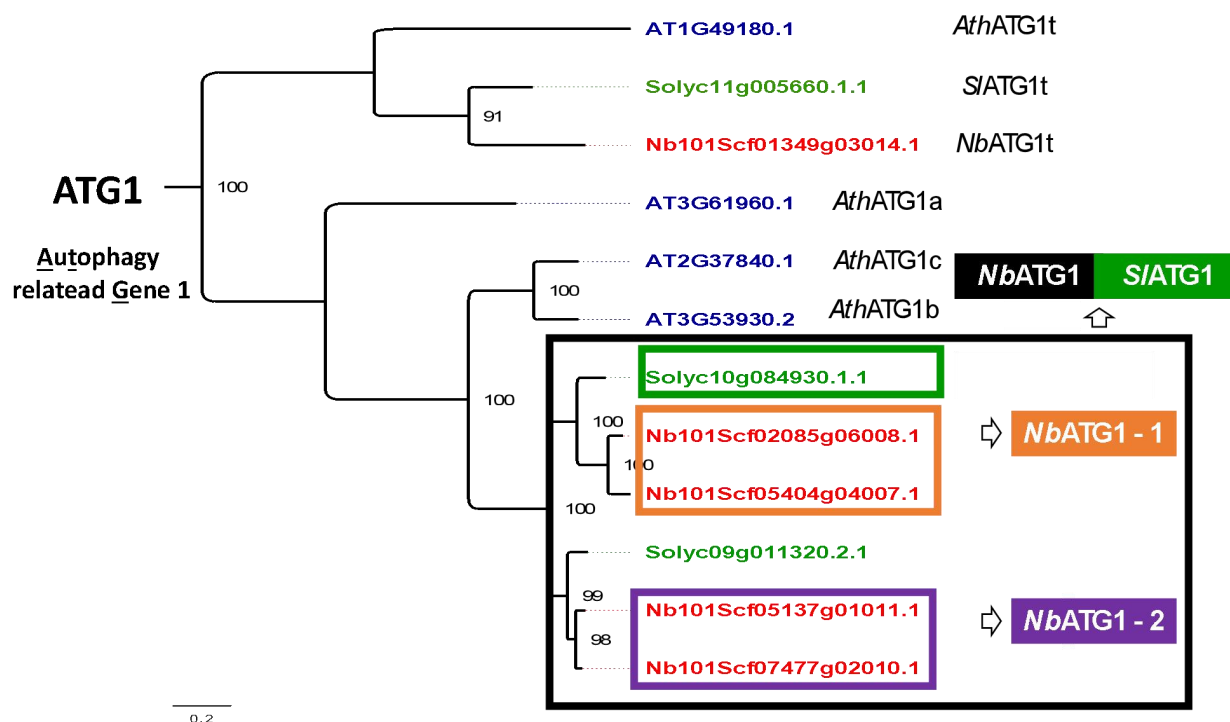


Figura II.6. Análisis filogenético realizado de la familia de proteínas Grupo-PI-3 en el que se incluyeron los miembros de las especies *S. lycopersicum* (tomate) en color verde, *N. benthamiana* en color rojo y *A. thaliana* en color azul. Se indican los genes truncos como xATG1t, siendo x la especie de la cual provienen. Del mismo modo, se denominó a cada uno de los miembros en *A. thaliana*. Se encuentran en recuadros los genes blancos a los que se esperó silenciar mediante las construcciones SIATG1 (verde), NbATG1 (negro), NbATG1-1 (naranja), NbATG1-2 (violeta). SIATG1 se basó en la secuencia de *S. lycopersicum* Solyc10g084930 previamente desarrollada (Bekier, 2018), NbATG1 se basó en Niben101Scf07477g02010, así como NbATG1-1 y NbATG1-2 en Nb101Scf02085g06008 y Nb101Scf05137g01011, respectivamente ([sección II.2.5.1](#)).

II.3.2 Caracterización funcional de los genes de la familia de proteínas ATG1 utilizando *Nicotiana benthamiana* como planta modelo

Con ese objetivo, se diseñaron las construcciones NbATG1-1 y NbATG1-2, según se describe en la [sección II.2.5.1](#), así como fue empleada la construcción NbATG1 previamente generada (Bekier, 2018). Debido a que se contaba con experiencia previa en el silenciamiento generado por VIGS y se contaba con el vector pQ11 que es un vector adaptado en base al virus TRV2 se empleó la estrategia de silenciamiento (Liu et al., 2002a; Rosli et al., 2013; Pombo et al., 2014). Esta estrategia permite la dispersión de la partícula viral atenuada y silenciar de forma sistémica la planta con una baja probabilidad de generar sintomatología asociada a virus (Liu y Page, 2008). El vector pQ11, versión Gateway™ del vector TRV2, se incorpora una secuencia de 250-350 pb que permite emplear la maquinaria de silenciamiento de la planta para silenciar el gen endógeno propuesto a estudiar (Baulcombe, 1999b; Liu et al., 2002b; Liu et al., 2002a; Brigneti et al., 2004).

II.3.3 El fenotipo de las plantas silenciadas en *Nicotiana benthamiana* presenta un fenotipo normal

Se evaluó el fenotipo de las plantas silenciadas luego de aproximadamente 20 días, período en el cual se espera obtener un silenciamiento transitorio sistémico, tal como previamente se ha demostrado (Brigneti et al., 2004; Xu et al., 2007; Velásquez et al., 2009; Hayward et al., 2011). Este análisis cualitativo es necesario, ya que permite identificar un fenotipo asociado a la inmunidad, el cual no podría aislarse si la planta experimenta algún tipo de estrés asociado al silenciamiento. Como se puede observar en la figura II.7, las plantas silenciadas presentaron un fenotipo normal con respecto a las plantas control *Ec1*. Con este resultado presente, se continuó con la caracterización funcional de la familia de proteínas ATG1 en *N. benthamiana*.



Prf

Ec1

NbATG1

NbATG1-2

NbATG1-1

Figura II.7. Fenotipo de plantas silenciadas utilizando mezclas binarias de *A. tumefaciens* GV2260 con pTRV1 y pQ11, este último portando las construcciones Prf, *Ec1*, *NbATG1*, *NbATG1-2*, *NbATG1-1*. Se evaluó el fenotipo luego de 3 semanas de la inoculación.

II.3.4 La respuesta hipersensible se retrasa en plantas silenciadas *NbATG1-1*, *NbATG1-2*, *NbATG1*

En base a los resultados obtenidos durante la tesis de grado (Bekier, 2018), resumidos en la [sección II.1.6](#), se observó un retraso de la sintomatología asociada a HR empleando la construcción *S/ATG1* basado en el gen Solyc10g084930 de tomate ([sección II.1.6](#)). Por ello, se emplearon las construcciones para el silenciamiento que estaban incorporados en los vectores de expresión pQ11 ([sección II.2.5.1](#)). Utilizando la construcción *NbATG1-1* se buscó el silenciamiento de los genes Niben101Scf02085g06008 y Niben101Scf05404g04007, así como *NbATG1-2* dirigía el silenciamiento de Niben101Scf05137g01011 y Niben101Scf07477g02010, y por último *NbATG1* para el silenciamiento de estos cuatro genes (ver el árbol filogenético en la [sección II.3.1](#)). Es decir que las primeras dos construcciones tenían como objetivo el silenciamiento de pares de genes que tienen ortología con uno de los genes de tomate Solyc10g084930 y Solyc09g011320 respectivamente, mientras que la última el silenciamiento del conjunto de los genes.

Tal como se describe en la [sección II.2.5.5](#), se emplearon las construcciones *Ec1* y *Prf* como controles negativo y positivo de silenciamiento génico, respectivamente, para evaluar la inmunidad específica dependiente de Pto – AvrPto.

Para el ensayo, se desafiaron plantas jóvenes *N. benthamiana*, previamente silenciadas ([sección II.2.5.5](#)). La HR se visibilizó por la sobreexpresión de Pto – AvrPto, introducidos mediante un vector de expresión pBTEx bajo el control de un promotor constitutivo 35S en bacterias *A. tumefaciens* GV. 2260 (Pombo et al., 2014). El reconocimiento de Pto – AvrPto permite la manifestación de la HR – MCP de forma macroscópica, como previamente se había reportado (Brigneti et al., 2004; Goodin et al., 2008; Chakravarthy et al., 2010; Oh y Martin, 2011; Pombo et al., 2014; Senthil-Kumar et al., 2018). Para realizar el ensayo se infiltró en las mismas 6 posiciones de las hojas jóvenes con mismo estado de desarrollo, empleándose cuatro plantas por construcción de silenciamiento, como se ilustra en la figura II.8

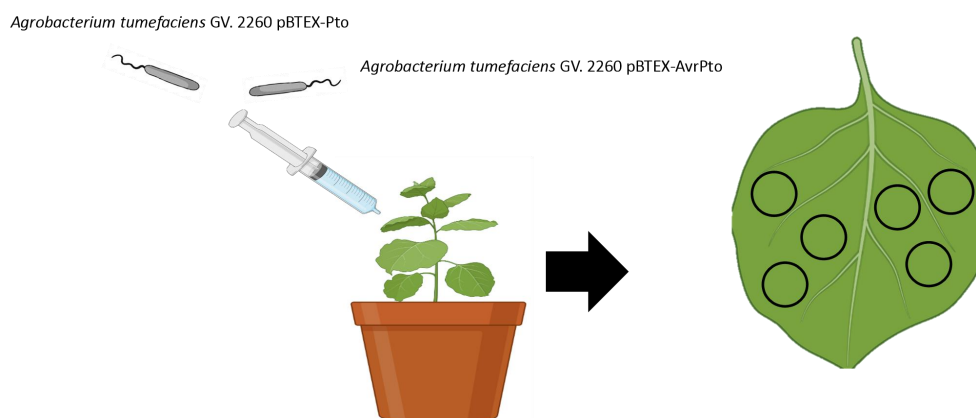


Figura II.8. Ilustración representativa del desafío de HR. Co-infiltración de *A. tumefaciens* GV. 2260 pBTEx-pto y *A. tumefaciens* GV. 2260 pBTEx-avrPto en las mismas 6 posiciones de las hojas de *N. benthamiana* en plantas silenciadas para la sobreexpresión del efector y la proteína R que lo reconoce.

El ensayo fue repetido al menos tres veces de manera independiente con resultados similares. En la figura II.9 se resumen los resultados obtenidos a 3, 4 y 5 dpi de uno de los ensayos. A partir de 3 dpi, se observó un retraso significativo de la HR – MCP en las construcciones *NbATG1-2* y *NbATG1* (p-valor < 0,001), mientras que el retraso en *NbATG1-1* fue evidente recién después de 5 dpi (p-valor < 0,05). Cabe destacar que *NbATG1-2* y *NbATG1* fueron las construcciones que presentaron resultados consistentes con un retraso significativo más temprano y pronunciado. Por el contrario, *NbATG1-1*, algunas repeticiones arrojaron significancia estadística, mientras que otras solo evidenciaron una tendencia.

Los resultados obtenidos sugieren que la familia de proteínas ATG1 estaría involucrado en el desarrollo de HR – MCP mediada por la interacción Pto – AvrPto, observándose el efecto más pronunciado a los genes *Niben101Scf07477g02010* y *Niben101Scf05137g01011*.

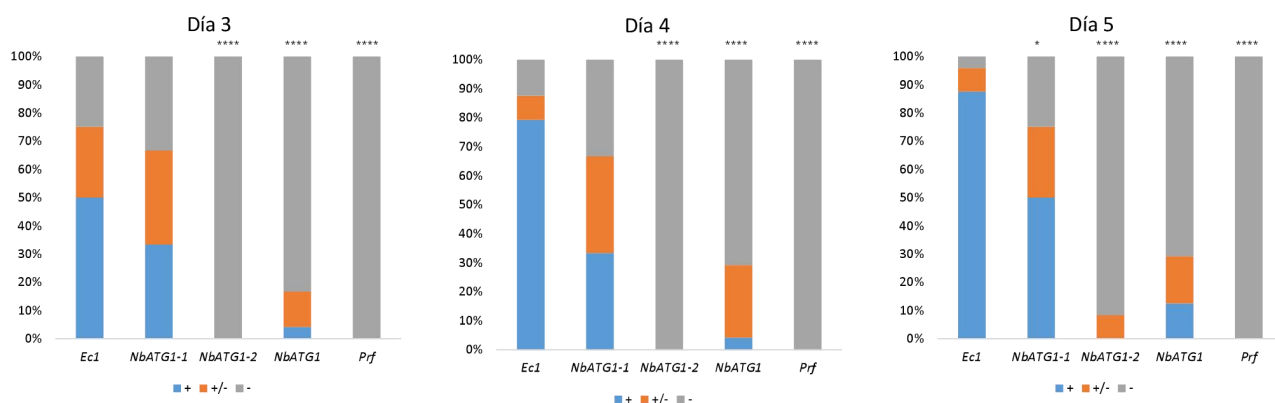


Figura II.9. HR causada por la sobreexpresión de Pto – AvrPto en plantas *N. benthamiana* mediante la co-infiltración de *A. tumefaciens* sobreexpresando dichos genes codificantes bajo un promotor constitutivo35S. Observación del retraso de la HR luego del silenciamiento con las construcciones *NbATG1-1*, *NbATG1-2*, *NbATG1* en los días 3, 4 y 5 dpi. * p-valor < 0,05, y *** p-valor < 0,0001 con respecto al control *Ec1*. Para el análisis estadístico se empleó la prueba exacta de Fisher y se consideraron las categorías + y +/- en su conjunto.

II.3.5 La sintomatología asociada a enfermedad se retrasa con las construcciones *NbATG1-1*, *NbATG1-2*, *NbATG1* en el patosistema compatible

Para profundizar el rol de ATG1 en la interacción planta – bacteria, se desafió en *N. benthamiana* silenciadas mediante VIGS con *Ps tab*, un patógeno natural de esta especie (Oh y Collmer, 2005), y que por ello causa síntomas de enfermedad (Oh y Collmer, 2005). Este sistema permite evaluar el efecto del silenciamiento de genes bajo la detección de sintomatología de enfermedad (Thilmony et al., 1995; Oh y Collmer, 2005; Oh y Martin, 2011).

Se desafiaron plantas transgénicas que sobreexpresan la proteína Pto de tomate (*N. benthamiana*-35S::Pto) con dos cepas bacterianas *Ps tab* una con un vector vacío (*Ps tab* vv) y otra expresando al efector AvrPto, que es reconocido por Pto (*Ps tab* AvrPto). Para ello en la misma hoja se infiltraron 3 círculos/planta con *Ps tab* vv y 3 círculos/planta *Ps tab* AvrPto, como se ilustra en la figura II.10.

De esta forma, las plantas infectadas con *Ps tab* AvrPto, la proteína Pto reconoce al efector y desencadena la muerte celular programada (MCP). Utilizando concentraciones bacterianas similares a las naturales (5×10^4 ufc/ml), esta respuesta es microscópica, pero suficiente para limitar la propagación del patógeno y prevenir el desarrollo de la enfermedad (Martin, 2011). Este reconocimiento no ocurre frente a *Ps tab* vv por lo que se desarrolla la enfermedad (Martin, 2011).

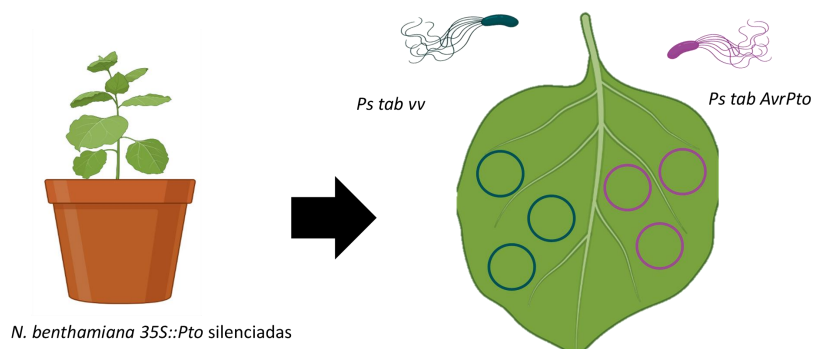


Figura II.10. Esquema del ensayo de enfermedad realizado en plantas *N. benthamiana*-35S::Pto. En plantas silenciadas 3 semanas previamente, se seleccionó una hoja por planta joven y se infiltró con jeringa, 3 círculos con *Ps tab vv* (izquierda) y *Ps tab AvrPto* (derecha).

Tal como se esperaba, al emplear *Ps tab AvrPto* no se observaron síntomas de enfermedad en el control negativo *Ec1*, mientras que sí se detectaron al silenciarse *Prf*. Sorprendentemente, no se observó un adelanto de la sintomatología asociada a enfermedad en ninguna de las repeticiones del ensayo empleándose las construcciones *NbATG1*, *NbATG1-1*, *NbATG1-2*. Las construcciones se comportaron del mismo modo que *Ec1*, sin evidenciar sintomatología, lo que podría indicar que estas proteínas participan en otra ruta metabólica (figura II.11). Cabe recordar que, en el ensayo de HR, se observó un retraso de la respuesta; por ende, lo esperable hubiera sido observar adelantada la enfermedad, de modo similar a lo que ocurre con *Prf*.

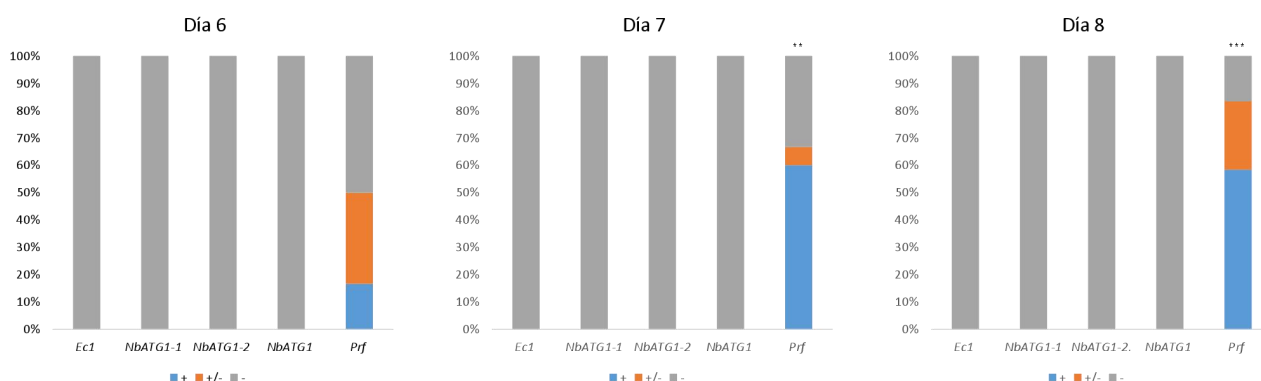


Figura II.11. Ensayo de enfermedad en *N. benthamiana* 35S::Pto silenciadas con las construcciones *NbATG1*, *NbATG1-1*, *NbATG1-2*. Se empleó *Ps tab AvrPto* para evaluar la sintomatología de enfermedad en un patosistema incompatible en los 6, 7 y 8 dpi. ** p-valor < 0,001 con respecto al control *Ec1*. Para el análisis estadístico se empleó la prueba exacta de Fisher y se consideraron las categorías + y +/- en su conjunto.

En la [sección II.3.4](#) se evidenció que las construcciones *NbATG1-2* y *NbATG1* retrasó la HR – MCP dependiente de la sobreexpresión de *AvrPto* – Pto. Por lo tanto, lo esperable hubiera sido observar un adelanto en la aparición de los síntomas de la enfermedad en relación con *Ec1*, similar a lo observado frente al silenciamiento con *Prf*, donde se desarrolla una infección compatible debido a la ausencia del efector *AvrPto* (Martin, 2012; Dalio et al., 2021). Sin embargo, se pudo observar un retraso de la sintomatología de enfermedad de forma significativa, siendo las más consistentes en las repeticiones *NbATG1-2* y *NbATG1* (figura II.12).

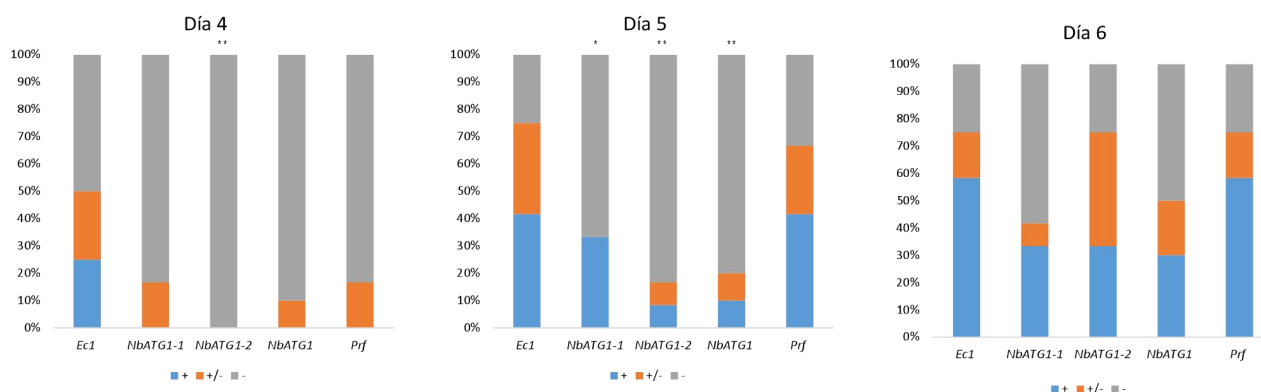


Figura II.12. Ensayo de enfermedad en *N. benthamiana*-35S::Pto silenciadas con las construcciones *NbATG1*, *NbATG1-1*, *NbATG1-2*. Se empleó *Ps tab* vv para evaluar la sintomatología de enfermedad en un patosistema compatible en los 4, 5 y 6 dpi. * p-valor < 0,05, y ** p-valor < 0,001 con respecto al control *Ec1*. Para el análisis estadístico se empleó el test exacto de Fisher y se consideraron las categorías + y +/- en su conjunto.

II.3.6 El silenciamiento de *NbATG1* inhibe el crecimiento bacteriano en un patosistema compatible

Para ver si el efecto del silenciamiento observado en las secciones [II.1.3.4](#) y [II.1.3.5](#) además de afectar al desarrollo de sintomatología, afectaba el crecimiento bacteriano en un sistema compatible y otro incompatible, se decidió evaluar el crecimiento bacteriano en plantas *N. benthamiana* silenciadas con *Ec1*, *Prf* y *NbATG1*.

Se seleccionó la construcción que silencia los cuatro genes (*NbATG1*), por ser una de las dos construcciones más consistente. Con dicho fin, plantas silenciadas fueron desafiadas con *Ps tab* VV y *Ps tab* AvrPto similar a lo realizado en la [sección II.1.3.5](#), pero con un inóculo menor de 1×10^4 ufc/ml con el fin de desarrollar más lentamente la enfermedad y poder realizar la extracción de tejido y poder realizar la cuantificación del inóculo de unidades formadoras de colonias para evaluar la multiplicación bacteriana en planta.

En los ensayos incompatibles dependientes de la interacción del efector AvrPto y la proteína Pto se pudo observar que el inóculo bacteriano en plantas *NbATG1* y en las plantas de control *Ec1* no presentaron diferencias significativas, mientras que el control positivo *Prf* si lo hizo (figura II.13). Por el contrario, resultados indicarían que podría haber un incremento del crecimiento bacteriano en plantas *NbATG1* con respecto al control (figura II.14). Si bien este resultado se observó en una de las dos repeticiones, en la otra, donde no se encontró una diferencia significativa, parece haber una tendencia que, debido al alto error estándar, no pudo evidenciarse de manera significativa.

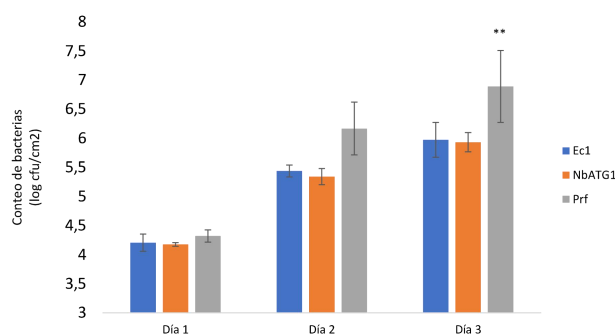


Figura II.13. Ensayo de curva de bacterias en *N. benthamiana*-35S:Pto silenciadas con las construcciones *NbATG1*, *NbATG1-1*, *NbATG1-2*. Se empleó *Ps tab* AvrPto para evaluar la sintomatología de enfermedad en un patosistema incompatible en los 1, 2 y 3 dpi. ** p-valor < 0,001 con respecto al control *Ec1*. Para el análisis estadístico se empleó la prueba exacta de Fisher y se consideraron las categorías + y +/- en su conjunto.

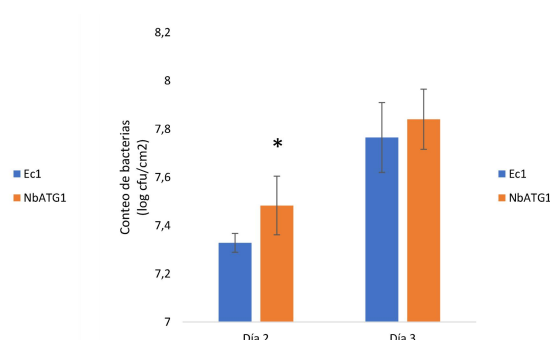


Figura II.14. Ensayo de curva de bacterias en *N. benthamiana*-35S:Pto silenciadas con las construcciones *NbATG1*, *NbATG1-1*, *NbATG1-2*. Se empleó *Ps tab* vv para evaluar la sintomatología de enfermedad en un patosistema compatible en los 2 y 3 dpi. * p-valor < 0,05 con respecto al control *Ec1*. Para el análisis estadístico se empleó la prueba exacta de Fisher y se consideraron las categorías + y +/- en su conjunto.

II.3.7 La respuesta HR–MCP es modulada por proteínas R y su par *elicitor* en plantas *NbATG1*

Recientemente, ha comenzado a cambiar la perspectiva sobre el funcionamiento de las proteínas en la inmunidad vegetal. Aunque el modelo predominante sigue siendo el que engloba las respuestas PTI y ETI, se han identificado casos de proteínas que participan en múltiples vías de señalización, influyendo en ambas etapas de la inmunidad (Del Pozo et al., 2004; Pruitt et al., 2021; Yuan et al., 2021; Dodds et al., 2024).

Considerando su rol en la autofagia, este proceso aún no del todo comprendido, se sabe que interviene en la inmunidad estimulando o inhibiendo el crecimiento de patógenos, a tal punto que se lo describe como un proceso pro-microbiano/anti-microbiano (Hayward et al., 2009; Talbot y Kershaw, 2009; Hofius et al., 2011; Lenz et al., 2011; Hofius et al., 2017; Üstün et al., 2017; Tang y Bassham, 2018). En función de los resultados obtenidos en los ensayos de HR y de enfermedad (secciones [II.1.3.4](#) y [II.1.3.5](#)), es posible que estas proteínas estén interviniendo en distintas cascadas de señalización que convergen en la muerte celular (programada).

Con el fin de evaluar esta posibilidad, se realizó un ensayo de “elicitores” no bacterianos que desencadenan la HR – MCP. Para ello, se decidió continuar trabajando con la construcción *NbATG1* que generaría el silenciamiento de los cuatro genes de interés, y que desarrolló la respuesta más consistente y duradera en los ensayos de HR y enfermedad (secciones [II.1.3.4](#) y [II.1.3.5](#)). Con tal fin, se emplearon en plantas silenciadas mediante VIGS los distintos pares de proteínas R y su par “elicitor”: GPA2 de papa/RBP-1 del nematodo del quiste de la papa (Sacco y col., 2009), proteína Rx2 de papa (*Solanum tuberosum*)/proteína de la cubierta del virus PVX (Bendahmane et al., 2000); RPP13 de *A. thaliana*/ATR13^{Emco5}-Δ41aa del oomicete *Hyalosporospora arabidopsis* (Rentel et al., 2008), Bax que es la proteína murina X asociada a Bcl-2 y que genera la MCP, esta última se expresó utilizando un sistema inducible por dexametasona (Lacomme et al., 1999). La infiltración del par Pto/AvrPto se incluyó como control positivo y la proteína Pto sola como control negativo de la HR – MCP. El ensayo se realizó de manera similar al ensayo de HR para Pto/AvrPto ([sección II.1.3.4](#)), con la diferencia de que, al incluir 6 infiltraciones distintas, cada una se aplicó en un área circular diferente dentro de la misma hoja, permitiendo evaluar todas las infiltraciones en la misma planta.

Este experimento se repitió en dos ocasiones, a partir de las cuales se pudieron observar algunos resultados. En primer lugar, el efecto del silenciamiento con MPKKKα no sería consistente, probablemente por variaciones ambientales (Pombo et al., 2014; Ramos et al., 2021). En particular los ensayos realizados transcurrieron en el verano y, si bien fueron realizados en cámara a temperaturas controladas, se sabe que las agroinfiltraciones no generan la misma respuesta frente a perturbaciones de temperatura elevadas, las cuales se registraron durante los experimentos.

Tal como se observa en la figura II.15, los resultados en cuanto al silenciamiento con MPKKKα fueron comparables a los obtenidos previamente, no habiéndose notado diferencias con respecto al control negativo *Ec1* (Pombo et al., 2014). Tal como era de esperar, en ninguno de los ensayos se observó afectada la HR – MCP dependiente de la sobreexpresión de la proteína Pto.

La interacción GPA/RBP1 se vio comprometida significativamente, esto podría indicar que esta familia de proteínas participa en la activación de la HR – MCP en distintas vías de señalización asociadas al reconocimiento de efectores, tanto bacterianos como no bacterianos. Esta tendencia, si bien no significativa, también pudo observarse frente a BAX. En este punto, cabe resaltar que el ensayo fue realizado con pocas replicas biológicas, ya que se infiltró un área circular por planta en un total de 4 plantas por construcción. La tendencia observada, aunque no alcanza significancia estadística, podría atribuirse a una cantidad insuficiente de réplicas biológicas, dado que el efecto no sería lo suficientemente marcado. De hecho, en uno de los ensayos, la construcción *NbATG1* no logró causar un retraso significativo en la manifestación de la MCP. Para obtener conclusiones más robustas, sería conveniente repetir este ensayo incrementando el número de réplicas biológicas y controlando las condiciones ambientales, especialmente la temperatura en la cámara de crecimiento, que podría estar influenciada por factores climáticos externos.

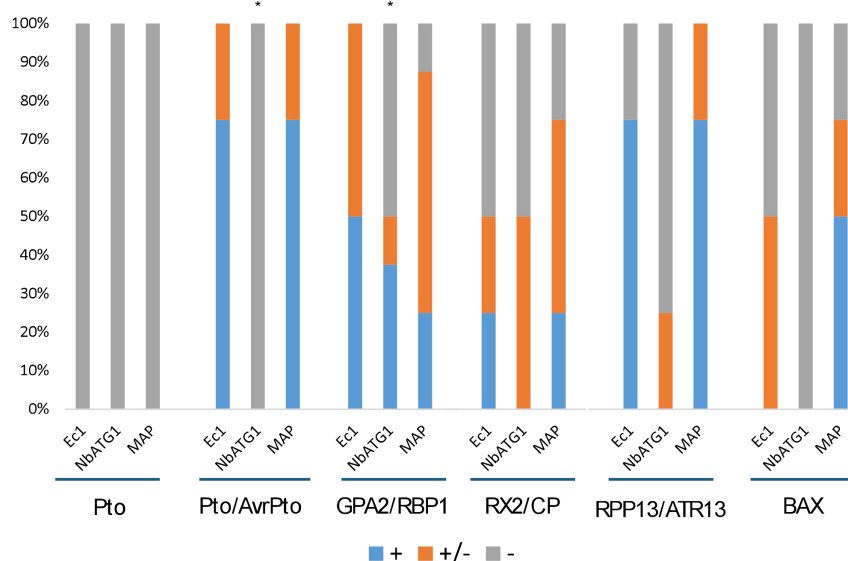


Figura II.15. Efecto causado por el silenciamiento con las construcciones *Ec1*, *NbATG1*, y *MPKKKα* frente a la sobreexpresión de “elicitors” no bacterianos GPA2 de papa/RBP-1 (GPA2/RBP1), proteína Rx2 de papa/proteína de la cubierta del virus PVX (RX2/CP), RPP13 de *A. thaliana*/ATR13^{Emc5-Δ41aa} (RPP13/ATR13), Bax. Se emplearon como control negativo de la MCP la sobreexpresión de la proteína Pto y como control del experimento la sobreexpresión de AvrPto/Pto previamente empleados en el ensayo de HR. * p-valor < 0,05 con respecto al control *Ec1*. Para el análisis estadístico se empleó el test exacto de Fisher y se consideraron las categorías + y +/- en su conjunto.

II.3.8 La senescencia se compromete mediante el silenciamiento con *NbATG1-1*, *NbATG1-2*, *NbATG1*

Debido a que el proceso de autofagia afecta la senescencia adelantándola o retrasándola, se decidió evaluar el efecto del silenciamiento sobre la senescencia (Bassham et al., 2006; Yoshimoto et al., 2009; Wang et al., 2016; Tang y Bassham, 2018; Petersen et al., 2024). En particular fue descripto que *AthATG1a* y *AthATG1b* tienen una expresión alta en tejidos senescentes (Suttangkakul et al., 2011).

El ensayo fue realizado dos veces, una primera con todas las construcciones *NbATG1-1*, *NbATG1-2* y *NbATG1*, con el control *Ec1* y una segunda vez con las construcciones *NbATG1* y *Ec1*. En el primer ensayo se obtuvo diferencias significativas tanto en la evaluación con el colorímetro como con el SPAD, si bien el colorímetro presentó resultados con una mayor dispersión. Debido a que los resultados en los ensayos de enfermedad y HR habían dado muy consistentes con la construcción *NbATG1*, se decidió en el segundo ensayo trabajar únicamente con esta construcción y el control *Ec1*, además, para ahorrar costos, se emplearon tres plantas de cada una. Por este motivo, no se pudieron llegar a vislumbrar diferencias significativas.

A partir de estos resultados, se pudo concluir que se produciría una fuerte tendencia de retraso en la senescencia que se deduce a partir de los cambios en la proporción de clorofila, tanto cuando se la cuantifica por SPAD como mediante colorimetría. Si bien, en este último caso, se obtuvieron resultados con mayor dispersión, ambos presentaron resultados significativos de retraso en la senescencia.

Se pudo obtener un adelanto significativo en la hoja1 ([sección II.2.6.5](#)) empleando la construcción *NbATG1* (figura II.16). Sin embargo, de manera inesperada y en contraste con este resultado, la construcción *NbATG1-2* mostró el efecto opuesto (figura II.16), es decir se retrasó la senescencia con respecto al control de forma

significativa. A medida que las hojas maduraban se observó una tendencia general al adelanto de la senescencia con todas las construcciones con el paso del tiempo (figura II.16). Analizando en detalle el boxplot de la figura II.16b, se evidenció que, independientemente del estado de madurez de la hoja, la senescencia aumenta progresivamente en el tiempo en todas las construcciones. En la hoja 1, este proceso mostró un adelanto de la senescencia en los primeros días del ensayo, alcanzando un *plateau* alrededor del día 8 para el caso de *NbATG1* (figura II.16). En contraste, la construcción *NbATG1-2* presentó un retraso de la senescencia que fue disminuyendo con el tiempo, pero incluso al día 8, la clorofila se mantuvo en niveles altos con respecto al control de forma significativa. En cuanto a las hojas 3 y 4, desde el día 2 se observó un adelanto en la senescencia para todas las construcciones, siendo más pronunciado en la hoja 4.

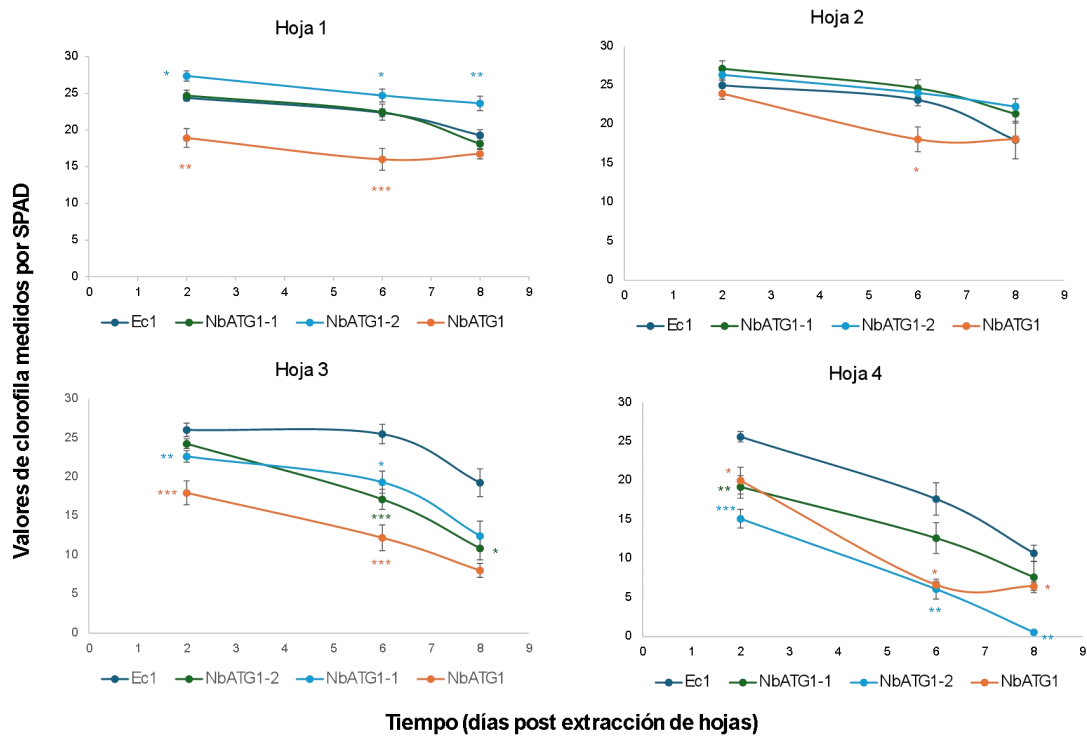
En tanto que las hojas 3 y 4 presentaron desde el día 2 un adelanto de la senescencia en todas las construcciones, siendo más notorio en la hoja 4, similar a como se ha reportado previamente en cuádruples mutantes de *A. thaliana* luego del hambreado de carbono (Huang et al., 2019). En esta hoja, aunque los efectos de *NbATG1* y *NbATG1-2* parecieran similares, la construcción *NbATG1* mostró una mayor velocidad en el incremento de la senescencia (figura II.16A), mientras que *NbATG1-2* generó el mayor adelanto al último día evaluado (figura II.16).

Tal como en el ensayo de HR – MCP ([sección II.1.3.4](#)), se llevó a cabo el mismo procedimiento experimental, pero en este caso se evaluó si en las plantas silenciadas *NbATG1* producían un desborde de la sintomatología por fuera del área infiltrada, como se ha reportado en plantas mutantes *atg* (Yoshimoto et al., 2009; Hofius et al., 2011; Munch et al., 2014). Este efecto no pudo ser observado, sin embargo, se evidenció que las plantas silenciadas presentaron un menor tamaño (figura II.17). Este efecto puede deberse al adelanto de la clorosis asociada a la senescencia observado en la figura II.16.

La autofagia se encuentra en niveles basales durante las etapas de desarrollo o juvenil (Wang y Schippers, 2019). En esta etapa se encuentran las plantas silenciadas ya que no han desarrollado aún ni flores ni semillas, se puede suponer que la disminución de tamaño también esté asociado al efecto del adelanto de la senescencia en las plantas silenciadas.

De estos resultados, se podría suponer que la familia de proteínas *NbATG1* se encuentra participando en el proceso de senescencia y que puede ser vislumbrado con las construcciones empleadas. A su vez, dado lo observado en *NbATG1* que presenta en la hoja joven un resultado opuesto a las demás construcciones, pero en las hojas maduras es comparable, es posible que esta familia se encuentre interviniendo rutas metabólicas diversas. Posiblemente el rol sea el de mantener la mayor cantidad de tiempo posible las hojas en estado no senescente para conservar la fotosíntesis viable ya que el silenciamiento a rasgos generales tendería a ser adelantada.

A



B

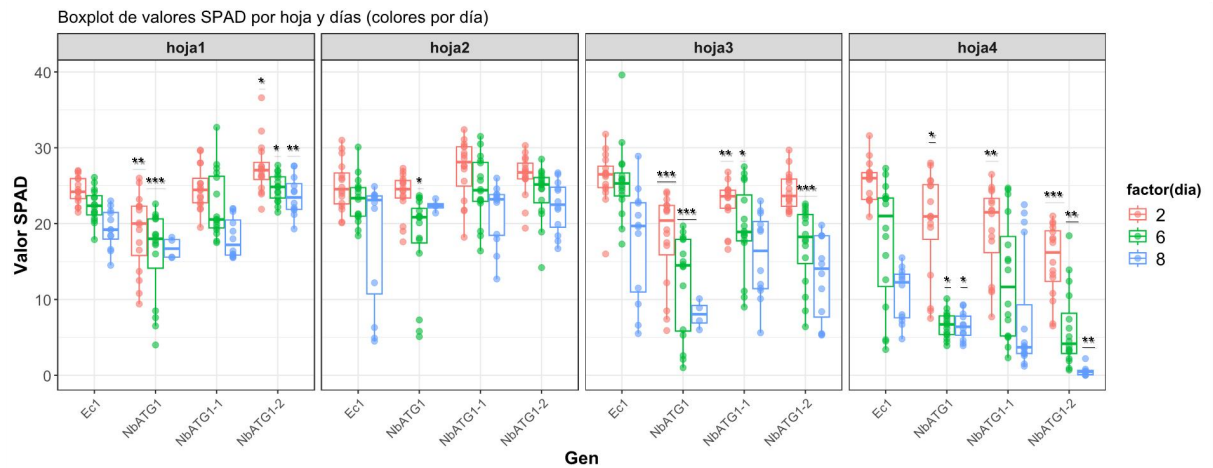


Figura II.16 Evaluación de la senescencia de hojas extraídas medida con SPAD que cuantifica la cantidad de clorofila. Las plantas fueron silenciadas con las construcciones *NbATG1-1*, *NbATG1-2*, *NbATG1* o el control *Ec1*. Las hojas evaluadas fueron de la de menor madurez (hoja 1) a la de mayor madurez (hoja 4). **(A)** Gráfico que muestra el valor medio diario de SPAD para cada construcción en función del tiempo **(B)** Boxplot con las mismas construcciones separado por hoja y factorizado por día, indicando en color rojo los valores observados al día 2, verde al día 6 y celeste al día 8. El análisis estadístico no paramétrico empleado fue el test de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad ajustando mediante el método de Bonferroni con respecto al control *Ec1*. La estadística se muestra con asteriscos donde: * p-valor < 0,05; ** p-valor < 0,01; *** p-valor < 0,001.

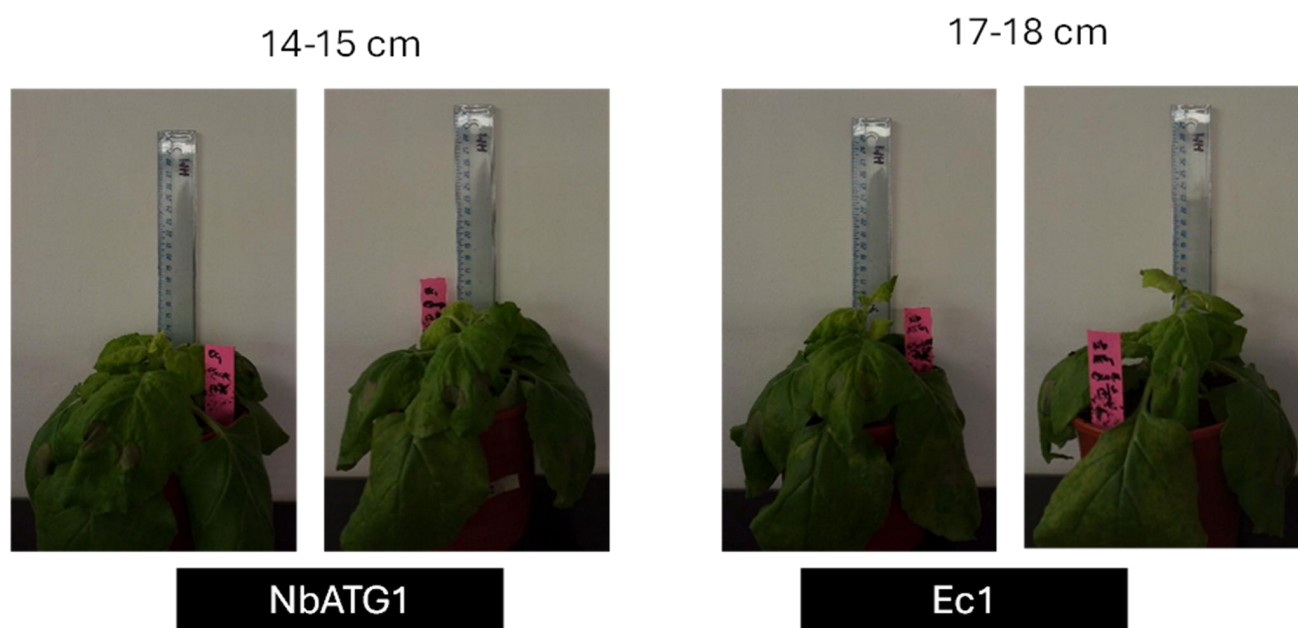


Figura II.17 Imagen representativa de lo observado en plantas silenciadas. Las plantas *NbATG1* mostraron una tendencia a presentar menor altura con respecto a las plantas control *Ec1*.

II.3.9 Eficiencia del silenciamiento de los genes ATG1

Para evaluar la eficiencia de silenciamiento se diseñaron cebadores como se indica en la [sección II.2.4.2.2](#). Las regiones amplificadas con estos cebadores se muestran en la figura II.18 mediante la herramienta VIGS tool (Fernandez-Pozo et al., 2015b), como se describe a continuación. Se diseñaron dos pares de cebadores: uno para medir la expresión de *NbATG1-1* y otro para *NbATG1-2*. Además, se incluyó un tercer par de cebadores destinado a evaluar la expresión de un gen no blanco, utilizado como control externo (outgroup). Se emplearon plantas silenciadas *NbATG1*, *NbATG1-1* y *NbATG1-2*.

Como se puede observar en la figura II.23 A, se hizo una primera aproximación utilizando la secuencia del fragmento *NbATG1* con dos desalineamientos (mismatch) para determinar los fragmentos coincidentes utilizando la herramienta VIGS tool (Fernandez-Pozo et al., 2015b). Pero debido a que se contaba con una base de datos de RNAseq de *N. benthamiana*, y se determinó que muchos de los genes encontrados por esta metodología no tenían buena expresión (datos no mostrados), entre los genes se determinó que Niben101Scf07965g02018 presentaba una buena expresión.

Tal como se ilustra en la figura II.23 B, para determinar la secuencia no blanco (*off-target*) de *NbATG1-1* se empleó la secuencia del ADNc de Niben101Scf05137g01011 y se constató que los oligonucleótidos amplifiquen una región en los dos genes de *NbATG1-2* (Niben101Scf05137g01011y Niben101Scf07477g02010). Del mismo modo, como se observa figura II.23 C, el *off-target* de *NbATG1-2* se obtuvo a partir la secuencia del ADNc Niben101Scf02085g06008 y se constató que los oligonucleótidos amplifiquen una región en los dos genes de *NbATG1-1* (Niben101Scf02085g06008 y Niben101Scf05404g04007). Para el *off-target* de todos los genes, se realizó un BLASTn de la secuencia completa de ADNc del gen *NbATG1* y luego un alineamiento multiple con los cuatro genes de interés (Niben101Scf07477g02010, Niben101Scf05137g01011 Niben101Scf05404g04007 y Niben101Scf02085g06008) mediante Clustal Omega (Sievers y Higgins, 2018; Madeira et al., 2024), como se observa en la figura II.18 D.

Se realizó RT-qPCR de plantas silenciadas para cuantificar el efecto de las construcciones empleadas, sin embargo, no observaron diferencias significativas, ya que la expresión de los genes basal era muy baja (datos no mostrados).

A

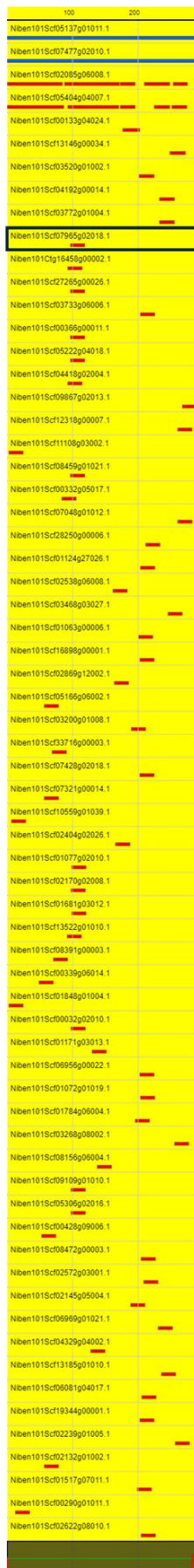
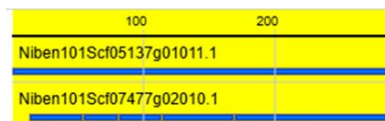
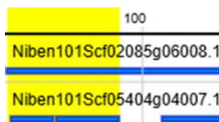


Figura II.23 Captura de pantalla VIGS tools con dos desalineamientos para el diseño de cebadores. (A) Se empleó la secuencia del fragmento *NbATG1* para el diseño como primera aproximación y se seleccionó el gen marcado Niben101Scf07965g02018 (B) secuencia procedente del ADNc de Niben101Scf05137g01011 como *off-target* de Niben101Scf02085g06008 y Niben101Scf05404g04007. (C) secuencia procedente del ADNc de Niben101Scf02085g06008 como *off-target* de Niben101Scf05137g01011 y Niben101Scf07477g02010. (D) Alineamiento múltiple de la secuencia Niben101Scf07965g02018 como *off-target* de los cuatro genes.

B



C



D

Niben101Scf07965g02018.1	GTTCCTACATGAAGAAATATATCAAGAGCCTAACACCCAAAGTTAGCGCAGAGCAGGAA	480
Niben101Scf07477g02010.1	-----	162
Niben101Scf05137g01011.1	-----	162
Niben101Scf02085g06008.1	-----	160
Niben101Scf05404g04007.1	-----	160
Niben101Scf07965g02018.1	GAAGTTTTAAGAACAACATTCAAGGAGCAACCAAGTACCTTTTGTCAAAGCTCAGTGAC	540
Niben101Scf07477g02010.1	-----	162
Niben101Scf05137g01011.1	-----	162
Niben101Scf02085g06008.1	-----	160
Niben101Scf05404g04007.1	-----	160
Niben101Scf07965g02018.1	CTTCAATCTTTGTTGGTGAGAGCATGGCTGATGATACGGAATGGTGTTCCTACTAC	600
Niben101Scf07477g02010.1	-----	162
Niben101Scf05137g01011.1	-----	162
Niben101Scf02085g06008.1	-----	160
Niben101Scf05404g04007.1	-----	160
Niben101Scf07965g02018.1	AAGGATGGCGCCACTGATCCAACCTTTTGTACCTCGCAGTGGACTCAAGGAAGTCAAG	660
Niben101Scf07477g02010.1	-----	162
Niben101Scf05137g01011.1	-----	162
Niben101Scf02085g06008.1	-----	160
Niben101Scf05404g04007.1	-----	160
Niben101Scf07965g02018.1	TGTTAAAAAGTTGGACCACTGCTGTCTCTGATTTTGTATGCATTTTACCATTAAAT	720
Niben101Scf07477g02010.1	-----	162
Niben101Scf05137g01011.1	-----	162
Niben101Scf02085g06008.1	-----	160
Niben101Scf05404g04007.1	-----	160

II.4 Resumen de los principales resultados

- Del análisis filogenético se concluyó que los genes de *S. lycopersicum* Solyc10g084930 y Solyc09g011320 presentaron clara ortología con dos pares de genes en *N. benthamiana* Niben101Scf02085g06008 y Niben101Scf05404g04007; Niben101Scf05137g01011 y Niben101Scf07477g02010, respectivamente. A partir de la comparación con *A. thaliana* se puede afirmar que son también homólogas a la familia de proteínas ATG1. En tomate, ambos genes se inducen en la respuesta ETI y, así como Solyc10g084930 tiene una inducción PTI dependiente de flgII-28, que es un efector que es reconocido específicamente en solanáceas (Clarke et al., 2013), aunque esto aparentemente no ocurriría en *N. benthamiana* (Hind et al., 2016; Roberts et al., 2020).
- Se diseñaron tres construcciones para el silenciamiento mediante VIGS: una que permite el silenciamiento de los cuatro genes de *N. benthamiana* (basada en el gen Niben101Scf07477g02010, (Bekier, 2018) y otras dos construcciones para el silenciamiento de los genes de a pares basadas en Niben101Scf02085g06008 (*NbATG1-1*) y Niben101Scf05137g01011 (*NbATG1-2*).
- El silenciamiento transitorio no generó alteraciones en las plantas.
- En las plantas silenciadas se observó un retraso de la MCP de la HR en la sobreexpresión de Pto – AvrPto con las construcciones *NbATG1-2* y, de forma más consistente, con *NbATG1*. De todos modos, la que arroja resultados más interesantes es *NbATG1-2*, dado que silenciaría al par ortólogo de Solyc09g011320; es decir silenciaría a la que no estaría inducida por flgII-28.
- En plantas silenciadas *N. benthamiana-35S::Pto* no se obtuvo incremento de la sintomatología de la enfermedad con ninguna de las tres construcciones de silenciamiento empleadas en un sistema incompatible dependiente de la interacción Pto – AvrPto como era esperado según los resultados de la HR.
- En plantas silenciadas *N. benthamiana-35S::Pto* se obtuvo retraso de la muerte celular asociada a la sintomatología de enfermedad en un sistema compatible. Siendo *NbATG1-2* y *NbATG1* las construcciones que presentaron resultados consistentes en los ensayos.
- Los resultados sugieren que el crecimiento bacteriano en el sistema incompatible no se vio afectado, dando resultados comparables al control negativo *Ec1*. No obstante, el crecimiento bacteriano sí se vio afectado en un sistema compatible, con un aumento, de manera contraintuitiva al hecho de producirse un retraso en la sintomatología de enfermedad en el mismo tipo de interacción patogénica.
- Los resultados en plantas silenciadas con *NbATG1* indicarían que la interacción de inductores no bacterianos podría retrasar la MCP de la HR.
- A partir de estos resultados se pudo observar un retraso en la senescencia en hojas maduras evaluando la proporción de clorofila tanto mediante la evaluación por SPAD como por la colorimétrica. En hojas jóvenes *NbATG1-2* retrasó la senescencia, mientras que *NbATG1* la adelantó con respecto a *Ec1*. En las hojas más viejas todas las construcciones adelantaron la senescencia. El adelanto de la senescencia afectaría el tamaño de las plantas por lo que las plantas silenciadas desarrollan menor tamaño.

II.5 Discusión

II.5.1 Análisis filogenético de la familia ATG1

Las proteínas del grupo de las quinasas cumplen un rol fundamental en la inmunidad vegetal (Pedley y Martin, 2005; Erickson et al., 2022; Zhang et al., 2024a). Por este motivo, se decidió evaluar genes codificantes para proteínas quinasas que se inducen transcripcionalmente durante la inmunidad a partir de datos generados previamente mediante RNAseq (Rosli et al., 2013; Pombo et al., 2014). Por otro lado, se llevó a cabo un análisis bioinformático de homología en base a secuencias aminoácidas, con el que se pudieron determinar las relaciones de ortología de la familia ATG1 entre las especies *A. thaliana*, *N. benthamiana* y *S. lycopersicum*. Esta familia de proteínas fue clasificada previamente como quinasas pertenecientes al Grupo Planta Específica 3 (Grupo-PI-3) de acuerdo con Lehti-Shiu y Shiu (2012) utilizando la base de datos SGN. En ese momento, los autores la caracterizaron como una familia específica de plantas, que no pudo ser asignada a ninguna familia previamente conocida. De todos modos, es de relevancia resaltar que esta clasificación se basa en un análisis que ha quedado desactualizado. Múltiples estudios de ortología han demostrado que la familia ATG1 se encuentra conservada en todos los principales linajes de organismos eucariotas, lo que refleja su importancia evolutiva, por lo que esta familia de proteínas no sería solamente específica de plantas (Noda y Fujioka, 2015; Batoko et al., 2017; Demeter et al., 2020; Zhang et al., 2021).

La familia ATG1 es una familia pequeña, con tres miembros identificados en *S. lycopersicum*, cinco en *N. benthamiana*, y cuatro en *A. thaliana* (figura II.6, [sección II.3.1](#)). Cabe destacar que tanto *S. lycopersicum* como *N. benthamiana* son especies de la familia Solanaceae, lo que permitió establecer relaciones de ortología claras: aproximadamente dos genes en *N. benthamiana* por cada uno en *S. lycopersicum*, lo cual se atribuye al carácter alotetraploide de la primera. En contraste, no se observa una ortología estricta con *A. thaliana*, dado que pertenece a la familia Brassicaceae. No obstante, se incluyó esta especie en el análisis debido a su condición de modelo vegetal ampliamente estudiado (Yahya, 2022).

Estudios filogenéticos han reportado que ATG1t únicamente se ha encontrado en especies vegetales, siendo un evento que ocurrió en la evolución temprana de las especies vegetales terrestres (Suttangkakul et al., 2011; Wang y Hou, 2022). xATG1t únicamente presenta el dominio quinasa seguido de un codón stop (Suttangkakul et al., 2011), aun así debido a su gran grado de conservación entre especies de distintos géneros, es probable que conserve un rol de relevancia.

Debido a que *SlATG1t* presentó su expresión suprimida, se continuó el análisis con aquellos genes de esta familia de proteínas que presentó la expresión inducida y cuya caracterización funcional podría abordarse mediante la estrategia de VIGS. Los genes seleccionados, Solyc09g011320 y Solyc10g084930, se inducen transcripcionalmente durante la respuesta inmune, siendo ambos inducidos durante la respuesta ETI y, también, Solyc10g084930 se induce frente al PAMP flgII-28 por lo que podrían cumplir un rol en la respuesta inmune.

La asignación de un nombre identificador permitió realizar una búsqueda bibliográfica más extensa en diversos cultivos. Gracias a ello, se identificó que ATG1, o su ortólogo en animales y levaduras, Ulk1, donde fue estudiado inicialmente, es una proteína de gran interés debido a su papel clave en la iniciación de la autofagia (Noda y Fujioka, 2015; Augustine, 2019; Wang y Hou, 2022). Además, se ha determinado que ATG1 está ampliamente presente en todas las especies vegetales analizadas hasta la fecha (Russell et al., 2013; Li et al., 2014; Noda y Fujioka, 2015; Kirkin, 2020; Wang y Hou, 2022).

Todo lo expuesto anteriormente respalda la hipótesis de que esta familia de proteínas podría estar cumpliendo un rol relevante que asocie la autofagia y la inmunidad vegetal en el patosistema estudiado aquí.

Resultó conveniente que se tratase de una familia pequeña de proteínas, ya que, para la caracterización funcional mediante VIGS, se reduce la probabilidad de afectar genes no blancos con secuencias codificantes similares. Además, debido a que los genes se inducen transcripcionalmente durante la infección, se esperaba que el silenciamiento permitiera caracterizar estos genes en la interacción planta – patógeno.

II.5.2 Eficiencia del silenciamiento

Una publicación previa, ha analizado la expresión basal de los genes de la familia ATG1 en la especie emparentada *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*) en diferentes tejidos, entre los que se encuentran la raíz, yema y hojas (Zhou et al., 2015). El mismo demostró que la expresión basal era muy baja en todos los tejidos analizados. Si bien, no son la misma especie, ambas pertenecen al mismo género (Schiavinato et al., 2020; Ranawaka et al., 2023; Wang et al., 2024a). Por lo que la presencia de estos genes en ambas especies es probablemente indicativo de que los genes presentes en *N. tabacum* podrían estar actuando de modo similar en *N. benthamiana*.

A su vez, empleando las accesiones de Zhou et al. 2015 y, realizando un BLASTn en la página SGN (Fernandez-Pozo et al., 2015a), se reveló una identidad de 98-99 % con las accesiones de *N. benthamiana* correspondientes a las secuencias codificantes del gen completo. Esto podría indicar que la expresión basal de los genes se mantiene de manera similar a la observada en *N. tabacum*.

Además, la expresión de la familia ATG1 parecería estar reprimida en las etapas tempranas de desarrollo de la planta (en las cuales se encuentran las plantas silenciadas), ya que no han desarrollado aún flores ni frutos, lo que podría también ser indicativo de que, en estas condiciones, las plantas tienen un estado de expresión basal muy bajo y explicar la falta de sensibilidad de la RT-qPCR detectada en este ensayo (Wang y Schippers, 2019).

En otras palabras, la expresión basal de estos genes resulta demasiado baja para poder medirla mediante RT-qPCR. No obstante, es valioso destacar que las diferencias significativas se mantuvieron en las sucesivas repeticiones de los ensayos de HR – MCP y enfermedad. Dado que la expresión fue muy baja, a tal punto que no se pudo vislumbrar diferencias significativas en la expresión de los genes entre las plantas silenciadas y las no silenciadas, se puede confirmar que no hubo sobreexpresión de los genes, lo que podría indicar que el efecto observado se debió efectivamente al silenciamiento.

II.5.3 Inmunidad vegetal

Los efectores AvrPto y AvrPtoB de la bacteria *Pst* DC3000 impiden el progreso de la enfermedad en plantas de *S. lycopersicum* debido al reconocimiento de Pto, desencadenando la HR – MCP (Sessa y Martin, 2000; Cohn y Martin, 2005; Mucyn et al., 2006; Mucyn et al., 2009; Oh y Martin, 2011; Lindeberg et al., 2012; Xin y He, 2013a; Ntoukakis et al., 2014; Sheikh et al., 2023). En la literatura se discute la diferencia entre lo que en este trabajo se denomina muerte celular y la MCP (ver [sección II.1.5.1](#)). Algunos trabajos denominan necrosis a la muerte celular asociada a enfermedad, como se define en esta tesis. La necrosis resulta de procesos externos a la planta, como la acción de metabolitos o efectores liberados por organismos fitopatógenos (Kalra y Bhatla, 2018; Bhattacharjee, 2019), y que no son regulados por la planta. En contraste, la MCP es un proceso altamente controlado por la planta, que en caso de no serlo generaría efectos destructivos, como pudo ser observado en plantas mutantes o silenciadas (Yoshimoto et al., 2009; Yoshimoto et al., 2010; Lv et al., 2014; Wang et al., 2016; Tang y Bassham, 2018; Bhattacharjee, 2019).

Asimismo, si bien el modelo más aceptado de la inmunidad vegetal continúa siendo el del zig-zag (Jones y Dangl, 2006; Shafikova y Omelichkina, 2020; Ngou et al., 2022), recientemente se ha propuesto que la respuesta PTI y la ETI se encuentra más “entremezclada”, generando una continua conversación o *crosstalk* entre ambas (Yuan et al., 2021; Dodds et al., 2024). Ambas respuestas comparten alteraciones en la expresión génica induciendo genes de la inmunidad, activación de la cascada de señalización que culmina en ROS, el flujo hacia el interior celular de Ca^{2+} , y la activación de MAPK. Todo esto genera una retroalimentación (*feedback*) positiva para activar una nueva ronda de genes, incluso la respuesta ETI es inducida por la respuesta PTI que puede estar actuando al mismo tiempo, conllevando a una respuesta más fuerte (Yuan et al., 2021).

Teniendo en cuenta esto, como se ha desarrollado previamente ([sección II.1.5.5](#)), se ha reportado que tanto AvrPto como AvrPtoB, si bien no presentan homología a nivel de secuencia, comparten ciertos dominios estructurales y muestran una redundancia parcial en su capacidad de interactuar con proteínas R de las plantas (Gutierrez et al., 2010; Martin, 2011; Lal et al., 2020). Algunas de estas proteínas son blanco de ambos efectores, entre los cuales se encuentra la proteína Pto de algunas variedades de *S. lycopersicum*, incluyendo aquellas con actividad quinasa asociadas a la inmunidad (Gutierrez et al., 2010; Martin, 2011).

II.5.3.1 La autofagia como proceso que afecta la inmunidad y la senescencia

El proceso de la autofagia, descubierto en la década 60 y que le valió el premio nobel Yoshinori Ohsumi en el año 2016, quien lo describió en levaduras (Mizushima, 2018; Kirkin, 2020). Múltiples trabajos mencionan el importante rol de la autofagia en la interrelación entre el estrés biótico y abiótico que desencadenan la MCP y la senescencia (Bassham et al., 2006; Yoshimoto et al., 2009; Wang et al., 2016; Tang y Bassham, 2018; Petersen et al., 2024). Estos complejos procesos son regulados por genes que ven afectada su expresión en función de la percepción del medio ambiente a partir de proteínas sensoras que activan la expresión de genes, modificación de proteínas y alteración del balance hormonal (Huang et al., 2021c; Petersen et al., 2024). Algunos de estos trabajos han incluso correlacionado la interacción más concretamente entre *P. syringae* y la senescencia, al mutarse genes asociados a la autofagia en *A. thaliana* (Yoshimoto et al., 2009; Suttangkakul et al., 2011; Wang et al., 2016). Se ha reportado que mutantes de *A. thaliana* han visto alterada su senescencia, algunas de ellas viéndose adelantada (Yoshimoto et al., 2009; Suttangkakul et al., 2011; Kalra y Bhatla, 2018; Zhang et al., 2023).

Si bien, la autofagia ha sido en las últimas décadas muy analizada, poco se comprende aún sobre este proceso, especialmente en lo que respecta a la función de ATG1 en sistemas vegetales (Wang y Hou, 2022). Su caracterización se ha centrado principalmente en contextos de estrés abiótico (Suttangkakul et al., 2011; Li et al., 2014; Huang et al., 2019; Qi et al., 2020). Aunque se ha demostrado la interacción de AvrPto y AvrPtoB con *AthATG1a* (Lal et al., 2020), hasta el momento no se han reportado estudios que caractericen el rol de ATG1 en la respuesta planta – patógeno (Wang y Hou, 2022).

ATG1 es una proteína quinasa presente en especies animales, fúngicas y también en plantas (Noda y Fujioka, 2015; Batoko et al., 2017; Demeter et al., 2020; Zhang et al., 2021). Presenta un dominio quinasa (KD, por sus siglas en inglés: *Kinase Domain*), también presenta un dominio de interacción y transporte de microtúbulos (MIT, por sus siglas en inglés: *Microtubule Interaction and Transport*) (Stjepanovic et al., 2014). En algunos de estos organismos el ortólogo es denominado ULK1, como previamente se mencionó (Torggler et al., 2016; Demeter et al., 2020; Kirkin, 2020). Esta proteína es esencial para la iniciación del autofagosoma, fundamentalmente en el proceso de autofagia selectivo, y en algunos organismos también se ha confirmado su rol en la autofagia no selectiva (Papinski y Kraft, 2016).

II.5.3.2 ATG1: autofagia en la senescencia

Durante el proceso de senescencia foliar, la autofagia transcurre de forma dependiente ATG1 (Suttangkakul et al., 2011). En particular las proteínas de la familia ATG1 en plantas generan un complejo conocido como el complejo ATG1, entre las que se encuentran las proteínas de la familia ATG13, y que permiten iniciar el proceso de la formación de los autofagosomas (Wang y Hou, 2022).

Debido al complejo proceso con múltiples componentes que afectan tanto la senescencia, la MCP dentro de HR, y la necrosis generada por la sintomatología de enfermedad, es probable la autofagia intervenga interconectando estos mecanismos, ya que el silenciamiento de genes desarrolla efectos pleiotrópicos (Tang y Bassham, 2018; Petersen et al., 2024). Por tal motivo, se realizó un análisis bioinformático de los motivos de las proteínas de la familia de proteínas ATG1, empleando las secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de la base de datos SGN (Fernandez-Pozo et al., 2015a) y luego, realizando un alineamiento con el programa MEGA11 para seleccionar las secuencias (Tamura et al., 2021). A continuación, para seleccionar las secuencias consenso descritas en la familia ATG1 (Li et al., 2014), se empleó el programa Jalview 2.11.4.1 (Waterhouse et al., 2009). De este modo, se encontró la secuencia aminoacídica que comprende el AIM (Li et al., 2014), como se puede observar en la figura II.19A. El AIM es un motivo que se encuentra dentro del dominio quinasa de los genes ATG1 y se encuentra presente en todos los miembros de la familia de estas proteínas con excepción de aquellas que están truncadas (Suttangkakul et al., 2011; Li et al., 2014), como se observa en la figura II.19A.

Asimismo, varios análisis filogenético de ATG1, en el que se incluyeron especies de distintas familias de plantas, observaron que ATG1a es un clado, en tanto que ATG1b y ATG1c se encuentran en un clado mixto y ATG1t en otro clado (Suttangkakul et al., 2011; Wang y Hou, 2022). Wang y Hou (2022) reportaron que la versión truncada únicamente está presente en plantas, siendo un evento que apareció en la evolución en plantas con semilla. El hecho de estar muy conservada ATG1 entre los organismos eucariotas constituiría una evidencia sólida de que las proteínas de la familia de ATG1 de *S. lycopersicum* y *N. benthamiana*, del mismo modo que ocurre con *A. thaliana*, tendrían un sitio de unión para interactuar con las proteínas de la familia ATG8 y ATG13, ya que, como se expuso presenta el AIM (figura II.19). Esto sería indicativo de que ATG1 de *S. lycopersicum* y *N. benthamiana* estaría participando de la autofagia (Suttangkakul et al., 2011; Li et al., 2014). A partir de lo observado en figura II.19 B, se confirmó que la región de mayor conservación de secuencias corresponde a la reportada por Li et al. (2014), la cual contiene la secuencia YVLV.

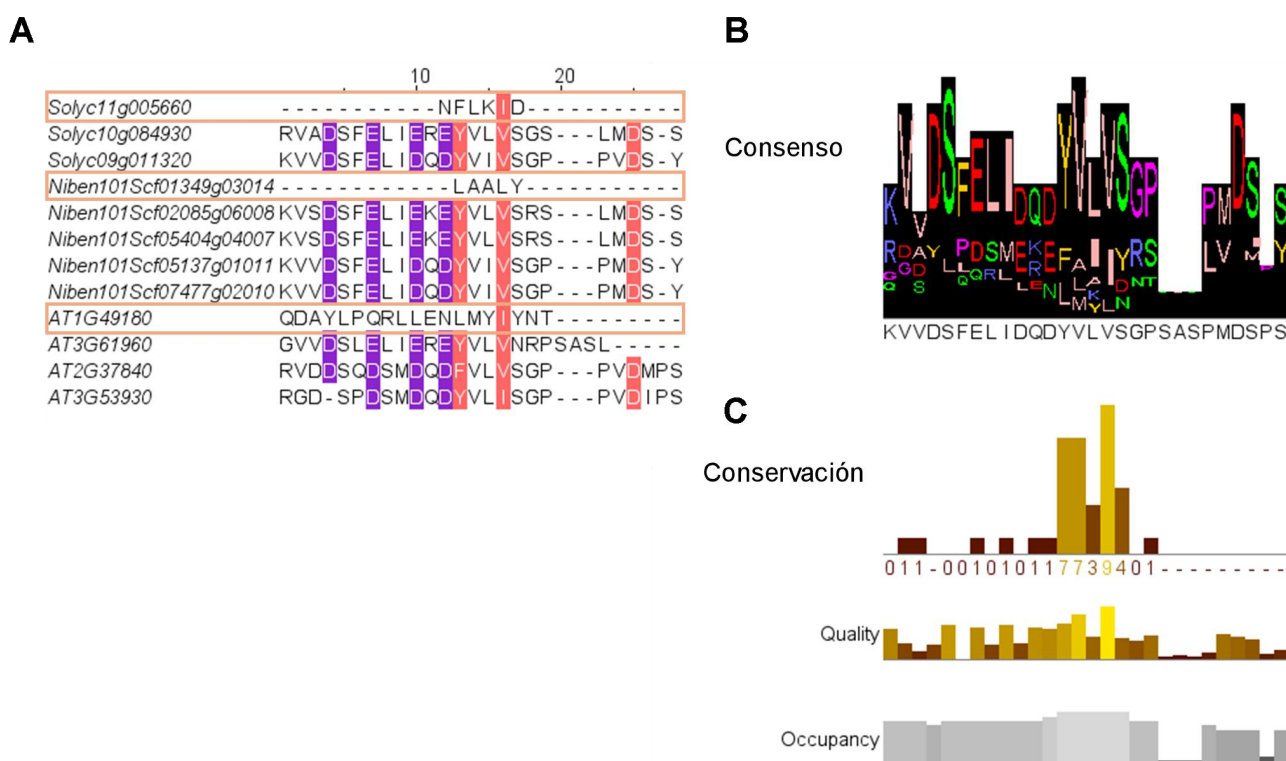


Figura II.19. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas completas de los miembros de la familia de proteínas ATG1 de las especies *S. lycopersicum*, *N. benthamiana*, *A. thaliana* realizado con MEGA11 (Tamura et al., 2021). **(A)** Recorte de la región consenso según Li et al. 2014 realizado con Jalview (Waterhouse et al., 2009). Se indica con color lila los residuos río arriba y en rojo los de río abajo en el AIM. Con rectángulos se señalan los genes ATG1t de cada una de las especies analizadas y la ausencia de la región consenso. **(B)** Imagen ilustrativa de los aminoácidos conservados, aquellos de mayor tamaño son los que presentan mayor conservación entre secuencias. **(C)** Se cuantifica la frecuencia de aparición de los aminoácidos.

Debido a múltiples estudios reportan que las proteínas ATG son necesarias para la senescencia (Yoshimoto et al., 2009; Kalra y Bhatla, 2018; Zhang et al., 2023; Petersen et al., 2024), se decidió evaluar este proceso en plantas silenciadas ATG1. Asimismo, teniendo en cuenta que VIGS permite el silenciamiento transitorio de forma sistémica (Baulcombe, 1999b; Liu et al., 2002b; Liu et al., 2002a; Brigneti et al., 2004), permitió hacer una evaluación de los efectos en la senescencia de la planta.

Resultados indicarían que la senescencia se ve afectada con todas las construcciones evaluadas *NbATG1*, *NbATG1-1* y *NbATG1-2* en hojas con distinto nivel de madurez. En hojas más maduras, la senescencia se ve adelantada empleando todas las construcciones. Mientras que en hojas jóvenes se observa el adelantamiento de la senescencia empleando *NbATG1*, mientras que al usar *NbATG1-2* llevaría al retraso de la senescencia. Probablemente, esto indique que las proteínas ATG1 no presenten funciones completamente redundantes. Esto es consistente con lo reportado, ya que, al igual que los genes *AthATG1a*, *AthATG1b*, y *AthATG1c* (Suttangkakul et al., 2011), *SlATG1a* y *SlATG1b* presentan un patrón diferente de expresión (Rosli et al., 2013; Pombo et al., 2014; Bekier, 2018), como se detalló en la [sección II.1.6](#)

Asimismo, podría indicar que ATG1 estaría prolongando el tiempo de vida de las hojas maduras, lo que fue consistente con todas las construcciones.

Como se mencionó previamente, en las hojas jóvenes la regulación probablemente sea más precisa, y los genes podrían ejercer efectos diferenciados que modulen esta respuesta, lo que respalda la idea de que estas proteínas no sean redundantes. En cambio, en las hojas maduras, con el objetivo de prolongar la actividad fotosintética y favorecer el desarrollo de los tejidos más jóvenes, todos los genes de la familia ATG1 contribuirían al retraso de la senescencia.

II.5.3.3 ATG1: autofagia en la inmunidad

En este trabajo doctoral, a partir de un RNAseq se identificaron los genes ATG1 que se inducen durante la inmunidad en *S. lycopersicum*. Se evaluó la interacción tanto compatible (virulenta) como incompatible (avirulenta) de *P. syringae*, empleando al fitopatógeno *Ps tab* vv (Oh y Collmer, 2005), y una bacteria *Ps tab* expresando al efector AvrPto de *Pst* como patógeno avirulento en plantas *Nb-35S::Pto*. Este sistema fue útil para modelar la interacción *S. lycopersicum* Pto – *Pst* DC3000.

Con el fin de evaluar funcionalmente los genes codificantes para las proteínas ATG1 no truncas, se decidió realizar el silenciamiento transitorio, a partir del cual se realizaron diversos ensayos para la evaluación de los mismos en la inmunidad.

A partir del uso de la interacción mediada por el efector AvrPto y la proteína R Pto, se llevó a cabo un ensayo para inducir la HR – MCP (Martin, 2011). Dado que la metodología consistió en la sobreexpresión de la proteína Pto y el efector AvrPto, la HR – MCP resultante se manifestó de forma macroscópica (Pombo et al., 2014), permitiendo su cuantificación mediante inspección visual. A partir de los mismos, se cuantificó la severidad de la sintomatología, observándose un retraso de la sintomatología macroscópica de HR. *NbATG1* y *NbATG1-2* presentaron este resultado en forma consistente entre los ensayos efectuados.

Como es sabido, un incremento de la HR – MCP, es una respuesta inmunitaria por parte de la especie vegetal para restringir la propagación del fitopatógeno (hemi) biótrofo (Agrios, 2005; Bhattacharjee, 2019). Por ello, la disminución de esta respuesta ([sección II.3.4](#)), podría indicar que podría verse un incremento en la sintomatología de enfermedad. Es por ello que, para confirmar un incremento de la enfermedad, se realizó un ensayo, que implicó infiltrar plantas silenciadas *Nb-35S::Pto* con las bacterias *Ps tab* vv y *Ps tab* AvrPto, generando un patosistema virulento y otro avirulento respectivamente. No obstante, de forma inesperada, las construcciones *NbATG1*, *NbATG1-1*, *NbATG1-2* no solo no produjeron un incremento en la necrosis causada por la enfermedad al infectar con *Ps tab* AvrPto (avirulento), sino que además llevaron a un retraso de la necrosis en la infección con *Ps tab* vv (virulento) ([sección II.3.5](#)). Por un lado, es notable mencionar que no se obtuvo el adelanto esperado de enfermedad asociado al retraso de HR – MCP, y por el otro, se dio un retraso de enfermedad que no depende de la interacción Pto – AvrPto. Esto indicaría que ATG1 estaría interviniendo en la HR – MCP, así como también participando en algún proceso que conlleva la necrosis causada por el patógeno. Lo que remite a los conceptos de pro-bacteria y anti-bacteria observados al silenciar o mutar genes de la autofagia frente a patógenos y en particular con *Pst* (Hofius et al., 2017; Üstün et al., 2017; Üstün et al., 2018).

Para indagar lo observado, se realizó un ensayo de cuantificación de bacterias en ambos patosistemas luego de silenciar ([sección II.3.6](#)). Resultados indicarían que no se ve afectado el crecimiento bacteriano con *Ps tab* AvrPto, a pesar de haberse visto retrasada la HR. Este resultado sería consistente con lo observado en el ensayo de enfermedad con la misma bacteria, ya que las plantas silenciadas se comportaron del mismo modo que el control negativo. Al emplearse *Ps tab* vv como agente infeccioso luego del silenciamiento de ATG1, se obtuvo un incremento del crecimiento bacteriano, lo que expresa el efecto opuesto al esperado, ya que en estas condiciones la necrosis se había retrasado. Esto sugiere un posible doble rol de ATG1: por un lado, como componente de la señalización de la HR; y por otro, como blanco de manipulación por parte del

patógeno para subvertir la respuesta autofágica a su favor, como fue reportado para genes ATG (Üstün et al., 2017; Üstün et al., 2018; Lal et al., 2020).

Si bien, la HR – MCP, es un proceso altamente regulado (Kalra y Bhatla, 2018; Bhattacharjee, 2019), es importante destacar que lo que se observa en este contexto es la manifestación de muerte celular, ya sea en su forma programada o asociada a necrosis ya que en la literatura se describen distintos tipos de comunicación cruzada (*crosstalk*) entre ambas formas de muerte celular (Hofius et al., 2017; Üstün et al., 2017; Üstün et al., 2018). Estas interacciones podrían conectar la HR – MCP, vinculada a respuestas inmunes, con la necrosis inducida por la acción patogénica, especialmente en contextos donde interviene la autofagia. Además, *P. syringae*, por su característica como agente hemibiotrófico, es capaz de estimular la MCP así como necrosis en distintas etapas de la infección (Xin y He, 2013a; Dalio et al., 2021).

Por lo tanto, por un lado, existe un *crosstalk* entre los mecanismos endógenos que conducen a la muerte celular en la planta, y por otro, un segundo *crosstalk* en el que el patógeno interviene activamente para manipular estos procesos a su favor, posiblemente a través de modular la autofagia, en particular modificando la actividad de ATG1. Cabe destacar que el ensayo de HR presentado en esta sección constituye un recorte del patosistema completo, dado que se analiza lo ocurrido debido a la sobreexpresión de Pto – AvrPto.

Considerando estos antecedentes, mediante un ensayo utilizando un sistema de doble híbrido Lal et. al. (2020) demostraron que *AthATG1a* interactúa con AvrPto y AvrPtoB. En este trabajo demostraron que AvrPtoB impide la actividad quinasa de *AthATG1a*, y por ende la autofosforilación. Y si bien no demuestran que se vea afectada la autofagia, la autofosforilación de ATG1 es requerida para la formación del pre-autofagosoma en la autofagia selectiva (Seay y Patel, 2006; Liu y Bassham, 2012; Gross et al., 2025). Asimismo, si bien demostraron también la unión con AvrPto, utilizado en este trabajo de tesis, no describen lo ocurrido con la actividad quinasa de *AthATG1a*. Al no tener funciones redundantes AvrPto y AvrPtoB (Gutierrez et al., 2010; Martin, 2011), y unirse en distintos dominios con *AthATG1a* (Lal et al., 2020), no se podría confirmar la implicancia de esto, así como tampoco saber de qué modo se afecta la autofagia.

II.5.4 Modelo de interacción H-P propuesto

A partir de lo expuesto, se propone el modelo ilustrado en la figura II.20. En este trabajo de tesis se observó un retraso en la HR – MCP luego del silenciamiento y contrario a lo esperado, no se observó afectada la enfermedad dependiente de la misma interacción Pto – AvrPto. Asimismo, se observó un retraso en la sintomatología de enfermedad en un sistema compatible, es decir independiente a la interacción mencionada.

P. syringae es un patógeno hemibiotrófico (Xin y He, 2013b) (secciones [I.1.1](#), [II.1.4](#) y [II.1.5](#)), por lo que la forma en la que este actúa tiene dos fases. En la fase pro-bacteria, con una etapa inicial biotrófica, que permite multiplicar por gran cantidad de tiempo la bacteria sin afectar en exceso a la planta (Xin y He, 2013b; Ghozlan et al., 2020; McCombe et al., 2022), y una segunda etapa, la denominada necrotrófica que es únicamente visibilizada en una infección compatible ya que en este caso los efectores logran sortear la inmunidad vegetal causando enfermedad.

Para poder explicar los resultados, se hipotetiza que ATG1 podría estar involucrado en dos grandes procesos metabólicos. Diversos estudios mencionan los complejos efectos causados por la autofagia, en particular se menciona la capacidad de estar actuando en vías pro-bacteria y al mismo tiempo anti-bacteria, incluso estar ocurriendo estos dos procesos en simultáneo, probablemente compitiendo (Hofius et al., 2017; Üstün et al., 2017; Üstün et al., 2018).

Un trabajo previo, analizó la proteína *AthATG1a* y su interacción mediante ensayos doble híbrido con los efectores AvrPto y AvrPtoB (Lal et al., 2020). Estos autores identificaron que *AthATG1a* interactúa con AvrPto y AvrPtoB. Mientras AvrPtoB tuvo una interacción fuerte con el dominio MIT y una débil con el KD, AvrPto presentó una interacción fuerte con el KD de *AthATG1a*. A su vez, vale mencionar que AvrPto y AvrPtoB no son completamente redundantes (Martin, 2011; Ntoukakis et al., 2014), si bien comparten el dominio PID, a partir del cual unen a Pto en el oligómero conformado por esta proteína en conjunto con Prf, AvrPtoB presenta otros dominios que AvrPto no presenta ([sección II.1.5.5](#)). En este marco, Lal et. al (2020) identificaron que AvrPtoB, al unirse con *AthATG1a* suprime la autofosforilación, la cual es requerida para poder iniciar el proceso de formación de pre-autofagosomas y luego de la autofagia (Seay y Patel, 2006; Liu y Bassham, 2012; Gross et al., 2025). A partir de estos estudios, se hipotetiza que AvrPto, al unirse al KD de *AthATG1a*, podría estar interactuar de forma comparable con todas las ATG1, interrumpiendo la actividad quinasa y reprimiendo la autofagia.

Tal como se observa en la figura II.20, y en base a esta hipótesis, el **modelo H – P** planteado está dividido en dos fases: **(I) Anti – bacteria** y **(II) Pro – bacteria**, haciendo uso de lo expuesto previamente en el que describen ambos procesos transcurriendo en paralelo (Üstün et al., 2018).

(I) Anti – bacteria

El proceso anti – bacteria es la HR – MCP, que restringe al patógeno para impedir su propagación al tejido que aún continúa sin infección (Agrios, 2005; Bhattacharjee, 2019). Este proceso se vio retrasado al silenciarse las plantas con las distintas construcciones ATG1 ([sección II.3.4](#)), y del mismo modo, un estudio indicaría resultados similares con otros pares de efectores y proteínas de resistencia ([sección II.3.7](#)). Previamente se ha demostrado que mutantes *atg* en *A. thaliana* han suprimido la HR – MCP frente a infecciones con *Pst* (Patel y Dinesh-Kumar, 2008; Hofius et al., 2009), aunque otras mutantes *atg* han causado el efecto opuesto (Yoshimoto et al., 2009).

Como ya se hizo mención, hay múltiples trabajos que indican que el *crosstalk* regula el complejo entramado que conlleva a regular la MCP (Hofius et al., 2017; Üstün et al., 2017; Kalra y Bhatla, 2018; Üstün et al., 2018; Bhattacharjee, 2019). En ese sentido, la MCP tiene un rol central, con el proceso senescente (Kalra y Bhatla, 2018; Bhattacharjee, 2019). En este trabajo se observó de forma que la senescencia se ve alterada en las hojas de plantas silenciadas, siendo adelantada la senescencia en hojas maduras. Este efecto presentó resultados más complejos en hojas juveniles, habiéndose obtenido un adelanto con alguna de las construcciones, en tanto que un retraso con otras. Es relevante destacar que la regulación de la senescencia en hojas juveniles, que aportan mayor energía a los tejidos reproductivos, debe ser más finamente regulada. Además, Yoshimoto et. al (2009) reportaron que el proceso de la autofagia, que interfiere con la enfermedad causada por *Pst*, también participa en la senescencia y esta asociación con la edad de la planta y del estado de desarrollo.

Como se ilustra en la figura II.20, se propone que ATG1 podría intervenir en múltiples procesos asociados a la HR – MCP, teniendo en cuenta el *crosstalk* existente entre ellos. En particular, ATG1 sería parcialmente requerido para conferir inmunidad específica dependiendo de interacciones particulares de efectores y proteínas R, así como también para regular la senescencia desarrollo-específica, es decir modular la regulación de la senescencia dependiendo del grado de madurez del tejido.

Para explicar la ausencia del incremento esperado en los síntomas asociados al desarrollo de la enfermedad (necrosis) ([sección II.3.5](#)), así como la falta de aumento en el crecimiento bacteriano vinculado a la interacción Pto–AvrPto ([sección II.3.6](#)), podría considerarse que, como se detalla a

continuación, la muerte celular asociada a la autofagia podría enmascarar la sintomatología de necrosis.

(II) Pro – bacteria

El proceso a favor de la bacteria podría a su vez ser dividido entre la etapa biotrófica y la necrotrófica, siendo la primera mayormente visible en un sistema incompatible, ya que la inmunidad restringe al patógeno; así como la necrotrófica en un sistema compatible. Esto fue analizado realizando un ensayo de desarrollo de enfermedad en el que se cuantificó la misma. Para ello se dividió el ensayo en plantas sobreexpresando la proteína Pto donde la mitad de la hoja se infectó con un patógeno avirulento (al expresar el efector AvrPto), y la otra mitad de la hoja fue infectada con el patógeno virulento natural de *N. benthamiana* (vv).

De forma inesperada, no se obtuvo el incremento de enfermedad asociado al retraso de HR (secciones [II.3.4](#) y [II.3.5](#)). Asimismo, al infectar con *Ps tab* vv se esperaba un resultado similar al de Ec1 y Prf al ser virulento, no obstante, se obtuvo un retraso de la sintomatología de la enfermedad.

A la luz de estos resultados, se presupone que ATG1 se encuentre participando en alguna vía que conlleve a generar la muerte celular por enfermedad (necrótica). En este sentido, es notorio recordar que la muerte celular tanto en su forma programada como en su forma necrótica se encuentra intervenido por el proceso de autofagia, en lo que ya se denominó el *crosstalk* (Hofius et al., 2017; Üstün et al., 2017; Üstün et al., 2018). Lal et. al (2020) reportaron que AvrPtoB mediante su PID se une al KD de *AthATG1a* interfiriendo en la autofosforilación de la misma. El PID también está presente en AvrPto, y debido a que en este dominio unen a Pto (Ntoukakis et al., 2014), se podría suponer que AvrPto también se una al KD de *AthATG1a*. En ese sentido Martin (2011) indica que ambas proteínas AvrPto y AvrPtoB tienen la capacidad de inactivar el KD de muchas proteínas. A su vez este domino se encuentra altamente conservado en esta familia de proteínas, incluso presente en ATG1t (Wang y Hou, 2022; Gross et al., 2025).

Por ello se puede inferir que en presencia de AvrPto se interrumpe la autofosforilación de ATG1, lo que a su vez bloquea la formación de los pre-autofagosomas y, en consecuencia, la autofagia. Esto llevaría a la interrupción de la necrosis, lo que explicaría la ausencia del incremento esperado de la enfermedad en el sistema avirulento en el que se utilizó AvrPto. Esto también se puede confirmar, en ausencia de este efector, ya que el silenciamiento conllevó al retraso de la necrosis. Por esto, se podría suponer que la autofagia gatillada por ATG1 es necesaria para desarrollar la necrosis en la etapa necrotrófica.

Como se mencionó previamente, tanto la muerte celular necrótica como programada han evidenciado una interconexión en la que la autofagia cumple un rol central (Seay y Patel, 2006; Liu y Bassham, 2012; Kalra y Bhatla, 2018; Ali et al., 2024). Si bien el proceso autofágico aún no es del todo comprendido, se ha demostrado que cumple funciones con múltiples aristas, generando efectos aparentemente contradictorios, descritos como **Anti – bacteria/Pro – bacteria** (Hofius et al., 2017; Üstün et al., 2017; Üstün et al., 2018; Gross et al., 2025), incluyendo impactos pleiotrópicos sobre el proceso de senescencia (Yoshimoto et al., 2009).

II.5.4.1 Conclusiones Generales del Modelo H-P

Por todo esto y en consistencia con lo reportado los procesos Anti – bacteria y Pro – bacteria podrían estar ocurriendo en simultáneo (Üstün et al., 2018).

En la fase Anti – bacteria, se presupone que, en las plantas silenciadas y ante la sobreexpresión de Pto – AvrPto y otros pares de proteínas R – efector, se pudo observar el efecto río abajo (*downstream*) dependiente de la interacción directa Pto – AvrPto, dado que éstos se encuentran sobreexpresados y en alta concentración. Esto conllevó al retraso de la HR – MCP, lo que permite inferir que, al minimizarse el efecto dependiente de la interacción AvrPto – ATG1 por la elevada concentración Pto, ATG1 podría estar actuando río abajo de alguna vía altamente conservada de la HR.

Por el contrario, en la fase Pro – bacteria, al transcurrir una infección en una concentración de patógeno similar a la encontrada en condiciones naturales, las concentraciones proteicas se encuentran balanceadas. Es por esto, que se espera que esta situación sea comparable a lo observado a campo durante una infección. Teniendo en cuenta que *P. syringae* es un patógeno hemibiotrófico, esta fase se divide en la etapa biotrófica y la etapa necrotrófica.

Se considera en este modelo como la etapa biotrófica, la que ocurre en un patosistema incompatible, es decir, con un patógeno avirulento. Durante la misma, AvrPto/AvrPtoB interactúan con el KD de proteínas de la célula vegetal, interrumpiendo la actividad quinasa, entre los que se encuentran proteínas de la inmunidad (Martin, 2011), y ATG1 (Lal et al., 2020). Al interrumpirse la actividad quinasa, se ve impedida ATG1 de autofosforilarse y se reprime la autofagia. Dado que se vio retrasada la necrosis al silenciarse ATG1, la interrupción de la autofagia sea un mecanismo que impide el avance de la enfermedad. Al no estar presente AvrPto, en la infección compatible en lo que se denomina como la etapa necrotrófica, ATG1 se puede autofosforilar conllevando al desarrollo de la autofagia y causando la necrosis asociada a la enfermedad. A su vez, durante la interacción Pto – AvrPto, se fomenta la HR – MCP, y una interrupción de la necrosis, por lo que el proceso de la muerte celular en continuo *crosstalk*, es un proceso dinámico.

De otra manera, podría considerarse que la autofagia está siendo utilizada por el patógeno en su beneficio y, cuando algunos de los efectores son reconocido por la maquinaria celular, se interfiere con la infección.

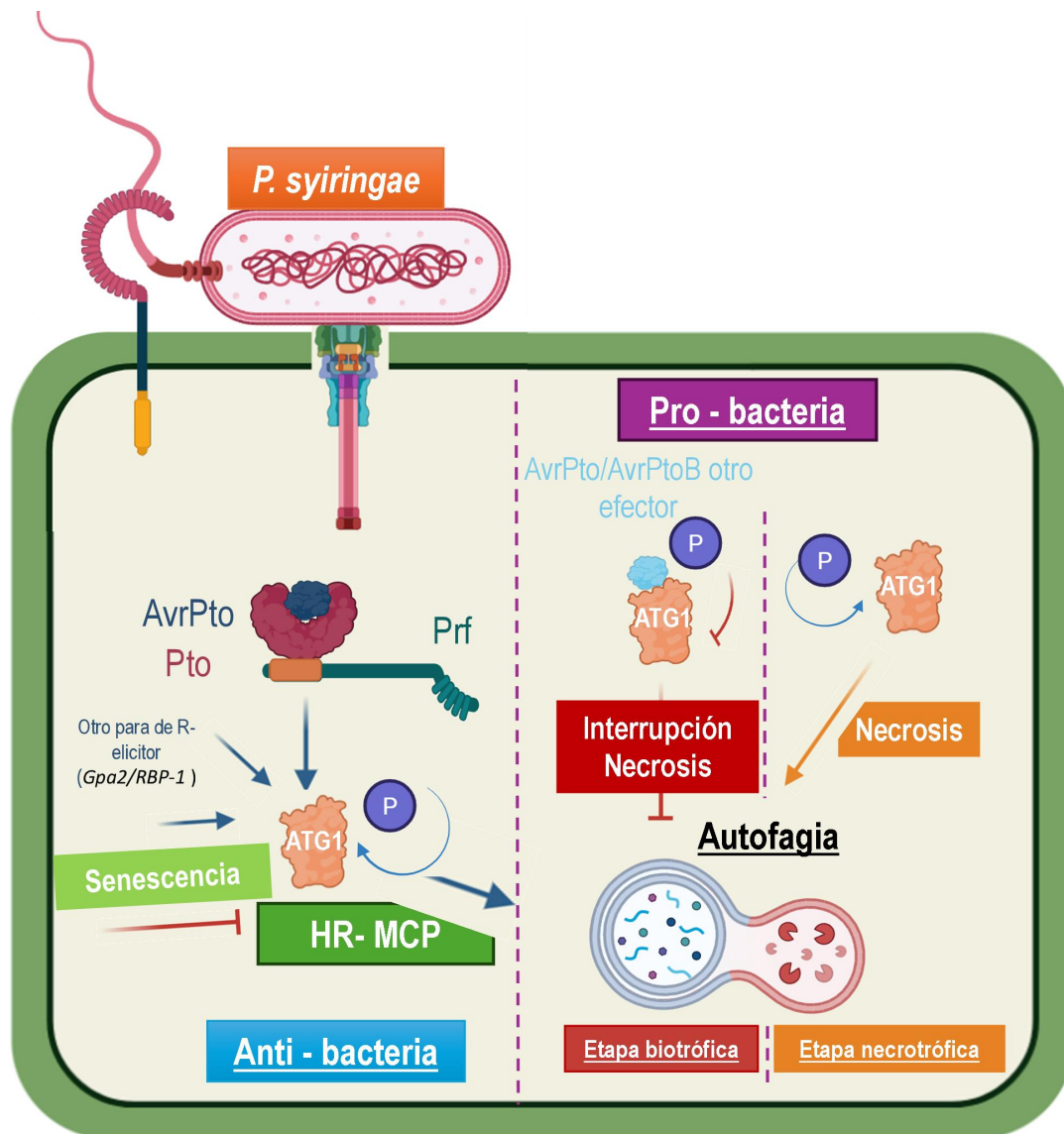


Figura II.20. Modelo ilustrativo que representa la interacción de *P. syringae* en relación con ATG1 durante la HR y la enfermedad, en función de lo evaluado en este trabajo de tesis. Se describen dos fases: **(I) Anti – bacteria** y **(II) Pro – bacteria**. La primera corresponde a la acción regulada de ATG1 para restringir la propagación del patógeno en la planta, mientras que la segunda, la bacteria, mediante la liberación de efectores, interfiere con la actividad autofágica en su propio beneficio. Lo representado para la llamada etapa biótropa, en la que la virulencia del patógeno se encuentra en su mínima expresión, se basa en lo previamente descrito (Lal et al., 2020), y fue extrapolado a la interacción con AvrPto. La relación propuesta entre ATG1 y su fosforilación se fundamenta en este trabajo y en estudios que establecen que la autofagia depende de la autofosforilación de ATG1. La relación con la fosforilación se basa en este trabajo u otros que describen que para que ocurra la autofagia se requiere de la autofosforilación de ATG1 (Seay y Patel, 2006; Liu y Bassham, 2012; Gross et al., 2025). No obstante, lo presentado en cuanto a la fosforilación tiene un carácter hipotético, utilizado para ilustrar de manera conceptual la inducción o la represión de la autofagia, según otros trabajos que identifican roles que ocurren pro – bacteria y anti – bacteria que transcurren al mismo tiempo (Üstün et al., 2017; Üstün et al., 2018).

II.5.5 Perspectivas a futuro

A futuro, sería interesante poder reconfirmar los resultados del efecto de senescencia en el crecimiento del tamaño de la planta a partir del desarrollo de mutantes defectivas de ATG1, así como la evaluación de la senescencia foliar.

Si bien, es altamente probable que ATG1 esté activando la autofagia y los efectos observados se deban a ello, es necesario poder demostrarlo. Para ello, sería de interés poder visibilizar la formación de autofagosomas. Diversos trabajos utilizan distintos marcadores de la familia ATG8 fusionados a GFP, así como el marcador amina autofluorescente monodansilcadaverina (MDC) para la determinación de estructuras de membranas mediante microscopía (Contento et al., 2005; Bassham, 2015; Zhang et al., 2020; Qi et al., 2023). Sería necesario, evaluar distintos miembros de ATG8 e infectar plantas para observar la presencia de autofagosomas, ya que *A. thaliana* presenta nueve miembros, siete *S. lycopersicum* y quince *N. benthamiana*, y los mismos podría intervenir en distintos procesos que no necesariamente involucren la inmunidad. Incluso hay trabajos realizados mediante la utilización de VIGS con el sistema TRV en tomate y tinción mediante MDC para realizar esto (Wang et al., 2015).

Sería también deseable realizar los ensayos en plantas silenciadas de forma estable de ATG1 mediante la tecnología CRISPR-CAS para poder volver al patosistema *S. lycopersicum* – *Pst* (Santillán Martínez et al., 2020; Tiwari et al., 2023), no obstante, debido a su efecto esencial, es probable que estas plantas presenten viabilidad afectada. Una vez puesto a punto todo este complejo sistema, sería relevante repetir los ensayos de enfermedad y HR – MCP, y determinar lo que ocurre con la autofagia para poder comprender las bases moleculares de lo observado. Debería, a su vez, agregarse como efector de interés AvrPtoB, ya que esta proteína es la que más se ha analizado en la bibliografía. Por ello, debería realizarse el ensayo de HR – MCP con la sobreexpresión de este efector, así como un ensayo de enfermedad y de crecimiento bacteriano con *Ps tab* AvrPtoB en particular en el proceso de autofagia (Wang et al., 2019; Lal et al., 2020).

Luego, de modo similar a como lo hicieron Lal et. al. (2020), mediante un ensayo de doble híbrido, evaluar la interacción de las cuatro variantes de ATG1 no truncas de *N. benthamiana* y las dos de *S. lycopersicum* con AvrPto y AvrPtoB y analizar los dominios de cada proteína con los que interactúa. Constatar y cuantificar la actividad quinasa y su autofosforilación *in vitro*.

Finalmente, sería enriquecedor diseñar un ensayo más complejo de HR – MCP, empleando un patógeno no virulento que exprese AvrPto o AvrPtoB, para observar la HR en un contexto de incompatibilidad genuina, proporcionando así una visión más realista de lo que ocurre en un sistema incompatible.

III - INMUNIDAD DE AMPLIO ESPECTRO

Citrus sp. - Xanthomonas citri pv. citri

“Descubrí que cuanto más trabajaba con ellos (los transposones), más y más grandes se volvían, y cuando realmente estaba trabajando con ellos, no estaba afuera, estaba allí abajo. Yo era parte del sistema. Estaba justo allí abajo con ellos, y todo se agrandaba. Incluso pude ver las partes internas de los cromosomas; en realidad, todo estaba allí. Me sorprendió porque realmente sentí como si estuviera justo allí abajo, y ellos fueran mis amigos.”

— *Barbara McClintock*

III Inmunidad de amplio espectro *Citrus* sp. – *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

III.1 Introducción

III.1.1 Cítricos y su relevancia económica

La citricultura está presente en diversas regiones del mundo con distintos niveles de producción. Sin embargo, hay regiones especializadas en producir cítricos tanto para abastecer su mercado interno como para la exportación (Gentile et al., 2020). Esta producción incluye una amplia actividad económica que incluye la producción, recolección, clasificación de frutos según su calidad, ya sea para consumo fresco, seco o para jugo, así como una cadena de certificación de toda la cadena que incluye también la evaluación de enfermedades de relevancia económica como la canchrosis de los cítricos o HLB (SENASA; SINAVIMO; SINAVIMO; SINAVIMO; Gentile et al., 2020; Gómez Lende, 2023). Una gran proporción de la fruta producida en Argentina se destina a la elaboración de jugo, lo que incorpora una etapa industrial adicional al proceso productivo. Esta incluye el empaquetado y una fase específicamente orientada al agregado de valor, que abarca la extracción de aceites esenciales, la separación del jugo del resto del fruto, su concentración y conservación. Se trata, por lo tanto, de una producción que implica una intensa actividad industrial y un importante desarrollo del empleo asociado (Gómez Lende, 2023). La producción de limón proporciona alto valor agregado y se desarrolla principalmente en el NOA, en la provincia de Tucumán. Su producción se encuentra muy industrializada, ya que se separan distintos subproductos que implican distinto grado de purificación, clarificación, entre otros procesos del jugo (Gómez Lende, 2023). A su vez, es relevante notar que, debido a la ubicación geográfica de nuestro país y a las condiciones climáticas favorables del NEA y NOA, es que Argentina tiene la capacidad de producir y exportar en contraestación, lo que nos ubica en un nicho comercial muy oportuno. A su vez teniendo en cuenta que países competidores como EEUU han perdido en varias temporadas más del 50% de su producción debido al HLB, en un período en el que nuestro país no contaba con la presencia de dicha enfermedad y vector (USDA, 2015; Blaustein et al., 2018; Gómez Lende, 2023). Asimismo, Argentina se encuentra en el sexto lugar como exportador mundial (figura III.1; FAOSTAT, 2023) y el 20% de la producción mundial se debe a nuestro país (Gómez Lende, 2023), que lo ubica en el quinto lugar como productor mundial de Limón (FAOSTAT, 2023). No obstante, es el octavo exportador si se cuantifica el valor exportado, lo que indicaría que la calidad de los frutos exportados tiene menor valor comercial que algunos de sus competidores, probablemente por tener menor calidad (figura III.1; FAOSTAT, 2023). Por lo tanto, las herramientas biotecnológicas podrían ser una oportunidad para mejorar la calidad de los frutos destinados a la exportación y aumentar el valor de los *commodities*.

Por todo esto, la producción citrícola es de mucha relevancia en nuestro país, ya que aporta a diversas aristas, entre las que se encuentran la producción agrícola, industrialización, y exportación, por lo que induce al desarrollo y disminución de la primarización de la economía, así como el desarrollo regional y nacional (Gómez Lende, 2023).

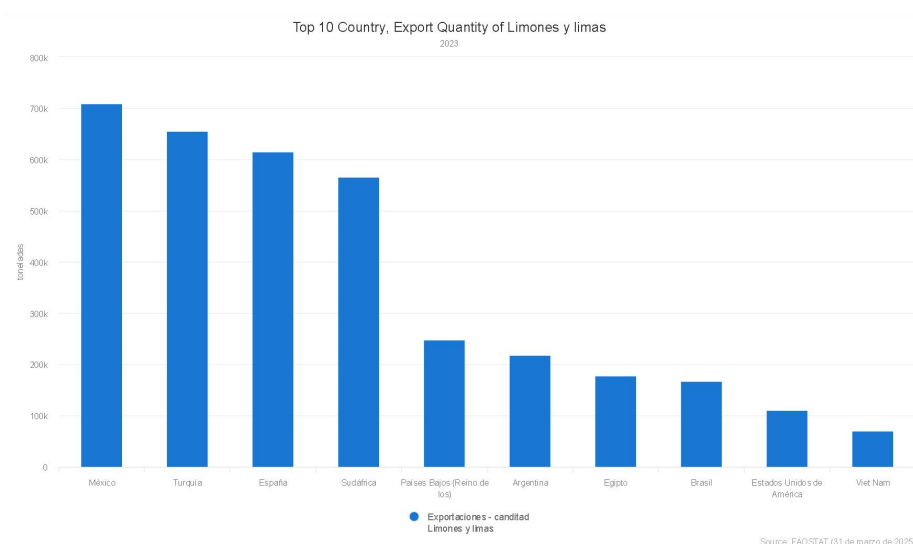
Es relevante destacar que la producción de este cultivo requiere una inversión inicial muy costosa, ya que, para obtener un campo con plantaciones productivas, compuestas por un pie o portainjerto y una copa o injerto, se debe esperar más de cuatro años (Palacios, 2005).

La producción frutícola basada en injertos es una práctica usual, ya que permite combinar una injerto que aporta las características deseadas por los consumidores con un portainjerto que, en general, confiere resistencia a distintos tipos de estrés biótico y abiótico, incluyendo plagas y patógenos (Palacios, 2005; Ramadugu et al., 2016; Alves et al., 2021).

Diversos fitopatógenos principalmente de origen fúngico, viral y bacteriano afectan la producción citrícola en el mundo y en particular en Argentina (Palacios, 2005; da Graça et al., 2016; Caserta et al., 2019). El grado de afectación depende de la presencia de material genético resistente o agroquímicos que permitan el control de los mismos (Blaustein et al., 2018).

Entre las enfermedades que se desarrollan en los cítricos, se encuentran las causadas por agentes bacterianos, que afectan en distinto grado la producción citrícola. Entre ellas se pueden mencionar las enfermedades controladas por aplicación de agroquímicos en base a agentes cúpricos y que son más de tipo “estéticas” como es el caso de la Cancrosis de los Cítricos, causada por el agente *Xcc* pero que son de relevancia económica por ser parte de los patógenos incluidos entre los requisitos para el ingreso a la unión europea mediante barreras para-arancelarias, así como bacterias no cultivables como *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* que causa la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y la ya mencionado *Ca. Liberibacter* que causa el HLB. Tanto CVC como HLB son enfermedades sistémicas que afectan severamente el sistema vascular de la planta y generan serios problemas a campo (Caserta et al., 2019). En Argentina la enfermedad CVC no es de relevancia. En cambio, el HLB, si bien aún se encuentra controlada tanto la enfermedad como el vector que la transmite, es de gran preocupación para nuestro país ya que hasta el momento no se desarrolló ningún método de control contra esta enfermedad, más que su prevención, motivo por el cual, como se mencionó previamente se desarrolló el Programa Nacional de Prevención del HLB (PNPHLBH, <https://www.argentina.gob.ar/senasa/micrositios/hlb>).

A



B

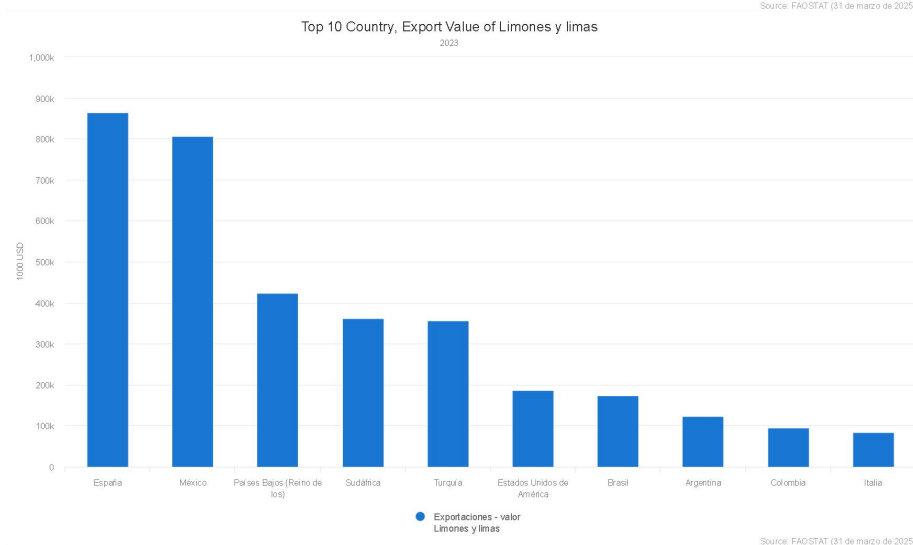


Figura III.1. Gráficos de los diez principales exportadores de limón a nivel mundial entre los que se encuentra Argentina en el año 2023 según FAOSTAT. Se indica en función de la cantidad de limón exportado en toneladas **(A)**, y en función del valor exportado **(B)**. Se puede observar que, si bien Argentina es el sexto exportador de cítricos a nivel mundial, es el octavo en su valor. Esto indicaría que el limón de exportación argentino tendría menor calidad que los de algunos países competidores como el de Brasil y EEUU.

III.1.2 HLB

Actualmente la enfermedad más seria de la producción cítrica con efectos devastadores es el HLB (Gentile et al., 2020). La enfermedad fue detectada inicialmente en China como tal en 1919. Sin embargo, gracias a los estudios del Dr. Lin, quien dedicó su carrera al estudio de esta afección procedente de Asia, se descubrió que ya había sido reportada en Taiwán desde 1870, aunque con distintos nombres en cada región (Bové, 2006). La misma denominada cordialmente “Huang Long Bing” (HLB) que se traduce en “Enfermedad del Brote Amarillo” (Zheng et al., 2018), fue descubierto en el mismo continente de donde proceden los cítricos (Bové, 2006; Wu et al., 2018; Droc et al., 2024), lo que le dio la posibilidad de una ventana temporal amplia para la co-evolución del HLB y, en consecuencia, para el desarrollo de la infección y generar enfermedad (Rodríguez-Quibrera et al., 2021; Machado et al., 2025). Se ha propuesto incluso que el origen evolutivo de este patógeno procedió de una relación de endosimbiosis que terminó generando una relación parasítica

obligada (da Graça et al., 2016; Rodríguez-Quibrera et al., 2021), incluso *Candidatus Liberibacter solanacearum* (C. *Liberibacter solanacearum*, CLso) que afecta solanáceas pareciera desarrollar una relación parasítica más que patogénica con la planta, lo que respaldaría esta hipótesis (Huang et al., 2021b). El Dr. Lin pudo demostrar la capacidad de transmitir la enfermedad por injertos, práctica muy utilizada para las plantaciones de cítricos, como se mencionó en la [sección III.1.1](#) (Bové, 2006). Esta enfermedad tuvo mucha relevancia en dicho continente, donde se observó presencia en Filipinas, India, Taiwan, además de China (Bové, 2006).

III.1.2.1 Agente bacteriano causante de HLB y su impacto

El HLB es una enfermedad que incluye, hasta el momento, cuatro tipos *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CaLas), *Candidatus Liberibacter americanus* (CaLam), *Candidatus Liberibacter africanus* (CaLaf) y *Candidatus Liberibacter caribbeanus* (Bové, 2006; Keremane et al., 2015; da Graça et al., 2016; Caserta et al., 2019; Munir et al., 2020). La misma se caracteriza por ser una enfermedad denominada *fastidiosa*, término que hace referencia a la dificultad de cultivar la bacteria responsable en medios de cultivo. Se trata de una bacteria α -proteobacteria y Gram negativa que es transmitida por dos vectores *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae* (Bové, 2006; da Graça et al., 2016; Munir et al., 2017).

Esta enfermedad causa una infección que afecta el sistema vascular, específicamente este agente bacteriano se multiplica en el floema, y lo hace de una forma heterogénea en la planta, generando parches en la planta que parecieran estar completamente sanos, en tanto que otras partes completamente interferidas por el crecimiento bacteriano, presencian ramificaciones muertas o con sus hojas con clorosis (Munir et al., 2017). El desarrollo del agente bacteriano en el floema, afecta severamente el suministro de nutrientes, alterando el metaboloma de la planta, causando acumulación de almidón (Dala-Paula et al., 2019).

Como puede observarse en la figura III.2, a raíz de la afección ocasionada en el floema, lleva al retraso en el crecimiento, pudrición de raíces, copa más delgada, brotes amarillos, hojas con parches cloróticos heterogéneo entre ambos lados de la nervadura central, pequeñas, floración precoz, exceso de caída de frutos, carencia de la coloración característica de los frutos lo que lleva a que también se lo denomine “*Greening*” por verdeamiento o clorosis del inglés, todo esto culmina en el deterioro general de la planta, que culmina en la muerte (Gottwald et al., 2007; da Graça et al., 2016; Dala-Paula et al., 2019; Hu et al., 2021). Previo a generar todos los síntomas que llevan al deceso de la planta, uno de los problemas principales es que los frutos comienzan a tener un sabor amargo que lleva a que no se puedan comercializar (Dala-Paula et al., 2019). La enfermedad también afecta a plantas cercanas a los cítricos como las del género *Murraya* sp. (Gottwald et al., 2007; Hu et al., 2021).

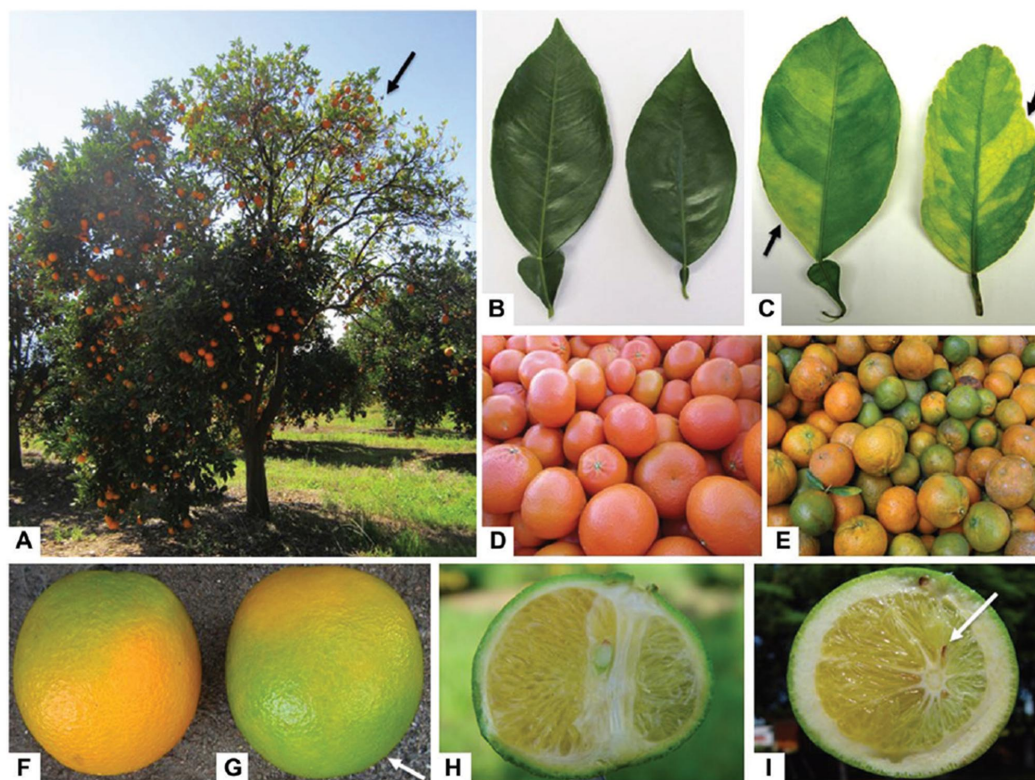


Figura III.2. Imágenes de la sintomatología observada causada por HLB tomada de da Graça et. al. 2016 y Munir et. al. 2017. Se observan ramificaciones cloróticas sectorizadas (A), hojas con clorosis características que incluyen patrones no simétricos a ambos lados de la nervadura (C). Frutos decolorados y con inversión de colores (G), frutos con malformaciones internas con alteración en el sabor del fruto (H) y semillas no viables (I).

III.1.2.2 Estatus fitosanitario en Argentina

Como se mencionó, la enfermedad depende de los vectores para la transmisión. En el mapa de la figura III.3 se observa la situación fitosanitaria de Argentina. Se han detectado plantas positivas para HLB desde el año 2012 en el NEA, así como *D. citri*, que recientemente se encuentra en las regiones citrícolas en las provincias de Salta, Jujuy, Formosa, Chaco, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, donde principalmente se produce naranaja

(<https://www.argentina.gob.ar/senasa/micrositios/hlb>,

[https://www.argentina.gob.ar/senasa/micrositios/hlb/sintomatologia-en-hojascaracteristicas-del-insecto-vector-del-hlb#:~:text=ninfas\)%20de%20D.-,citri.,Trampas%20para%20su%20detecci%C3%B3n%20precoz.](https://www.argentina.gob.ar/senasa/micrositios/hlb/sintomatologia-en-hojascaracteristicas-del-insecto-vector-del-hlb#:~:text=ninfas)%20de%20D.-,citri.,Trampas%20para%20su%20detecci%C3%B3n%20precoz.)).

Si bien, con los sistemas de trampeos la situación de HLB se encuentra aún controlada, la producción citrícola se encuentra bajo constante control bajo PNPHLB (<https://www.argentina.gob.ar/senasa/micrositios/hlb>).

Por lo que es inminente desarrollar tecnologías que permitan controlar dicha enfermedad, ya sea a partir del control del vector, o del desarrollo de nuevo material genético portante en los cultivos que tengan tolerancia o no afecten la producción agrícola, por ej. a partir de la tolerancia o la no alteración del sabor de los frutos. Hasta el año 2020 el estatus fitosanitario de nuestro país era libre de HLB, pero a partir de dicho año, si bien previamente se encontraron casos aislados de la misma, se encontraron campos productivos con dicha enfermedad, por lo que debió cambiar su estatus fitosanitario y aumentar la rigurosidad del PNPHLB (Gómez Lende, 2023).

Áreas definidas para el PNPHLB

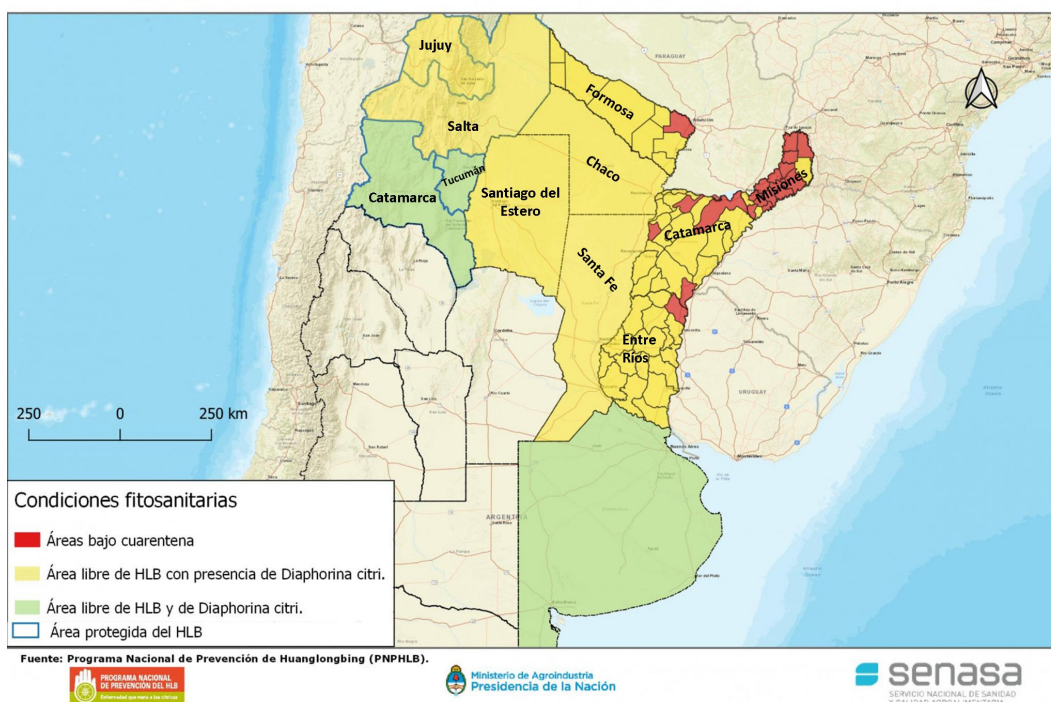


Figura III.3. Mapa Argentino del PNPHLB, indicando las zonas fitosanitarias en relación con el HLB y la presencia del vector *D. citri*. Siendo las áreas consideradas según las categorías: Área libre de HLB y de *D. citri*: Ausencia de *Candidatus Liberibacter spp* y *Diaphorina citri* en plantas cítricas y/u hospedantes alternativos; Área libre de HLB con presencia de *Diaphorina citri*: Ausencia de *Candidatus Liberibacter spp.* y con presencia de *D. citri*; Área bajo cuarentena: PCR-RT + a *Candidatus Liberibacter spp.* en *D. citri* o plantas cítricas y/u hospedantes alternativos, y en las que es necesario aplicar medidas fitosanitarias de control tendientes a evitar la dispersión de la enfermedad; Área protegida de HLB

III.1.2.2.1 Estrategias de control de HLB

Ante la inminente necesidad de desarrollar estrategias efectivas contra esta enfermedad, cuyo impacto en la producción citrícola es devastador, en los últimos años se han explorado diversos enfoques de control. Algunas de las estrategias se enfocaron en el control del vector implementado diversas medidas para limitar su dispersión, entre ellas el trapeo, la colocación de árboles atractores del vector que desincentiven su alimentación en cultivos citrícolas y no desarrollen enfermedad, así como la aplicación de agroquímicos (Munir et al., 2017; Li et al., 2021). Del mismo modo, se desarrollaron estrategias para disminuir la multiplicación bacteriana, ya sea mediante aplicación de bioinsumos, antibióticos u otro tipo de agroquímicos (Munir et al., 2017; Li et al., 2021).

Más recientemente, gracias al avance de la genómica, se pueden realizar análisis de redes de interacción génica en el contexto planta-patogeno (Machado et al., 2025). Por último, se han estudiado estrategias centradas en la planta, como el análisis de la inmunidad en distintas variedades de cítricos y la evaluación de la susceptibilidad de especies emparentadas con *Citrus spp.* y modificaciones genéticas para mejorar la resistencia de las variedades (Ramadugu et al., 2016; Munir et al., 2017; Alves et al., 2021; Hu et al., 2021; Li et al., 2021).

III.1.3 Cancrosis de los Cítricos

La Cancrosis de los Cítricos causada por *Xcc*, previamente denominada *Xanthomonas axonopodis* subsp. *citri* (Schaad et al., 2006), es una enfermedad que genera canchros en la parte aérea de la planta, tanto en hojas como en frutos (Martins et al., 2020). Argentina presenta controlada esta infección a partir de las buenas prácticas agrícolas establecidas en el “Programa de Control Para Mitigar el Riesgo a la Cancrosis de Los Cítricos”. Dicho programa contempla, entre otras medidas, la aplicación de agroquímicos a base de cobre combinado con mancozeb, y la trazabilidad de la producción (Gottwald et al., 2002; Canteros et al., 2017). Sin embargo, debido a las barreras para-arancelarias es que la mera aparición de un fruto con sintomatología genera el impedimento de la producción de todo el empaque (Canteros et al., 2017).

III.1.3.1 Agente causante de la canchrosis de los cítricos.

La enfermedad es causada por bacterias del género *Xanthomonas*, siendo la predominante *Xcc* y el que se encuentra presente en Argentina (Canteros et al., 2017). Es una bacteria que puede perdurar hasta dos meses en el microbioma de la fitosfera, teniendo un periodo en el que se encuentra epifítica e ingresando al tejido por heridas y estomas, a partir de lo cual comienza su multiplicación bacteriana en el apoplasto y culmina en la formación localizada de una sintomatología “canchrosa” a la que se denomina canchro que es provocada por la muerte celular del tejido (Martins et al., 2020). Tal como se expone en la figura III.4, este agente desarrolla ETS ([sección I.2.I](#)) a partir de la liberación de efectores, entre los cuales se destaca el PthA4 que permite sobrepasar la respuesta PTI de la planta y terminar en la sintomatología mencionada (Martins et al., 2020). La liberación de estas bacterias al exterior permite reiniciar este ciclo de enfermedad en sucesivas reinfecciones, lo que conlleva al desarrollo de múltiples canchros (Martins et al., 2020).

Esta enfermedad se caracteriza por requerir una etapa de desarrollo de biofilms en el proceso infectivo, lo que le da la virulencia y su capacidad de supervivencia en la filósfera de la hoja (Martins et al., 2020; Ali et al., 2023).

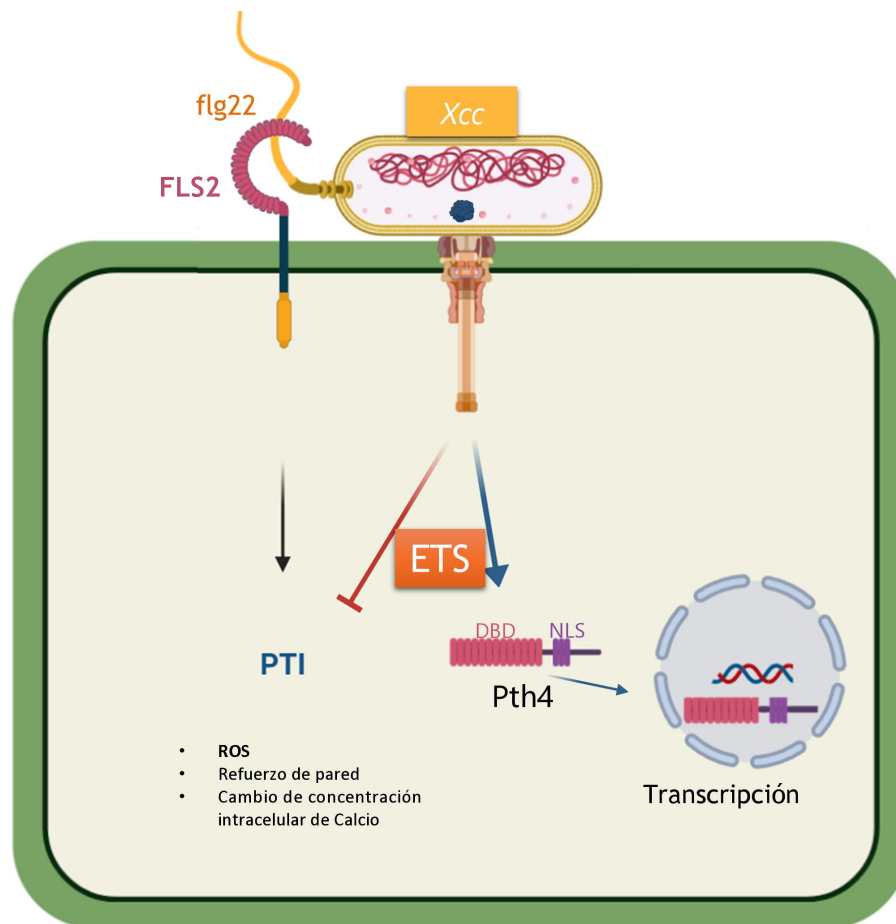


Figura III.4. Modelo ilustrativo representativo de la interacción compatible *Citrus sp.* – *Xcc*. El agente bacteriano presenta el epítipo *flg22*, reconocido por el PRR *FLS2*. Este reconocimiento activa la señalización *PTI*, tal como se describió para el patosistema *S. lycopersicum* – *Pst* DC3000. Sin embargo, a diferencia de este último, los efectores liberados por *Xcc* permiten el establecimiento de la enfermedad, es decir *ETS*. Como consecuencia, se manifiesta la sintomatología característica del cancro bacteriano. Entre los efectores, se encuentra *Pth4*, característico por ingresar al núcleo por presentar señales de localización nuclear (NLS, del inglés *Nuclear Localization Signals*), y alterar la transcripción génica mediante dominio de unión al ADN (DBD, del inglés *DNA Binding Domain*).

III.1.3.2 Estatus fitosanitario en Argentina

En el mundo, se han descrito tres tipos de cepas de esta especie (Canteros et al., 2017; Ali et al., 2023). En Argentina, la presencia del agente bacteriano *Xcc* data de 1920, con la aparición del tipo B (Canteros et al., 2017). No obstante, la introducción del tipo A fue reportada en la década de 1970 y que, por su mayor agresividad, desde ese entonces nuestro país reporta dicho tipo como endémico predominante (Canteros et al., 2017). La tolerancia hacia esta enfermedad depende tanto del cultivar cítrico, así como del tipo de *Xcc* (Ali et al., 2023). El tipo A es la única variante que desarrolla lesiones de tipo cancro bien determinados en la lima mexicana (Ali et al., 2023). Entre los cultivares de mayor susceptibilidad se encuentra el pomelo (Gottwald et al., 2002; Ali et al., 2023).

Argentina considera que el estatus fitosanitario de esta enfermedad se clasifica como “plaga no cuarentenaria reglamentada” lo que implica que, para su exportación, el lote debe declararse libre de la

misma (SINAVIMO). En caso de detectarse sintomatología positiva, países importadores, como los que integran la Unión Europea, principales destinos de la producción cítrica argentina, pueden rechazar el envío.

III.1.3.2.1 Estrategias de control de la cancrrosis de los cítricos

Cuando fue detectada la cancrrosis de los cítricos en la Argentina, no había métodos de control eficiente de dicho fitopatógeno, por lo que, las plantas infectadas debían ser erradicadas (Canteros et al., 2017), lo cual debido a complejidad de la producción mediante el uso de plantas injertadas y a que requiere una alta inversión de tiempo, implicaba una pérdida de gran valor ([sección III.1.5](#)).

Asimismo, es de destacar que, en la década de 1990, mediante el Programa de mitigación de riesgos para el cancrrosis de los cítricos (Canteros et al., 2017), se sentaron las bases para el control, seguimiento y buenas prácticas agronómicas de dicha enfermedad. Se cuenta con material vegetal resistente/tolerante que puede ser empleado para la producción, disminuyendo los efectos devastadores de esta infección (Palacios, 2005).

En la actualidad, este agente bacteriano se puede controlar químicamente, mediante el empleo del agroquímico mancozeb, basado en cobre. No obstante, en las últimas décadas se han encontrado y almacenado cientos de cepas resistentes a agroquímicos en base a agente cúpricos, entre los que se encuentra el mancozeb (Canteros et al., 2017). Además, las condiciones climáticas, como es el efecto de “El Niño”, fenómeno que conlleva a lluvias intensas en breves períodos de tiempo, aumentan los ciclos de reinfección y pueden causar infecciones con severas defoliaciones (Canteros et al., 2017).

Por todo lo expuesto, es de sumo interés el desarrollo de nuevas medidas que mitiguen los efectos de esta enfermedad, que sea ambientalmente sustentable y de acción duradera en el tiempo, contribuyendo a la disminución de la presión de selección de bacterias resistentes.

III.1.4 Inmunidad de amplio espectro como estrategia para controlar la enfermedad

Ca. Liberibacter es un género bacteriano con muchas dificultades para su caracterización molecular, ya que no es cultivable. Esto lleva a que su mecanismo de acción sea muy poco comprendido, asimismo, los cítricos no son plantas modelos de fácil trabajo, por su carácter híbrido. Para que este cultivo sea productivo, debe ser injertado combinando un pie resistente y una copa productiva (Palacios, 2005; da Graça et al., 2016; Gentile et al., 2020; Hu et al., 2021).

Considerando la experiencia previa con *Xcc*, una enfermedad ampliamente estudiada y presente en nuestro país (Gottwald et al., 2002; Schaad et al., 2006; Furman, 2013; Martins et al., 2020), se utilizó *N. benthamiana* – *Xcc* como modelo para analizar un sistema incompatible. Y de manera análoga a lo analizado en la [sección II](#), se empleó *N. benthamiana* – *Ps tab*, como patosistema compatible.

Además, dado que el patosistema *Ca. Liberibacter* – *Citrus* spp. presenta dificultades experimentales por las razones mencionadas anteriormente, y considerando el uso previo de AMPs para el control del HLB (Zou et al., 2017; Huang et al., 2021a; Longhi et al., 2022), se decidió utilizar *N. benthamiana* como planta modelo debido a su capacidad de desarrollar HR claramente visible y que permite su cuantificación.

En conjunto, se establecieron dos patosistemas, uno compatible y otro incompatible, para evaluar la actividad de AMPs frente bacterias fitopatógenas. Este enfoque permitió analizar de forma integral tanto la respuesta inmune como el desarrollo de la enfermedad. Además, uno de los patosistemas corresponde al agente bacteriano que conduce a la cancrrosis de los cítricos, podría aportar un indicio de respuesta de esta enfermedad en cítricos.

III.1.5 Antecedentes particulares: Péptidos antimicrobianos de la familia SNAKIN/GASA

La familia de proteínas SNAKIN/GASA es una familia de proteínas que se encuentra presente en plantas, hongos y bacterias. Los genes de esta familia continúan siendo ampliamente estudiados e, incluso en la actualidad, algunos autores los consideran como el tipo de AMP que presenta el mayor efecto positivo frente fitopatógenos de origen fúngico y bacteriano (Iqbal, 2023). Existen varios ejemplos de introducción de genes codificantes para péptidos antimicrobianos que han sido incorporados en cítricos para el control de microorganismos (Furman et al., 2013; Conti et al., 2020; Martins et al., 2020).

En este sentido en el IABIMO y en colaboración con la Facultad de Cs. Exactas y Naturales de la UBA, se ha trabajado en la identificación de AMPs para su posible aplicación en el desarrollo de nuevos cultivos (Almasia et al., 2008; Almasia et al., 2010; Faccio et al., 2011; Nahirñak et al., 2012b; Rivero et al., 2012; Furman et al., 2013; Beracochea et al., 2015; Darqui et al., 2018; Conti et al., 2020; Conti et al., 2021; Nahirñak et al., 2024). Con ese objetivo, se seleccionaron genes de la familia SNAKIN/GASA que ha demostrado tener un rol antimicrobiano frente a diversos patógenos (Segura et al., 1999; Almasia et al., 2008; Tavares et al., 2008; Almasia et al., 2010; Faccio et al., 2011; Nahirñak et al., 2012b; Nahirñak et al., 2012a; Nahirñak et al., 2016; Almasia et al., 2017; Darqui et al., 2018; Nahirñak et al., 2019; Almasia et al., 2020; Conti et al., 2020; Nahirñak et al., 2022; Bouterraa et al., 2023; Nahirñak et al., 2024).

Gracias a ello, algunos miembros de esta familia ha demostrado inducir algunas fitohormonas como el ácido ascórbico, las giberelinas, auxinas participar en el balance de ROS y algunas de estas propiedades han demostrado tener efectos beneficiosos para el control de microorganismos fitopatógenicos (Almasia et al., 2008; Nahirñak et al., 2012b; Nahirñak et al., 2019; Almasia et al., 2020; Conti et al., 2020; Nahirñak et al., 2024).

En particular, la proteína SNAKIN 1 de *Solanum tuberosum* (StSN1) ha demostrado disminuir las enfermedades causadas por *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) y *Erwinia carotova* (*E. carotova*) (Almasia et al., 2008), mientras que la proteína SNAKIN 3 de *Solanum tuberosum* (StSN3) ha mostrado efectividad frente a *Ps. tab* y *Pectobacterium carotovorum*, ambos en el cultivo de *Solanum tuberosum* (*S. tuberosum*, papa) (Nahirñak et al., 2024). También plantas expresando StSN1 en el cultivo de lechuga demostraron tener inducida la tolerancia frente a *R. solani* y *Sclerotinia sclerotium* (*S. sclerotium*) (Darqui et al., 2018), así como presentar incrementada la resistencia en trigo contra *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) y *Erwinia carotova* (*E. carotova*) (Faccio et al., 2011).

Además, StSN1 ha demostrado tener inducida la expresión frente a heridas y temperatura (Almasia et al., 2010), lo que podría indicar un posible rol contra estrés abiótico. Y, por último, lo que propició el trabajo de esta tesis es la capacidad que han demostrado que varios eventos transgénicos de la variedad Citrange Troyer expresando el gen StSN1 contra el fitopatógeno Xcc, disminuyó la cancrrosis de los cítricos (Conti et al., 2020). Dicho trabajo demostró la disminución del número y síntomas de canchros en un 70%.

Dado que no existe un genotipo comercial con resistencia completa contra dicha enfermedad (Ramadugu et al., 2016; Munir et al., 2017; Alves et al., 2021), y que la producción de árboles cítricos requiere una inversión en tiempo de varios años hasta la obtención de frutos, por lo que el mejoramiento convencional presenta severas limitaciones (Raveh et al., 2020). A ello se suman las características biológicas de los cítricos, como su carácter híbrido, la apomixis, la esterilidad parcial masculina y femenina, la incompatibilidad cruzada y autoincompatibilidad que lleva a que sea necesaria la reproducción clonal para conservar los caracteres deseados (Palacios, 2005; Raveh et al., 2020). En este marco, la intragénesis constituye una alternativa viable que permite la introgresión de los genes deseados en el fondo genético comercial.

Es por ello, que se planeó la identificación de genes endógenos de la familia SNAKIN/GASA de cítricos y realizar una prospección de genes (*screening*) para su caracterización funcional en los patosistemas modelo *N. benthamiana* – *Xcc* y *N. benthamiana* – *Ps tab*, representando un patosistema incompatible y otro compatible, respectivamente, con la eventual posibilidad de generar una evaluación en cítricos intragénicos.

III.1.5.1 Análisis bioinformático y filogenético de la familia de genes SNAKIN/GASA de cultivares de cítricos

Previamente en nuestro laboratorio, se llevó a cabo la secuenciación de los genes de las variedades de cítricos obtenidos de campo de la estación experimental Bella Vista (INTA) C.s.: *Citrus sinensis*; C.p.x P.t.: *Citrumelo* (*Citrus x paradisi* x *Poncirus trifoliata*); C.l.: *Citrus limon*; P.t.: *Poncirus trifoliata*; C.j.: *Citrus jhamhiri*; C.lia.: *Citrus limonia*; C.w.: *Citrus warburgiana*; C.a.: *Citrus aurantium*. Como se describió previamente, la familia de proteínas SNAKIN/GASA debe presentar un motivo de doce cisteínas con la siguiente secuencia “X_nC_{x3}C_{x2}RC_{x8}(₉)C_{x3}C_{x2}CC_{x2}C_xCVPXGX₂GN_{x3}CPCY_{x10}(₁₄)KCP”, donde X es un residuo distinto a la cisteína; R es arginina, V es valina, P es prolina, G es glicina, Y es tirosina y K es lisina) (Su et al., 2020; Bouteraa et al., 2023). A partir de ello, se hizo un análisis bioinformático utilizando las bases de datos NCBI (Benson et al., 2005) y Citrus Genome (<https://www.citrusgenomedb.org/>) en las que se buscó la secuencia consenso aminoacídica para localizar los genes codificantes de los mismo y obtener los identificadores probables de esta familia de proteínas. Como se observa en la figura III.5, las correspondientes secuencias aminoacídicas deducidas contienen el dominio conservado SNAKIN/GASA con el residuo de doce cisteínas, así como el dominio C-terminal (figura III.5) (Berrocal-Lobo et al., 2002; Nahirñak et al., 2016; Su et al., 2020; Bouteraa et al., 2023). De este análisis se desprende la presencia de 16 genes GASA que fueron mapeados en 6 cromosomas de *Citrus sinensis* (*C. sinensis*) y siete *Citrus limon* (*C. limon*), dos de las especies que presentan el haplotipo completo resuelto y sus cromosomas (Xu et al., 2013; Xu y Roose, 2020; Nakandala et al., 2025) (figuras III.6 y III.7).

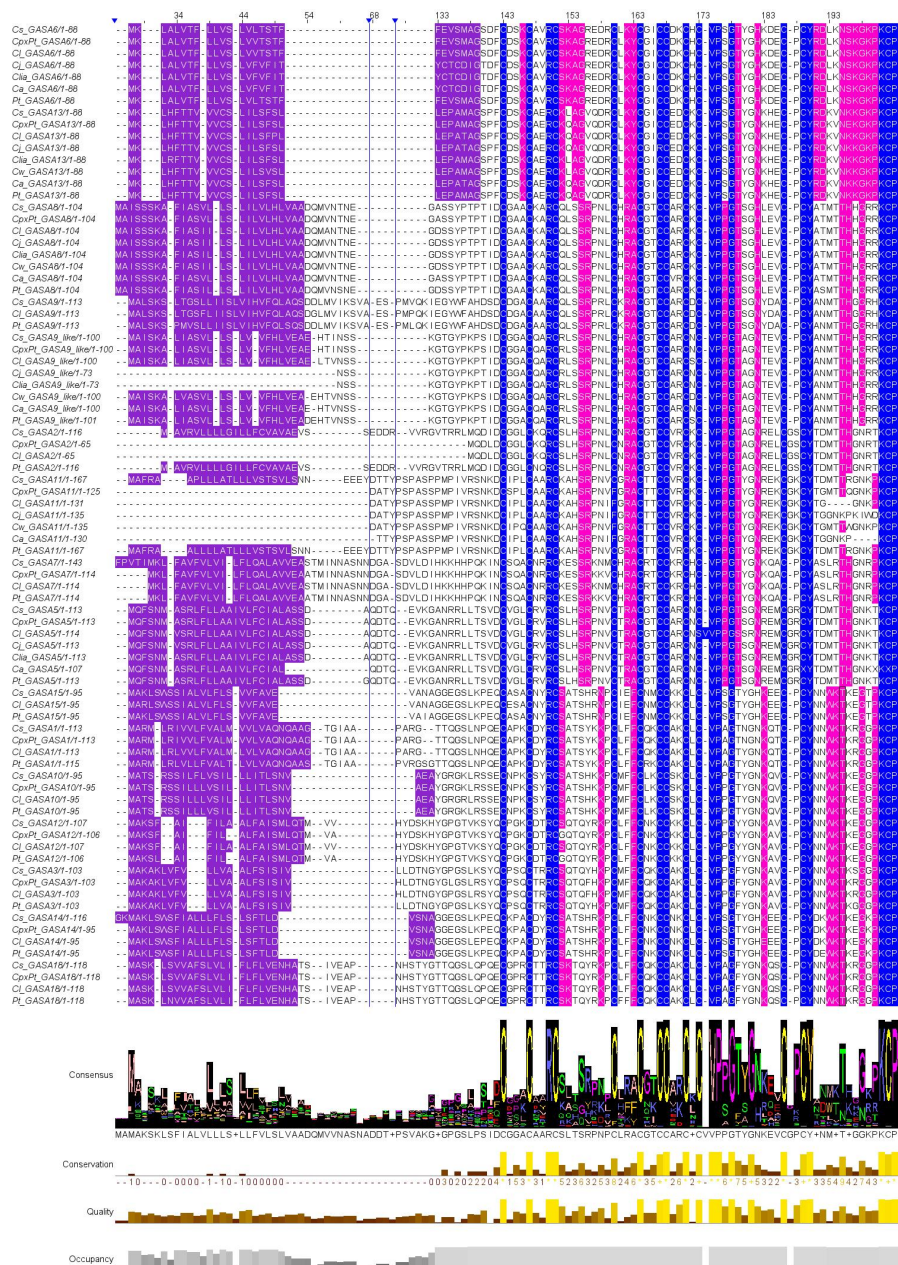


Figura III.5 Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas predichas de las variedades de cítricos de la familia de proteínas SNAKIN/GASA utilizando Clustal Omega (Sievers et al., 2011) y coloreado de las secuencias conservadas con el software Jalview (Waterhouse et al., 2009). Las variedades empleadas fueron: C.s.: *Citrus sinensis*; C.p.x Pt.: *Citrumelo* (*Citrus x paradisi* x *Citrus trifoliata*); C.l.: *Citrus limon*; P.t.: *Poncirus trifoliata*; C.j.: *Citrus jhambiri*; C.lia.: *Citrus limonia*; C.w.: *Citrus warburgiana*; C.a.: *Citrus aurantium*. Las secuencias conservadas en todos los miembros de la familia de proteínas están marcadas en color azul, entre las que se encuentran los 12 aminoácidos cisteína, en color magenta se indican los residuos empleados para clasificar a cada miembro en una subfamilia, y en color violeta se indican las putativas secuencias asociadas a la señal peptídica según Nahiriñak et al., 2016. Las líneas en azul verticales indicadas con flechas muestran regiones variables que fueron ocultas con fines ilustrativos. En la parte inferior de la figura se presentan los aminoácidos más conservados a partir del alineamiento con ClustalO en el programa Jalview (Waterhouse et al., 2009; Sievers et al., 2011), como se puede observar las doce cisteínas, junto con el motivo C-terminal final KCP, son los aminoácidos de mayor conservación.

A partir de un análisis de sintenia realizado mediante la base de datos de Citrus Genome (<https://www.citrusgenomedb.org/>) mediante la búsqueda de los genes en estudio, se pudo identificar los bloque sinténicos (figuras III.6 y III.7). Se pudo determinar que los genes GASA 8, GASA 9, GASA 9-like se encuentran en el cromosoma tres en las variedades *C. sinensis* y *C. limon*, por lo que son parte de una región sinténica, así como en los *scaffolds* de *P. trifoliata* que presenta del mismo modo un orden común de genes ortólogos y conservación de secuencias cromosómicas (figuras III.6 y III.7). En el caso de *Citrus clementina* (*C. clementina*) se encuentran en un bloque sinténico las GASA 8 y GASA 9, no fue encontrada la subfamilia "GASA 9-like" (tabla III.1). De la misma manera GASA 10, GASA 11 y GASA 12 están conservados en un bloque sinténico en *C. sinensis*, *C. clementina* y *P. trifoliata*, mientras que en *C. limon* tan solo GASA 10 y GASA 12 están unidas en un bloque sinténico (tabla III.1).

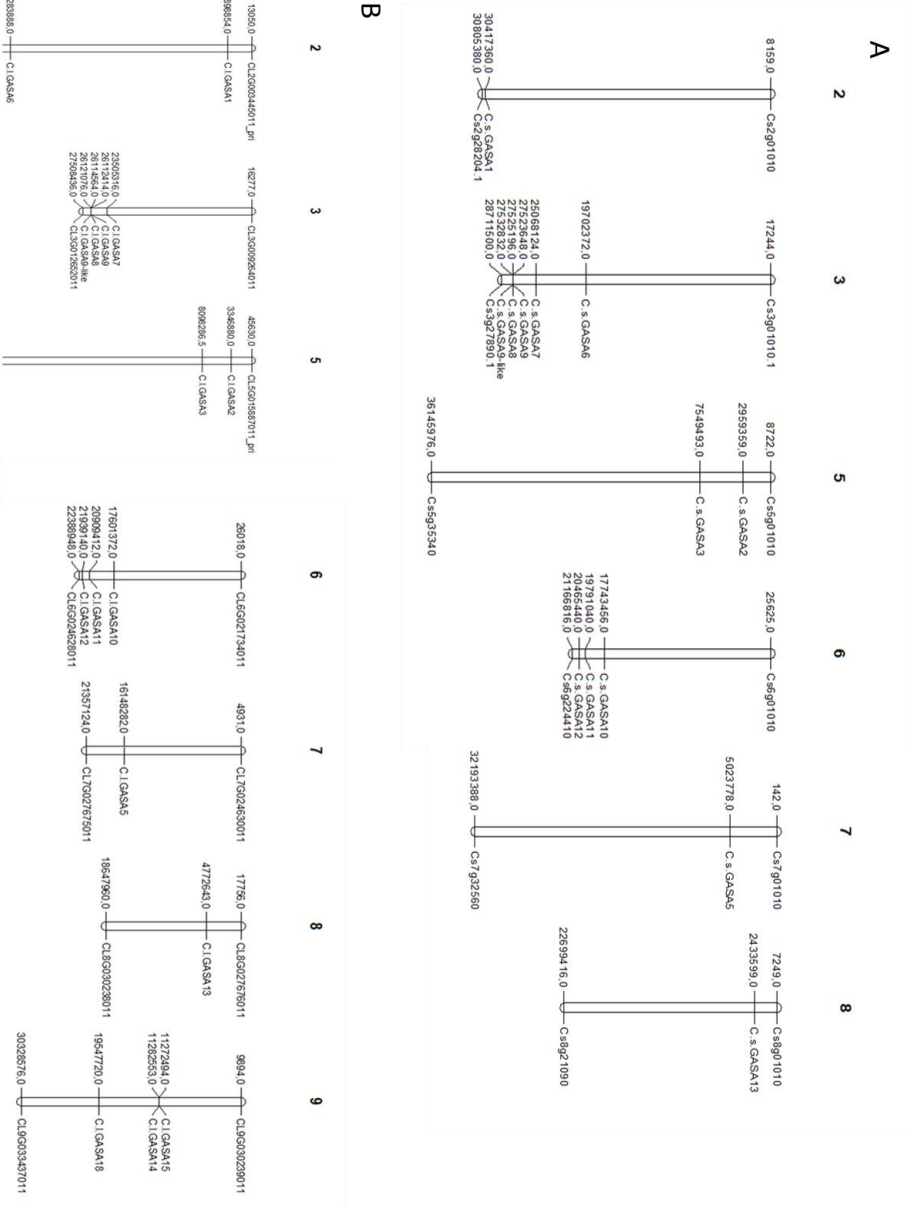


Figura III.6. La ubicación física de cada gen GASA se mapeó con el software Mapchart (Voorrips, 2002) para los genomas **(A)** *C. sinensis* y **(B)** *C. limon*. en los cromosomas o andamiajes de *C. clementina*, *C. limon*, *C. sinensis* y *P. trifoliata*.

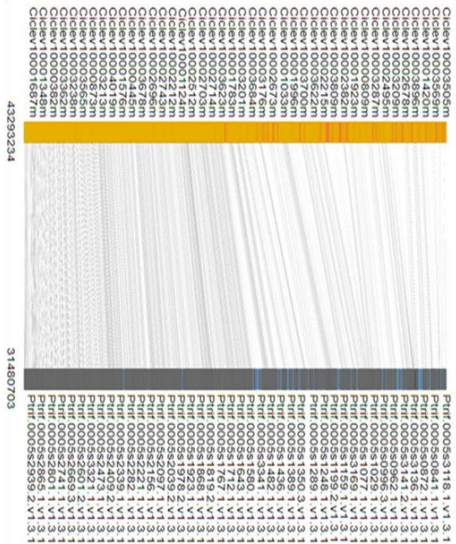
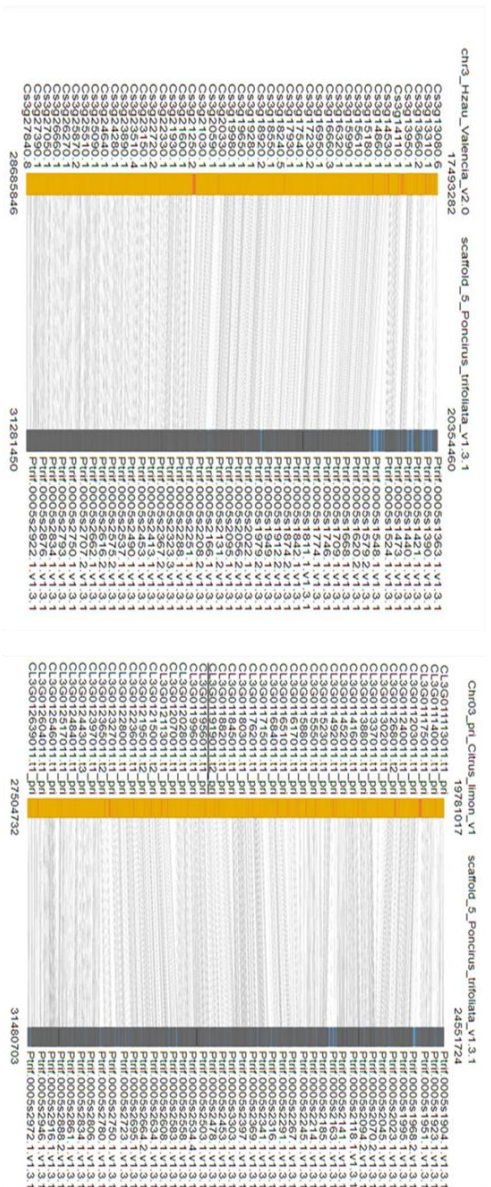


Figura III.7. Análisis de la sintenia estructural mediante la base de datos Citrus Genome (<https://www.citrusgenomedb.org>). Los genes GASA 8, GASA 9 y GASA 9-like son parte de una región

Tabla III.1: Identificación de los bloques sinténicos de los genes GASa 6, GASa 8, GASa 10, GASa 11 y GASa 12 generados usando la especie de referencia *C. sinensis* contra *P. trifoliata* y *C. limon*.

Gen	Bloque sinténico	Citrus sinensis (Referencia)	Citrus Clementina	Poncirus trifoliata	Citrus limon
GASa 6/GASa8/GASa10	cccsIB133	chr3_Hzau_Valencia_v1.0 : 17493282 - 28685846	scaffold_5_Cc_182 : 32266176 - 43070554		
		C33g13080.C33g27830	Ciclev10001868.Ciclev10002184		
	csjptL228	chr3_Hzau_Valencia_v1.0 : 17493282 - 28685846		scaffold_5_Poncirus_trifoliata_v1.3.1 : 20354460 - 31281450	
		C33g13080.C33g27850		Pttrf 0005s1363.Pttrf 0005s2949	
	cpcsiR184	chr3_Hzau_Valencia_v1.0 : 21506588 - 28685846			Chr03_ptl_Citrus_limon_v1 : 19781017 - 27293122
		C33g17910.C33g27850			CL3601113011.CL36012617011
GASa 10/GASa 11/GASa 12	csjptB387	chr6_Hzau_Valencia_v1.0 : 14457133 - 21166815		scaffold_6_Poncirus_trifoliata_v1.3.1 : 16542890 - 22556189	
		C36g12866.C36g22410		Pttrf 0006s1297.Pttrf 0006s2273	
	cccsIB182	chr6_Hzau_Valencia_v1.0 : 14457133 - 21166815	scaffold_6_Cc_182 : 19265824 - 25583801		
		C36g12860.C36g22400	Ciclev10012664.Ciclev10012201		
GASa 10/GASa 12	dpcsiB397	chr6_Hzau_Valencia_v1.0 : 15211053 - 19539155			Chr06_ptl_Citrus_limon_v1 : 15637962 - 19962733
		C36g19840.C36g13810			CL66023468011.CL66024256011
GASa 11	dpcsiB399	chr6_Hzau_Valencia_v1.0 : 19536270 - 20073304			Chr06_ptl_Citrus_limon_v1 : 20567754 - 21159713
		C36g20700.C36g19840			CL66024288011.CL66024400011

Gan	Bloque sinténico	Citrus sinensis (Referencia)	Citrus Clementina	Poncirus trifoliata	Citrus limon
GASA 8/GASA8/GASA10	cccsIB133	chr3_Hzau_Valencia_v1.0 : 17493282 - 28685846	scaffold_5_Cc_182 : 32266176 - 43070554		
		Cs3g13080.Cs3g27330	Ciclev10001868.Ciclev10002184		
	csjptL226	chr3_Hzau_Valencia_v1.0 : 17493282 - 28685846		scaffold_5_Poncirus_trifoliata_v1.3.1 : 20354460 - 31281450	
		Cs3g13080.Cs3g27350		Pttf_0005s1363.Pttf_0005s2949	
	cpcsiR184	chr3_Hzau_Valencia_v1.0 : 21506568 - 28685846			Chr03_pnt_Citrus_limon_v1 : 19781017 - 27293122
		Cs3g17910.Cs3g27350			CL3601113011.CL36012617011
GASA 10/GASA 11/GASA 12	csjptB387	chr6_Hzau_Valencia_v1.0 : 14457133 - 21166815		scaffold_6_Poncirus_trifoliata_v1.3.1 : 16542890 - 22556189	
		Cs6g12856.Cs6g22410		Pttf_0006s1297.Pttf_0006s2273	
	cccsIB182	chr6_Hzau_Valencia_v1.0 : 14457133 - 21166815	scaffold_6_Cc_182 : 19265824 - 25583801		
		Cs6g12860.Cs6g22400	Ciclev10012664.Ciclev10012201		
GASA 10/GASA 12	cpcsiB397	chr6_Hzau_Valencia_v1.0 : 15211053 - 19539155			Chr06_pnt_Citrus_limon_v1 : 15637962 - 19962733
		Cs6g19840.Cs6g13810			CL6G023468011.CL6G024256011
GASA 11	cpcsiB399	chr6_Hzau_Valencia_v1.0 : 19536270 - 20073304			Chr06_pnt_Citrus_limon_v1 : 20567754 - 21159713
		Cs6g20700.Cs6g19840			CL6G024288011.CL6G024400011

Partiendo de las secuencias aminoacídicas obtenidas (figura III.5), e identificados según la nomenclatura utilizada por Wu et. al (2021), se clasificaron en tres subfamilias, en concordancia con lo reportado previamente para otras especies ((Berrocal-Lobo et al., 2002; Nahirňak et al., 2016; Nahirňak et al., 2024). Este análisis se representa en un árbol filogenético (figura III.8), y en la tabla III.2 donde se detallan las subfamilias y sus respectivos miembros.

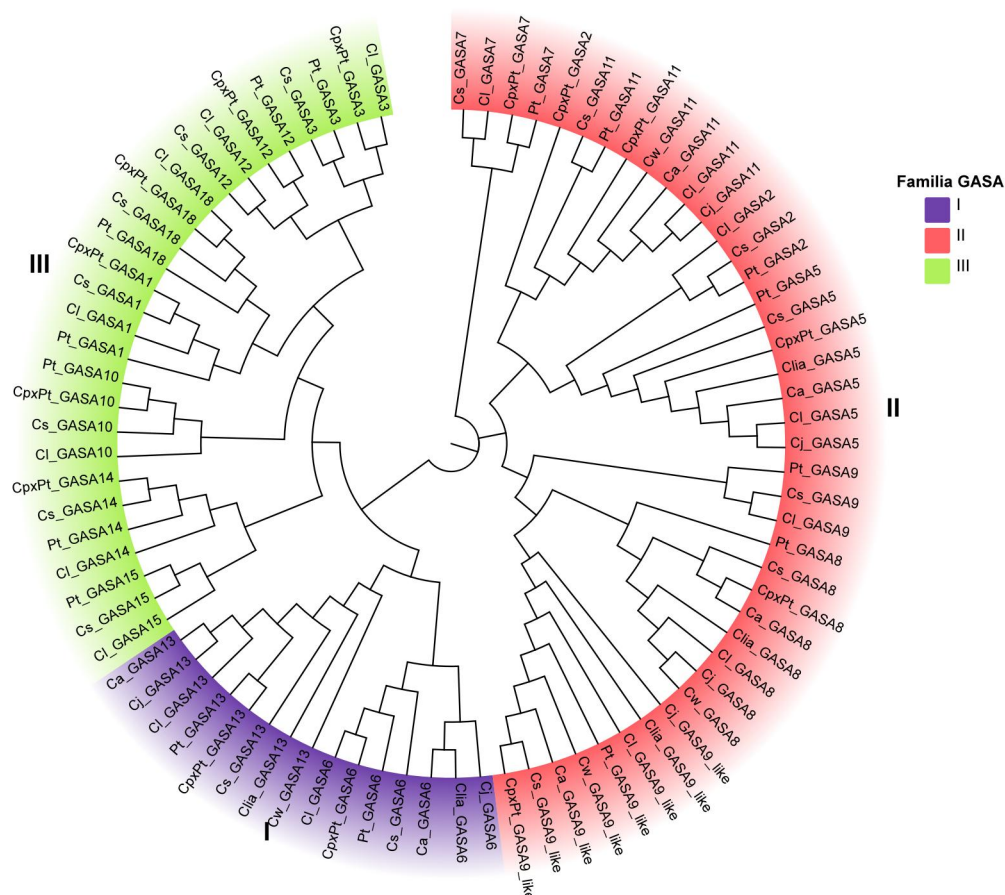


Figura III.8. Árbol filogenético de la familia de proteínas GASA empleando el programa MEGA 11 (Tamura et al., 2021) mediante el método *Neighbor-Joining* utilizando 1000 *bootstrap*. Se realizó una versión de color empleando el programa online denominado chiplot. Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas mediante secuenciación, a partir de las que se predijo las secuencias aminoacídicas que fueron las empleadas para este análisis. Se clasificaron en las tres subfamilias previamente reportadas (Berrocal-Lobo et al., 2002; Nahirňak et al., 2016; Nahirňak et al., 2024). Las mismas se indican según color: I color lila, II color magenta, III color verde. Las variedades incluidas en este análisis son: C.s.: *Citrus sinensis*; C.p.x P.t.: *Citrumelo* (*Citrus x paradisi* x *Citrus trifoliata*); C.l.: *Citrus limon*; P.t.: *Poncirus trifoliata*; C.j.: *Citrus jhambiri*; C.lia.: *Citrus limonia*; C.w.: *Citrus warburgiana*; C.a.: *Citrus aurantium*, seguido por el número de cada proteína GASA.

Tabla III.2: Detalle de los miembros de la familia SNAKIN/GASA secuenciados e incorporados en el árbol filogenético. Se presenta la subfamilia a la que pertenece cada miembro y su anotación.

Subfamilia	Miembros	Anotación
I	GASA 6	Peamacleína
	GASA 13	Peamacleína
	GASA 2	SNAKIN-2 o proteína 3 regulada por giberelinas
	GASA 5	SNAKIN-2-similar
	GASA 7	SNAKIN-2 isoforma X1
II	GASA 8	Proteína regulada por giberelina 11
	GASA 9	SNAKIN-2 o proteína 1 regulada por giberelinas similar
	GASA 9-similar	Proteína 1 regulada por giberelinas
	GASA 11	Proteína 14 regulada por giberelinas
	GASA 1	Proteína similar a GAST1
III	GASA 3	Proteína 6 regulada por giberelina
	GASA 10	Proteína 5 regulada por giberelina
	GASA 12	Proteína 4 regulada por giberelina
	GASA 14	Similar a la proteína 12 regulada por giberelina
	GASA 15	Proteína GAST1
	GASA 18	Proteína GAST1

III.2 Materiales y Métodos

III.2.1 Materiales vegetales utilizados

III.2.1.1 Citrus sp.

Las plantas empleadas para la obtención de los genes de la familia SNAKIN/GASA para la medición de expresión y para la obtención de genes sobreexpresantes fueron de las siguientes variedades: *Citrus limon* var. *eureka*, *Citrus clementina* var. *clemenule*, *Citrus limonia* Osbeck (Rang Lima Rangpur), Citrange Troyer (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*), *Poncirus trifoliata*, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf (*Poncirus trifoliata* – Rubidoux). Dichas plantas fueron obtenidas del campo de la Estación Experimental Concordia del INTA (E.E.A Concordia) durante tres días consecutivos en el mes de octubre del 2021, por lo cual dichas plantas se encontraban bajo las mismas condiciones climático-ambientales. Las mismas eran plantas adultas, con posibilidad de generar frutos, con lo cual también presentaban desarrollos vegetativos comparables. Luego de la toma de las muestras, los tejidos fueron inmediatamente almacenados en nitrógeno líquido y luego en destino almacenados a -80 °C.

III.2.1.2 Nicotiana benthamiana

Para realizar los ensayos funcionales de enfermedad con *Ps tab* y de HR con *Xcc* se utilizaron plantas de *N. benthamiana* WT. Las plantas se crecieron en invernáculo con temperaturas controladas dentro de un rango de 20 a 26 °C con ciclos de 16 h de luz suplementada y 8 h de oscuridad.

III.2.2 Técnicas de Biología Molecular

III.2.2.1 Extracción de ARN

Se extrajo el ARNtotal a partir de 100 mg de tejido molido con mortero en nitrógeno líquido, seguido de una trituration más fina en Tissue lyser de hojas de *N. benthamiana* o de las variedades de cítricos utilizando el reactivo *TransZol Plant* (*TransGenBiotech*) bajo las indicaciones del fabricante. De modo semejante a como se indica en la [sección II.2.3.1](#), la calidad fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa y luego cuantificada mediante espectrofotometría (*Nanodrop ND-1000*; *NanoDrop Technologies*). En caso de que la calidad no fuera suficiente, se realizó una limpieza del mismo con cloruro de litio. Brevemente, se resuspende el ARN extraído con LiCl en una relación 1:3, luego se lo incubó a -80 °C por al menos 2 h. Se hace una centrifugación de 40 min con 10.000 g. Se hacen dos lavados con etanol 70% y luego se lo resuspendió en 25 µl de H₂O libre de ARNasas. Por último, se desnaturaliza el mismo a partir de una incubación por 5 min a 60 °C. A partir del cual nuevamente se evalúa la calidad del ARN como se mencionó previamente. Se pasó por un paso de degradación del ADN genómico empleando una ADNasa I (Termofisher EN0521), para ello se partió de 2000 ng de ARN y se siguió las instrucciones del fabricante.

III.2.2.2 Síntesis de ADN copia (ADNc) mediante la reacción de Retrotranscripción (RT)

De modo semejante a lo detallado en la [sección II.2.4.3.2](#) es que a partir de 2000 ng de ARN, 1 µl de oligonucleótidos al azar en una concentración de 10 µM, 1µl de 10 mM de DNTPs, se realizó la reacción de síntesis bajo las indicaciones del fabricante, con una primera incubación por 5 min a 65 °C. Y luego agregado del buffer 1x, 2 µl de DTT, y 1 µl de MMLV (Invitrogen) a lo que se incubó por 50 min a 37 °C, seguido de una desnaturalización de 15 min a 70 °C. Para la evaluación de la calidad del ADNc se realizó un gel de agarosa 1,5% y chequeo mediante qPCR empleando el gen de referencia CsGAPC2 (Mafra et al., 2012; Conti et al., 2020).

III.2.2.3 Diseño de cebadores

Para evaluar la expresión absoluta de los genes SNAKIN/GASA en cítricos, se diseñaron oligonucleótidos basados en las regiones UTR de los genes secuenciados previamente por el grupo empleándose las herramientas bioinformáticas Citrus Genome, NCBI y luego se seleccionó la secuencia nucleotídica empleándose la herramienta Primer3 v.4.1.0 (Koressaar y Remm, 2007; Untergasser et al., 2012; Koressaar et al., 2018). La lista de cebadores se encuentra en la tabla III.4. La eficiencia de amplificación fue calculada mediante el programa LingReg (Ramakers et al., 2003), se obtuvieron eficiencias porcentuales (E%) con un rango de 70-85%.

Tabla III.4: Lista de cebadores empleados para la evaluación de la expresión mediante RT-qPCR de los genes de la familia SNAKIN/GASA

Gen	Cebador	Secuencia (5'3')
Housekeeping_FBOX	CsFBOX Fw	TTGGAAACTCTTTGCCACT
	CsFBOX Rv	CAGCAACAAAATACCCGTCT
GASA1/SN8	SN8f	TCTTCTCCAAAGAATAATGGCCAGA
	SN8r	TATAAACTGATACCATTAATTCAAGGG
GASA6/SN1	SN1f	CTCTTCTTCAGGAAATTCTGAGA
	SN15r	AAGAGAATGTAAATTTAAGGACACT
GASA7/SN17	qPCRSN17F	CACACTCCTATGCCTGCAGT
	qPCRSN17R	ACACATCACTCGCTCCATCC
GASA8/SN2	SN2f	CAGGTGCCAGTTATCGTCGA
	SN2r	GTATCATGTATCATGCACAATCA
GASA9/SN3	qPCRSN3F	CTGACGGGTTTCGTTCTCAT
	qPCRSN3R	GCACATGCTCCGTCACAATC
GASA9_like/SN4	qPCRSN4F	AGGTGCCGATTATCGTCGAG
	SN4r	CGTTTCAACTTAAATATTTCAAG

GASA10/SN9	SN9f	G TAGAAGACAATACACATGGCCAC
	SN9r	ATTCTCAATCAAGGGCATTGGG
GASA11/SN10	qPCRSN10F	TTCGGCTGGGTCTGTCTTC
	qPCRSN10R	GGTGGATAAGTGGTGGGTGG
GASA12/SN14	qPCRSN14F	GACCTGGGACTGTCAAGAGC
	qPCRSN14R	TGTTGTAGCAAGGGCACACA
GASA13/SN11	qPCRSN11F	AGTCACTTACTTGAAAGGAAAGCA
	qPCRSN11R	CTCCTGCTAGCTTGACCTT
08100.1	qPCRCs7g08100F	GTTTAGATCCTAAGCTAGTAATTGCCA
	qPCRCs7g08100.1R	TGATTTTCAATCAGTGCTATGCA
0800.2	qPCRCs7g08100F	GTTTAGATCCTAAGCTAGTAATTGCCA
	qPCRCs7g08100.2 R	GCATCAGATGAAGCCAGTGC

III.2.2.4 PCR para chequeo

La mezcla de reacción para la PCR contuvo 4 µL de ADN genómico o 1 µL de *miniprep*, 1 µL de una concentración 5 µM de cada cebador, 1 µL de buffer 10X, 0,2 µL de dNTPs (10 mM), 0,04 µL de Taq polimerasa (Invitrogen), 0,3 µL de MgCl₂ (50 mM), alcanzando un volumen total de 10 µL. El ciclado consistió en 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 45 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C, y 45 seg a 72 °C, y luego, un paso final de amplificación de 10 min a 72 °C.

III.2.2.5 PCR para clonado con sistema de corrección

La mezcla de reacción para la PCR contiene 10 µL de templado, 1 µL de una concentración 5 µM de cada cebador, 2,5 µL de 10X TransTaq HiFi Buffer II (TransGen Biotech), 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 0,25 µL de TransTaq HiFi DNA pol (TransGen Biotech), 0,125 µL de MgSO₄ y alcanzando un volumen total de 25 µL. El ciclado consistió en 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 45 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C, y 45 seg a 72 °C, y luego, un paso final de amplificación de 10 min a 72 °C.

III.2.2.6 Clonados del vector pGEM-T para la qPCRa

Para hacer la qPCR absoluta se debe cuantificar el ADN. Con este objetivo se clonaron los genes SNAKIN/GASA en el vector pGEM-T (Promega). Se amplificaron los genes mediante PCR utilizando la Taq Polimeras HiFi ([sección III.2.2.4](#)), luego se corrieron los productos en gel de agarosa 2%. Se purificaron del gel para obtener el ADN utilizando el kit de purificación de gel Easy Pure Quick Gel Extraction (TransGen Biotech) bajo las indicaciones del fabricante. Se corroboró la presencia de ADN corriendo 5 µl de esta purificación en un gel de agarosa 2%. Se realizó la ligación con la enzima Ligasa de ADN T4 (Promega) bajo las especificaciones del fabricante. Con los productos purificados se transformó en bacterias *E. coli* DH5α. Se utilizó el kit comercial EasyPure® Plasmid MiniPrep Kit (TransGen Biotech), bajo las especificaciones del

fabricante. Se realizó una primera cuantificación y evaluación de la calidad del ADN mediante espectrofotometría (*Nanodrop ND-1000; NanoDrop Technologies*), que debió tener relaciones 260/280 con valores dentro del rango 1.80-2 y concentraciones mayores a 100 ng/μl para utilizar, luego el Quibit que es un método fluorométrico de mayor precisión y sensibilidad.

III.2.2.7 Clonados para la sobreexpresión

Para la sobreexpresión transitoria de genes en *N. benthamiana* se empleó el vector de entrada pCR®8/GW/TOPO del sistema Gateway® (Invitrogen). El mismo contiene los sitios attL1 y attL2, presenta incorporado en el vector la enzima TOPO® para facilitar la inserción del fragmento de ADN de manera rápida y eficiente, como antibiótico de selección tiene a la espectinomycin, presenta extremos pegajosos que permiten incorporar fragmentos con las terminaciones de los productos de la enzima EcoR1, también presenta los sitios para los cebadores universales M13 para facilitar la secuenciación del inserto. El inserto fue el producto de PCR de los genes *PtGASA6*, *PtGASA8*, *PtGASA10* y fue incorporado según las especificaciones del fabricante a partir de la enzima TOPO® (Invitrogen) que tiene incorporado el mismo. A partir de los sitios attL del vector pCR®8/GW/TOPO se generó la recombinación con los sitios attR1 y attR2 empleando la enzima LR Clonase® II (Invitrogen) en el vector de destino pK2GW7 del sistema Gateway® (Invitrogen) que presenta el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico del coliflor (CAMV 35S), gen de resistencia a kanamicina para la selección en plantas, y marcador de selección de espectinomycin. Para confirmar la inserción de los fragmentos en el sentido apropiado se mandó a secuenciar al servicio de Unidad de Genómica del IABIMO-IB (UGB) con los cebadores M13.

III.2.2.8 Cuantificación de la sobreexpresión de los genes SNAKIN/GASA mediante RT-qPCR relativa (RT-qPCRr)

Con el fin de evaluar la sobreexpresión de los genes SNAKIN/GASA de forma transitoria por 48 h, luego de sobreexpresar los genes tal como se detalla en la [sección III.2.3.1](#). Se extrajo el tejido de hojas, a partir del cual se obtuvo el ADNc, según se detalla en [sección III.2.2.2](#). Se emplearon 4 réplicas biológicas y tres réplicas técnicas para la evaluación mediante RT-qPCR empleándose los cebadores GASA6, GASA8, y GASA10. Como gen de referencia (*Houskeeping*) se empleó el gen *NbUbi3*, como se observa en la tabla III.5 (Conti, 2005). El ciclado consistió en 5 min de 95 °C, 45 ciclos de 15 seg a 95 °C, 40 seg a 60 °C, y 40 seg a 72 °C y lectura, más una de curva de melting empleando el equipo StepOne.

La preparación de la reacción de PCR en tiempo real se realizó en un volumen final de 10 μl por tubo. La mezcla maestra incluyó 5,07 μl de agua libre de nucleasas (MQ), 1 μl de buffer 10X, 0,6 μl de MgCl₂ (50 mM), 0,2 μl de dNTPs (10 mM), 0,2 μl de Sybr Green 10X (Invitrogen), 0,1 μl de Rox, 0,03 μl de Taq Platinum (Invitrogen), 0,4 μl (5 μM) de cada par de cebadores y 2 μl de cDNA diluido 1/10.

Tabla III.5: Cebador utilizado como gen de referencia para la evaluación de la sobreexpresión en plantas de *N. benthamiana*

Gen	Cebador	Secuencia	Referencia
Ubiquitina 3 de <i>N. benthamiana</i>	NbUbi3F	GCTGATTACAACATCCAGAAGG	Conti, 2005
	NbUbi3R	TGCAACACAGCAAGCTTAACC	

III.2.2.9 Cuantificación de la expresión de los genes mediante RT-qPCR absoluta (RT-qPCRa)

Para medir la expresión de los genes de la familia SNAKIN/GASA en las variedades de cítricos, se partió del ADNc de los híbridos de cítricos enumeradas en la [sección III.2.1.1](#). Se realizó RT-qPCR con los cebadores indicados en la tabla III.4 y los genes de referencia CsFBOX y CsGAPC2 (Mafra et al., 2012; Conti et al., 2021). Se exportaron los datos de Ct del equipo StepOne y a partir del uso del programa LinReg se obtuvieron las eficiencias de los cebadores y los valores normalizados Cq empleados para ser utilizados como input para el análisis estadístico (Ramakers et al., 2003). Se decidió utilizar como gen normalizador CsFBOX, ya que se observaron curvas que presentaron una mayor sensibilidad, ya que los valores corregidos con LinReg, presenciaban una gran proporción de Wells con no detección de la expresión génica para CsGAPC2.

Debido a la falta de un control con el cual comparar la expresión, se realizó la RT-qPCRa. Para obtener una cuantificación más precisa del número de copias de ADN, se realizó una curva estándar para determinar la cantidad de moléculas de ADN. Brevemente, se clonaron los genes de la familia SNAKIN/GASA en el vector pGEM-t (Promega) de hojas de cítricos de la variedad *C. clementina* var. *clemenule*. Se empleó dicha variedad por su estrecha relación filogenética con *C. sinensis*, una de sus especies parentales, la cual presenta uno de los genomas de *Citrus* sp. más exhaustivamente estudiados hasta la fecha, lo que facilita el análisis comparativo (Xu et al., 2013; Xu y Roose, 2020; Nakandala et al., 2025), para más detalle ver secciones [III.2.3.2](#), [III.2.3.3](#) y [III.2.4.2](#). A partir de los resultados de la medición de Qubit ([sección III.2.2.6](#)), se realizaron las diluciones seriadas de los clonados (-1 a -13). Luego se realizó la qPCRa. De estos resultados se obtuvo la curva de estandarización y se determinó la relación lineal entre el número de copias de ADN en función de los Cts. Luego, a partir de los resultados de la corrección del LinGer de la qPCR de tejidos de las variedades de cítricos, se utilizó el programa online NeBioCalculator v.1.15.0 (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/dsdnaamt>), a partir del cual se obtienen la cantidad de números de copias de ADN. Como input se introdujo la secuencia, el tamaño del ADN y la cuantificación de la masa de los ADNs. Así se transformaron las relaciones de Cq en valores de masa de ADN, pudiéndose obtener una relación absoluta. Los reactivos empleados y el ciclado se realizó de la misma forma descrita en la [sección III.2.2.8](#), así como los cebadores empleados se encuentran en la tabla III.4.

III.2.3 Ensayos en plantas

III.2.3.1 Sobreexpresión de genes SNAKIN/GASA

Para ello, se infiltraron plantas de *N. benthamiana* empleando al agente *A. tumefaciens* GV. 3101 como agente para la sobreexpresión. Se transformaron 3 cepas de *A. tumefaciens* GV. 3101 para transformar en el vector pGGI000, vector de clonación compatible con Golden Gate y expresar los genes SNAKIN/GASA. Este vector de expresión permite sobreexpresar los genes previamente nombrados bajo un promotor constitutivo fuerte del virus35S del Cauliflower mosaic virus. Las mismas fueron corroboradas por secuenciación empleando el servicio de secuenciación UGB-INTA Castelar.

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa FgStatstcs (Di Rienzo J.A, 2009) (<http://sites.google.com/site/fgStatistics/>) utilizando Réplicas técnicas muestreadas por pares, con ciclos de remuestreo = 5000, y se calculó el ratio que indica la proporción de sobreexpresión observada con respecto al control.

III.2.3.2 Ensayo de enfermedad con *Pseudomonas syringae* pv.*tabaci* en plantas sobreexpresando los genes de interés de manera transitoria

Las cepas bacterianas de *Ps tab* fueron gentilmente cedidas por el grupo de la Dra. Cecilia Vázquez Rovere. Se realizó una puesta a punto del ensayo en plantas de *N. benthamiana* para sobreexpresar los genes *PtGASA* e infectar con este agente patógeno.

Se crecieron en LB líquido en agitación durante toda la noche a 28 °C y 200 r.p.m. bacterias de *A. tumefaciens* GV. 3101 con el vector pK2GW7 con el gen a sobreexpresar suplementadas con el correspondiente antibiótico y acetosiringona (según se indica en la tabla III.6) para la inducción de la expresión de los genes. Se cosecharon las células centrifugándolas durante 10 min a 4.000 xg. Se resuspendió en MES y se llevó a $DO_{600} = 1,2$ con el agregado de acetosiringona e incubó durante 2 horas quietas o en heladera a 4°C ON. Para las co-infiltraciones se realizan mezclas de partes iguales de la agrobacterias portando los distintos plásmidos.

Al mismo tiempo, se tomaron bacterias *Ps tab* crecidas ON a 28°C en KBM sólido. Se hicieron dos lavados con $MgCl_2$ 10mM, seguido de una centrifugación de 5000 rpm 3'. Se llevó a una DO_{600} equivalente a 2×10^6 ufc/ml.

Tabla III.6: Detalle de antibióticos empleados para el crecimiento y selección de las agrobacterias.

	Rif	Genta	Spec	Acs
GASA	100ug/ml	40 ug/m	100mg/ml	100uM
Vacia	100ug/ml	40 ug/m	-	100uM

Se hizo una mezcla final de *A. tumefaciens* GV. 3101 portando el vector pK2GW7 de los genes *PtGASA* o una cepa sin vector con *Ps tab*, llevando a una concentración final de $DO_{600} = 0,6$ y 1×10^6 ufc/ml respectivamente.

Este inóculo fue utilizado para desafiar una hoja por planta de *N. benthamiana* de aproximadamente dos meses de crecimiento. Esta co-infiltración se realizó en las mismas 6 posiciones de una hoja madura para obtener una sintomatología pareja asociada a la posición, de forma tal de poder normalizar la sintomatología por hoja. Se obtuvo un valor por cada uno de los círculos desafiados y luego se normalizó por hoja, es decir obteniéndose un valor así por planta. A partir de las 48 horas, se comenzó a observar la aparición de síntomas y se obtuvieron los resultados sin conocer el tipo de inoculación realizado en cada planta.

III.2.3.3 Ensayo de HR con *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en plantas sobreexpresantes

De forma similar a como se explicó en el [ensayo de enfermedad](#), se realizaron los mismos pasos del protocolo para la sobreexpresión transitoria de genes mediante *A. tumefaciens*.

A partir de colonias aisladas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) jóvenes crecidas en medio solido de agar nutritivo (AN) se generaron placas de inóculo crecidas durante toda la noche del día del ensayo a 28°C. Debido a que este microorganismo presenta una gran mucosidad debido a la formación característica del biofilm, se dejó al menos 2 h en agitación en $MgCl_2$ 10 mM de forma tal de desarmar lo mayor posible este biofilm y tener en suspensión una proporción alta del inóculo.

Se hicieron dos lavados con $MgCl_2$ 10mM, seguido de una centrifugación de 7000 rpm 3'. Se llevó a una $DO_{600} = 0,218$.

Luego se realizó una dilución a la mitad, al mezclar ambos inóculos, llevando a una relación de *A. tumefacciones* GV. 3101 y *Xcc* de $DO_{600} = 0,6$ y $0,109$ respectivamente.

Y la co-infiltración se realizó de forma análoga a lo expresado en la [sección III.2.3.2](#).

III.2.4 Análisis estadístico

III.2.4.1 Análisis estadístico para medir la sobreexpresión de plantas

Para evaluar la sobreexpresión transitoria de los genes *SNAKIN/GASA* en plantas de *N. benthamiana* que se realizaron según se detalla en la [sección III.2.3.1](#), se utilizó el programa fgStatistics (<https://sites.google.com/site/fgstatistics>) que permite hacer un análisis estadístico para comparar la expresión relativa de RT-qPCR, utilizando el algoritmo desarrollado por Pfaffl et al (2001). Se utilizó el gen de referencia *NbUbi3* (Conti, 2005) y se evaluó la sobreexpresión de los genes *PtGASA6*, *PtGASA8*, *PtGASA10*. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos niveles de expresión cuyos p-valores fueron menores a 0,05 (indicados con *); menores a 0,01 (indicados como **) y menores a 0,001 (indicados con ***).

III.2.4.2 Análisis estadístico de los ensayos en plantas

Para realizar las cuantificaciones de los síntomas y luego los análisis estadísticos a partir de la sintomatología de enfermedad se realizó un índice de enfermedad (DI) y otro de HR (HRI) de forma semejante a lo descrito (Schandry, 2017). Para el DI se emplearon cuatro categorías que permitieron transformar esta variable en una variable cuantitativa con valores que identifican rangos porcentuales, donde: 1 indica 0-25% del área ocupada, 2 indica 25-50 %, 3 indica 50-75% y 4 indica 75-100% ([sección III.3.7](#)). De modo semejante, se realizó el HRI ([sección III.3.8](#)). Estos índices permiten transformar los datos a valores numéricos que pueden ser utilizados para realizar los análisis estadísticos o para obtener el valor de Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (AUDPC, del inglés *Area Under the Disease Progress Curve*) (Shaner, 1977; Schandry, 2017). No obstante, como indica Schandry et al. (2017), el valor de AUDPC genera pérdida de información por ser un único valor, en tanto evaluar en el tiempo el DI e HRI permite ver cómo progresa temporalmente la enfermedad. Por ello, para el análisis estadístico se utilizaron tanto los DI e HRI como el ADUPC. Para cada hoja se obtuvieron 6 valores, uno por cada posición de infiltración, para más detalle ver secciones [III.3.6](#), [III.3.7](#) y [III.3.8](#). Luego, se calculó el promedio de estos valores para tener un valor normalizador por hoja. Los análisis se realizaron empleando el programa R mediante la interfaz Rstudio (<https://www.r-project.org/>). Se calculó el AUDPC para cada planta y luego un valor de AUDPC promedio por condición de sobreexpresión como fue descrito previamente (Del Ponte, 2023). Para el análisis estadístico, se utilizaron como *input* los valores de los DI e HRI y se realizaron comparaciones por pares utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad y como método de ajuste se empleó Bonferroni bajo el paquete `pairwise.wilcoxon.test` (Core, 2024). Del mismo modo, para analizar el AUDPC, se obtuvieron los valores de AUDPC/planta y con ellos se realizó la misma prueba no paramétrica. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos niveles de expresión cuyos p-valores fueron menores a 0,05 (indicados con *); menores a 0,01 (indicados como **) y menores a 0,001 (indicados con ***).

III.2.5 Estructura tridimensional de proteínas

Para generar *in silico* la estructura tridimensional de las proteínas SNAKIN/GASA, se buscaron las secuencias aminoácidas *in silico* de los genes secuenciados, empleando la base de datos CitrusGenome (<https://www.citrusgenomedb.org/>) previamente curadas con el programa BioEdit (Hall et al., 2011). Luego, se utilizó la versión en línea (*online*) de ColabFold v1.5.5: AlphaFold2 using MMseqs2, (Kim et al., 2024) utilizando la configuración por defecto. Para generar una visualización por fuera del ColabFold se utilizaron los programas NGL Viewer (Rose y Hildebrand, 2015).

III.3 Resultados

III.3.1 Expresión relativa de genes SNAKIN/GASA

Con el fin de estudiar genes con posible efecto antimicrobiano de la familia SNAKIN/GASA, se analizó la expresión de un subconjunto de genes GASA con miembros pertenecientes a los tres grupos (Wu et al., 2021). Los genes seleccionados para su estudio fueron GASA1, GASA6, GASA7, GASA8, GASA9, GASA9_like, GASA10, GASA11, GASA12 y GASA13. La nomenclatura de los genes fue basada en bibliografía previa (Wu et al., 2021). Para este análisis se obtuvo la expresión de los tejidos floral, hoja joven (HJ) y hoja madura (HM) de distintas variedades de cítricos, según se enumera en la [sección III.2.1.1](#). A partir de los mismos se extrajo el ARN, sintetizó el cDNA y luego se analizó por RT-qPCR la expresión ([sección III.2.2](#)).

Inicialmente se planteó analizar la expresión mediante RT-qPCR relativa, normalizando la expresión al gen endógeno (*housekeeping* FBOX), como se observa en las figuras III.10, III.11, III.12 y III.13. Se graficó la expresión relativa de los tejidos de cada variedad. Y para ordenar la información se lo hizo de dos formas distintas: (1) ordenando todas las variedades para cada tejido, como se observa en las figuras III.10 y III.11 o (2) ordenando cada variedad con la expresión de sus diferentes tejidos, figuras III.12 y III.13. Se incluyó en el análisis a un gen que denominamos internamente SN7, pero que luego se detectó que carecía de unos de los dominios necesarios para poder pertenecer a dicha familia de proteínas. A partir de un análisis en el que se emplearon para relativizar la expresión, una expresión con Cts = 40 como parámetro de no expresión, se pudo observar una tendencia generalizada de todas las variedades y para la mayoría de los genes GASA, de una mayor expresión en los tejidos floral y hoja joven, siendo aún mayor en el primero (figuras III.10, III.11, III.12 y III.13). Hay que resaltar que la variedad de Rangpur es más sensible a patógenos que las restantes, siendo Citrange Troyer y *Poncirus trifoliata* las de mayor resistencia en este estudio (Palacios, 2005; Ramadugu et al., 2016; Munir et al., 2017; Peng et al., 2020; Alves et al., 2021). Si bien estos resultados no son concluyentes, se puede observar que los tejidos provenientes de Citrange Troyer y *Poncirus trifoliata*, tuvieron una tendencia a una mayor expresión de los genes GASA en los tejidos más jóvenes.

Como se dijo previamente, los genes SNAKIN/GASA pertenecen a una familia de AMPs. Es probable que tengan un rol en la defensa contra patógenos ya que se expresa en una etapa temprana de desarrollo de frutos, etapas en la que se suele observar una mayor expresión en genes de defensa, lo que podría mantener la integridad del fruto para la descendencia fértil (Segura et al., 1999; Almasia et al., 2008; Nahirñak, 2008; Tavares et al., 2008; Almasia et al., 2017; Meneguetti et al., 2017; Almasia et al., 2020). Por dicho motivo, se buscaron genes que presentarán su expresión alta en tejidos jóvenes.

Se consideró relevante que la expresión sea alta en los tejidos floral u hoja joven ya que los mismos son los que están asociados con la producción de órganos reproductivos y, posteriormente, de frutos. Por dicho motivo, suelen tener mejores barreras protectoras, entre las cuales podría hipotetizarse que los genes con función antimicrobiana de amplio espectro muestren una expresión elevada (Meneguetti et al., 2017). En particular, se ha descrito previamente que proteínas de la familia SNAKIN/GASA, tienen una elevada expresión en hojas y flores (Segura et al., 1999; Herbel et al., 2017; Meneguetti et al., 2017) y, específicamente StSN2, fue descrita con mayor expresión en dichos tejidos (Herbel et al., 2017). Por ello, el análisis de este trabajo se enfocó en tejido floral y hojas jóvenes.

Se pudo hacer una virtual división en dos grupos según el nivel de expresión de los genes. El primer grupo está conformado por aquellos genes que presentan una expresión alta y generalizada en todas las variedades para los tejidos floral u hoja joven, incluyendo a GASA1, GASA6, GASA8, GASA9_like, GASA10, GASA11, GASA12 y GASA13. Por otro lado, el segundo grupo está conformado por genes con baja expresión constituido por GASA2, GASA7 y GASA9, junto a "SN7", que, como se indicó previamente no constituye la familia SNAKIN/GASA y que se utilizó para evaluar genes con buena y mala expresión (figuras III.10 y III.11).

A su vez, los genes del grupo que presentaron niveles elevados de expresión, mostraron esta regulación en tejidos floral y en hojas jóvenes en las variedades de mayor tolerancia a patógenos (Citrange Troyer y *Poncirus trifoliata*) con respecto a *Rangpur*, lo cual podría ser indicativo de una asociación directa con esos niveles de tolerancia (figura III.12 y III.13) (Palacios, 2005; Ramadugu et al., 2016; Munir et al., 2017; Alves et al., 2021; Huang et al., 2021b; Weber et al., 2022).

Para obtener valores absolutos de expresión, se procedió a hacer RT-qPCR absoluta y de esta forma poder hacer comparación del tipo “todos con todos”, ya que al obtener cantidad de moléculas de ADN se pueden realizar comparaciones de tipo tejido-tejido, tejido-variedad, variedad-variedad, con total independencia ([sección III.3.2](#)).

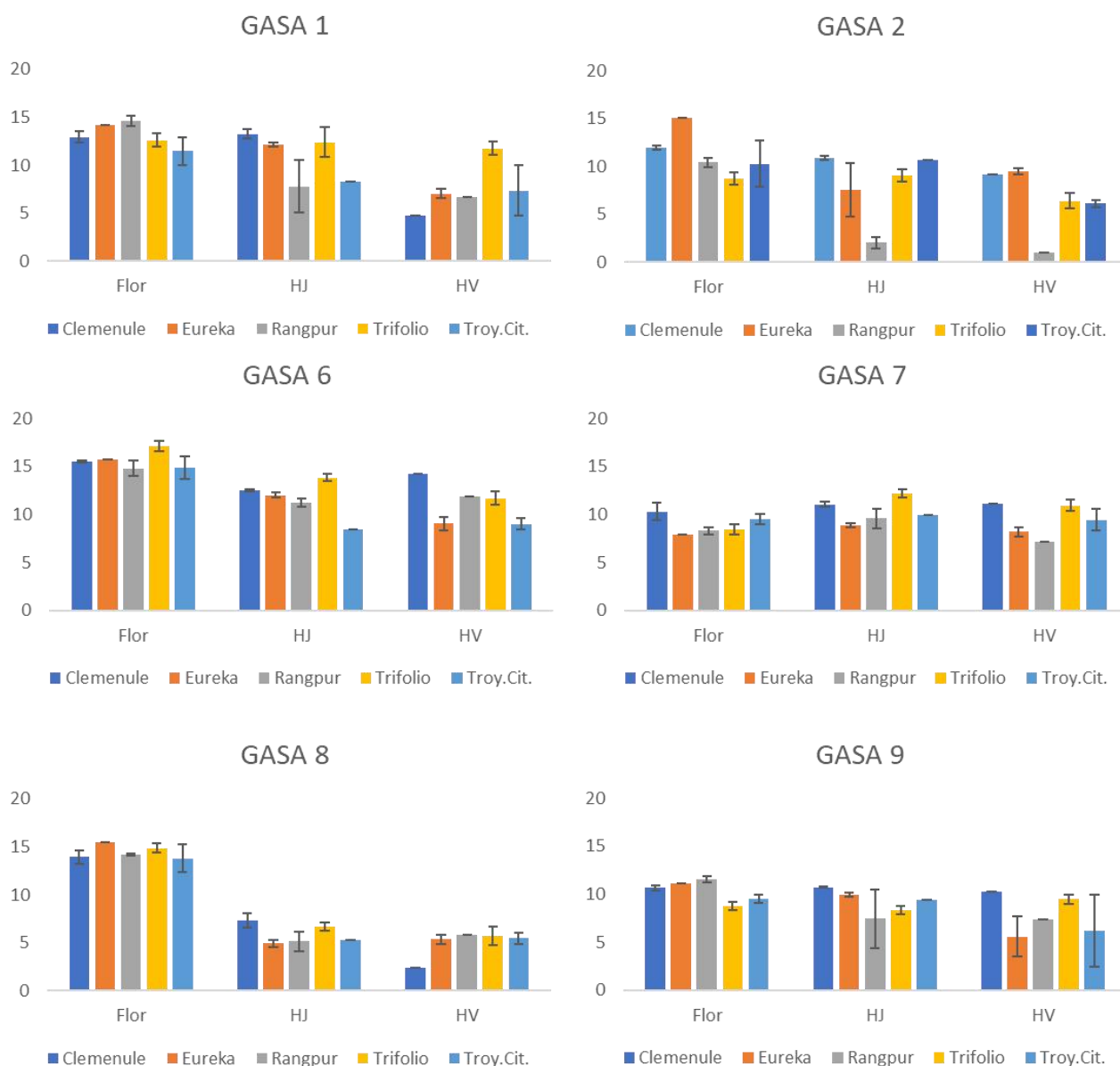


Figura III.10. Perfil de expresión de RT-qPCR relativa utilizando muestras virtuales con expresión con Ct = 40 para simular la ausencia de expresión. Se graficó el logaritmo en base 2 de la variación relativa (“fold change”) de la fluorescencia normalizada (Rn) para los genes en estudio GASA 1, GASA 2, GASA 6, GASA 7, GASA 8 y GASA 9. Se ordenaron todas las variedades en función del tejido.

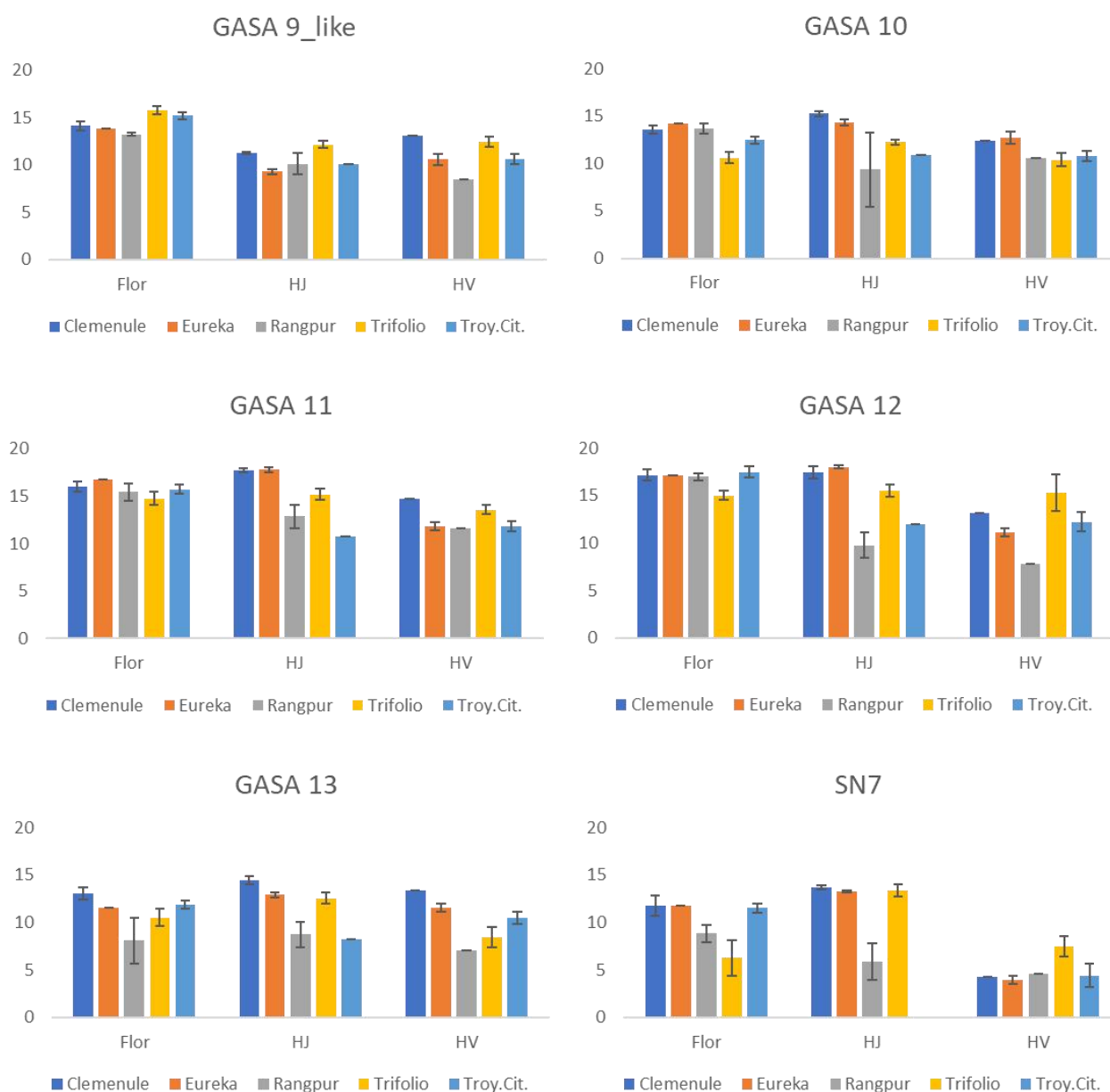


Figura III.11. Perfil de expresión de RT-qPCR relativa utilizando muestras virtuales con expresión con ct=40. Se graficó el logaritmo en base 2 de la variación relativa (*“fold change”*) de la fluorescencia normalizada (Rn) para los genes en estudio GASA 9_like, GASA 10, GASA 11, GASA 12, GASA 8, GASA 13 y SN7. Se ordenaron todas las variedades en función del tejido.

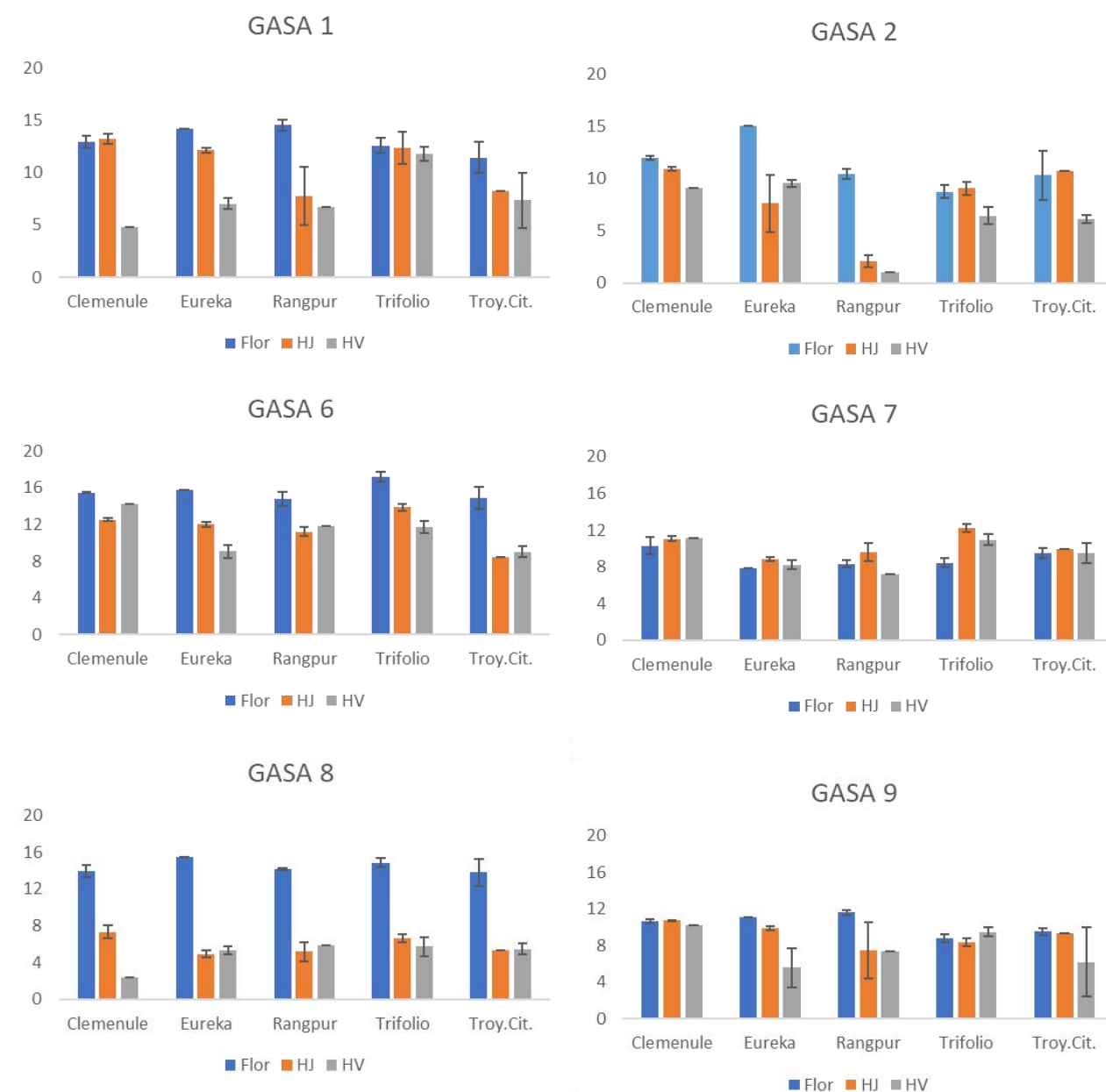


Figura III.12. Perfil de expresión de RT-qPCR relativa utilizando muestras virtuales con expresión con $ct=40$. Se graficó el logaritmo en base 2 de la variación relativa (*"fold change"*) de la fluorescencia normalizada (R_n) para los genes en estudio GAS1, GAS2, GAS6, GAS7, GAS8 y GAS9. Se ordenaron los tejidos para cada variedad de forma de visualizar el comportamiento de los tejidos en las respectivas variedades.

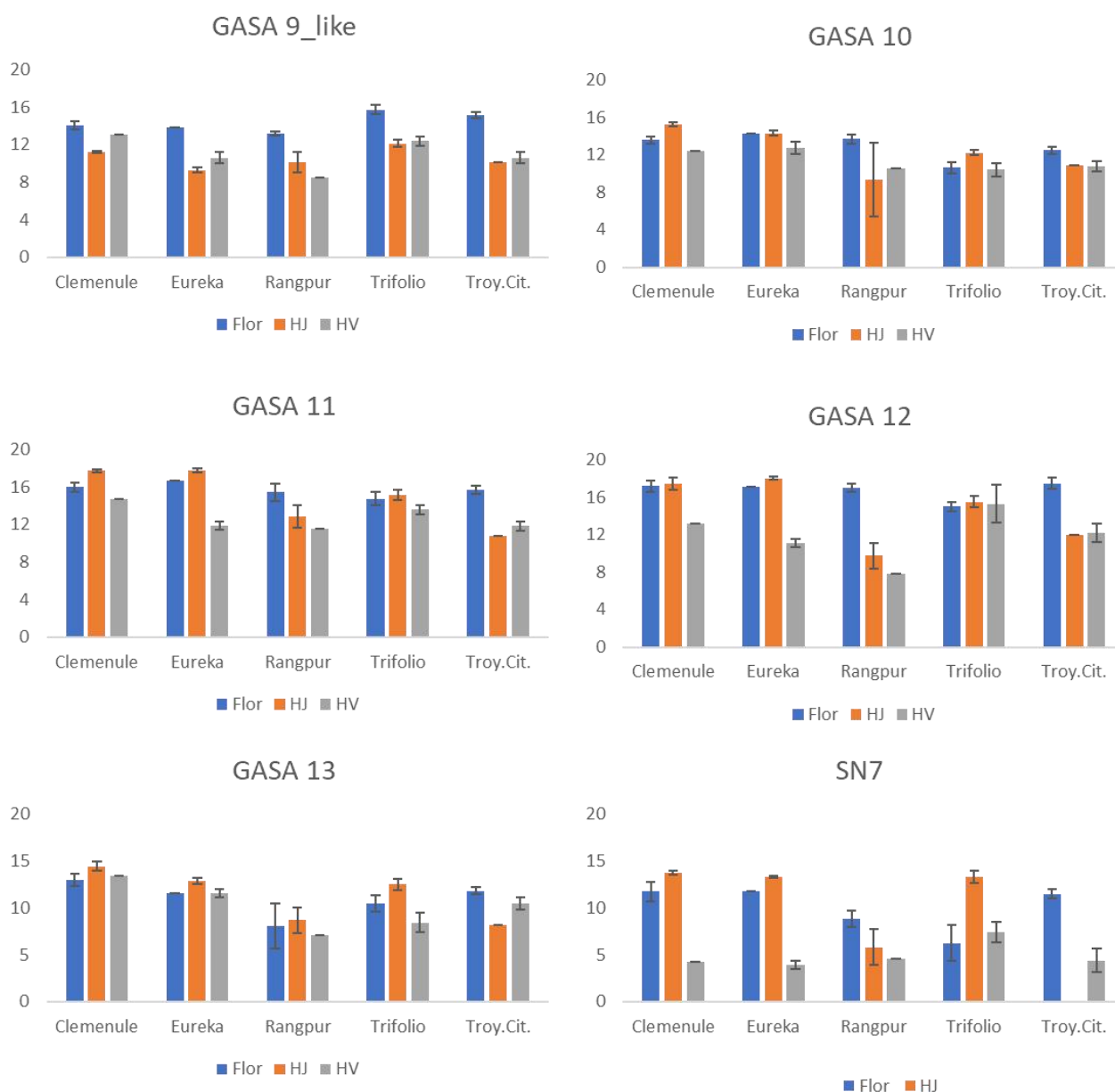


Figura III.13. Perfil de expresión de RT-qPCR relativa utilizando muestras virtuales con expresión con $ct=40$. Se graficó el logaritmo en base 2 de la variación relativa (*“fold change”*) de la fluorescencia normalizada (R_n) para los genes en estudio GASA 9_like, GASA 10, GASA 11, GASA 12, GASA 8, GASA 13 y SN7. Se ordenaron los tejidos para cada variedad de forma de visualizar el comportamiento de los tejidos en las respectivas variedades.

III.3.2 Expresión absoluta de genes SNAKIN/GASA

Con el fin de comparar los niveles de expresión basal ([sección III.3.1](#)), se usó la técnica de RT-PCR a partir de una cantidad conocida de ADN correspondiente a los vectores portando los genes GASA en estudio, tal como se describe en la [sección III.2.29](#).

A partir de los resultados obtenidos mediante dicha técnica, se representó la expresión génica mediante un gráfico de interacciones en un mapa de calor (*heatmap*). En dicho mapa los genes fueron ordenados en

función de las subfamilias a las que pertenece cada uno de los mismos (figura III.14). Las GASA 6 y GASA 13 pertenecen a la subfamilia I; GASA 9, GASA 9_like, GASA 11, GASA 8 y GASA 7 pertenecen a la subfamilia II; las GASA 12, GASA 1 y GASA 10 pertenecen a la subfamilia III.

En todas las subfamilias analizadas, se observaron genes con expresión alta en los tejidos de interés (hoja joven y/o floral) en las variedades estudiadas. Además, algunos de los genes estudiados presentaron una expresión baja para todos los tejidos (hoja joven, hoja madura y flor). Entre los genes con buena expresión en los tejidos de interés se encuentran: GASA6 (subfamilia I); GASA8, GASA9_like y GASA11 (subfamilia II); y GASA1, GASA10 y GASA12 (subfamilia III). En cambio, GASA13 (subfamilia I), GASA7 y GASA9 (subfamilia II) no mostraron una expresión destacada en ninguno de los tejidos evaluados.

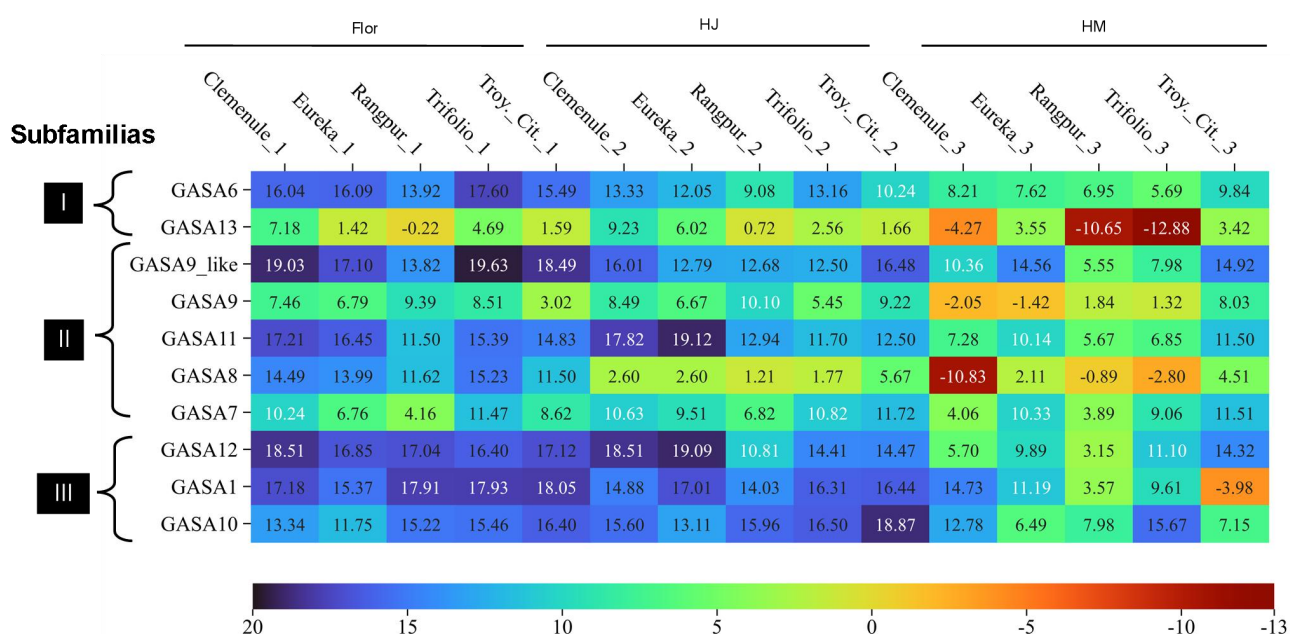


Figura III.14. Heatmap representativo de la expresión génica medida como $\log_2(\text{Número de Copias GASA}_x)$, empleando RT-qPCR absoluta de tejido floral (Flor), hoja joven (HJ), hoja madura (HM) de las variedades de cítricos *Citrus limon* var. *eureka*, *Citrus clementina* var. *clemenule*, *Citrus limonia* Osbeck (Rang Lima Rangpur), Citrange Troyer (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*), *Poncirus trifoliata*, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf (*Poncirus trifoliata* – Rubidoux). El esquema obtenido mediante la herramienta Chiplot (<https://www.chiplot.online/heatmap.html>), emplea una escala que va desde el color azul oscuro, correspondiente con la máxima expresión, hasta el rojo, que se corresponde con su mínimo. A la izquierda se observan los genes GASA analizados e indicando subfamilia correspondiente (I, II o III).

III.3.3 Selección de genes SNAKIN/GASA para la caracterización funcional

Para la selección de los genes candidatos a evaluar, se propuso realizar la evaluación funcional de un gen representativo por subfamilia, mediante infecciones en patosistemas modelo, para determinar si dichos genes candidatos podrían actuar como péptidos antimicrobianos frente a bacterias fitopatógenas. La hipótesis planteada (secciones [III.3.1](#) y [III.3.2](#)) fue que los genes candidatos debían presentar una expresión génica elevada en tejidos jóvenes de desarrollo, tal como se ha demostrado previamente para otros péptidos antimicrobianos (Segura et al., 1999; Herbel et al., 2017; Meneguetti et al., 2017; Bouteraa et al., 2023).

Teniendo en cuenta que en todas las subfamilias hay genes con inducción alta en los tejidos florales y HJ ([Sección III.3.2](#)), se decidió seleccionar un gen por subfamilia para continuar con la caracterización funcional. Para la subfamilia I, familia de la *StSN1*, se decidió seleccionar *PtGASA6*, única en esta familia con buena expresión. En el caso de la subfamilia II, se pudo observar que varios miembros presentan las condiciones deseadas, estos son *PtGASA8*, *PtGASA9_like* y *PtGASA11*.

PtGASA8 presentó una buena expresión en el tejido floral de *P. trifoliata* y además es la única que tiene disminuida la expresión en Rangpur, variedad de mayor susceptibilidad a patógenos (Palacios, 2005; Ramadugu et al., 2016). Este patrón se interpretó como un indicio de que *GASA8* podría contribuir desde el fondo genético de *P. trifoliata*, a la tolerancia a la enfermedad, siendo a su vez uno de los genes con buena expresión en esta variedad en el tejido de interés. Por ello, se seleccionó este miembro para la subfamilia II. Asimismo, diferentes autores demuestran inducción de este gen frente a infecciones con *Xcc* (Wu et al., 2021) y además, tiene una tendencia a tener inducción frente a HLB, según se reporta en el *BioProject* PRJNA755969 en *Microcitrus australasica* (Weber et al., 2022), especie que presenta tolerancia o resistencia (Palacios, 2005; Ramadugu et al., 2016; Alves et al., 2021; Huang et al., 2021b).

Finalmente, en lo que respecta a la subfamilia III se identificaron tres genes con niveles elevados de expresión en tejido floral y en hoja joven: *GASA1*, *GASA10* y *GASA12*. Estos genes mostraron una expresión destacada en flores en todas las variedades analizadas y buena expresión en hoja joven (figura III.14). Cabe resaltar que la mayor expresión de estos genes se observó en *P. trifoliata* y Citrange Troyer, variedades reconocidas por su resistencia a patógenos.

A su vez, *GASA1* y *GASA10* también evidenciaron buena expresión en hoja joven. Además, *GASA10* presentó una expresión marcadamente superior en las variedades más tolerantes (Citrange Troyer y *P. trifoliata*) y niveles bajos en dos de las variedades más susceptibles (*C. clementina* y *C. limon* var. *Eureka*), como se muestra en la figura III.14 (Palacios, 2005; Ramadugu et al., 2016; Munir et al., 2017; Alves et al., 2021; Huang et al., 2021b; Weber et al., 2022). Por estos motivos, *GASA10* fue seleccionado como gen candidato para los ensayos funcionales posteriores.

Por todo lo expuesto, se seleccionaron los genes *GASA6*, *GASA8* y *GASA10* para hacer la caracterización funcional y se decidió utilizar los genes de *P. trifoliata* para realizar la caracterización funcional a los que se denominaron *PtGASA6*, *PtGASA8*, *PtGASA10*, respectivamente.

III.3.4 Caracterización funcional: Ensayo *in vivo* en plantas modelo de *Nicotiana benthamiana*

Se desarrollaron dos ensayos *in planta*. Uno de ellos se diseñó para evaluar la respuesta frente a un patógeno bacteriano de interés en cítricos, mediante un patosistema con *N. benthamiana* que resulta incompatible con la enfermedad, es decir, presenta resistencia evidenciada por la aparición de una HR. El segundo ensayo permitió una evaluación más completa, utilizando un patógeno propio de *N. benthamiana* para poder observar la interacción compatible a partir del desarrollo de síntomas de enfermedad en un patosistema de susceptibilidad, como se observa en la figura III.15. En ambos ensayos, se co-infiltró cada fitopatógeno con *A. tumefaciens* para la expresión los genes seleccionados en la [sección III.3.3](#) o con el vector vacío como control. Se evaluó presencia e intensidad de respuesta HR visible macroscópicamente, así como los síntomas de enfermedad respectivamente, según la figura III.16.

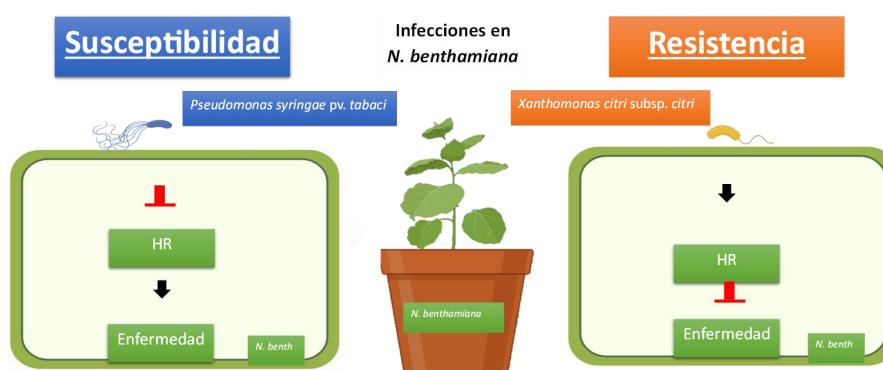


Figura III.15. Esquema de los ensayos realizados *in planta* para las infecciones con *Ps tab* y *Xcc*. *Ps tab* genera una infección compatible en plantas de *N. benthamiana* debido a que es un patógeno natural de esta especie. La misma se debe a que este patógeno suprime la inmunidad basal y también la HR (Shamrai, 2014), o inmunidad y por ende desarrolla la enfermedad del fuego salvaje.

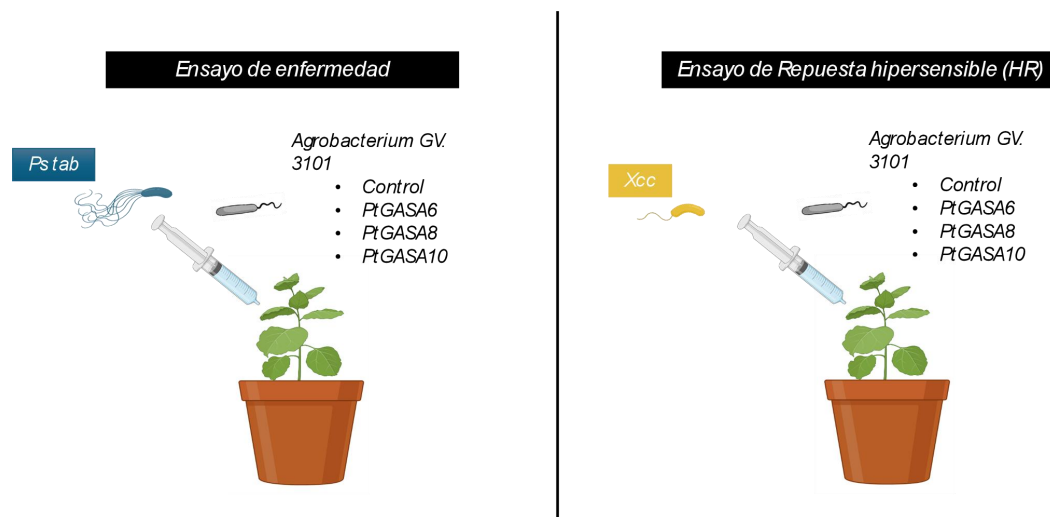


Figura III.16. Esquema de la co-infiltración de cada uno de los fitopatógenos *Ps tab* (derecha) y *Xcc* (izquierda) con *A. tumefaciens* expresando los genes GASA (GASAx) de *P. trifoliata* por la cara abaxial de hojas *N. benthamiana*..

III.3.5 Las plantas sobreexpresan los genes *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10*

Se seleccionaron los genes *PtGASA6*, *PtGASA8*, *PtGASA10* para la caracterización funcional, tal como se detalló en la [sección III.3.3](#). Para ello, se infiltraron plantas jóvenes de aproximadamente un mes de desarrollo, como se describe en la [sección III.2.3](#), con *A. tumefaciens* GV. 3101 expresando los genes previamente seleccionados ([sección III.3.3](#)) o utilizando una bacteria sin vector como control. Como gen de referencia se empleó el factor de elongación 1 α (EF-1 α , SGN-U446573) previamente descrito (Conti, 2005).

La sobreexpresión de los genes *PtGASA6*, *PtGASA8*, *PtGASA10* fue observada de forma significativa (p-valor < 0,001) en los tejidos infiltrados con *A. tumefaciens* GV. 3101 transformada con las correspondientes construcciones (figura III.17). Como se esperaba, no se observó sobreexpresión en los genes GASA no diana, es decir, en aquellos tejidos que no fueron infiltrados con la construcción específica para su sobreexpresión (tabla III.7, figura III.17).

Se observó que la sobreexpresión de *PtGASA6*, *PtGASA8*, *PtGASA10* fue de 9,28, 6,72, o 5,78 veces con respecto al control, respectivamente (tabla III.7, figura III.17).

A partir de estos resultados se decidió continuar la caracterización funcional de estos genes. Para ello, se implementaron dos ensayos que permitieron visualizar de manera macroscópica, la sintomatología asociada a enfermedad o a HR en plantas sobreexpresantes transitoriamente.

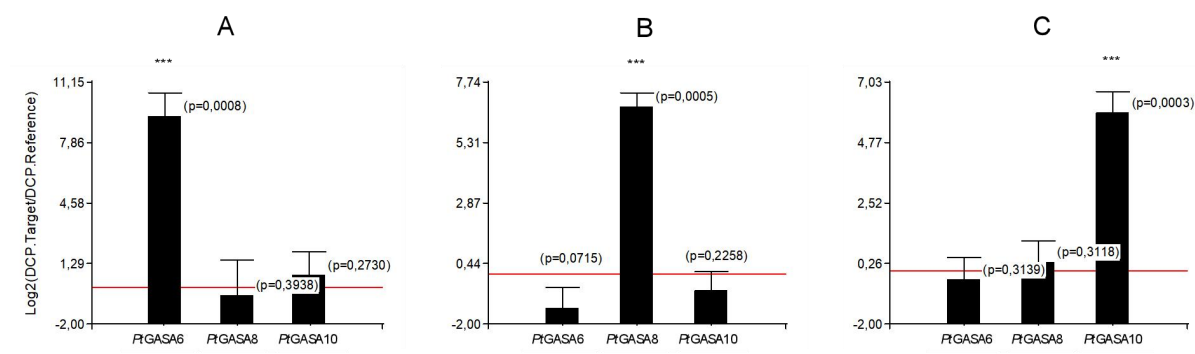


Figura III.17 Análisis de la expresión de los genes *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10* medido como $\text{Log}_2\left(\frac{\Delta\text{CtGASAx}}{\Delta\text{CtControl}}\right)$. Expresión medida de tejido extraído de hojas luego de 48 h de infiltración con *A. tumefaciens* GV. 3101 expresando *PtGASA6*, *PtGASA8* o *PtGASA10* bajo un promotor constitutivo35S. Se expresó de forma ectópica transitoriamente *PtGASA6* (A), *PtGASA8* (B), *PtGASA10* (C). Se observó de forma esperada la sobreexpresión con respecto al control de los genes *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10* respectivamente. En cambio, no se registró sobreexpresión de los genes no diana, es decir, aquellos que no fueron expresados. Las diferencias significativas se realizaron utilizando el software FgStatistics (Di Rienzo J.A, 2009) que permite realizar la comparación de expresión relativa para RT-qPCR, se muestra con *** indicando p-valor < 0,001.

Tabla III.7: con valores de expresión de los genes *PtGASA6*, *PtGASA8*, *PtGASA10* en plantas sobreexpresantes transitoriamente

Sobreexpresión	Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2(Ratio))	p-value
PtGASA6	Control	PtGASA6	623,7	1274,28	9,28	1,24	0,0008
PtGASA6	Control	PtGASA8	0,74	4,29	-0,44	1,96	0,3938
PtGASA6	Control	PtGASA10	1,54	4,64	0,62	1,36	0,273
PtGASA8	Control	PtGASA6	0,38	0,26	-1,39	0,88	0,0715
PtGASA8	Control	PtGASA8	105,52	39,89	6,72	0,59	0,0005
PtGASA8	Control	PtGASA10	0,64	0,24	-0,65	0,71	0,2258
PtGASA10	Control	PtGASA6	0,78	0,97	-0,35	0,87	0,3139
PtGASA10	Control	PtGASA8	1,23	1,11	0,3	0,84	0,3118
PtGASA10	Control	PtGASA10	58,6	46,21	5,87	0,8	0,0003

III.3.6 Puesta a punto de ensayos HR y enfermedad

Con el fin de poder evaluar el efecto antimicrobiano, se realizaron dos puestas a punto de dos patosistemas con *N. benthamiana*: uno compatible, utilizando *Ps tab*, y otro incompatible, con *Xcc*, un patógeno de cítricos que induce la HR, motivo por el cual fue incorporado al estudio, como se detalla en la [sección III.1.3](#). Para establecer las condiciones óptimas de infección en invernáculo, se determinaron las concentraciones de inóculo necesarias para que cada patógeno generara sintomatología visible (macroscópica): de enfermedad y HR, respectivamente. Por lo cual primero se realizaron infecciones en ausencia de *A. tumefaciens* GV. 3101.

Luego, en base a ensayos similares en el laboratorio, la sobreexpresión transitoria de genes alcanza su máxima expresión entre las 48 y 72 hpi, se seleccionaron concentraciones de inóculo de ambas bacterias que permitieran detectar la sintomatología deseada en ese momento.

Para llevar a cabo las infecciones con ambos patógenos y sobreexpresar los genes candidatos, se optó por co-infiltrar cada patógeno con *A. tumefaciens* GV. 3101 portando el vector de sobreexpresión pK2GW7::GASAx o pK2GW7::vv. Como control de infección, se incluyó la infección con el patógeno en ausencia de *A. tumefaciens* GV. 3101.

La decisión de realizar co-infiltraciones se tomó con el fin de lograr la sobreexpresión génica de manera simultánea al inicio de la aparición de la sintomatología, minimizando a su vez el daño del tejido foliar. Dado que las infiltraciones se llevaron a cabo mediante el uso de jeringa, resultaba fundamental evitar un estrés adicional en el tejido que pudiera inducir respuestas inespecíficas. El daño provocado por la agroinfiltración podría haber interferido con la correcta visualización de los síntomas, generando resultados erróneos o dificultando su interpretación. Esta estrategia fue respaldada por un reporte previo en el que se co-infiltraron con *A. tumefaciens* y *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* para demostrar el efecto antimicrobiano de un péptido de arroz de la familia SNAKIN/GASA, mediante la observación de sintomatología de enfermedad (Boonpa et al., 2018). Este antecedente permitió validar la co-infiltración como una aproximación válida y eficiente para analizar el efecto de la sobreexpresión génica frente a la infección bacteriana.

Se utilizó una única construcción por planta, dado que los AMPs, y en particular las SNAKINAS, son proteínas pequeñas cuyo mecanismo de acción aún no se encuentra completamente elucidado (Oliveira-Lima et al., 2017; Almasia et al., 2020; Wu et al., 2020; Bouteraa et al., 2023). Al desconocerse si son capaces de atravesar la membrana plasmática de las células vegetales, no es posible aseverar si estas se restringen al apoplasto o si pueden difundir hacia otras zonas. En este contexto, la utilización de múltiples construcciones en una misma planta (misma hoja, [sección III.2.3](#)) podría inducir efectos cruzados o interferencias, comprometiendo así la correcta interpretación de los resultados. Por este motivo, se optó por emplear una única construcción por planta.

Para ambos ensayos, se realizaron 6 infiltraciones por hoja, manteniendo las mismas 6 posiciones en todas las plantas con el fin de evitar variaciones en la respuesta debidas a la ubicación dentro del tejido foliar (para ver detalles del análisis estadístico ver [sección III.2.4.2](#)), tal como se describe a continuación en las secciones [III.3.7](#) y [III.3.8](#), correspondientes a los ensayos de enfermedad y HR, respectivamente.

III.3.7 La sobreexpresión de los genes *PtGASA6* y *PtGASA10* retrasa la enfermedad causada por la infección de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* en el ensayo de enfermedad

Según lo expuesto en las secciones [III.3.4](#) y [III.3.5](#), se realizó el ensayo de enfermedad con *Ps tab* para evaluar la respuesta al desarrollo de síntomas de necrosis. Estos genes, provenientes de *P. trifoliata*, fueron seleccionados por tratarse de la variedad analizada con mayor resistencia a enfermedades y, en particular, considerada tolerante frente a HLB (Palacios, 2005; Ramadugu et al., 2016; Munir et al., 2017; Alves et al., 2021; Huang et al., 2021b; Weber et al., 2022).

Para realizar el ensayo, tal como se describe en la [sección III.3.6](#), se co-infiltró con *A. tumefaciens* GV. 3101 y *Ps tab* (figura III.18). Además, se incluyó un control de infección en ausencia de *A. tumefaciens* GV. 3101. En estas condiciones se cuantificó la necrosis asociada a enfermedad (figura III.19). El ensayo se llevó a cabo en 15 plantas por cada gen sobreexpresado, infiltrando una hoja joven con el mismo estado de desarrollo por planta, en las mismas 6 posiciones, según se indica en la [sección III.3.6](#), tal como se observa en la figura III.18.

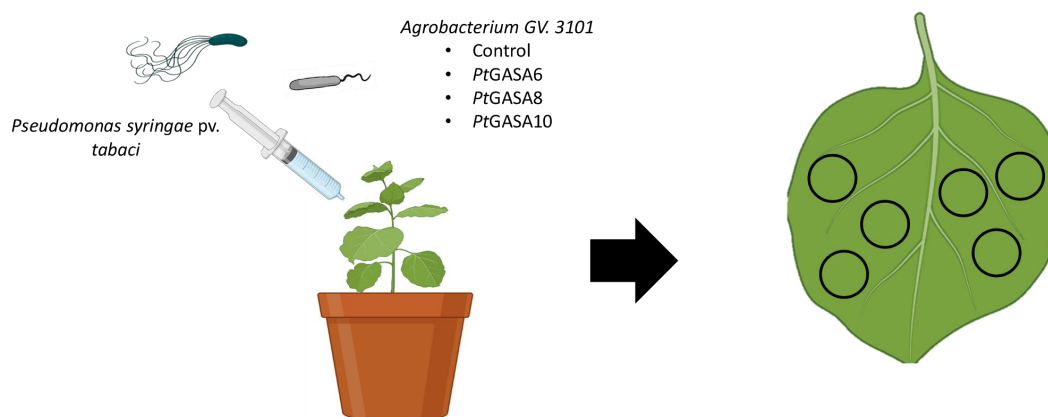


Figura III.18. Esquema del desafío con el fitopatógeno *Ps tab* en co-infiltración con *A. tumefaciens* GV. 3101 sobreexpresando los genes *PtGASA6*, *PtGASA8*, *PtGASA10* o el control en una relación 1:1.

Las plantas fueron observadas desde las 24 h, con al menos una observación diaria. Los primeros síntomas comenzaron a observarse partir del día 4 post-infección, momento en el que se inició la puntuación de los mismos. La sintomatología fue registrada durante dos semanas. En algunos ensayos, entre los días 6 y 11 post-infección, se extrajeron diariamente 5 hojas, los cuales fueron fotografiadas, seleccionándose posteriormente las imágenes más representativas para su presentación (figura III.19). Durante los primeros días de observación, el control positivo presentó sintomatología asociada a enfermedad, al igual que las plantas que sobreexpresaban el gen *PtGASA8*. En cambio, las plantas sobreexpresantes *PtGASA6* y *PtGASA10* presentaron una sintomatología marcadamente más reducida, siendo sensiblemente menor en el caso de *PtGASA10* (figura III.19).

Día

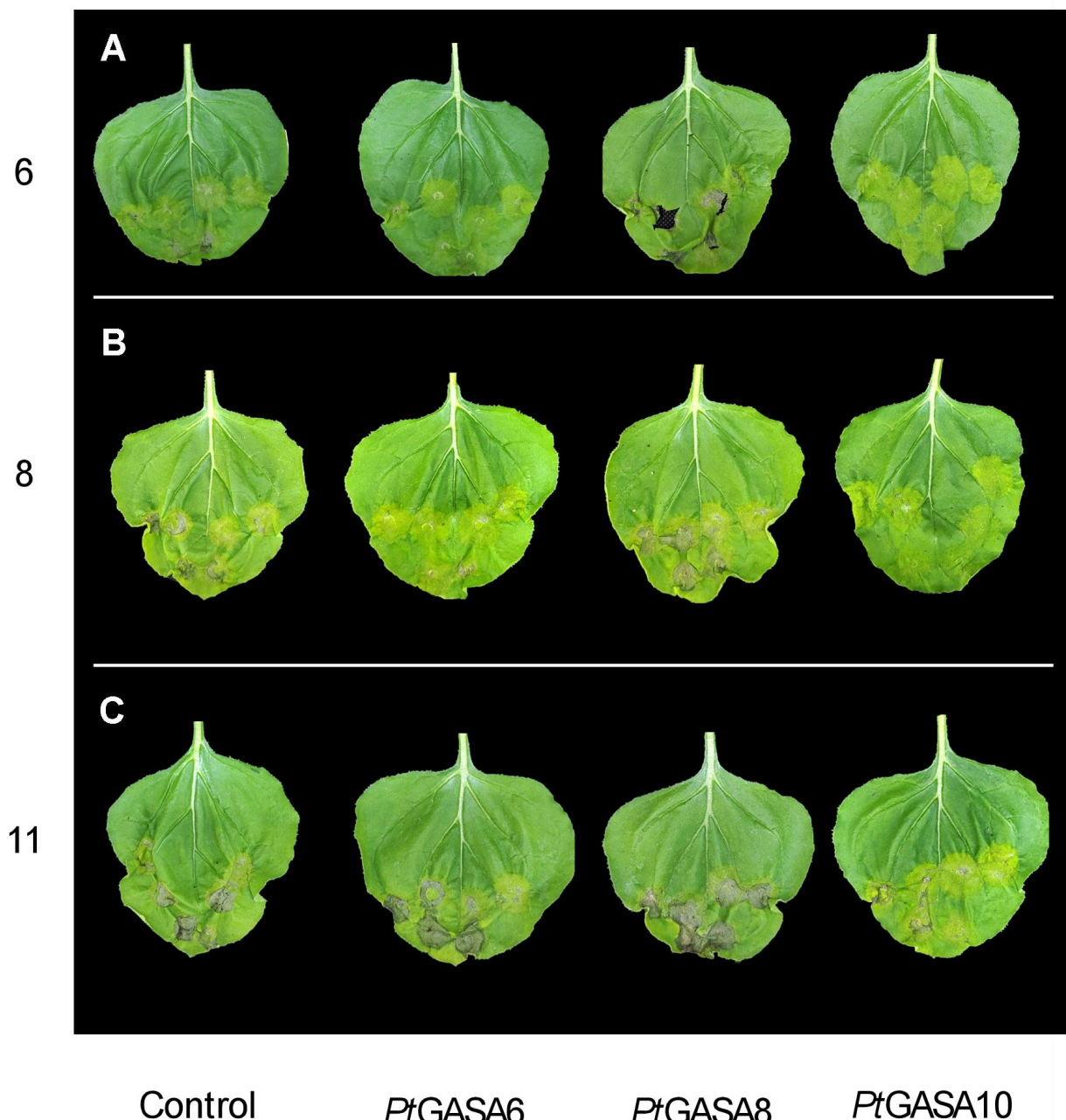
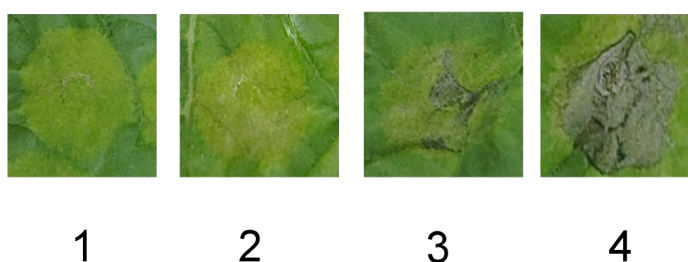


Figura III.19. Foto representativa de una hoja por tratamiento de la enfermedad en hojas de *N. benthamiana* sobreexpresando transitoriamente los genes *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10* o el control para los días 6 (**A**), 8 (**B**), 11 (**C**) post-infección. Cada hoja se co-infiltró en las mismas 6 posiciones con *A. tumefaciens* GV. 3101 expresando los genes nombrados y el agente patógeno *Ps tab*. Dado que este patógeno, por ser natural de *N. benthamiana* no desarrolla HR, se visualizó la necrosis parcial o total en cada círculo, visibles como manchas amarillentas. Se pudo observar que las hojas control y *PtGASA8* presentaron una proporción alta de hojas con presencia de sintomatología abundante de enfermedad, mientras que las *PtGASA6* y *PtGASA10* tienen retrasados los síntomas de enfermedad de forma significativa, siendo aún mayor el retraso en las plantas sobreexpresantes *PtGASA10*.

Se evaluó la severidad de los síntomas observados en cada uno de los círculos infiltrados de cada hoja mediante una escala ordinal con valores de 1 a 4 bajo el concepto de índice de enfermedad (DI), (del inglés, *disease index*) (Schandry, 2017). En la figura III.20 se observa la representación visual de cada valor utilizada en el ensayo.

La evaluación consistió en estimar el área afectada en función con la superficie total de cada círculo, promediando los valores de los 6 círculos por hoja en un único valor ([sección III.2.4.2](#)), según el DI observado, tal como se muestra en la figura III.20B. Esto permitió obtener una relación numérica representativa para cada hoja, y por consiguiente para cada planta, contribuyendo a reducir la dispersión de los datos al normalizar la información.

A



B

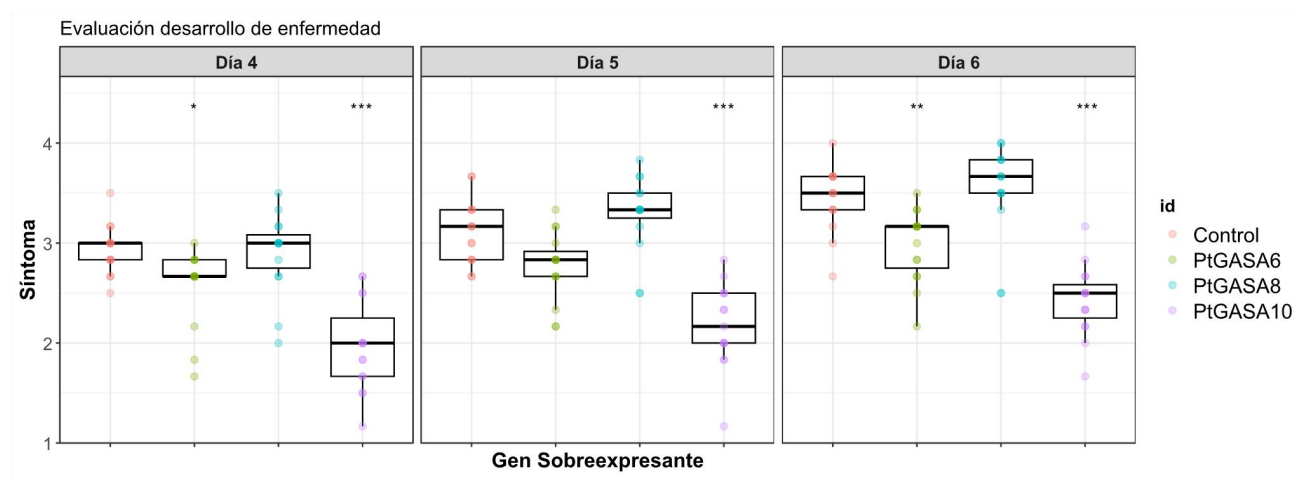
Área ocupada	DI	Observado
0 – 25%	1	Clorosis de base asociada a la inoculación
25 - 50 %	2	25 – 50% del área ocupada por enfermedad - comienzo de necrosis y clorosis asociada a sintomatología de la enfermedad
50 – 75 %	3	> 50% del área ocupada por enfermedad - avance de la necrosis asociado a enfermedad
75 - 100 %	4	100% de área ocupada por enfermedad – Completamente necrosado

Figura III.20. (A) Imágenes representativas de la escala de la sintomatología visualizada en los ensayos de enfermedad empleando al fitopatógeno *Ps tab*, siendo 1 la representación el fondo causado por la infiltración de la mezcla entre *A. tumefaciens* y *Ps tab* a los 3 dpi, y 4 la mayor expresión de la sintomatología contemplando la coloración necrótica, así como el área afectada del círculo. **(B)** Escala representativa del DI utilizado para realizar los análisis cuantitativos de avance de enfermedad.

En las repeticiones del ensayo se observó, de modo consistente, un retraso significativo en la aparición de la sintomatología necrótica asociada a la enfermedad. En la figura III.21 se grafica la sintomatología registrada para cada construcción de sobreexpresión a lo largo de los días posteriores al desafío. El día 4 evidenció diferencias significativas para las construcciones *PtGASA6* (p-valor < 0,05) y *PtGASA10* (p-valor < 0,001).

Si bien en el día 5 se redujo la diferencia entre el control y *PtGASA6*, probablemente debido a la progresión de los síntomas, para el día 6 ambas construcciones presentaron un retraso significativo en la aparición de la sintomatología (p-valor < 0,01 para *PtGASA6* y p-valor < 0,001 para *PtGASA10*).

En particular, *PtGASA6* y *PtGASA10* lograron retrasar el desarrollo de los síntomas entre un 13-10% y 50-40%, respectivamente, durante los días 4 a 6.



III.21. Evaluación del desarrollo de enfermedad en los días 4, 5 y 6 post-desafío causado por *Ps tab* en hojas sobreexpresando los genes candidatos, empleando una mezcla de *A. tumefaciens* expresando los genes *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10*, o sin plásmido (control). Se utilizó una mezcla final con *A. tumefaciens* DO₆₀₀ = 0,6 y 1×10^6 UFC/ml de *Ps tab*. El análisis estadístico no paramétrico empleado fue el test de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad ajustando mediante el método de Bonferroni con respecto al control. La estadística se muestra con asteriscos donde: * p-valor < 0,05; ** p-valor < 0,01; *** p-valor < 0,001.

Asimismo, se realizó una evaluación mediante la determinación del AUDPC, que permite evaluar el progreso de la enfermedad en el tiempo. Esta herramienta resulta más sensible a los cambios en el desarrollo de la sintomatología, ya que considera tanto la severidad como la duración de la enfermedad. Sin embargo, dado que el AUDPC reduce la evolución temporal a un único valor por planta, también implica una pérdida de información (Nutter et al., 2006; Schandry, 2017). Por este motivo, se consideró necesario complementar ambos enfoques: la evaluación diaria, como se presentó previamente, y el análisis mediante el AUDPC.

Por ello, se generaron las curvas de progresión de la enfermedad en función de DI (figura III.20). Dichas curvas permiten evaluar la progresión en el tiempo de la enfermedad y visibilizar si la aceleración de la enfermedad cambia entre los tratamientos, por ejemplo, a partir de la pendiente. En cuanto al AUDPC, se observó un retraso de 10,15% (p-valor < 0,05) y 46,15% (p-valor < 0,01) de *PtGASA6* y *PtGASA10*, respectivamente. Por el contrario, *PtGASA8* se comportó comparable al control.

A partir de las curvas de progresión de la enfermedad, se observó que el inicio de la enfermedad, es decir el punto de origen fue diferente, siendo *PtGASA6* y *PtGASA10* las que presentaron un retraso en el inicio de la

sintomatología causados por la enfermedad (figura III.22). No obstante, la pendiente de la curva de progreso de la enfermedad (figura III.22A), que refleja la velocidad de avance en el tiempo, no presentó diferencias entre sobreexpresantes y el control. Del mismo modo, no se obtuvo una respuesta alterada para la sobreexpresión de *PtGASA8*. Es notable destacar que, realizando una comparación de *ratios* entre las medianas mediante comparación de a pares usando el rango de Wilcoxon con corrección de continuidad, *PtGASA10* mostró un retraso significativamente mayor en la progresión de la enfermedad, con un 32,7 % menor AUDPC en comparación con *PtGASA6* (p-valor < 0,01).

De esto se desprende que el retraso de la enfermedad fue perceptible, manteniéndose hasta, al menos, una semana posterior al desafío. Es decir, que hasta ese momento no se emparejaron los tratamientos, lo que se correlaciona con la evaluación diaria realizada (figura III.21) y confirma lo observado mediante las curvas de progresión de enfermedad (figura III.22A): que la velocidad de la enfermedad no se modificó, sino únicamente el punto de partida. En este sentido, es fundamental destacar que el retraso observado coincide con el período en el que ocurre la sobreexpresión de los genes, la cual es transitoria y comienza a disminuir luego de alcanzar su pico máximo, aproximadamente 72 horas después de la inoculación con *A. tumefaciens*.

Finalmente, es relevante destacar que estos resultados obtenidos se basan en la confirmación de la sobreexpresión de los genes diana, como se menciona en la [sección III.2.3.1](#). En este sentido, *PtGASA10* fue el gen que presentó el mayor efecto en el retraso de enfermedad, tanto en la evaluación diaria (figura III.21), como en la realizada mediante AUDPC (figura III.22B). A pesar de tener una menor sobreexpresión, aproximadamente de la mitad, tal como se describe en la [sección III.3.5](#), con un *ratio* de 5,87 (Tabla III.7), su impacto fue superior en comparación con *PtGASA6*, que presentó un *ratio* de 9,28. Esto sugiere que el efecto observado en *PtGASA10* podría ser más potente, posiblemente indicando que podría estar afectando más directamente en alguna vía asociada al desarrollo de enfermedad (Tabla III.7). No obstante, *PtGASA6* también ha generado un retraso de la sintomatología, pero más gradual y moderado. En cambio, *PtGASA8* no presentó un efecto diferente al observado con respecto al control.

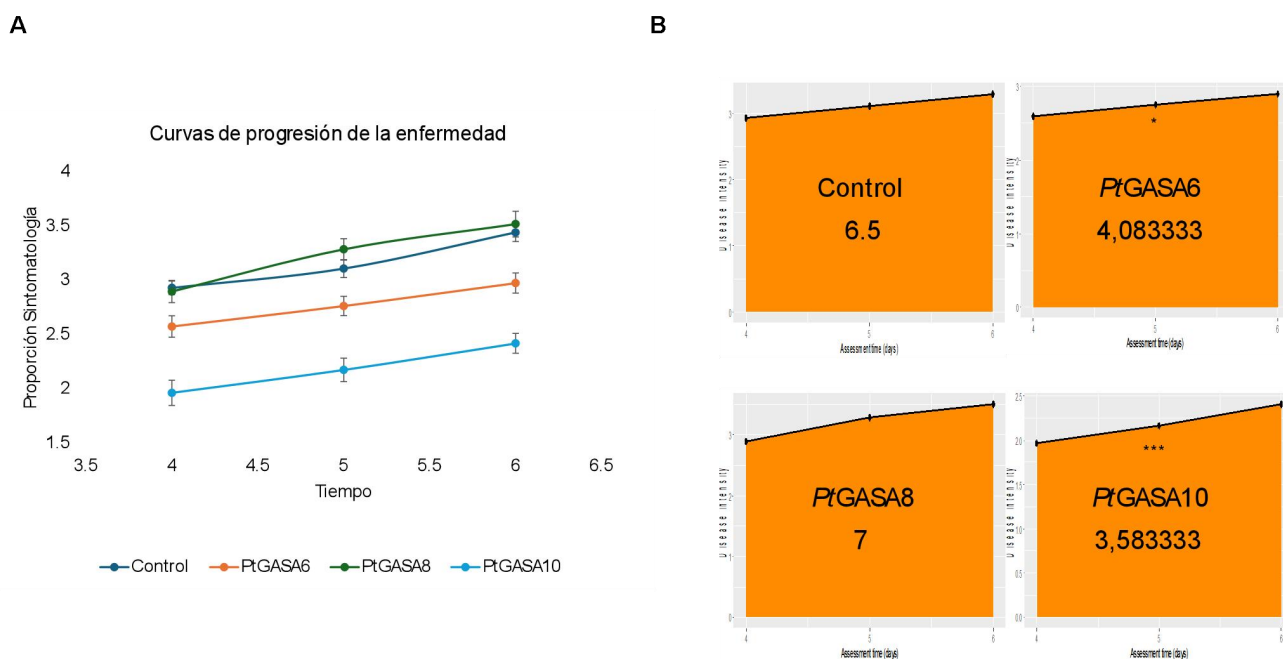


Figura III.22. Evaluación del desarrollo de enfermedad causado por *Ps. tab* en hojas sobreexpresando los genes *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10*, empleando una mezcla de *A. tumefaciens* expresando los genes *PtGASA6*, *PtGASA8* o *PtGASA10*, o sin plásmido (control). Se hizo una mezcla 1:1 de con *A. tumefaciens* DO₆₀₀= 0,6 y 2×10^6 UFC/ml de *Ps. tab* **(A)** Curva de progresión de la enfermedad, evaluando DI en función del tiempo. Se puede observar en color azul el crecimiento de la enfermedad para el control, naranja, verde y celeste para *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10* respectivamente. El incremento de la sintomatología fue mayor para el control y *PtGASA8*, mientras que *PtGASA6* y *PtGASA10* presentaron un incremento significativamente menor. **(B)** AUDPC de cada uno de los genes sobreexpresantes y el control, demostrando un menor crecimiento para los genes *PtGASA6* y *PtGASA10* del desarrollo de la enfermedad con respecto al control. El análisis estadístico no paramétrico empleado fue el test de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad ajustando mediante el método de Bonferroni con respecto al control. La estadística se muestra con asteriscos donde: * p-valor < 0,05; *** p-valor < 0,001.

III.3.8 La sobreexpresión de los genes *PtGASA6* y *PtGASA10* adelanta la Respuesta Hipersensible generada por la infección de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Con el fin de caracterizar el efecto de un patógeno bacteriano relevante para la citricultura y además, permita profundizar en el conocimiento sobre cómo la sobreexpresión de los genes SNAKIN/GASA afecta a la inmunidad, se empleó al fitopatógeno *Xcc*, el cual genera HR en infecciones en *N. benthamiana* (Caserta et al., 2019).

Con tal fin, se sobreexpresaron los genes *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10*, tal como se describe en la [sección III.3.6](#), y, de forma análoga a lo que se detalló en la [sección III.3.7](#), se generó una co-inoculación empleando *A. tumefaciens* GV. 3101 y *Xcc*, incluyendo un control de infección en ausencia de *A. tumefaciens* GV. 3101.

De manera similar, las inoculaciones se realizaron en las mismas 6 posiciones de las 15 hojas para cada gen, como se esquematiza en la figura III.23. El ensayo fue repetido en dos ocasiones, obteniéndose resultados

comparables en ambos casos. En este punto, cabe destacar que el uso de un alto número de réplicas técnicas (15 por cada gen candidato) confiere solidez estadística al estudio, al reducir la dispersión atribuida a efectos aleatorios. Esto contrasta con la mayoría de los ensayos de este tipo, que suelen emplear un número reducido de plantas (Boonpa et al., 2018; Norkunas et al., 2018).

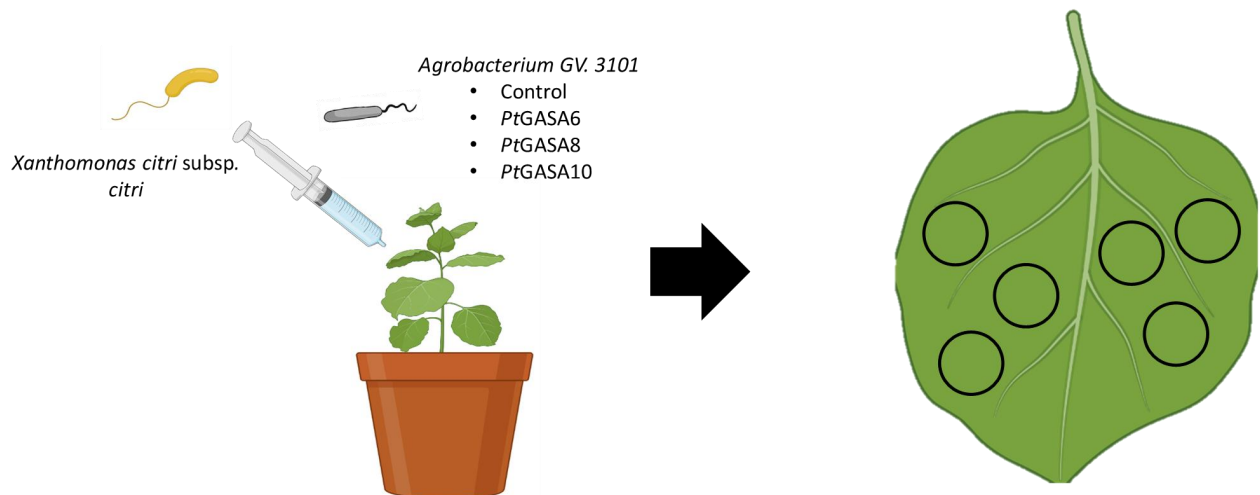


Figura III.23. Esquema del desafío con *Xcc* – *A. tumefaciens* GV. 3101 sobreexpresando los genes *PtGASA6*, *PtGASA8*, *PtGASA10* o el control en una relación 1:1.

Día

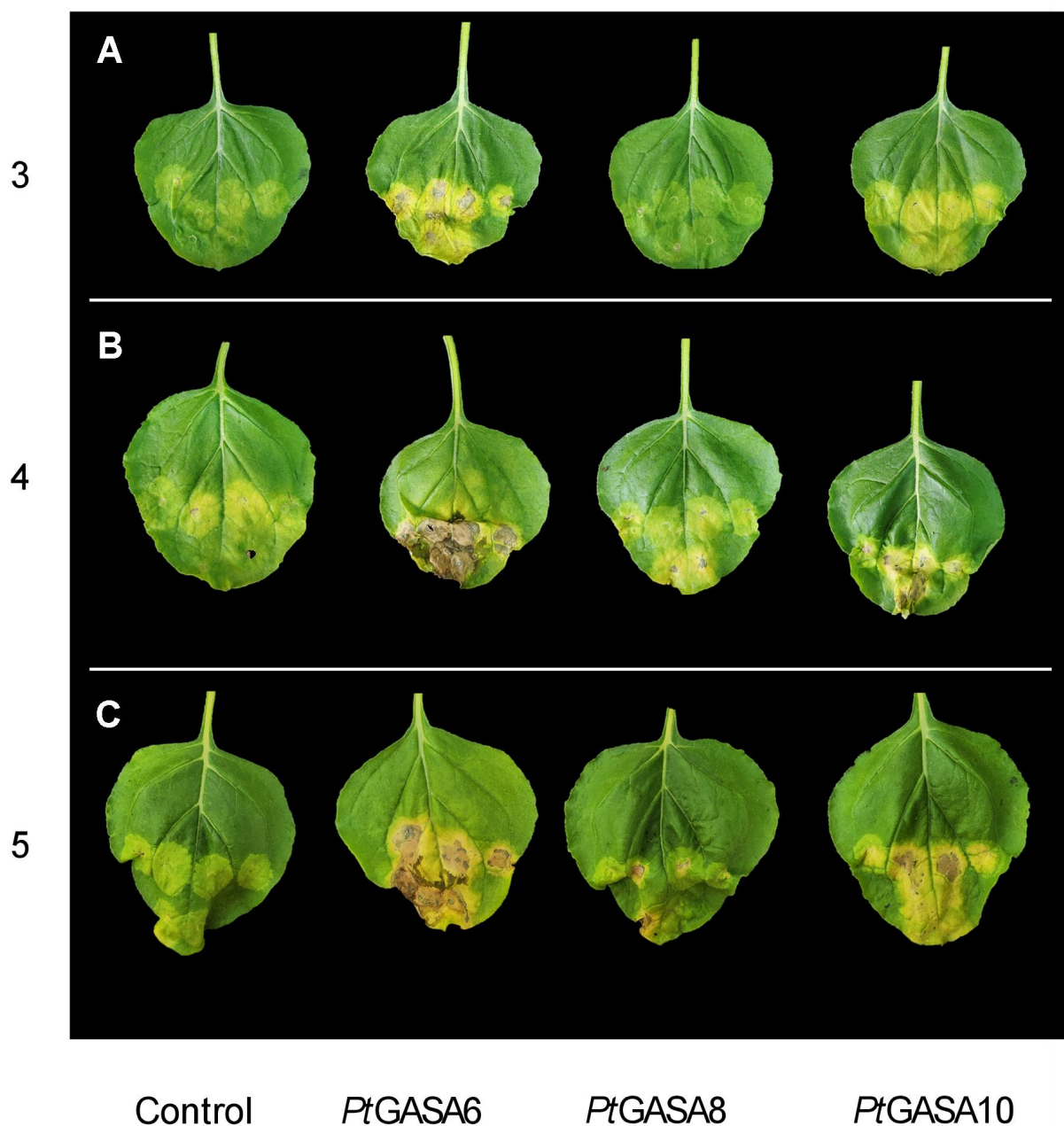


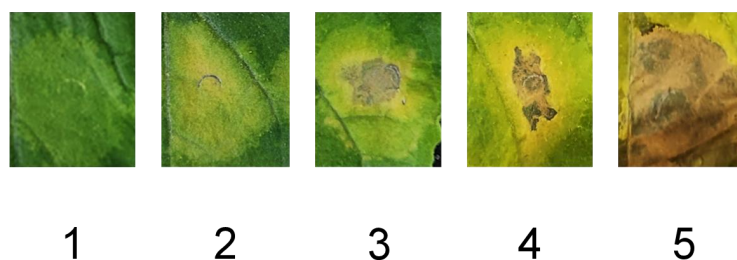
Figura III.24. Foto representativa de una hoja representativa por tratamiento para la visualización de la HR al sobreexpresar *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10* o el control para los días 3 (**A**), 4 (**B**), 5 (**C**) post-infección. Cada hoja se co-infiltró en las mismas 6 posiciones con *A. tumefaciens* GV. 3101 expresando los genes nombrados y el agente patógeno *Xcc*. La sintomatología esperada son círculos con HR parcial o total. Se pudo observar que las hojas control y *PtGASA8* presentaron una proporción baja de hojas con presencia de sintomatología, mientras que las *PtGASA6* y *PtGASA10* tienen adelantada la sintomatología de HR de forma significativa, siendo aún mayor el adelanto en las plantas sobreexpresantes.

La sintomatología asociada a la HR comenzó a hacerse visible macroscópicamente a partir de las 48 h post-desafío, intensificándose a partir de las 72 h post-desafío, momento en que se inició la captura fotográficamente las mismas, como se observa en la figura III.24. Debido a que la interacción es incompatible entre *Xcc* y *N. benthamiana*, se esperaba observar sintomatología de HR de forma macroscópica en el control. En este sentido, la aparición de dichos síntomas fue significativamente más intensa en las plantas sobreexpresantes *PtGASA6* y *PtGASA10*, siendo este efecto aún más marcado en *PtGASA6* (figura III.24). Esta tendencia se mantuvo hasta el día 17 post-desafío, utilizando una escala ordinal con valores que fueron de 1 a 5, siendo 5 el círculo con mayor expansión de la sintomatología asociada a HR. Dado que en este caso se observó una mayor sensibilidad para diferenciar los niveles de sintomatología, se incorporó una categoría adicional. A la misma se la denominó índice de HR (HRI), análogo al índice de enfermedad descrito en la [sección III.3.7](#). Este índice se presenta en la figura III.25.

Esto sería indicativo de que los genes SNAKIN/GASA estarían induciendo la HR.

Empleando el HRI, tal como se describe en la figura III.25, se evaluó la severidad de la sintomatología de HR. Con estos valores se analizó, en función del tiempo, el crecimiento del área sintomatológica desde los días 5 o 6 post-desafío. A partir de esta misma información, se calculó el ADUPC para la sobreexpresión de cada uno de los genes mencionados.

A



B

Área ocupada	HRI	Observado
0 – 20 %	1	clorosis de base asociada a la inoculación
20 – 40 %	2	> 20% del área ocupada por HR – inicio de clorosis asociada a HR
40 – 60 %	3	> 40% del área ocupada por HR – avance de la clorosis + aparición de MCP
60 – 80 %	4	>60% del área ocupada por HR – avance de la MCP asociado a HR + clorosis con mayor intensidad
80 – 100 %	5	100 % del área ocupada por HR – con MCP completo

Figura III.25. HRI **(A)** Sintomatología asociada a la tabla. **(B)** Tabla de valores asociados a la relación porcentual del área ocupada por la sintomatología causada por la respuesta macroscópica causada por la HR, el valor empleado para realizar la estadística (HRI), y lo que fue observado para asociarlo a cada uno de los valores.

Como se observa en la figura III.26, *PtGASA6* comenzó a evidenciar un incremento más rápido en la aparición de HR a partir del día 6, diferencia que resulta significativa desde el día 7. En el caso de *PtGASA10*, una diferencia comparable a la observada en *PtGASA6* al día 6 comienza a vislumbrarse recién en el día 7, aunque con un aumento más gradual, alcanzando significancia recién al día 12. En este punto, la sobreexpresión de ambos genes presentó diferencias significativas con respecto al control.

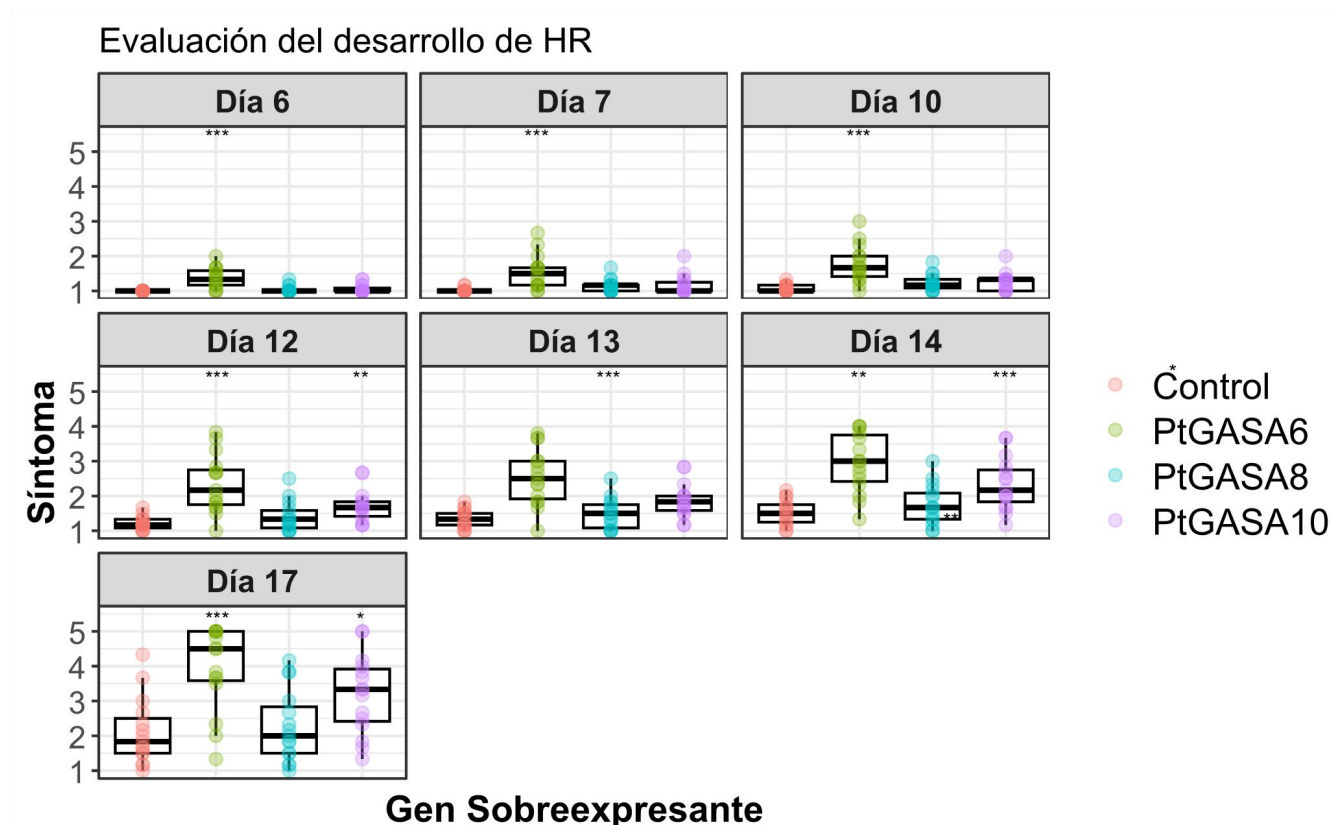


Figura III.26. Evaluación del desarrollo de HR en los días 6 A 17 post-desafío luego del desafío con *Xcc* en hojas sobreexpresando los genes *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10*, empleando una mezcla de *A. tumefaciens* expresando los genes *PtGASAx*, o sin plásmido (control). Se preparó una mezcla final con *A. tumefaciens* a una DO_{600} de 0,6 y *Xcc* a una DO_{600} de 0,109. El análisis estadístico no paramétrico empleado fue el test de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad ajustando mediante el método de Bonferroni con respecto al control. La estadística se muestra con asteriscos donde: * p-valor < 0,05; ** p-valor < 0,01; *** p-valor < 0,001.

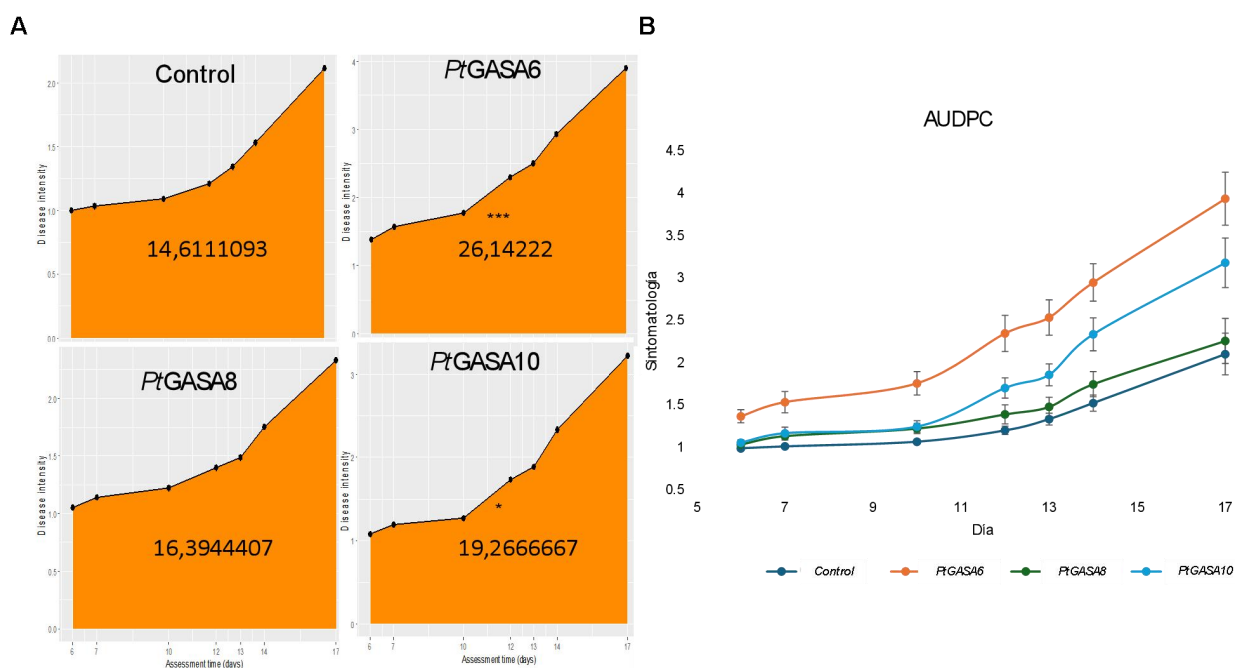


Figura III.27. Evaluación del desarrollo de la sintomatología de HR tras la sobreexpresión de los genes *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10*, mediante co-inoculación de *A. tumefaciens* (portando cada gen o sin plásmido, como control) con *Xcc*. **(A)** AUDPC de cada uno de los genes sobreexpresantes y el control, demostrando la mayor abundancia de MCP de los genes *PtGASA6* y *PtGASA10* con respecto al control. **(B)** Curva de progresión de la HR utilizando el HRI en función del tiempo. El análisis estadístico no paramétrico empleado fue el test de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad ajustando mediante el método de Bonferroni con respecto al control. La estadística se muestra con asteriscos donde: * p-valor < 0,05; *** p-valor < 0,001.

III.3.9 Análisis de la sobreexpresión de *StSN1*, *StSN3* y *PtGASA10*

Debido a antecedentes previos en el IABIMO, se decidió hacer un ensayo comparativo con *StSN1* y *StSN3* y *PtGASA10*. De esta forma se esperaba comparar los resultados obtenidos en esta tesis, con genes estudiados previamente y reportados en publicaciones científicas (Almasia et al., 2008; Nahirňak et al., 2012a; Nahirňak et al., 2012b; Nahirňak et al., 2016; Almasia et al., 2017; Darqui et al., 2018; Almasia et al., 2020; Conti et al., 2020; Nahirňak et al., 2024).

En consecuencia, se repitió el ensayo de la [sección III.3.7](#), sobreexpresando en este caso los genes *StSN1*, *StSN3* y *PtGASA10*. Las hojas sobreexpresantes, co-infiltradas con *Ps tab*, se presentan en la figura III.28, donde se observa la sintomatología representativa observadas a los 13 pdi. En el control, todos los círculos infiltrados desarrollaron una necrosis prácticamente completa, mientras que en las hojas sobreexpresantes *StSN1*, *StSN3* y *PtGASA10* la sintomatología se manifestó solo en algunos círculos y de forma más limitada.

Utilizando los valores normalizados, según se detalló en las secciones [III.2.3.2](#) y [III.2.4.2](#), se observó una tendencia a tener mayor sintomatología a partir del día 4 post-desafío (figura III.29A). La misma incrementa en el día 5, donde se pudo vislumbrar diferencias significativas tanto en *StSN1*, como en *PtGASA10*. Luego, *StSN1* comenzó a incrementar la sintomatología necrótica asociada a enfermedad, perdiendo la diferencia significativa observada inicialmente. En cambio, que *StSN3*, perteneciente a la misma subfamilia de proteínas dentro de la familia SNAKIN/GASA que *PtGASA10*, enlenteció el desarrollo de la enfermedad surgiendo diferencias significativas con respecto al control.

A partir del día 5 post-inoculación, las diferencias en la aparición de la sintomatología asociada a enfermedad para *PtGASA10* con respecto al control comenzaron a incrementarse (p-valor < 0,001). La sobreexpresión de este gen produjo el mayor retraso en la aparición de síntomas en comparación con las otras dos construcciones, y su efecto fue de mayor duración temporal, ya que presentó un retraso significativo de la enfermedad hasta el día 11 inclusive post-desafío.

En cuanto a las construcciones *StSN1* y *StSN3*, se observó una disminución significativa de la sintomatología por un único día, correspondiente al día 5 y al día 7, respectivamente (figura III.29A).

En relación con el comportamiento del AUDPC, las pendientes de crecimiento de *StSN3* y el control fueron similares, observándose el típico crecimiento en forma de sigmoidea característico del crecimiento bacteriano. En cambio, para *StSN1* y *PtGASA10*, ambas con diferencias significativas con respecto al control en el AUDPC (figura III.29B) (p-valor < 0,001), no se evidenció a visibilizar la pendiente sigmoidea y el crecimiento se frenó hasta el día 7. A partir de ese momento, la aparición de sintomatología se aceleró hasta alcanzar niveles cercanos a los del control (figura III.29C). No obstante, incluso en ese día, *PtGASA10*, debido al marcado retraso inicial en la aparición de síntomas, continuó mostrando diferencias (figuras III.29B y III.29C).

Esta tendencia parece ser más duradera en *PtGASA10*, a pesar de no ser un gen propio de solanáceas, probablemente esto se deba a la gran identidad de secuencias y quizás a la eficacia de su sobreexpresión.

Es importante resaltar que, al cuantificar los síntomas de forma ciega, (es decir sin conocerse a qué tratamiento fue sometida cada planta), las plantas sobreexpresantes *StSN1* presentaron una gran dispersión desde un inicio, lo que explica que la tendencia a retrasar la aparición de la sintomatología no resulte significativa a partir del día 7. Por el contrario, *StSN3*, aunque demoró en apreciarse esta diferencia, presentaba síntomas más homogéneos entre las distintas plantas.

Día

13

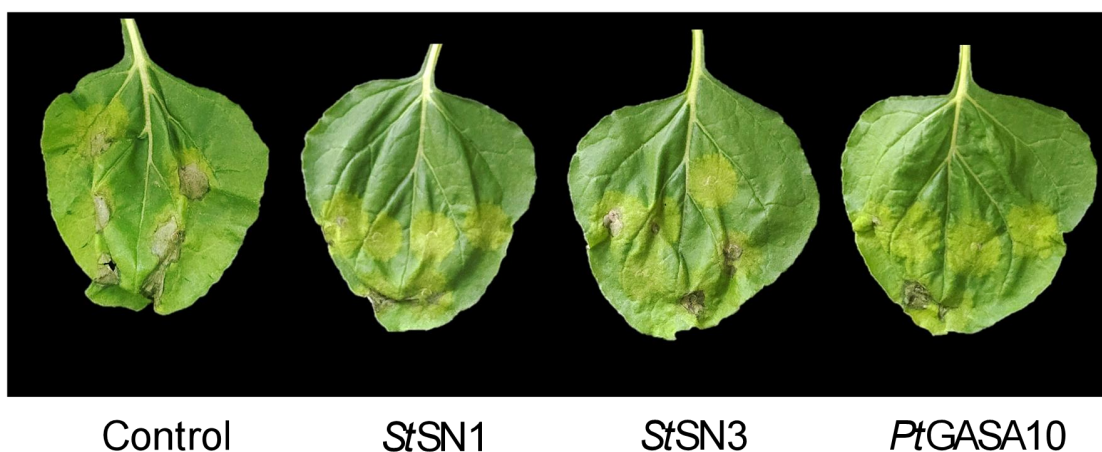


Figura III.28. Foto representativa de una hoja por tratamiento de la enfermedad en hojas de *N. benthamiana* sobreexpresando transitoriamente los genes *StSN1*, *StSN3*, *PtGASA10* o el control, 13 días post-infección. Cada hoja se co-infiltró en las mismas 6 posiciones con *A. tumefaciens* GV. 3101 expresando los genes nombrados y el agente patógeno *Ps tab*. La sintomatología esperada son círculos con necrosis parcial o total, vislumbrado como manchas amarronadas. Se pudo observar que las hojas control presentaron una proporción alta de hojas con presencia de sintomatología abundante de enfermedad, mientras que las *StSN1*, *StSN3*, *PtGASA10* tienen retrasados los síntomas de enfermedad de forma significativa.

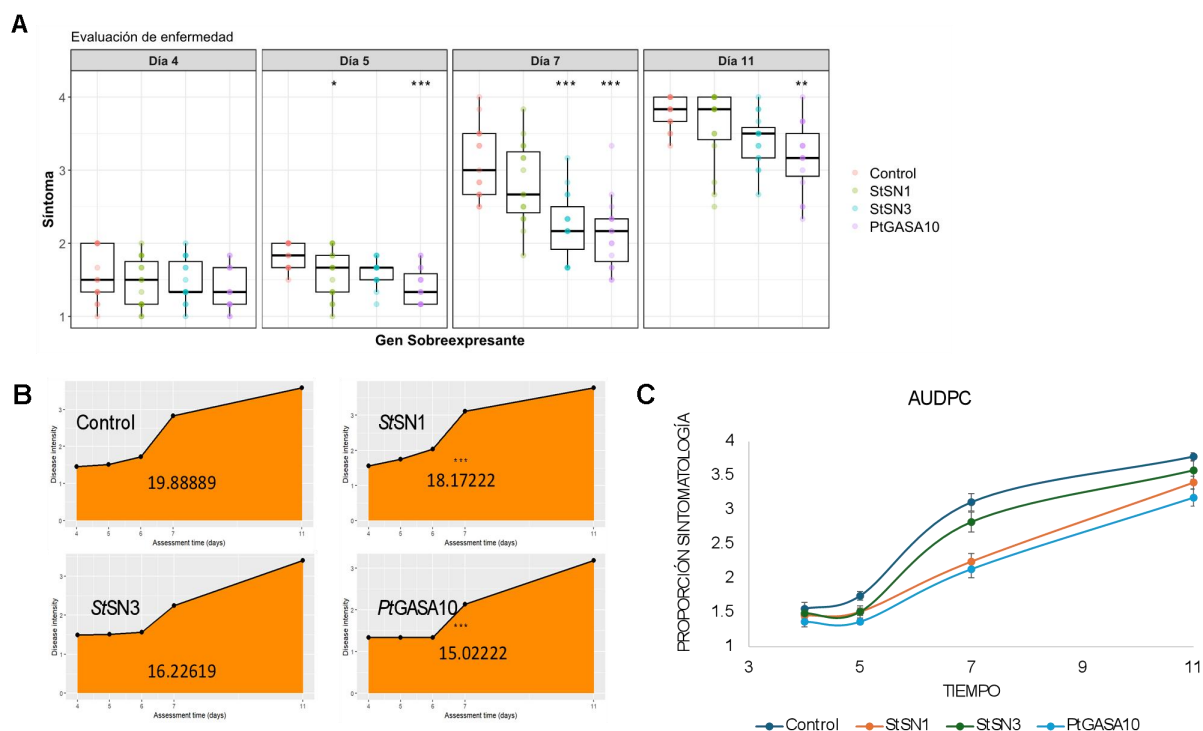


Figura III.29. Evaluación del desarrollo de enfermedad causado por *Ps tab* en hojas sobreexpresando los genes *StSN1*, *StSN3* y *PtGASA10*, empleando una mezcla de *A. tumefaciens* expresando los genes antes mencionados o sin plásmido (control). Se hizo una mezcla 1:1 de con *A. tumefaciens* DO₆₀₀ = 0,6 y 2×10^6 UFC/ml de *Ps tab* **(A)** Evaluación del HRI para los días 4, 5, 7 y 11 post-desafío. Se pudo observar un retraso significativo en los días 5-11 de las sobreexpresantes *PtGASA10*, para el día 5 de *StSN1*, y en el día 7 de *StSN3*. Las mayores diferencias a lo largo del tiempo se observaron en *PtGASA10*. **(B)** Evaluación de la curva AUDPC para cada tratamiento. Los genes *StSN1* y *PtGASA10* presentaron valores significativamente menores en las curvas de AUDPC con respecto al control, indicando que el crecimiento de la enfermedad en el tiempo se retrasó en el tiempo, siendo la *PtGASA10* la que mayor diferencia presenta. **(C)** Gráfico indicando las curvas de AUDPC superpuestas de cada uno de los genes sobreexpresantes y el control. Además de lo expuesto en (B), se observó que la pendiente de crecimiento de la enfermedad fue comparable entre *StSN1* y *PtGASA10* y de la misma forma ocurrió para las pendientes entre el control y *StSN3*. El análisis estadístico no paramétrico empleado fue el test de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad ajustando mediante el método de Bonferroni con respecto al control. La estadística se muestra con asteriscos donde: * p-valor < 0,05; ** p-valor < 0,01; *** p-valor < 0,001.

III.3.10 Estructura tridimensional *in silico* de las proteínas SNAKIN/GASA de cítricos y papa

Como se mencionó previamente, el IABIMO estudió el rol antimicrobiano de StSN1, StSN2 y StSN3 (Almasia et al., 2008; Almasia et al., 2010; Nahirñak et al., 2012b; Nahirñak et al., 2012a; Nahirñak et al., 2016; Nahirñak et al., 2019; Almasia et al., 2020; Conti et al., 2020; Nahirñak et al., 2024). Por ello, se realizó una comparación para evaluar su potencial antimicrobiano mediante los ensayos puestos a punto, como se describe en la [sección III.3.9](#).

A raíz de los resultados promisorios obtenidos se decidió evaluar la estructura terciaria de estos AMPs *in silico* mediante la utilización de la herramienta *AlphaFold2* usando MMseqs2 en el entorno de Colab v1.5.5 para generar el archivo PDB que permite su visualización estructural (Jumper et al., 2021; Mirdita et al., 2022; Kim et al., 2024). Luego, las estructuras fueron visualizadas utilizando la herramienta NGL Viewer (Rose y Hildebrand, 2015). Cabe destacar que previamente se ha demostrado que las predicciones *in silico* presentan un alto grado de precisión, resultando representativas de su conformación real y de su posible localización en el tejido vegetal (Almasia, 2009). No obstante, es necesario validarlo experimentalmente para obtener la exacta ubicación (Nahirñak et al., 2012a; Yeung et al., 2016; Almasia et al., 2020), por ejemplo, diferenciar si se encuentran en la membrana plasmática o en la pared celular como se ha determinado para CcGASA4 (Wu et al., 2020).

Como se puede observar en la figura III.30, todas las proteínas podrían presentar un motivo hélice-vuelta-hélice (HTH, del inglés *helix-turn-helix*), y con motivos de plegamiento al azar del tipo hélice enrollada (*random coil* del inglés).

En todos los casos se identificó un motivo, señalado con línea punteada (·····), que presenta la misma estructura en los miembros de las tres subfamilias, y que son idénticas en ambas especies analizadas, *P. trifoliata* y *S. tuberosum*. Mediante cristalografía de StSN1 se describió que este motivo corresponde a la vuelta situada entre las dos hélices del HTH (Yeung et al., 2016).

Si bien las tres subfamilias comparten motivos comunes, se observó que aquellos indicados con línea continua (——), muestran mayor similitud entre las subfamilias II y III, dado que generan una disposición más laxa de las α -hélices, que aparecen más separadas. En cambio, el motivo característico de la subfamilia I, señalado con línea y punto (- · - · -), produce una estructura más compacta, con las α -hélices más condensadas.

Según ha descrito Almasia et al. (2020), la proteína StSN1 presenta tres dominios caracterizados: (1) en el extremo N-terminal se encuentra el péptido señal; (2) una región intermedia; (3) en el extremo C-terminal se halla el motivo SNAKIN/GASA, que incluye las regiones conservadas que le dan la denominación a esta familia de proteínas como las 12 cisteínas ([sección III.1.5.1](#)), así como regiones variables que permiten clasificarlas en las 3 subfamilias previamente mencionadas ([sección III.1.5.1](#)).

En la figura III.31 se visualizan las estructuras terciarias de las proteínas PtGASA6 y PtGASA10 con sus correspondientes C-terminal y N-terminal, y la ubicación del dominio SNAKIN/GASA, de forma semejante a cómo fue descrito (Yeung et al., 2016; Almasia et al., 2020). La región HTH, donde se encuentra dicho dominio, presenta una gran proporción de aminoácidos cargados positivamente, tales como arginina, histidina y lisina (figura III.31), en concordancia con lo descrito para StSN1. Asimismo, como se observa en la figura III.32, las zonas de mayor densidad de cargas positivas coinciden con la región HTH, donde también se establecerían los puentes disulfuro (Yeung et al., 2016), lo cual podría ser indicativo de su posible mecanismo de acción ([sección III.5.6](#)) y, según lo propuesto por Almasia et al. (2008), estos motivos estructurales sugerirían además la posibilidad de que dichas proteínas se liberen hacia el citosol.

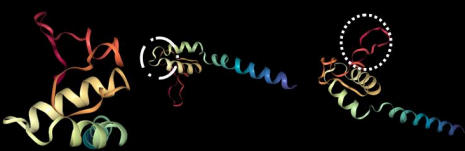
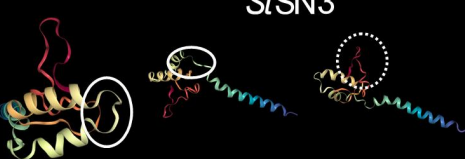
	<i>S. tuberosum</i>	<i>P. trifoliata</i>
Subfamilia I	StSN1 	PtGASA6 
Subfamilia II	StSN2 	PtGASA8 
Subfamilia III	StSN3 	PtGASA10 

Figura III.30 Representación esquemática de los motivos conservados en las subfamilias I, II y III de la familia SNAKIN/GASA de *S. tuberosum* (izquierda) y *P. trifoliata* (derecha). El primer renglón representa a la subfamilia I, con StSN1 y PtGASA6 como integrantes, luego la subfamilia II con StSN2 y PtGASA8 y por último la subfamilia III con StSN3 y PtGASA10. El motivo común a todas las subfamilias y especies (*P. trifoliata* y *S. tuberosum*) se indica con línea punteada (·····). El motivo propio de la subfamilia I, señalado con línea y punto (— · —), genera una disposición más compacta con α -hélices condensadas. En cambio, los motivos presentes en las subfamilias II y III, representados con línea continua (——), promueven una estructura más laxa, con α -hélices más separadas.

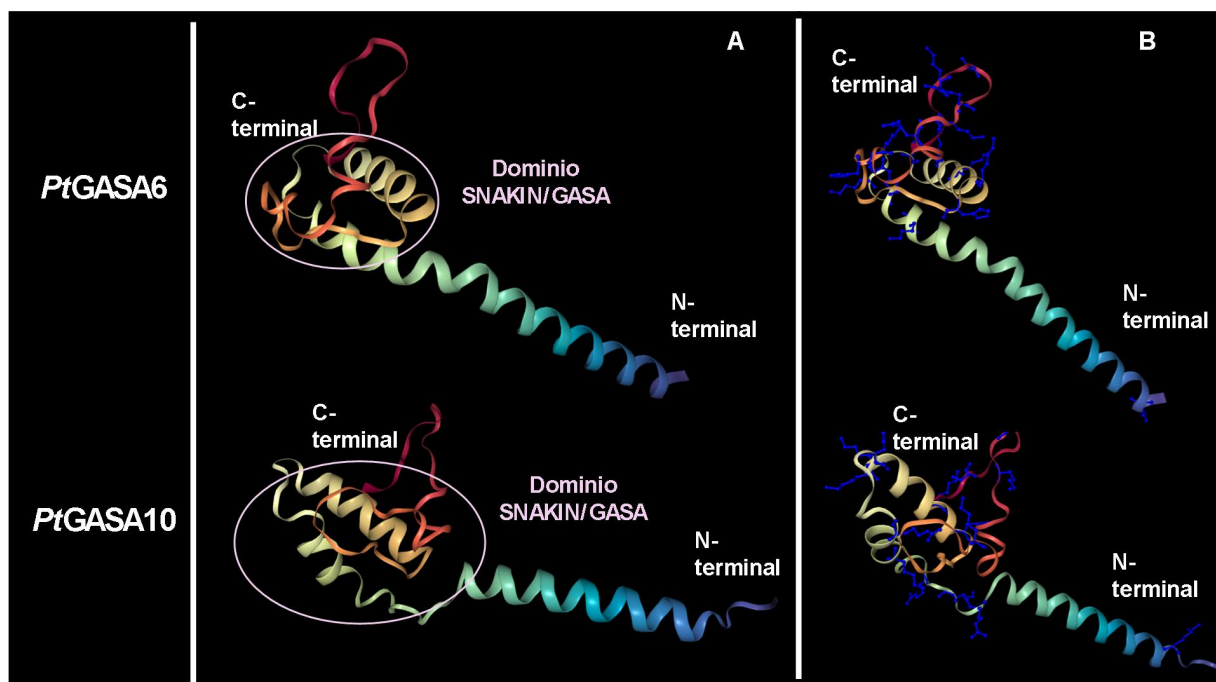


Figura III.31. Estructura tridimensional de las *PtGASA6* y *PtGASA10*. **(A)** Se indican los extremos C-terminal y N-terminal y la ubicación del dominio SNAKIN/GASA. **(B)** En azul se indican los aminoácidos cargados positivamente (arginina, lisina o histidia) que se encuentran mayoritariamente en el HTH.

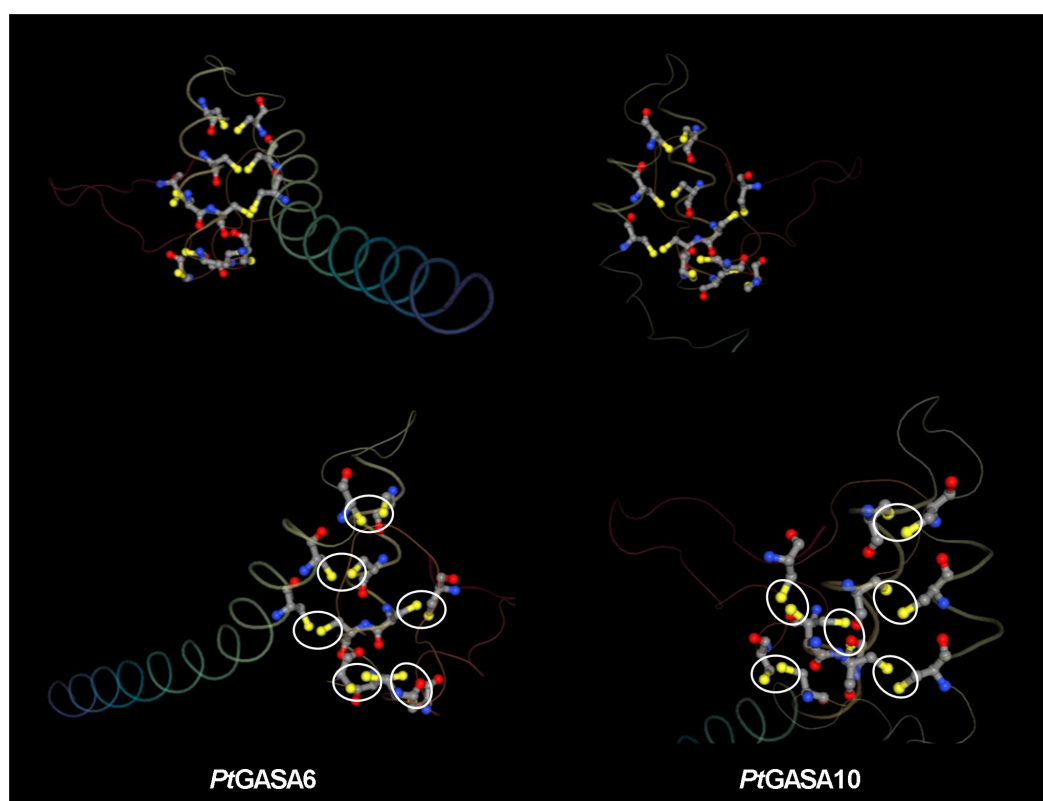


Figura III.32. Estructura tridimensional de *PtGASA6* y *PtGASA10* con los 6 puentes disulfuro potenciales predichos in silico, donde las cisteínas se destacan en amarillo.

III.4 Resumen de los principales resultados

- Se pudo demostrar la sobreexpresión de los genes *PtGASA6*, *PtGASA8*, *PtGASA10* en plantas de *N. benthamiana* con p-valor < 0,001. Los genes *PtGASA6*, *PtGASA8*, *PtGASA10* presentaron una sobreexpresión de 9,28, 6,72, o 5,78 veces con respecto al control, respectivamente.
- Se pudieron poner a punto los ensayos de HR y enfermedad que permitieran la visualización de sintomatología a la velocidad requerida para que coincidiera la aparición de sintomatología con el máximo de sobreexpresión.
- La sobreexpresión de los genes *PtGASA6* y *PtGASA10* retrasan la sintomatología de enfermedad de *Ps tab*. No se obtuvo el mismo efecto en *PtGASA8*.
- La sobreexpresión de los genes *PtGASA6* y *PtGASA10* adelantan la sintomatología de HR causada por *Xcc*. No se obtuvo el mismo efecto en *PtGASA8*.
- Resultados indican un efecto similar en el ensayo de enfermedad para los genes *StSN1* y *StSN3*.
- Se logró modelar la estructura terciaria *in silico* de las proteínas *StSN1*, *StSN2*, *StSN3*, *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10* y compararlas entre sí.

III.5 Discusión

III.5.1 La familia SNAKIN/GASA como genes promisorios para disminuir infecciones bacterianas

La familia de proteínas SNAKIN/GASA constituye una familia de AMP, por lo que presentan tamaño pequeño (menor a 100 aminoácidos) (Su et al., 2020). Diversos estudios han demostrado que genes de esta familia tienen un potencial rol antimicrobiano contra agentes patogénicos de diversos orígenes ya sean (hemi) biotrófico como necrotróficos, abarcando bacterias, hongos y virus (Almasia et al., 2008; Almasia et al., 2010; Faccio et al., 2011; Nahirñak et al., 2012b; Beracochea et al., 2015; Nahirñak et al., 2016; Almasia et al., 2020; Conti et al., 2020; Wu et al., 2020; Bouteraa et al., 2023; Nahirñak et al., 2024). No obstante, aún no se comprende su mecanismo de acción, en parte debido a sus efectos pleiotrópicos, que afectan severamente el fenotipo arquitectónico en plantas mutantes (Almasia et al., 2008; Nahirñak et al., 2012a; Nahirñak et al., 2019; Nahirñak et al., 2024).

En cítricos, AMPs de otras familias de proteínas han sido evaluadas como potenciales bioinsumos para el control del HLB, por ej. mediante la aplicación foliar (Huang et al., 2021a; Li et al., 2021).

En contraste, los estudios sobre la familia SNAKIN/GASA son aún limitados (Wu et al., 2020; Wu et al., 2021). Wu et al. (2021) analizaron la expresión de los genes *CcGASA* de *C. clementina* en frutos, hojas, raíces, yemas. En dicho estudio observaron de manera consistente, es decir en al menos dos réplicas biológicas con expresión comparable, que los genes *CcGASA1*, *CcGASA3*, *CcGASA7*, *CcGASA12*, *CcGASA16*, *CcGASA17*, y *CcGASA18* presentaron buena expresión de forma basal en hojas. *CcGASA6*, *CcGASA8*, *CcGASA9*, y *CcGASA11* se expresaron fundamentalmente en frutos. *CcGASA 2* se expresó fundamentalmente en raíces. Y *CcGASA4*, *CcGASA5*, *CcGASA10* presentaron mayor expresión en yemas. De ello se desprende que la *CsGASA6*, *CsGASA8* y *CsGASA10*, presentaron buena expresión en tejidos reproductivos jóvenes, lo que respalda la hipótesis de que estos genes se expresan preferentemente en dichos tejidos ([sección III.3.3](#)), en consistencia con lo reportado en esta tesis ([sección III.3.2](#)). Cabe señalar la expresión analizada mediante RT-qPCR en la [sección III.3.2](#), que incluye los cítricos denominados ‘Clemenules’, corresponde a una variedad de *C. clementina* (*C. clementina* Hort. ex Tanaka). El único tejido compartido entre ambos estudios es la hoja, según lo publicado por Wu et al. (2021). Sin embargo, los autores no especifican su grado de madurez; aun así, por el patrón de expresión observado en este trabajo y en concordancia con lo descrito en la [sección III.3.2](#), podría inferirse que se trata de HJ.

Así mismo, los autores de dicho trabajo indagaron el comportamiento de la expresión de los genes previamente nombrados luego de desarrollar infecciones con *Xcc*. Las evaluaciones se hicieron a las 12, 24, 48 y 72 horas post-infección. De esto los autores concluyen que *CcGASA 1*, *CcGASA8*, *CcGASA9*, *CcGASA11*, *CcGASA12*, *CcGASA16* presentaron un incremento significativo de la expresión y en algunos de ellos de varios ordenes de magnitud. La inducción de estos genes podría indicar que, si bien tienen una buena expresión basal en los tejidos donde genera la infección *Xcc*, ésta aumenta luego de la infección en un sistema por lo que estos genes podrían estar cumpliendo algún rol frente a la misma (Wu et al., 2021).

En otros cultivos, se ha demostrado la inducción de los genes SNAKIN/GASA frente a patógenos (Berrocal-Lobo et al., 2002; Almasia et al., 2008; Nahirñak et al., 2016; Iqbal, 2023; Nahirñak et al., 2024). Por ejemplo, la plantas sobreexpresantes estables de *StSN1* (subfamilia I) en *S. tuberosum* redujo lesiones causadas *E. carotovora*, *R. solani* (Almasia et al., 2008) y *S. sclerotiorum* (Nahirñak et al., 2012a), reducción que se atribuyó en parte por la disminución de ROS (Nahirñak et al., 2019). Este mecanismo podría ser ventajoso para la planta, dado que los patógenos necrotróficos suelen inducir la HR en su beneficio, al requerir tejido

celular muerto para su desarrollo, proceso favorecido por la acumulación de ROS (Morel y Dangl, 1997; Agrios, 2005; Ghozlan et al., 2020).

Del mismo modo, se ha demostrado que *StSN3* (subfamilia III) incrementa la resistencia frente a *Ps tab* y *E. carotova*, e incluso induce la expresión de forma dependiente de estos fitopatógenos (Nahirñak et al., 2016; Nahirñak et al., 2024).

En conjunto, se destaca a la familia SNAKIN/GASA como una familia de proteínas con potencial de interés, en particular por haberse analizado frente a diversos fitopatógenos así como en diversos cultivos de interés agrícola.

III.5.2 Expresión de los genes candidatos y criterios para la selección de *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10*

Se determinó que, todopara cada una de las subfamilias de la familia SNAKIN/GASA, se contó con al menos un miembro con buena expresión génica basal en los tejidos juveniles (floral y HJ). Dado que estos tejidos son jóvenes, se esperaba que presentaran una expresión elevada aquellos genes con propiedades antimicrobianas para el cuidado de la descendencia fértil, como se observa en la figura III.14 ([sección III.3.2](#)).

Para poder analizar estos resultados, en el árbol filogenético previamente realizado (figura III.8, [sección III.1.5.1](#)) se incluyeron los miembros de la familia SNAKIN/GASA de *S. tuberosum* (entre los que se encuentran *StSN1* y *StSN3*). Este análisis se observa en la figura III.33.

A partir del análisis de ortología, y en conjunto con los análisis de expresión génica de cítricos ([sección III.3.2](#)), se realizó la selección de genes para su caracterización, detallado a continuación.

Dentro de la subfamilia I, se observó que únicamente la *GASA6* presentó una expresión alta en flor y HJ, tal como se describió en la [sección III.5.2](#), y a su vez, la *GASA6* de *Citrus* sp. mostró la identidad de secuencias de mayor similitud con *StSN1* y se agrupó como su ortólogo más cercano de cítricos como se observa en la figura III.33 ([sección III.5.4](#)). *StSN1* previamente demostró propiedades antimicrobianas frente a diversos fitopatógenos fúngicos y bacterianos, como se enumeró en la [sección III.1.5](#) (Almasia et al., 2008; Almasia et al., 2010; Faccio et al., 2011; Nahirñak et al., 2012a; Beracochea et al., 2015; Nahirñak et al., 2016; Almasia et al., 2020; Conti et al., 2020). Por ello, la *GASA6* fue seleccionada para continuar en su estudio.

Asimismo, Conti et al. (2020) evaluaron la infección de cinco plantas transgénicas *StSN1* en infecciones con *Xcc*, todas ellas presentaron una disminución de los síntomas de enfermedad de forma significativa, algunas de ellas prácticamente no presentaron síntomas.

Para la selección de la proteína de interés de la subfamilia II se pudo observar en la figura III.14 ([sección III.3.2](#)), que los genes con expresión alta son los que codifican para *GASA9_like*, *GASA11*, y *GASA8*. Todos ellos presentaron buena expresión en los tejidos de HJ, a excepción de *GASA8*. Y presentaron la misma tendencia en tejidos florales. Al igual que lo observado en la subfamilia I, es notable resaltar que todos los genes aquí enumerados presentaron una muy buena expresión en la especie *P. trifoliata* en el tejido floral, variedad que mayor resistencia a patógenos presenta en relación con la demás evaluadas (Palacios, 2005; Ramadugu et al., 2016; Munir et al., 2017; Alves et al., 2021; Huang et al., 2021b; Weber et al., 2022). En el caso de Citrange Troyer, otra variedad tolerante a diversos fitopatógenos pero no a HLB (Palacios, 2005; Ramadugu et al., 2016), se observó una menor expresión de *GASA8* con respecto a *GASA9_like* y *GASA11*. Cabe señalar que Citrange Troyer es una planta híbrida interespecífica derivada de la cruce entre *C. sinensis* (L.) Osb. x *P. trifoliata* (L.) Raf. *C. sinensis* (naranja) es una especie de copa, es decir que provee propiedades agrónomicamente deseables en cuanto a la selección para el consumidor e incluyendo resistencias asociadas a la variedad de portainjertos *P. trifoliata* (Palacios, 2005). Sin embargo, el fondo genético de *P. trifoliata* se

ve diluido por *C. sinensis*, disminuyendo de esta forma la tolerancia a los diversos tipos de estrés (Palacios, 2005). Por ser la variedad analizada con mayor resistencia a patógenos, se decidió evaluar la sobreexpresión de los genes de *P. trifoliata* en ensayos con plantas *in vivo*.

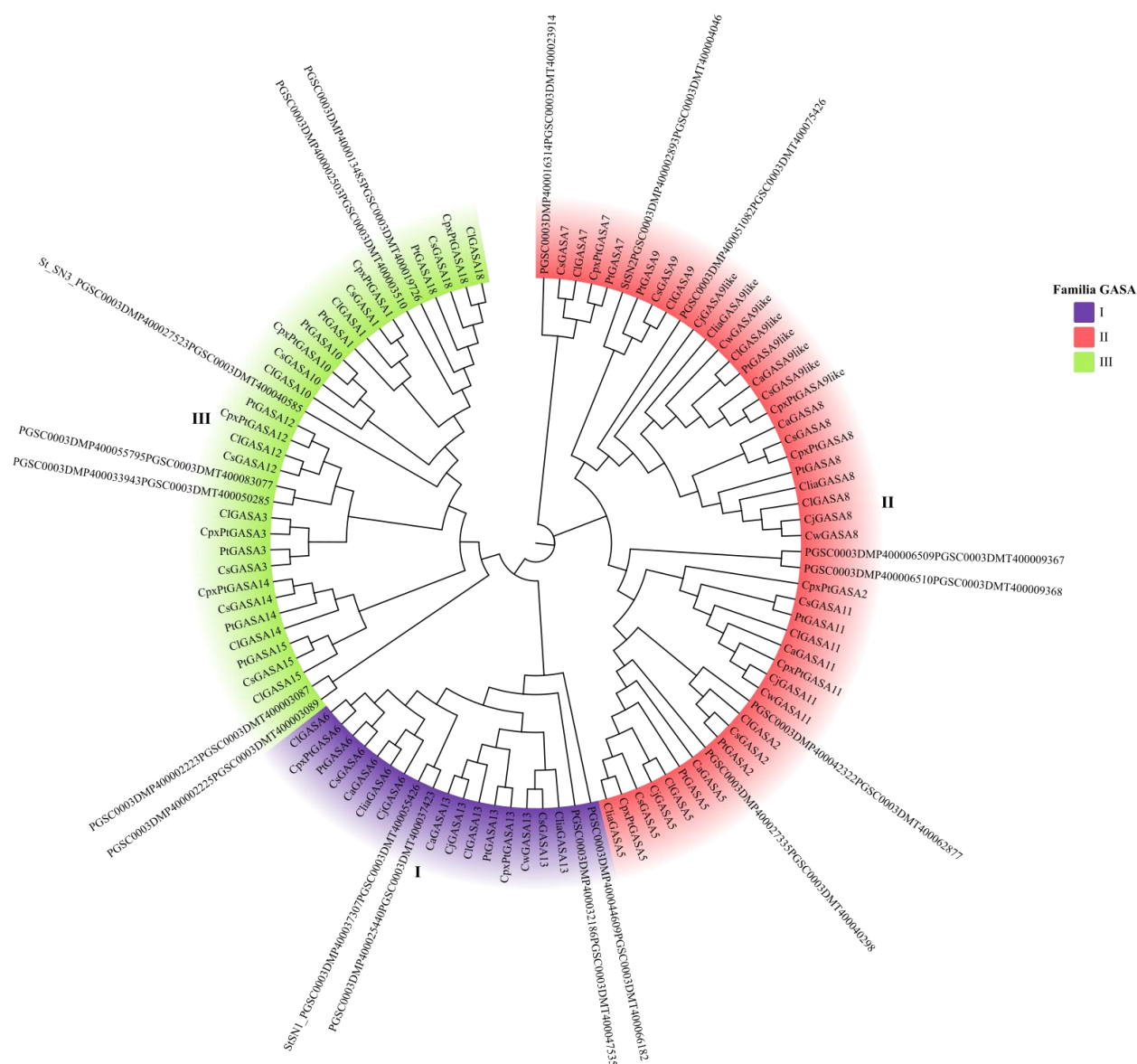


Figura III.33. Árbol filogenético de la familia de proteínas GASA empleando MEGA 11 (Tamura et al., 2021) mediante el método *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987) utilizando 1000 *bootstrap*. Se realizó una versión de color empleando el programa online denominado chiplot (Xie et al., 2023). Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas tal como se describió en la [sección III.1.5.1](#). Se clasificaron en las tres subfamilias previamente reportadas (Berrocal-Lobo et al., 2002; Nahirñak et al., 2016; Nahirñak et al., 2024). Las mismas se indican según color: I color lila, II color magenta, III color verde. Las variedades incluidas en este análisis son: C.s.: *Citrus sinensis*; C.p.x P.t.: *Citrumelo* (*Citrus x paradisi* x *Citrus trifoliata*); C.l.: *Citrus limon*; P.t.: *Poncirus trifoliata*; C.j.: *Citrus jhambiri*; C.lia.: *Citrus limonia*; C.w.: *Citrus warburgiana*; C.a.: *Citrus aurantium*, y *S. tuberosum* seguido por el número de cada proteína SNAKIN/GASA.

A su vez, la GASA6 de *Citrus* sp. presenta mostró la identidad de secuencias de mayor similitud con StSN11 y se agrupó como su ortólogo más cercano de cítricos como se observa en la figura III.33 ([sección III.5.5](#)). , proteína StSN1 que previamente ha demostrado conferir propiedades antimicrobianas frente a diversos fitopatógenos fúngicos y bacterianos, como se enumeró en la [sección III.11.5](#) (Almasia et al., 2008; Almasia et al., 2010; Faccio et al., 2011; Nahirñak et al., 2012a; Beracochea et al., 2015; Nahirñak et al., 2016; Almasia et al., 2020; Conti et al., 2020). Por ello, la GASA6 fue seleccionada para continuar en su estudio. expresando artificiales con Xcc, y(). presenta una comparación , que es , pero que tiene una en este híbrido combinado con el de lo que podría explicar su menor. Como se mencionó previamente, GASA8 presentó una buena expresión en el tejido floral de *P. trifoliata* y fue el único miembro con baja expresión en este tejido en las variedades Rangpur y Citrange Troyer (figura III.14, [sección III.3.2](#)), lo que podría ser un indicio de que GASA8 podría ser alguno de los genes del fondo genético de *P. trifoliata* contribuyendo a la tolerancia a la enfermedad y, a su vez, sería uno de los genes que tiene buena expresión en esta variedad en el tejido deseado. A su vez, es el único gen de esta subfamilia que presentaría una tendencia a estar inducido frente al HLB en *Microcitrus australasica* (Weber et al., 2022), especie conocida por presentar algún grado de resistencia frente al HLB (Palacios, 2005; Ramadugu et al., 2016; Alves et al., 2021; Huang et al., 2021b; Weber et al., 2022). Asimismo, GASA8 ha mostrado inducida su expresión en frutos en infecciones con Xcc, incrementando la expresión en el tiempo durante la infección hasta, al menos, las 72 h post-desafío, y aumentando la expresión hasta 15 veces (Wu et al., 2021). Por último, es el único gen de esta subfamilia que no presentó una buena expresión en HJ en este análisis (figura III.14, [sección III.3.2](#)). Esto podría sugerir que su expresión está restringida a los tejidos en estadios más tempranos del desarrollo, donde se esperaría presenten un rol protector frente a enfermedades. Por todos ello, se decidió incluir PtGASA8 en este análisis.

En cuanto a lo observado en la subfamilia III, GASA10 presentó una expresión alta en tejido floral y HJ ([sección III.3.2](#)), también se destacó por presentar su mayor expresión en tejidos reproductivo (Wu et al., 2021), lo que sugiere un buen nivel basal previo a la infección. Además, presentó una alta expresión en las variedades de mayor resistencia evaluadas en esta tesis (*P. trifoliata* y *Citrange Troyer*) y baja en las más sensibles (*C. clementina* y *C. limon* var. *Eureka*), como se observó en la figura III.30 (Palacios, 2005; Ramadugu et al., 2016; Munir et al., 2017; Alves et al., 2021; Huang et al., 2021b; Weber et al., 2022). Además, presentó una inducción de la expresión en *C. sinensis* frente a la enfermedad HLB (Chin et al., 2021).

Por último, la GASA10 de *Citrus* sp. presentó la identidad de secuencias de mayor similitud con StSN3, siendo, junto con GASA1 y GASA18, uno de los miembros con mayor grado de ortología respecto a dicha proteína ([sección III.5.4](#)). Cabe destacar que la relación de ortología es compleja, debido a que los cítricos y la papa se encuentran en familias filogenéticamente muy distantes. Se decidió seleccionar GASA10 por tratarse de una proteína que previamente ha demostrado propiedades antimicrobianas frente a diversos fitopatógenos fúngicos, bacterianos y virales y presentarse inducida su expresión génica frente a *Ps tab* (Nahirñak et al., 2016; Nahirñak et al., 2024), como se indicó en la [sección III.1.5](#). Dado que su expresión se concentra en tejidos clave para la protección de la descendencia fértil, este gen surge como un candidato prometedor con posible función defensiva.

A partir de estos estudios se pudo concluir que los genes CcGASA6, CcGASA8 y CcGASA10 presentan niveles elevados de expresión en tejidos reproductivos y CsGASA8 se induce por Xcc (Wu et al., 2021). Del mismo modo, StSN1 se induce también por *R. solani* y *E. carotova* y StSN3 por *Ps tab* y *E. carotova* (Nahirñak et al., 2016; Nahirñak et al., 2024). Estos antecedentes proporcionaron los criterios relevantes que justificaron la selección de los genes ([sección III.3.3](#)).

III.5.3 *PtGASA6*, *PtGASA8* y *PtGASA10* frente a infecciones bacterianas: respuesta en un patosistema compatible y en otro incompatible

Los efectos devastadores de enfermedades bacterianas como el HLB en las producciones cítricas, cuyos efectos se debe a la enfermedad, a la latencia, al retraso de la aparición de síntomas hasta que ya se dispersó entre los cultivos (da Graça et al., 2016; Graham et al., 2020; Hu et al., 2021), con el factor agravante de la presencia de *D. citri* en el territorio argentino (SINAVIMO). Motivaron a la necesidad de búsqueda de genes con potencial rol biotecnológico para controlar dicha enfermedad.

Además, este agente presenta una complejidad para su estudio ya que no es una bacteria fácilmente cultivable (Bové, 2006; da Graça et al., 2016; Munir et al., 2017). Por lo cual se decidió evaluar el efecto de los genes de interés en otros patosistemas. Además, para tener un panorama completo de lo ocurrido durante la infección se decidió evaluar en un sistema compatible para así poder evaluar lo ocurrido durante la enfermedad, así como otro incompatible y evaluar la HR. A partir de este trabajo se pudieron poner a punto dos patosistemas efectivos para la evaluación rápida de genes frente a fitopatógenos bacterianos. Como patosistema compatible se empleó la interacción *N. benthamiana* – *Ps tab* (Oh y Collmer, 2005), así como patosistema incompatible se empleó *N. benthamiana* – *Xcc*. Al igual que *Ca. Liberibacter*, todos los agentes bacterianos evaluados fueron Gram -. El patosistema compuesto por *N. benthamiana* – *Xcc*, presentó otro beneficio que fue la de incorporar un patógeno de cítricos (Schaad et al., 2006).

Puesto que *P. trifoliata* fue la variedad que presenta mayor grado de tolerancia a HLB, se decidió sobreexpresar los genes seleccionados los genes seleccionados provenientes de esta especie (Palacios, 2005; Ramadugu et al., 2016). Mediante análisis por RT-qPCR se comprobó que, tras las correspondientes agroinfiltraciones, los genes seleccionados fueron efectivamente sobreexpresados.

A partir de los ensayos en *N. benthamiana*, se determinó que tanto *PtGASA6* como *PtGASA10* presentaron efectos deseables ya que retrasaron la necrosis asociada a la enfermedad y promovieron la sintomatología característica de la HR (secciones [III.3.7](#) y [III.3.8](#)). Este comportamiento no fue observado en el caso de *PtGASA8*. Es importante destacar que, si bien *PtGASA6* como *PtGASA10* promovieron una mayor respuesta inmune tanto en el contexto de una interacción compatible como incompatible, las respuestas observadas no parecen ser equivalentes en ambos casos. El retraso de la necrosis causada por *Ps tab* fue mucho más visible en *PtGASA10* en relación *PtGASA6* ([sección III.3.7](#)). Si bien, ambos genes sobreexpresantes retrasaron la sintomatología para el día 4 post desafío, la necrosis visible fue mucho mayor con *PtGASA6* figura III.21 y III.22 ([sección III.3.7](#)).

Al analizar los resultados del ensayo de enfermedad en el que se hizo la evaluación diaria (figura III.21), se evidenció una tendencia con *PtGASA10* a mantener la progresión de la necrosis atenuada y sin incrementos marcados, mientras que en el control se observó un avance sostenido de los síntomas ([sección III.3.7](#)). En cambio, *PtGASA6*, presentó la progresión inicial más marcada que *PtGASA10*, ya que el punto de partida fue mayor, pero se estabilizó en etapas posteriores, tendiendo a acercarse a la respuesta observada para *PtGASA10*. En la evaluación mediante AUDPC, se constató que *PtGASA10* presentó un inicio de la enfermedad más tardío que *PtGASA6*, aunque ambos mostraron diferencias significativas respecto al control (figura III.22A). Sin embargo, la tendencia lineal en el tiempo no pareció verse afectado, lo que indicaría que, una vez iniciados los síntomas, su avance se mantuvo de forma comparable entre tratamientos. Esta dinámica podría explicarse porque el análisis del AUDPC atenúa las variaciones puntuales diarias a un único valor acumulado, lo que reduce la sensibilidad para detectar diferencias temporales específicas, mientras que en el *boxplot* se puede ver, además de la media, todos los valores determinados, ofreciendo una visión más detallada de la evolución temporal de los síntomas (Shaner, 1977; Jeger y Viljanen-Rollinson, 2001; Schandry, 2017). Por lo tanto, se interpreta que la evaluación de cada día descripta inicialmente refleja con mayor

fidelidad el comportamiento diferencial entre *PtGASA10* y *PtGASA6*: *PtGASA10* mostró una respuesta más temprana, mientras que *PtGASA6*, tras una progresión inicial más marcada, se estabilizó progresivamente, alcanzando una respuesta similar hacia el día 6.

En cuanto al efecto observado en el ensayo de HR evaluado diariamente ([sección III.3.8](#)), se vislumbró que *PtGASA6* fue la que primero evidenció un incremento significativo de esta respuesta, a partir del día 6 (figura III.26). Desde del día 12 comenzó a manifestarse la respuesta causada por *PtGASA10*; sin embargo, la respuesta de *PtGASA6* alcanzó aproximadamente el doble de intensidad que la de *PtGASA10* (figura III.26).

Debido a la coloración característica del síntoma de HR, junto con la rapidez de su progresión, permitió el añadido de una categoría con respecto al ensayo de enfermedad ya que se pudo determinar con mayor sensibilidad la sintomatología (figura III.25, [sección III.3.8](#)). En este ensayo, también se observó incrementada la diferencia temporal. Inicialmente, la diferencia en el HRI entre *PtGASA6* y *PtGASA10* fue de $\Delta IHR_{\text{día6}}_{PtGASA6/PtGASA10} = IHR_{\text{día6}}_{PtGASA6} - IHR_{\text{día6}}_{PtGASA10} = 0,3$ y $\Delta IHR_{\text{día17}}_{PtGASA6/PtGASA10} = IHR_{\text{día17}}_{PtGASA6} - IHR_{\text{día17}}_{PtGASA10} = 1$. El AUDPC nuevamente no permitió vislumbrar esta diferencia.

Teniendo en cuenta la extensa evidencia generada en torno a los genes *StSN1* y *StSN3* (Almasia et al., 2008; Almasia et al., 2010; Nahirñak et al., 2012b; Nahirñak et al., 2012a; Nahirñak et al., 2016; Nahirñak et al., 2019; Almasia et al., 2020; Conti et al., 2020; Nahirñak et al., 2024), y considerando que la planta modelo utilizada en este trabajo, *N. benthamiana*, al igual que *S. tuberosum*, pertenece a la familia de las solanáceas, se decidió realizar una primera aproximación comparativa entre estos genes y *PtGASA10*, dado que este último mostró los efectos más destacados en la reducción de la necrosis asociada a la enfermedad. Resultados de este ensayo indicarían que los tres genes estarían retrasando la sintomatología de enfermedad, no obstante, *StSN1* pareciera presentar un resultado más heterogéneo por lo que al día 5 luego del desafío desapareció el efecto observado inicialmente, aunque evaluando el comportamiento general mediante AUDPC, se observó un retraso.

Es notable resaltar que los resultados entre las evaluaciones diarias y el AUDPC deben ser analizados en paralelo ya que pueden diferir. Esta dinámica podría explicarse porque el análisis del AUDPC atenúa las variaciones puntuales diarias a un único valor acumulado, lo que reduce la sensibilidad para detectar diferencias temporales específicas, mientras que en el boxplot se puede ver, además de la media, todos los valores determinados, ofreciendo una visión más detallada de la evolución temporal de los síntomas (Shaner, 1977; Jeger y Viljanen-Rollinson, 2001; Schandry, 2017).

III.5.4 Mecanismo de acción

Desde hace varias décadas se analizan proteínas con propiedades de AMP en péptidos caracterizados por una alta proporción de residuos de cisteína, entre las que se encuentran las tioninas (Caaveiro et al., 1997) y las proteínas en horquilla (*hairpins*) (Nolde et al., 2011). Se les atribuye la capacidad de interferir en las estructuras membranosas o de sus paredes celulares y así afectar sus capacidades de infección (Almasia et al., 2020). Es por ello por lo que se decidió hacer un análisis *in silico* para evaluar la estructura terciaria de las proteínas en estudio. A partir de este análisis (figura III.30, [sección III.3.10](#)), se observó la presencia de un motivo estructural tipo HTH en todos los miembros analizados. La formación de este motivo HTH, con una gran concentración de cargas positivas, se encuentra muy conservado evolutivamente en esta familia de proteínas e incluso en otros AMPs, lo que podría ser indicativo de su potencial acción contra fitopatógenos (Nahirñak et al., 2012a; Porto y Franco, 2013; Yeung et al., 2016; Menegueti et al., 2017; Rodríguez-Decuadro et al., 2018; Almasia et al., 2020; Wu et al., 2021; Shang et al., 2023; Nahirñak et al., 2024).

Los autores señalan que α -hélices estructuralmente conservadas deben ser analizadas como una parte esencial para poder comprender el mecanismo de acción de proteínas con actividad AMP (Almasia et al., 2020). Tal es así, que en un estudio comparativo de cristalografía de diversos AMPs se identificó una estructura terciaria altamente coincidente con otro péptido *EcAMP1* (Yeung et al., 2016). Se ha identificado que *EcAMP1* tiene la capacidad de salir del citosol de la célula vegetal e ingresar a conidios de *Fusarium solani* (Nolde et al., 2011; Vasilchenko et al., 2016). La aplicación de elevadas concentraciones de este AMP generó alteración de los conidios de este hongo (Vasilchenko et al., 2016).

En este sentido, se observó a partir un análisis de los péptidos SNAKIN/GASA de *C. clementina* resultados comparables a los observados para los genes *PtGASA6*, *PtGASA8*, *PtGASA10* (Wu et al., 2021). Wu et al. (2021) proponen que estos péptidos deben presentar un rol en la respuesta inmune.

Debido a que los α -hélices estarían asociadas a la unión al ADN, podrían modular la expresión génica tanto del patógeno como de las células vegetales durante la infección. Muchos AMPs presentan estos motivos y, si bien aún no se comprende del todo su funcionamiento, algunos de las proteínas SNAKIN/GASA han sido encontrados en el núcleo (Su et al., 2020). En este contexto, dicha regulación podría interferir con la actividad de las fitohormonas o con el balance de antioxidantes (Almasia et al., 2020; Su et al., 2020).

Por esto, se realizó una búsqueda *in silico* de la potencial ubicación de las proteínas GASAs mediante el servidor TMHMM v2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). A partir de este análisis se obtuvo que *PtGASA6*, al igual que *StSN1* (Nahirňak et al., 2012a; Almasia et al., 2020), ambas de la misma subfamilia I (figura III.33, [sección III.5.2](#)), no presentarían sitio de anclaje en la membrana plasmática (figura III.34).

Por el contrario, *PtGASA8* y *PtGASA10*, presentarían al menos un motivo α -hélice transmembrana, lo que sugiere que podrían anclarse en la membrana plasmática o ser excretadas hacia el apoplasto por esta vía (figura III.34). En particular, *PtGASA10*, perteneciente a la subfamilia III (figura III.33, [sección III.5.2](#)), que muestra un patrón similar de motivos estructurales transmembrana a *StSN3*, lo que refuerza la consistencia de estos resultados.

Además, lo observado aquí concuerda con lo reportado en *C. clementina*. Wu et al. (2021) reportaron que los genes SNAKIN/GASA de este cultivar, que cabe mencionar corresponde a un cítrico, podrían encontrarse en cloroplasto, de en el espacio extracelular, vacuolas, así como núcleo y en particular, *CcGASA10* podrían encontrarse en el espacio extracelular.

No obstante, los resultados obtenidos *in silico* deben ser demostrados experimentalmente ya que podrían presentarse discrepancias (Almasia et al., 2020), por ejemplo inicialmente se planteó que *StSN1* se encontraba en la pared celular o en el apoplasto, posteriormente se determinó que se encuentra en la membrana plasmática, contrariamente a lo determinado *in silico* (Almasia, 2009; Nahirňak et al., 2016).

Como se observa en la figura III.35, los resultados expuestos en este trabajo indicarían que los genes *PtGASA6* y *PtGASA10* generaron el efecto deseado de adelantar la HR, observado al desafiar *N. benthamiana* con *Xcc* ([sección III.3.8](#)), así como retrasar la necrosis desarrollada en el proceso de la enfermedad, observado en el desafío *N. benthamiana* – *Ps tab* ([sección III.3.7](#)).

Si bien esto fue observado con ambos genes, parecieran tener distinto impacto ya que, como se mencionó previamente, *PtGASA6* tuvo mayor efecto en el incremento de la HR, mientras que *PtGASA10* lo tuvo en el retraso de la enfermedad (figura III.35). Esto podría indicar que los mecanismos de acción podrían ser distintos o que intervienen en distintas rutas metabólicas, así como tener distinta localización o movilidad en el tejido vegetal (Almasia et al., 2020; Su et al., 2020; Wu et al., 2021; Nahirňak et al., 2024).

Se ha reportado que plantas silenciadas estables sobreexpresando *StSN1* incrementa ROS (Nahirñak et al., 2019), en otro sistema se ha reportado que la sobreexpresión de SN1 de *Stylosanthes* spp induce ROS, en respuesta a la toxicidad por aluminio (Guo et al., 2024). Estos efectos, si bien contradictorios, son indicativos de que esta subfamilia podría estar afectando la síntesis de ROS, aunque el efecto puede ser distinto en distintas especies vegetales o sistemas de trabajo como se ha sugerido previamente (Almasia et al., 2020). De acuerdo con el modelo ilustrado en la figura III.35, la ausencia de un sitio de anclaje en membrana en *PtGASA6* (figura III.34), sugiere que podría tener un rol fundamental que se desarrolla en el citosol, donde conlleve a inducir la HR. Esto podría ser un mecanismo que podría explicar el efecto pronunciado en la HR, luego de la sobreexpresión de este gen ([sección III.3.8](#)). Aun así, si bien, la no detección *in silico* de un sitio transmembrana para *PtGASA6* sería consistente con lo descrito previamente (Nahirñak et al., 2012a), esto debería ser corroborado experimentalmente, ya que la proteína podría igualmente anclarse en la membrana aunque el programa no lo prediga (Nahirñak et al., 2016).

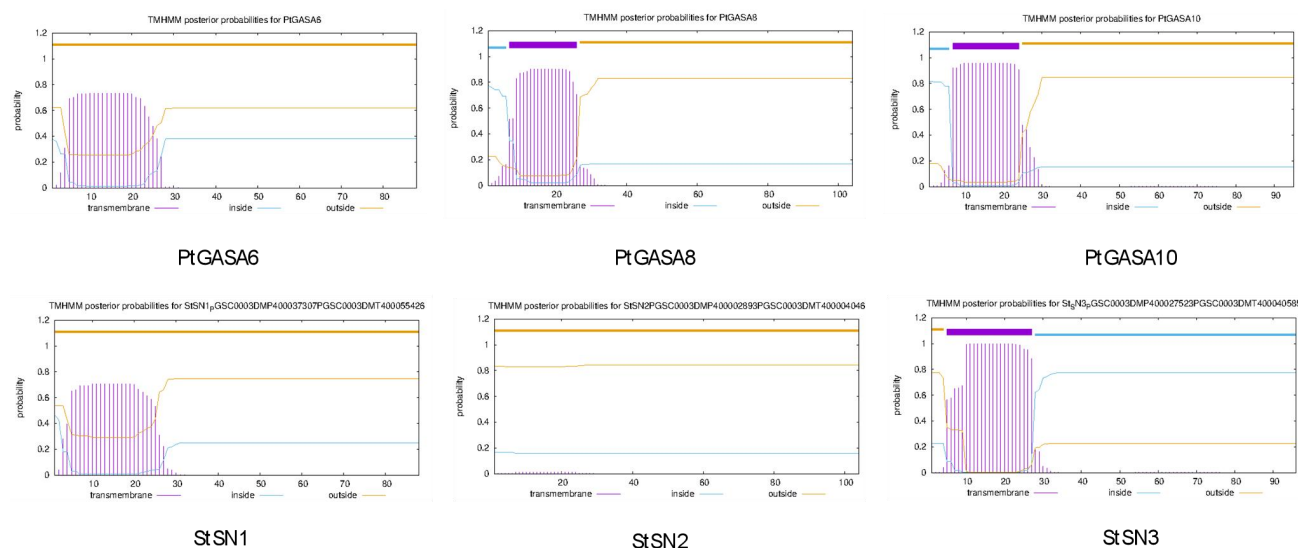


Figura III.34. Topología de las proteínas *PtGASA6*, *PtGASA8*, *PtGASA10*, *StSN1*, *StSN2* y *StSN3*. La línea violeta indica la probabilidad de que un segmento de la proteína se inserte en la membrana plasmática (región transmembrana). La línea celeste, ubicada en la parte superior del gráfico, representa las regiones orientadas hacia el interior celular (citoplasmáticas), mientras que la línea amarilla señala las regiones localizadas en el exterior de la célula (extracelulares). La topología predicha indicaría que *PtGASA8*, *PtGASA10* y *StSN3* podrían tener un sitio de anclado a la membrana (región transmembrana).

Es destacable que el efecto observado para *PtGASA10* fue especialmente pronunciado en el retraso de la necrosis de la enfermedad ([sección III.3.7](#), figura III.35), a pesar de que su nivel de expresión fue dos veces menor en comparación con *PtGASA6* ([sección III.3.2](#)). Esto sugiere que *PtGASA10* posee una capacidad notable para retrasar el avance de la enfermedad, incluso con una expresión reducida, lo que podrían indicar una alta eficiencia funcional o un mecanismo de acción particularmente efectivo, así como la posibilidad de que tenga más tiempo de vida de la proteína, sin embargo, para confirmar esta última hipótesis sería necesario cuantificar la concentración proteica.

Asimismo, este efecto podría estar relacionado con la presencia de un sitio de anclaje en membrana y, potencialmente, con su excreción, lo que le permitiría desempeñar un rol dual al interactuar con el apoplasto y generar una reducción más intensa de la sintomatología ([sección III.3.7](#)), ya que le brindaría la posibilidad de tener una interacción directa con el patógeno durante la infección. En este contexto, es notable señalar que *Ps tab* induce la expresión de *StSN3* (Nahirñak et al., 2016), que como se indicó, es uno de los miembro más cercano a *PtGASA10* (figura III.31). Esto podría ser un buen indicio de que, durante la infección causada por bacterias, la planta induciría este gen para impedir la propagación de los agentes bacterianos en el tejido vegetal.

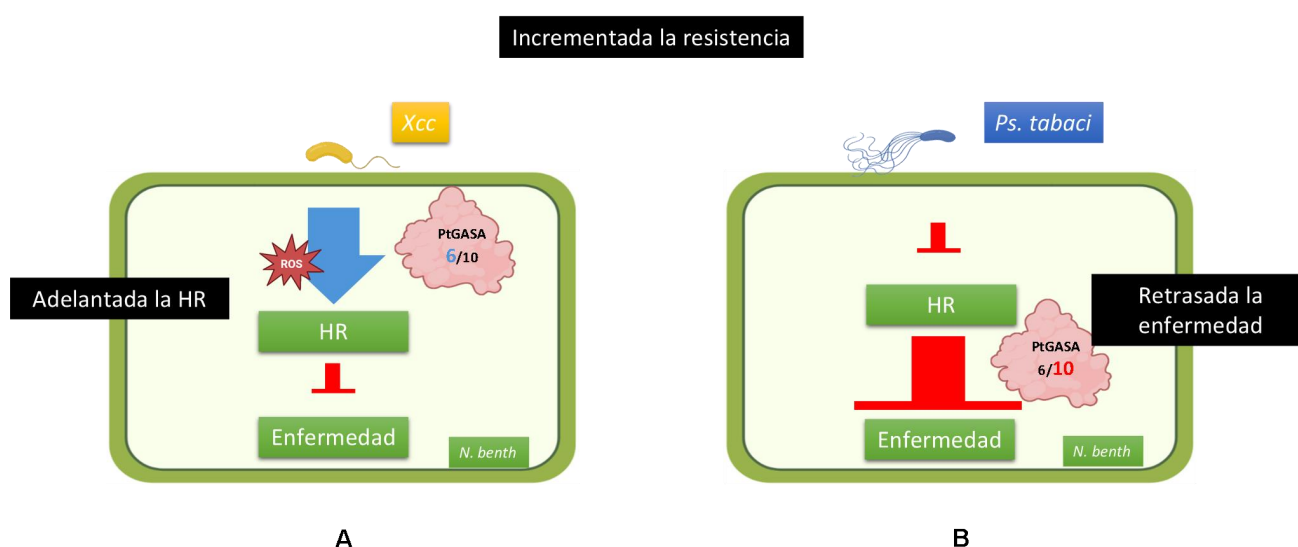


Figura III.35 Modelo ilustrativo representativo de lo ocurrido durante las infecciones al sobreexpresar los genes *PtGASA6* y *PtGASA10* durante las infecciones incompatibles (*Xcc*) y complatible (*Ps. tab*). Con ambos genes se observó adelantada la HR, así como retrasada la necrosis, respectivamente. Sin embargo, los efectos fueron distintos según el gen: *PtGASA6* incrementó la HR en un 30% más que *PtGASA10*, mientras que *PtGASA10* logró retrasar la necrosis un 40% más que *PtGASA6*. Esto sería indicativo de que el mecanismo de acción de estas proteínas sería distinto.

III.5.5 Perspectivas a futuro

Dado que, como tendencia general, los genes *SNAKIN/GASA* presentan baja expresión en raíz y el HLB genera una infección sistémica afectando el floema (Munir et al., 2017; Dala-Paula et al., 2019), sería interesante sobreexpresarlo en raíz, ya que dicha enfermedad termina generando un daño muy importante por afectarse el sistema vascular de la planta, generando clorosis muy significativas (Gottwald et al., 2007; da Graça et al., 2016; Dala-Paula et al., 2019; Hu et al., 2021). Quizás con un promotor de sobreexpresión de raíz o de floema.

En particular, teniendo en cuenta el pequeño tamaño de los AMPs y que hay antecedentes del desarrollo de AMPs en nanopartículas, sería interesante evaluar esta posibilidad como alternativa para el desarrollo de un bioinsumo para implementarlo en diversos cultivos, entre ellos, en cítricos como se evalúa en esta tesis (Koshariya et al., 2024).

Asimismo, como una primera aproximación dentro de las bacterias consideradas fastidiosas, que permitirían diseñar un modelo más apropiado para HLB, se podría evaluar emplear a *Clso*, patógeno que afecta a las solanáceas para poder realizar ensayos con características similares a las ensayadas en esta tesis. Sin embargo, esta bacteria es exótica para Argentina y se encuentra estrictamente clasificada como organismo cuarentenario por SENASA, por lo que su introducción en el país no está autorizada. En consecuencia, tales ensayos deberían realizarse en regiones donde la bacteria es endémica.

Cabe destacar que, al inicio de esta tesis, no se contaba con habilitación para el trabajo con HLB; no obstante, actualmente el invernáculo del IABIMO posee la única autorización en el país otorgada por SENASA para manipular HLB bajo condiciones de bioseguridad, así como la capacidad de obtener plantas modificadas genéticamente para la incorporación de los genes de interés (Conti et al., 2021). Esto brindaría en un futuro, la capacidad de realizar ensayos con dicho fitopatógeno, obteniendo resultados dirigidos al estudio de esta enfermedad.

Diversos reportes exponen métodos para realizar infecciones con HLB injertando, ya sea hojas (Hilf y Lewis, 2016) o ramificaciones de árboles confirmados para Clas (Zhang et al., 2012; Hilf y Lewis, 2016; Cui et al., 2022), incluso algunos autores han desarrollado protocolos mediante la infección de *D. citri* (Lopes y Cifuentes-Arenas, 2021). Como primera aproximación en cítricos, sería interesante desarrollar plantas intragénicas expresando los genes *PtGASA6* y *PtGASA10* en pomelo, cultivar de mayor susceptibilidad a *Xcc*, y generar infecciones con este patógeno, de forma similar a como se ha realizado en el laboratorio previamente con otros genes (Conti et al., 2020). De esta forma, se conserva parte del patosistema original, al evaluar la infección con el mismo. Luego, sería el objetivo de mayor interés evaluar, estas plantas frente a HLB, para ello las plantas sobreexpresantes deberían ser injertadas con material infectado y evaluar si se ve afectada la enfermedad.

Un enfoque más genético para evaluar la selección asistida de las variantes *SNAKIN/GASA* aquí identificadas como candidatas para conferir tolerancia a HLB, sería seleccionar plantas de *P. trifoliata* con variantes lo más isogénicas posible de expresión contrastante para estos genes y evaluar su comportamiento. También se podría evaluar mutantes inducidas obtenidas por mutagénesis convencional, edición génica (CRISPR-CAS) o por TILLING comparando variantes de mayor o menor expresión de estos mismos genes.

IV - *CONCLUSIONES*

IV Conclusiones

Existen diversas estrategias empleadas para controlar enfermedades causadas por agentes bacterianos en cultivos agrícolas. Actualmente, los principales métodos de control son químicos, basados en su mayoría en compuestos cúpricos, y físicos, como la solarización, los cuales pueden generar impactos ambientales y/o reducir la microbiota del suelo. En la actualidad, los agentes bacterianos como *Xcc*, agente infeccioso de la enfermedad de la Cancrosis de los Cítricos son controlados fundamentalmente por control químico en base a compuestos cúpricos (Palacios, 2005). Sin embargo, estos agroquímicos no afectan al HLB. Sería de gran relevancia para nuestro país poder desarrollar alternativas a los controles químicos y físicos para poder reducir el impacto ambiental de los mismos e incrementar la productividad de los cultivos.

Es por ello, que en este trabajo se analizó la inmunidad vegetal para poder encontrar posibles genes que confieran tolerancia/resistencia, ya sea parcial o completa frente a este tipo de estrés biótico. Se conoce que las plantas poseen varios mecanismos de defensa contra agentes patógenos. Un mecanismo de la inmunidad conocido como resistencia horizontal permite generar defensa contra múltiples patógenos por lo que se dice que es de amplio espectro (Agrios, 2005; Kou y Wang, 2010), generar este tipo de defensa es deseable ya que, en general, suelen ser durables al ser gobernada por múltiples genes (Kou and Wang 2010; Li et al. 2020). Por otro lado, se encuentran los específicos que operan a partir del reconocimiento de proteínas por proteínas de resistencia (proteínas R) de las plantas generando una mayor resistencia contra patógenos planta-específico, como se explica a continuación (Agrios, 2005; Tariq y Saleem, 2018; Li et al., 2020).

Actualmente, para el mejoramiento vegetal la mejor estrategia es poder combinar genes de inmunidad específica e inespecífica (o innata) para obtener resistencia contra múltiples patógenos y que sea durable, disminuyendo la probabilidad de seleccionar resistencia en los patógenos frente a los mismos (Li et al., 2020). En este contexto se seleccionaron dos patosistemas: *S. lycopersicum* – *Pst* y *Citrus sp.* – *Xcc*, representativos de la inmunidad específica e innata, respectivamente. Los genes evaluados en este trabajo podrían brindar oportunidades para el desarrollo de cultivos con mayor resistencia a patógenos bacterianos, mediante el apilamiento de genes que otorguen cualidades deseables y aseguren una inmunidad amplia y duradera.

Los genes de la familia ATG1 tienen una relevancia para estudios más fundamentales, para poder comprender las vías metabólicas que interfieren en procesos inmunitarios en los que hay un *crosstalk* con otros procesos como el de la autofagia. Por su parte, la familia de proteínas SNAKIN/GASA se encuentran en plantas y parecieran ser muy conservados, por lo que serían de gran relevancia para evaluarlos en cultivos con su expresión alterada (intergénicos), estos genes tienen un gran potencial para ser implementados para el mejoramiento genético así como para desarrollar potenciales bioinsumos de la industria alimenticia o para aplicar en cultivos en la etapa postcosecha.

En relación con los genes de inmunidad específica, aún es necesario profundizar en el rol de la autofagia con fines fundamentales, a fin de determinar su potencial aplicación. Respecto de los genes de amplio espectro, resulta indispensable caracterizar su mecanismo de acción, incluyendo el impacto sobre el efecto de ROS y su modulación con las fitohormonas, y luego evaluarlo contra la enfermedad blanco de interés, el HLB.

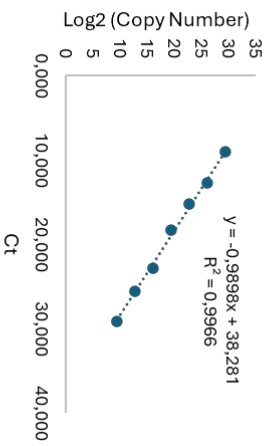
V - INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

V Información suplementaria

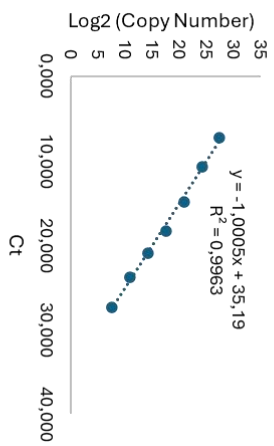
Tabla S1: Tasa de cambio de expresión de los genes GASA en los diferentes tratamientos desafiado con HLB utilizada para el armado del heatmap de la figura b. Los datos de expresión se encuentran en unidades de Log_2 (fold – change).

File	GWSA.2	GWSA.3	GWSA.4	GWSA.5	GWSA.6	GWSA.9	GWSA.10	GWSA.11	GWSA.12	GWSA.13	GWSA.14	GWSA.15	GWSA.16	GWSA.17
FLW434848-0m1.csv	0.93768614	3.58E+09		-0.94537542	0.951292655		3.9E+08							
FLW434848-14d1.csv	-4.53E+09	-0.810910456		-0.71248781	-1.35E+09		0.5602559	-2.29E+09	-0.2427421	-1.54E+09	-1.38E+09			
FLW434848-20d1.csv	1.93E+09	-0.05263815		-0.07484948	0.000077213		-0.16655539	-1.69E+09	0.519193325	-0.046945375	0.596716245			
FLW434848-48d1.csv	2.88E+09	2.38E+09		0.45010065	0.055180442		0.647393332	-1.94E+09	0.1694801	-1.31E+09	0.294006073			
FLW4417324-0m1.csv	1.74E+09	1.39E+09	0.00E+00	1.05E+09	0.055598442	0.00E+00	1.25E+09	0.15431323	0.19410231	-0.68163583	2.07E+09	0.00E+00	1.7E+09	
FLW4417324-12d1.csv	0.70945238	0.338073343	1.33E+09	-0.51201917	0.343224483	0.00E+00	0.07385753	1.15E+09	-1.59E+09	-1.81E+09	-3.48E+09	0.00E+00	0.662034151	
FLW4417324-42d1.csv	1.29E+09	0.062256531	0.75713531			0.00E+00	-0.26186683	2.61E+09	1.72E+09	1.1E+09	1.12E+09	0.00E+00	0.00E+00	
FLW4571169-0m1.csv	2.87E+09	1.77E+09		-0.459291383			0.72093236	4.69E+09	3.17E+09	1.8E+09	4.11E+09	0.300335019	0.942265898	
FLW4571169-15d1.csv	4.48E+09	0.949291383		0.040452543	0.906093355	-2.3E+09	0.040452543	0.906093355	0.062876111	-3.27E+09	-1.74E+09	1.24E+09		
FLW4571169-50d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.300740002	-0.926352203	-1.2E+09	0.902942789	0.109130033	0.048144865	2.71E+09	-0.00E+00	2.2E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.4E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.61755944	3.54E+09	0.00E+00	0.564816565	0.216283234	1.60E+09	1.48E+09	1.39E+09	1.39E+09		
FLW4571169-90d1.csv	0.8894152	0.72855208	0.00E+00	0.										

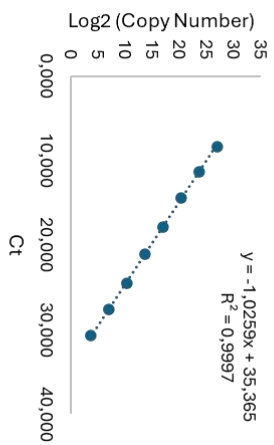
GASA 1



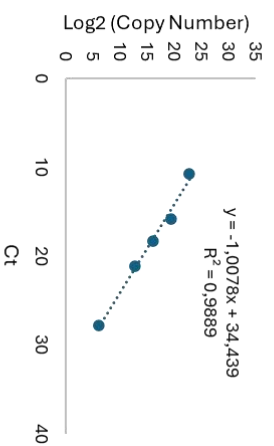
GASA 6



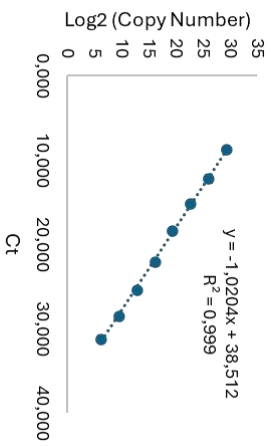
GASA 7



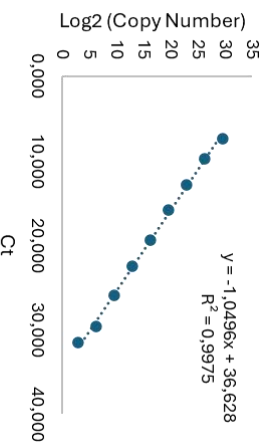
GASA 8



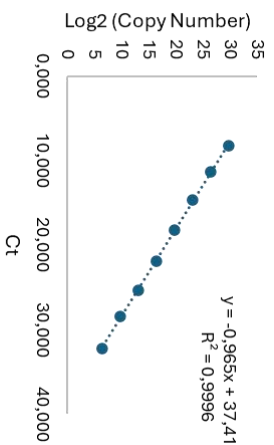
GASA 9_like



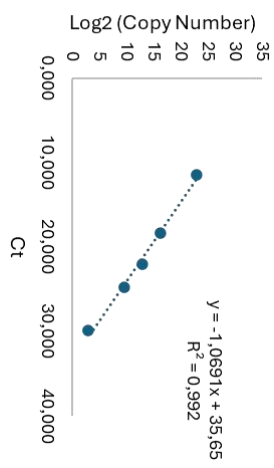
GASA 9



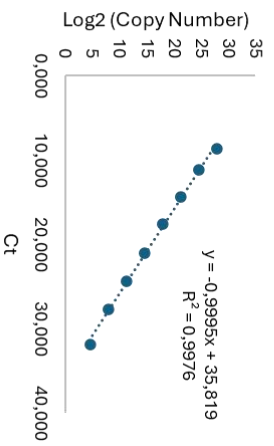
GASA 10



GASA 11



GASA 12



GASA 13

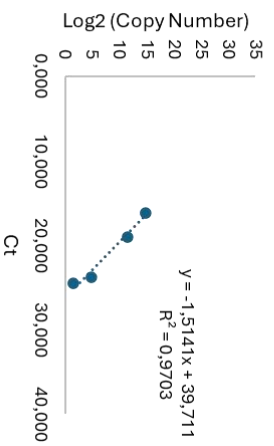


Figura z. Gráficos de la relación entre Log2 del número de copias de ADN en función del Ct de los genes GASA 1, GASA 6, GASA 7, GASA 8, GASA 9_like, GASA 9, GASA 10, GASA 11, GASA 12, GASA 13. Cada gráfico presenta la ecuación lineal y su R^2 , donde “y” es Log2 del número de copias de ADN y “x” el Ct, despejando el número de copias de ADN del y se obtiene la cantidad de moléculas de ADN. A partir de la cuantificación del ADN en Quibit

VI - REFERENCIAS

VI Referencias

- Agrios GN** (2005) Plant Pathology 5th. Ed. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Alhoraibi H, Bigeard J, Rayapuram N, Colcombet J, Hirt H** (2019) Plant immunity: The mti-eti model and beyond. *Curr Issues Mol Biol* **30**: 39–58
- Ali S, Hameed A, Muhae-Ud-Din G, Ikhlaz M, Ashfaq M, Atiq M, Ali F, Zia ZU, Naqvi SAH, Wang Y** (2023) Citrus Canker: A Persistent Threat to the Worldwide Citrus Industry—An Analysis. *Agronomy* **13**: 1–31
- Ali S, Tyagi A, Mir ZA** (2024) Plant Immunity: At the Crossroads of Pathogen Perception and Defense Response. *Plants*. doi: 10.3390/plants13111434
- Almasia NI** (2009) Tesis Doctoral.
- Almasia NI, Bazzini AA, Hopp HE, Vazquez-Rovere C** (2008) Overexpression of snakin-1 gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants. *Mol Plant Pathol* **9**: 329–338
- Almasia NI, Molinari MP, Maroniche GA, Nahirñak V, Barrios Barón MP, Taboga OA, Vazquez Rovere C** (2017) Successful production of the potato antimicrobial peptide Snakin-1 in baculovirus-infected insect cells and development of specific antibodies. *BMC Biotechnol* **17**: 1–11
- Almasia NI, Nahirñak V, Hopp HE, Vazquez-Rovere C** (2020) Potato Snakin-1: an antimicrobial player of the trade-off between host defense and development. *Plant Cell Rep* **39**: 839–849
- Almasia NI, Nahirñak V, Hopp Esteban H, Vazquez-Rovere C** (2010) Isolation and characterization of the tissue and development-specific potato snakin-1 promoter inducible by temperature and wounding. *Electron J Biotechnol* **13**: 1–21
- Alves MN, Lopes SA, Raiol-Junior LL, Wulff NA, Girardi EA, Ollitrault P, Peña L** (2021) Resistance to ‘Candidatus Liberibacter asiaticus,’ the Huanglongbing Associated Bacterium, in Sexually and/or Graft-Compatible Citrus Relatives. *Front Plant Sci* **11**: 1–16
- Arie T, Takahashi H, Kodama M, Teraoka T** (2007) Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnol* **24**: 135–147
- Augustine RC** (2019) You are what you eat: An Atg1-independent path to autophagy. *Plant Cell* **31**: 2821–2822
- Bakare OO, Gokul A, Fadaka AO, Wu R, Niekerk LA, Barker AM, Keyster M, Klein A** (2022) Plant Antimicrobial Peptides (PAMPs): Features, Applications, Production, Expression and Challenges. *Molecules*. doi: 10.3390/molecules27123703
- Bakker EG, Toomajian C, Kreitman M, Bergelson J** (2006) A genome-wide survey of R gene polymorphisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1803–1818
- Bally J, Jung H, Mortimer C, Naim F, Philips JG, Hellens R, Bombarely A, Goodin MM, Waterhouse PM** (2018) The rise and rise of *Nicotiana benthamiana*: A plant for all reasons. *Annu Rev Phytopathol* **56**: 405–426
- Bassham DC** (2015) Methods for analysis of autophagy in plants. *Methods* **75**: 181–188
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K** (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* **2**: 2–11
- Batoko H, Dagdas Y, Baluska F, Sirko A** (2017) Understanding and exploiting autophagy signaling in plants. *Essays Biochem* **61**: 675–685

- Baulcombe DC** (1999a) Fast forward genetics based on virus induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 109–113
- Baulcombe DC** (1999b) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 109–113
- Bekier FN** (2018) Tesis de Licenciatura - Estudio de genes de tomate asociados a la respuesta inmune frente a *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente causal de la peca bacteriana.
- Bendahmane A, Querci M, Kanyuka K, Baulcombe DC** (2000) Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: Application to the Rx2 locus in potato. *Plant J* **21**: 73–81
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL** (2005) GenBank. *Nucleic Acids Res* **33**: 34–38
- Beracochea VC, Almasia NI, Peluffo L, Nahirñak V, Hopp EH, Paniego N, Heinz RA, Vazquez-Rovere C, Lia V V.** (2015) Sunflower germin-like protein HaGLP1 promotes ROS accumulation and enhances protection against fungal pathogens in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* **34**: 1717–1733
- Berardini TZ, Reiser L, Li D, Mezheritsky Y, Muller R, Strait E, Huala E** (2015) The arabidopsis information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *Genesis* **53**: 474–485
- Bergounoux V** (2014) The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnol Adv* **32**: 170–189
- Beritza K, Watts EC, van der Hoorn RAL** (2024) Improving transient protein expression in agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana*. *New Phytol* **243**: 846–850
- Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, López G, García-Olmedo F, Molina A** (2002) Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol* **128**: 951–961
- Bhattacharjee S** (2019) ROS in Aging and Senescence. *React. Oxyg. Species Plant Biol.* Springer, New Delhi, pp 65–79
- Blaustein RA, Lorca GL, Teplitski M** (2018) Challenges for Managing Candidatus Liberibacter spp. (Huanglongbing Disease Pathogen): Current Control Measures and Future Directions . *Phytopathology®* **108**: 424–435
- Bombarely A, Rosli HGHG, Vrebalov J, Moffett P, Mueller LA, Martin GB** (2012) A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Mol Plant-Microbe Interact* **25**: 1523–1530
- Boonpa K, Tantong S, Weerawanich K, Panpetch P, Pringsulaka O, Yingchutrakul Y, Roytrakul S, Sirikantaramas S** (2018) Heterologous expression and antimicrobial activity of OsGASR3 from rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Physiol* **224–225**: 95–102
- Bouteraa MT, Romdhane W Ben, Baazaoui N, Alfaifi MY, Chouaibi Y, Akacha B Ben, Hsouna A Ben, Ka~ M, Garzoli S, Saad R Ben, et al.** (2023) GASA Proteins: Review of Their Functions in Plant Environmental Stress Tolerance. 1–16
- Boutrot F, Zipfel C** (2017) Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annu Rev Phytopathol* 1–30
- Bové JM** (2006) Huanglongbing: A Destructive, Newly-Emerging, Century-Old Disease Of Citrus. *Cond J Plant Pathol* **88**: 7–37

- Brettell RIS, Pryor AJ** (1986) Molecular approaches to plant and pathogen genes. A Genet. Approach to Plant Biochem. Springer, pp 233–246
- Brigneti G, Martín-Hernández AM, Jin H, Chen J, Baulcombe DC, Baker B, Jones JDG** (2004) Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J* **39**: 264–272
- Caaveiro JMM, Molina A, González-Mañas JM, Rodríguez-Palenzuela P, García-Olmedo F, Goñi FM** (1997) Differential effects of five types of antipathogenic plant peptides on model membranes. *FEBS Lett* **410**: 338–342
- Cai R, Lewis J, Yan S, Liu H, Clarke CR, Campanile F, Almeida NF, Studholme DJ, Lindeberg M, Schneider D, et al.** (2011) The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity. *PLoS Pathog.* doi: 10.1371/journal.ppat.1002130
- Campos ML, De Souza CM, De Oliveira KBS, Dias SC, Franco OL** (2018) The role of antimicrobial peptides in plant immunity. *J Exp Bot* **69**: 4997–5011
- Canteros BI, Gochez AM, Moschini RC** (2017) Management of citrus canker in Argentina, a success story. *Plant Pathol J* **33**: 441–449
- Caserta R, Teixeira-Silva NS, Granato LM, Dorta SO, Rodrigues CM, Mitre LK, Yochikawa JTH, Fischer ER, Nascimento CA, Souza-Neto RR, et al.** (2019) Citrus biotechnology: What has been done to improve disease resistance in such an important crop? *Biotechnol Res Innov* **3**: 95–109
- Causse M, Giovannoni J, Bouzayen M, Zouine M** (2016) The tomato genome. Springer
- Chai J, Song W, Parker JE** (2023) New Biochemical Principles for NLR Immunity in Plants. *Mol Plant-Microbe Interact* **36**: 468–475
- Chakravarthy S, Velásquez AC, Ekengren SK, Collmer A, Martin GB** (2010) Identification of *Nicotiana benthamiana* Genes Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern–Triggered Immunity. *Mol Plant-Microbe Interact* **23**: 715–726
- Cheng W, Munkvold KR, Gao H, Mathieu J, Schwizer S, Wang S, Yan Y Bin, Wang J, Martin GB, Chai J** (2011) Structural analysis of *Pseudomonas syringae* AvrPtoB bound to host BAK1 reveals two similar kinase-interacting domains in a type III effector. *Cell Host Microbe* **10**: 616–626
- Chin EL, Ramsey J, Saha S, Mishchuk D, Chavez J, Howe K, Zhong X, Flores-Gonzalez M, Mitrovic E, Polek M, et al.** (2021) Multi-omics Comparison Reveals Landscape of Citrus limon and Citrus sinensis Response to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *PhytoFrontiers™* **1**: 76–84
- Ciarroni S, Clarke CR, Liu H, Eckshtain-Levi N, Mazzaglia A, Balestra GM, Vinatzer BA** (2018) A recombinant flagellin fragment, which includes the epitopes flg22 and flgII-28, provides a useful tool to study flagellin-triggered immunity. *J Gen Plant Pathol* **84**: 169–175
- Clarke CR, Chinchilla D, Hind SR, Taguchi F, Miki R, Ichinose Y, Martin GB, Leman S, Felix G, Vinatzer BA** (2013) Allelic variation in two distinct *Pseudomonas syringae* flagellin epitopes modulates the strength of plant immune responses but not bacterial motility. *New Phytol* **200**: 847–860
- Cohn JR, Martin GB** (2005) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant J* **44**: 139–154
- Contento AL, Xiong Y, Bassham DC** (2005) Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *Plant J* **42**: 598–608
- Conti G** (2005) Tesis de Doctorado - Estudio de las bases moleculares de la interacción virus- planta, relación entre genes de defensa, ARNs pequeños y sintomatología. 55–57

- Conti G, Gardella V, Vandecaveye MA, Gomez CA, Joris G, Hauteville C, Burdyn L, Almasia NI, Nahirñak V, Vazquez-Rovere C, et al.** (2020) Transgenic Citrange troyer rootstocks overexpressing antimicrobial potato Snakin-1 show reduced citrus canker disease symptoms. *J Biotechnol* **324**: 99–102
- Conti G, Xoconostle-Cázares B, Marcelino-Pérez G, Hopp HE, Reyes CA** (2021) Citrus Genetic Transformation: An Overview of the Current Strategies and Insights on the New Emerging Technologies. *Front Plant Sci* **12**: 1–22
- Core R** (2024) R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Cui X, Zhang J, Liu Y, Luo X, Deng X, Zhang S, Xu M** (2022) Comparison of different grafting methods on the effect of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” transmission. *Fruit Res.* doi: 10.48130/FruRes-2022-0015
- Dala-Paula BM, Plotto A, Bai J, Manthey JA, Baldwin EA, Ferrarezi RS, Gloria MBA** (2019) Effect of huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a review. *Front Plant Sci* **9**: 1–19
- Dalio RJD, Paschoal D, Arena GD, Magalhães DM, Oliveira TS, Merfa M V., Maximo HJ, Machado MA** (2021) Hypersensitive response: From NLR pathogen recognition to cell death response. *Ann Appl Biol* **178**: 268–280
- Darqui FS, Radonic LM, Trotz PM, López N, Vázquez Rovere C, Hopp HE, López Bilbao M** (2018) Potato snakin-1 gene enhances tolerance to *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic lettuce plants. *J Biotechnol* **283**: 62–69
- Demeter A, Romero-Mulero MC, Csabai L, Ölbei M, Sudhakar P, Haerty W, Korcsmáros T** (2020) ULK1 and ULK2 are less redundant than previously thought: computational analysis uncovers distinct regulation and functions of these autophagy induction proteins. *Sci Rep* **10**: 1–17
- Derevnina L, Kamoun S, Wu C hang** (2019) Dude, where is my mutant? *Nicotiana benthamiana* meets forward genetics. *New Phytol* **221**: 607–610
- Dirección de Producción Agrícola La Producción de Tomate en Argentina** (2020) La Producción de Tomate en Argentina. 1–14
- Dodds PN, Chen J, Outram MA** (2024) Pathogen perception and signaling in plant immunity. *Plant Cell* **36**: 1465–1481
- Dodds PN, Rathjen JP** (2010) Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**: 539–548
- Droc G, Giraud D, Belser C, Labadie K, Duprat S, Cruaud C, Istace B, Dos F, Menezes S, Curk F, et al.** (2024) A super-pangenome for cultivated citrus reveals evolutive features during the allopatric phase of their reticulate evolution.
- Erickson J, Weckwerth P, Romeis T, Lee J** (2022) What’s new in protein kinase/phosphatase signalling in the control of plant immunity? *Essays Biochem* **66**: 621–634
- European Council of European Union** New genomic techniques: Council agrees negotiating mandate.
- Faccio P, Vazquez-Rovere C, Hopp E, González G, Décima-Oneto C, Favret E, Diaz Paleo A, Franzone P, Paleo AD, Franzone P** (2011) Increased tolerance to wheat powdery mildew by heterologous constitutive expression of the *Solanum chacoense* snakin-1 gene. *Czech J Genet Plant Breed* **47**: 135–142
- Fernandez-Pozo N, Menda N, Edwards JD, Saha S, Tecle IY, Strickler SR, Bombarely A, Fisher-York T, Pujar A, Foerster H, et al.** (2015a) The Sol Genomics Network (SGN)--from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Res* **43**: D1036–41

- Fernandez-Pozo N, Rosli HG, Martin GB, Mueller LA** (2015b) The SGN VIGS tool: User-friendly software to design virus-induced gene silencing (VIGS) Constructs for functional genomics. *Mol Plant* **8**: 486–488
- Flor HH** (1942) The inheritance of pathogenicity in a cross between physiologic races 22 and 24 of *Melampsora lini*.
- Furman N** (2013) Tesis de doctorado - “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 N, Kobayashi K, Zaneck MC, Calcagno J, García ML, Mentaberry A** (2013) Transgenic sweet orange plants expressing a dermaseptin coding sequence show reduced symptoms of citrus canker disease. *J Biotechnol* **167**: 412–419
- García-Valdés E, Lalucat J** (2016) *Pseudomonas*: molecular phylogeny and current taxonomy. *Pseudomonas Mol. Appl. Biol. Springer, Cham*, pp 1–23
- Geeta, Mishra R** (2018) Fungal and bacterial biotrophy and necrotrophy. *Mol Asp plant-pathogen Interact* **21**–42
- Gentile A, La Malfa S, Deng Z** (2020) *The Citrus Genome*. Springer
- Ghozlan MH, EL-Argawy E, Tokgöz S, Lakshman DK, Mitra A** (2020) Plant Defense against Necrotrophic Pathogens. *Am J Plant Sci* **11**: 2122–2138
- Goberna MF, Lewi DM, Godoy P, Simeone F, Hopp HE** (2023) Regulatory framework for CRISPR-edited crops in Argentina. *Glob Regul Outlook Cris Plants* **213**–230
- Golubova D, Tansley C, Su H, Patron NJ** (2024) Engineering *Nicotiana benthamiana* as a platform for natural product biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*. doi: 10.1016/j.pbi.2024.102611
- Gómez-Gómez L, Boller T** (2000) FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **5**: 1003–1011
- Gómez Lende S** (2023) Circuito productivo de la Citricultura.
- Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA** (2008) *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol Plant-Microbe Interact* **21**: 1015–1026
- Gottwald T, da Graça J V., Bassazeni RB** (2007) Home | Log In Citrus Huanglongbing : The Pathogen and Its Impact. 1–46
- Gottwald TR, Graham JH, Schubert TS** (2002) Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact. *Plant Heal Prog*. doi: 10.1094/php-2002-0812-01-rv
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O** (2010) Sea view version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* **27**: 221–224
- da Graça J V., Douhan GW, Halbert SE, Keremane ML, Lee RF, Vidalakis G, Zhao H** (2016) Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world’s citrus. *J Integr Plant Biol* **58**: 373–387
- Graham J, Gottwald T, Setamou M** (2020) Status of Huanglongbing (HLB) outbreaks in Florida, California and Texas. *Trop Plant Pathol* **45**: 265–278
- Gross AS, Raffener M, Zeng Y, Üstün S, Dagdas Y** (2025) Autophagy in Health and Disease. *Autophagy Heal Dis* **1**–433
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O** (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* **59**: 307–321

- Guo X, Zhu S, Xue Y, Lin Y, Mao J, Li S, Liang C, Lu X, Tian J** (2024) The Stylo Cysteine-Rich Peptide SgSnakin1 Is Involved in Aluminum Tolerance through Enhancing Reactive Oxygen Species Scavenging. *Int J Mol Sci* **25**: 1–15
- Gutierrez JR, Balmuth AL, Ntoukakis V, Mucyn TS, Gimenez-Ibanez S, Jones AMEE, Rathjen JP** (2010) Prf immune complexes of tomato are oligomeric and contain multiple Pto-like kinases that diversify effector recognition. *Plant J* **61**: 507–518
- Hall T, Biosciences I, Carlsbad C** (2011) BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF bull biosci* **2**: 60–61
- Han X, Li S, Zeng Q, Sun P, Wu D, Wu J, Yu X, Lai Z, Milne RJ, Kang Z, et al.** (2025) Genetic engineering, including genome editing, for enhancing broad-spectrum disease resistance in crops. *Plant Commun* **6**: 101195
- Hayward A, Padmanabhan M, Dinesh-Kumar SP** (2011) Virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other plant species. *En PBF Ouwerkerk, AH Meijer, eds, Plant Reverse Genet. Methods Protoc.* pp 55–63
- Hayward AP, Tsao J, Dinesh-Kumar SP** (2009) Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 1041–1047
- Herbel V, Sieber-Frank J, Wink M** (2017) The antimicrobial peptide snakin-2 is upregulated in the defense response of tomatoes (*Solanum lycopersicum*) as part of the jasmonate-dependent signaling pathway. *J Plant Physiol* **208**: 1–6
- Hilbe JM** (2007) STATISTICA 7: an overview. *Am Stat* **61**: 91–94
- Hilf ME, Lewis RS** (2016) Transmission and propagation of ‘candidatus liberibacter asiaticus’ by grafting with individual citrus leaves. *Phytopathology* **106**: 452–458
- Hind SR, Strickler SR, Boyle PC, Dunham DM, Bao Z, O’Doherty IM, Baccile JA, Hoki JS, Viox EG, Clarke CR, et al.** (2016) Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. *Nat Plants* **2**: 1–8
- Hofius D, Li L, Hafrén A, Coll NS** (2017) Autophagy as an emerging arena for plant–pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* **38**: 117–123
- Hofius D, Munch D, Bressendorff S, Mundy J, Petersen M** (2011) Role of autophagy in disease resistance and hypersensitive response-associated cell death. *Cell Death Differ* **18**: 1257–1262
- Hofius D, Schultz-Larsen T, Joensen J, Tsitsigiannis DI, Petersen NHTT, Mattsson O, Jørgensen LB, Jones JDGG, Mundy J, Petersen M** (2009) Autophagic Components Contribute to Hypersensitive Cell Death in *Arabidopsis*. *Cell* **137**: 773–783
- van der Hoorn RAL, Kamoun S** (2008) From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* **20**: 2009–2017
- Hu B, Rao MJ, Deng X, Pandey SS, Hendrich C, Ding F, Wang N, Xu Q** (2021) Molecular signatures between citrus and *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *PLoS Pathog* **17**: 1–22
- Huang C-YY, Araujo K, Sánchez JN, Kund G, Trumble J, Roper C, Godfrey KE, Jin H, Niño Sánchez J, Kund G, et al.** (2021a) A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus Huanglongbing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**: 1–10
- Huang CY, Niu DD, Kund G, Jones M, Albrecht U, Nguyen L, Bui C, Ramadugu C, Bowman KD, Trumble J, et al.** (2021b) Identification of citrus immune regulators involved in defence against Huanglongbing using a new functional screening system. *Plant Biotechnol J* **19**: 757–766

- Huang HC, Schuurink R, Denny TP, Atkinson MM, Baker CJ, Yucel I, Hutcheson SW, Collmer A (1988)** Molecular cloning of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* gene cluster that enables *Pseudomonas fluorescens* to elicit the hypersensitive response in tobacco plants. *J Bacteriol* **170**: 4748–4756
- Huang S, Zhang B, Chen W (2021c)** Research progress of ATGs involved in plant immunity and NPR1 metabolism. *Int J Mol Sci* **22**: 1–11
- Huang X, Zheng C, Liu F, Yang C, Zheng P, Lu X, Tian J, Chung T, Otegui MS, Xiao S, et al. (2019)** Genetic analyses of the arabidopsis ATG1 kinase complex reveal both kinase-dependent and independent autophagic routes during fixed-carbon starvation. *Plant Cell* **31**: 2973–2995
- Iqbal A (2023)** Snakins : Antimicrobial potential and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. 1–16
- Iqbal A, Khan RS, Shehryar K, Imran A, Ali F, Attia S, Shah S, Mii M (2019)** Antimicrobial peptides as effective tools for enhanced disease resistance in plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* doi: 10.1007/s11240-019-01668-6
- Islam T, Haque MA, Barai HR, Istiaq A, Kim JJ (2024)** Antibiotic Resistance in Plant Pathogenic Bacteria: Recent Data and Environmental Impact of Unchecked Use and the Potential of Biocontrol Agents as an Eco-Friendly Alternative. *Plants*. doi: 10.3390/plants13081135
- Jeger MJ, Viljanen-Rollinson SLH (2001)** The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theor Appl Genet* **102**: 32–40
- Jones JDGG, Dangl JL (2006)** The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, et al. (2021)** Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**: 583–589
- Kalra G, Bhatla SC (2018)** Senescence and Programmed Cell Death. *Plant Physiol Dev Metab* 937–966
- Kang L, Tang X, Mysore KS (2004)** *Pseudomonas* type III effector AvrPto suppresses the programmed cell death induced by two nonhost pathogens in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Mol Plant-Microbe Interact* **17**: 1328–1336
- Kaur A, Kaur S, Kaur A, Sarao NK, Sharma D (2022)** Pathogenesis-Related Proteins and Their Transgenic Expression for Developing Disease-Resistant Crops: Strategies Progress and Challenges. *Case Stud Breed Strateg Major Plant Species*. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.106774>
- Keremane M, Ramadugu C, Castaneda A, Diaz J, Peñaranda E, Chen J, Duan Y, Halbert S, Lee R (2015)** Report of Candidatus *Liberibacter caribbeanus*, a new citrus-and psyllid-associated *Liberibacter* from Colombia, South America.
- Kim G, Lee S, Levy Karin E, Kim H, Moriwaki Y, Ovchinnikov S, Steinegger M, Mirdita M (2024)** Easy and accurate protein structure prediction using ColabFold. *Nat Protoc* 1–23
- Kim H, Kim BS, Shim JE, Hwang S, Yang S, Kim E, Iyer-Pascuzzi AS, Lee I (2017)** TomatoNet: A Genome-wide Co-functional Network for Unveiling Complex Traits of Tomato, a Model Crop for Fleshy Fruits. *Mol Plant* **10**: 652–655
- Kirkin V (2020)** History of the Selective Autophagy Research: How Did It Begin and Where Does It Stand Today? *J Mol Biol* **432**: 3–27
- Ko SR, Lee S, Koo H, Seo H, Yu J, Kim YM, Kwon SY, Shin AY (2024)** High-quality chromosome-level genome assembly of *Nicotiana benthamiana*. *Sci Data* **11**: 1–8

- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *MGG Mol Gen Genet* **204**: 383–396
- Koressaar T, Lepamets M, Kaplinski L, Raime K, Andreson R, Remm M** (2018) Primer3-masker: Integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics* **34**: 1937–1938
- Kõressaar T, Lepamets M, Kaplinski L, Raime K, Andreson R, Remm M, Koressaar T, Lepamets M, Kaplinski L, Raime K, et al.** (2018) Primer3-masker: Integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics* **34**: 1937–1938
- Koressaar T, Remm M** (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* **23**: 1289–1291
- Koshariya AK, Satkar K, Rawte S** (2024) Novel Biotechnological Strategies to Boost Disease Resistance and Enhance Quality Parameters in Horticultural Plants. *Plant Cell Biotechnol Mol Biol* **25**: 79–100
- Kou Y, Wang S** (2010) Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 181–185
- Kourelis J, Kaschani F, Grosse-holz FM, Homma F** (2018a) Homology-guided re-annotation improves the gene models of the allopolyploid *Nicotiana benthamiana*. doi: 10.1101/373506
- Kourelis J, Kaschani F, Grosse-holz FM, Homma F, Kaiser M, Hoorn RAL Van Der** (2018b) Re-annotated *Nicotiana benthamiana* gene models for enhanced proteomics and reverse genetics. 9:
- Kourelis J, Kaschani F, Grosse-holz FM, Homma F, Kaiser M, Hoorn RAL Van Der** (2019) proteome for improved proteomics in the allopolyploid *Nicotiana benthamiana*. 1–15
- Kraiselburd I, Daurelio LD, Tondo ML, Merelo P, Cortadi AA, Talón M, Tadeo FR, Orellano EG** (2013) The LOV protein of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* plays a significant role in the counteraction of plant immune responses during citrus canker. *PLoS One* **8**: 1–16
- Kulaeva O, Kliukova M, Afonin A, Sulima A, Zhukov V, Tikhonovich I** (2020) The role of plant antimicrobial peptides (AMPs) in response to biotic and abiotic environmental factors. *Biol Commun* **65**: 187–199
- Lacomme C, Santa Cruz S, Cruz SS** (1999) Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7956–7961
- Lal NK, Thanasuwat B, Huang P jui, Cavanaugh KA, Carter A, Micheltmore RW, Dinesh-kumar SP, Lal NK, Thanasuwat B, Huang P jui, et al.** (2020) Phytopathogen Effectors Use Multiple Mechanisms to Manipulate Plant Autophagy. *Cell Host Microbe* **28**: 1–14
- Leary AY, Sanguankiatichai N, Duggan C, Tumtas Y, Pandey P, Segretin ME, Salguero Linares J, Savage ZD, Yow RJ, Bozkurt TO** (2018) Modulation of plant autophagy during pathogen attack. *J Exp Bot* **69**: 1325–1333
- Leary AY, Savage Z, Tumtas Y, Bozkurt TO** (2019) Contrasting and emerging roles of autophagy in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* **52**: 46–53
- Leeuwis C, Aarts N, Steensland A, Zeigler M** (2021) Productivity in agriculture for a sustainable future. *Innov Revolut Agric A Roadmap to Value Creat* 95–116
- Lehti-Shiu MD, Shiu S-HSHS-H** (2012) Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **367**: 2619–2639
- Lehti-Shiu MD, Uygun S, Moghe GD, Panchy N, Fang L, Hufnagel DE, Jasicki HL, Feig M, Shiu S-H** (2015) Molecular Evidence for Functional Divergence and Decay of a Transcription Factor Derived from Whole-Genome Duplication in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **168**: 1717–1734

- Lema MA** (2019) Regulatory aspects of gene editing in Argentina. *Transgenic Res* **28**: 147–150
- Lenth R** (2023) emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means_. R Packag. version 1.8. 5
- Lenz HD, Haller E, Melzer E, Kober K, Wurster K, Stahl M, Bassham DC, Vierstra RD, Parker JE, Bautor J, et al.** (2011) Autophagy differentially controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Plant J* **66**: 818–830
- Li F, Chung T, Vierstra RD** (2014) AUTOPHAGY-RELATED11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 788–807
- Li F, Zhang C, Li Y, Wu G, Hou X, Zhou X, Wang A** (2018) Beclin1 restricts RNA virus infection in plants through suppression and degradation of the viral polymerase. *Nat Commun* **9**: 1–17
- Li J, Wang C, Yang L, Qiu F, Li Y, Zheng Y, Liu S, Song L, Liang W** (2023) Enhancing tomato resistance by exploring early defense events against Fusarium wilt disease. *Phytopathol Res*. doi: 10.1186/s42483-023-00176-y
- Li W, Deng Y, Ning Y, He Z, Wang GL** (2020) Exploiting Broad-Spectrum Disease Resistance in Crops: From Molecular Dissection to Breeding. *Annu Rev Plant Biol* **71**: 575–603
- Li X, Ruan H, Zhou C, Meng X, Chen W** (2021) Controlling Citrus Huanglongbing: Green Sustainable Development Route Is the Future. *Front Plant Sci* **12**: 1–12
- Lindeberg M, Cunnac S, Collmer A** (2012) *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: Last words in endless arguments. *Trends Microbiol* **20**: 199–208
- Liu E, Page JE** (2008) Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus. *Plant Methods* **4**: 1–5
- Liu Y, Bassham DC** (2012) Autophagy: Pathways for Self-Eating in Plant Cells. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 215–237
- Liu YL, Schiff M, Dinesh-Kumar SP** (2002a) Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J* **31**: 777–786
- Liu YL, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP** (2002b) Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N- mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J* **30**: 415–429
- Longhi TV, de Carvalho DU, Duin IM, da Cruz MA, Leite Junior RP** (2022) Transgenic Sweet Orange Expressing the Sarcotoxin IA Gene Produces High-Quality Fruit and Shows Tolerance to ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms23169300
- Lopes SA, Cifuentes-Arenas JC** (2021) Protocol for Successful Transmission of “Candidatus Liberibacter asiaticus” from Citrus to Citrus Using Diaphorina citri. *Phytopathology* **111**: 2367–2374
- Lv X, Pu X, Qin G, Zhu T, Lin H** (2014) The roles of autophagy in development and stress responses in Arabidopsis thaliana. *Apoptosis* **19**: 905–921
- Ma L, Lukasik E, Gawehns F, Takken FLW** (2012) The Use of Agrobacterium Infection for Transient Expression. *Methods Mol Biol* **61**: 71–74
- Machado R, Moschen S, Conti G, González S, Rivarola M, Gómez C, Hopp E, Fernández P** (2025) Exploring the Genetic Networks of HLB Tolerance in Citrus : Insights Across Species and Tissues Exploring the Genetic Networks of HLB Tolerance in Citrus : Insights Across Species and Tissues. 0–24
- Madeira F, Madhusoodanan N, Lee J, Eusebi A, Niewielska A, Tivey ARN, Lopez R, Butcher S** (2024) The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Res* **52**: W521–W525

- Mafra V, Kubo KS, Alves-Ferreira M, Ribeiro-Alves M, Stuart RM, Boava LP, Rodrigues CM, Machado MA** (2012) Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0031263
- Martin GB** (2011) Suppression and Activation of the Plant Immune System by *Pseudomonas syringae* Effectors AvrPto and AvrPtoB. *En F Martin, S Kamoun, eds, Eff. plant-microbe Interact.* Wiley-Blackwell, pp 123–154
- Martins PMM, de Oliveira Andrade M, Benedetti CE, de Souza AA** (2020) *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: host interaction and control strategies. *Trop Plant Pathol* **45**: 213–236
- McBride KE, Summerfelt KR** (1990) Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **14**: 269–276
- McCombe CL, Greenwood JR, Solomon PS, Williams SJ** (2022) Molecular plant immunity against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic fungi. *Essays Biochem* **66**: 581–593
- Meneguetti BT, Machado L dos S, Oshiro KGN, Nogueira ML, Carvalho CME, Franco OL** (2017) Antimicrobial Peptides from Fruits and Their Potential Use as Biotechnological Tools—A Review and Outlook. *Front Microbiol* **7**: 1–13
- Michalk DL, Kemp DR, Badgery WB, Wu J, Zhang Y, Thomassin PJ** (2019) Sustainability and future food security—A global perspective for livestock production. *L Degrad Dev* **30**: 561–573
- Miller JC, Tanksley SD** (1990) RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor Appl Genet* **80**: 437–448
- Mine A, Seyfferth C, Kracher B, Berens ML, Becker D, Tsuda K** (2018) The defense phytohormone signaling network enables rapid, high-amplitude transcriptional reprogramming during effector-triggered immunity[OPEN]. *Plant Cell* **30**: 1199–1219
- Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M** (2022) ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* **19**: 679–682
- Mizushima N** (2018) A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol* **20**: 521–527
- Morel JB, Dangl JL** (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ* **4**: 671–683
- Moscona J, Sastry KA** (2025) Inappropriate technology: Evidence from global agriculture. National Bureau of Economic Research
- Mucyn TS, Clemente A, Andriotis VME, Balmuth ALB, Oldroyd GED, Staskawicz BJ, Rathjen JP** (2006) The tomato NBARC-LRR protein Prf interacts with Pto kinase in vivo to regulate specific plant immunity. *PLANT CELL ONLINE* **18**: 2792–2806
- Mucyn TS, Wu A-J, Balmuth AL, Arasteh JM, Rathjen JP** (2009) Regulation of Tomato Prf by Pto-like Protein Kinases. *Mol Plant-Microbe Interact* **22**: 391–401
- Mulungu EL** (2024) Unmasking the hidden threat : a review of damage and losses due to phytopathogenic bacteria. **5**: 250–263
- Munch D, Rodriguez E, Bressendorff S, Park OK, Hofius D, Petersen M** (2014) Autophagy deficiency leads to accumulation of ubiquitinated proteins, ER stress, and cell death in Arabidopsis. *Autophagy* **10**: 1579–1587
- Munir S, He P, Wu Y, He P, Khan S, Huang M, Cui W, He P, He Y** (2017) Huanglongbing Control: Perhaps the

End of the Beginning. *Microb Ecol* **76**: 192–204

Munir S, Li Y, He P, He P, He P, Cui W, Wu Y, Li X, Li Q (2020) Restructuring citrus endophytic diversity through potential indigenous endophytes could eliminate huanglongbing pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Res access 2022-10-04 1–26

Nahirñak V (2008) Tesis de doctorado.

Nahirñak V, Almasia NI, Fernandez PV, Hopp HE, Estevez JM, Carrari F, Vazquez-Rovere C (2012a) Potato Snakin-1 gene silencing affects cell division, primary metabolism, and cell wall composition. *Plant Physiol* **158**: 252–263

Nahirñak V, Almasia NI, González MN, Massa GA, Décima Oneto CA, Feingold SE, Hopp HE, Vazquez Rovere C (2022) State of the Art of Genetic Engineering in Potato: From the First Report to Its Future Potential. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2021.768233

Nahirñak V, Almasia NI, Hopp HE, Vazquez-Rovere C (2012b) Snakin/GASA proteins. *Plant Signal Behav* **7**: 1004–1008

Nahirñak V, Almasia NI, Lia VV, Hopp HE, Vazquez Rovere C (2024) Unveiling the defensive role of Snakin-3, a member of the subfamily III of Snakin/GASA peptides in potatoes. *Plant Cell Rep* **43**: 1–19

Nahirñak V, Rivarola M, Almasia NI, Barón MPB, Hopp HE, Vile D, Paniego N, Rovere CV (2019) Snakin-1 affects reactive oxygen species and ascorbic acid levels and hormone balance in potato. *PLoS One* **14**: 1–18

Nahirñak V, Rivarola M, de Urreta MG, Paniego N, Hopp HE, Almasia NI, Vazquez-Rovere C (2016) Genome-wide analysis of the Snakin/GASA gene family in *Solanum tuberosum* cv. Kennebec. *Am J Potato Res* **93**: 172–188

Nakandala U, Furtado A, Henry RJ, Jester B UTJD (2025) Citrus genomes: Past, present and future. *Hortic Res* **186**: uhaf033

Nakatogawa H, Ohbayashi S, Sakoh-Nakatogawa M, Kakuta S, Suzuki SW, Kirisako H, Kondo-Kakuta C, Noda NN, Yamamoto H, Ohsumi Y (2012) The autophagy-related protein kinase Atg1 interacts with the ubiquitin-like protein Atg8 via the Atg8 family interacting motif to facilitate autophagosome formation. *J Biol Chem* **287**: 28503–28507

Ngou BPM, Ahn HK, Ding P, Jones JDG (2021) Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* **592**: 110–115

Ngou BPM, Ding P, Jones JDG (2022) Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *Plant Cell* **34**: 1447–1478

Noda NN, Fujioka Y (2015) Atg1 family kinases in autophagy initiation. *Cell Mol Life Sci* **72**: 3083–3096

Nolde SB, Vassilevski AA, Rogozhin EA, Barinov NA, Balashova TA, Samsonova O V., Baranov Y V., Feofanov A V., Egorov TA, Arseniev AS, et al. (2011) Disulfide-stabilized helical hairpin structure and activity of a novel antifungal peptide EcAMP1 from seeds of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*). *J Biol Chem* **286**: 25145–25153

Norkunas K, Harding R, Dale J, Dugdale B (2018) Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods* **14**: 1–14

Ntoukakis V, Balmuth AL, Mucyn TS, Gutierrez JR, Jones AME, Rathjen JP (2013) The Tomato Prf Complex Is a Molecular Trap for Bacterial Effectors Based on Pto Transphosphorylation. *PLoS Pathog*. doi: 10.1371/journal.ppat.1003123

- Ntoukakis V, Saur IML, Conlan B, Rathjen JP** (2014) The changing of the guard: The Pto/Prf receptor complex of tomato and pathogen recognition. *Curr Opin Plant Biol* **20**: 69–74
- Nutter FW, Esker PD, Netto RAC** (2006) Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. *Eur J Plant Pathol* **115**: 95–103
- Odintsova T, Egorov T** (2012) Plant antimicrobial peptides. Host Def Pept Their Potential as Ther Agents **111–136**
- Oh CS, Martin GB** (2011) Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase. *Trends Plant Sci* **16**: 132–140
- Oh CS, Pedley KF, Martin GB** (2010) Tomato 14-3-3 protein 7 positively regulates immunity-associated programmed cell death by enhancing protein abundance and signaling ability of MAPKKK α . *Plant Cell* **22**: 260–272
- Oh HS, Collmer A** (2005) Basal resistance against bacteria in *Nicotiana benthamiana* leaves is accompanied by reduced vascular staining and suppressed by multiple *Pseudomonas syringae* type III secretion system effector proteins. *Plant J* **44**: 348–359
- Oh S, Choi D** (2022) Receptor-mediated nonhost resistance in plants. *Essays Biochem* **66**: 435–445
- Oliveira-Lima M, Benko-Iseppon AM, Neto JRCF, Rodríguez-Decuadro S, Kido EA, Crovella S, Pandolfi V, Maria Benko-Iseppon A, Ribamar Costa Ferreira Neto J, Rodriguez-Decuadro S, et al.** (2017) Snakin: structure, roles and applications of a plant antimicrobial peptide. *Curr Protein Pept Sci* **18**: 368–374
- Palacios J** (2005) Citricultura. Tucumán, Argentina
- Pan Q, Liu YS, Budai-Hadrian O, Sela M, Carmel-Goren L, Zamir D, Fluhr R** (2000) Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: Tomato and arabidopsis. *Genetics* **155**: 309–322
- Pan ZQ, Shao GC, Liu XM, Chen Q, Dong MQ, Du LL** (2020) Atg1 kinase in fission yeast is activated by atg11-mediated dimerization and cis-autophosphorylation. *Elife* **9**: 1–17
- Papinski D, Kraft C** (2016) Regulation of Autophagy by Signaling Through the Atg1/ULK1 Complex. *J Mol Biol* **428**: 1725–1741
- Patel S, Dinesh-Kumar SP** (2008) Arabidopsis ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy* **4**: 20–27
- Pedley KF, Martin GB** (2005) Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 541–547
- Pedley KF, Martin GB** (2003) Molecular Basis of *Pto*-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annu Rev Phytopathol* **41**: 215–243
- Peng Z, Bredeson J V., Wu GA, Shu S, Rawat N, Du D, Parajuli S, Yu Q, You Q, Rokhsar DS, et al.** (2020) A chromosome-scale reference genome of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) provides insights into disease resistance, cold tolerance and genome evolution in Citrus. *Plant J* **104**: 1215–1232
- Peters IR, Helps CR, Hall EJ, Day MJ** (2004) Real-time RT-PCR: Considerations for efficient and sensitive assay design. *J Immunol Methods* **286**: 203–217
- Petersen M, Avin-wittenberg T, Bassham DC, Dagdas Y, Fan C, Fernie AR, Jiang L, Mishra D, Otegui MS, Rodriguez E, et al.** (2024) Autophagy in plants. *Autophagy Reports*. doi: 10.1080/27694127.2024.2395731
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids*

Res. 29:

- Piastrellini R, Rótolo GC, Arena AP, Civit BM, Curadelli S** (2024) Evaluation of the environmental sustainability of agricultural production using the methodologies of emergy analysis and life cycle assessment. Case study, tomato grown in Mendoza (Argentina). *Clean Circ Bioeconomy*. doi: 10.1016/j.clcb.2024.100082
- Pombo MA, Ramos RN, Zheng Y, Fei Z, Martin GB, Rosli HG** (2019) Transcriptome-based identification and validation of reference genes for plant-bacteria interaction studies using *Nicotiana benthamiana*. *Sci Rep* **9**: 1–10
- Pombo MA, Rosli HG, Fernandez-Pozo N, Bombarely A** (2020) *Nicotiana benthamiana*, A Popular Model for Genome Evolution and Plant–Pathogen Interactions. *Tob. Plant Genome. Compend. Plant Genomes*.
- Pombo MA, Zheng Y, Fernandez-Pozo N, Dunham DM, Fei Z, Martin GB** (2014) Transcriptomic analysis reveals tomato genes whose expression is induced specifically during effector-triggered immunity and identifies the Epk1 protein kinase which is required for the host response to three bacterial effector proteins. *Genome Biol* **15**: 492
- Del Ponte EM** (2023) R for Plant Disease Epidemiology (R4PDE). Section 8
- Porto WF, Franco OL** (2013) Theoretical structural insights into the snakin/GASA family. *Peptides* **44**: 163–167
- Del Pozo O, Pedley KF, Martin GB** (2004) MAPKKK α is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *EMBO J* **23**: 3072–3082
- Preston GM** (2000) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* : the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Mol Plant Pathol* **1**: 263–275
- Pruitt RN, Locci F, Wanke F, Zhang L, Saile SC, Joe A, Karelina D, Hua C, Fröhlich K, Wan WL, et al.** (2021) The EDS1–PAD4–ADR1 node mediates Arabidopsis pattern-triggered immunity. *Nature* **598**: 495–499
- Qi H, Li J, Xia FN, Chen JY, Lei X, Han MQ, Xie LJ, Zhou QM, Xiao S** (2020) Arabidopsis SINAT Proteins Control Autophagy by Mediating Ubiquitylation and Degradation of ATG13. *Plant Cell* **32**: 263–284
- Qi H, Wang Y, Bao Y, Bassham DC, Chen L, Chen Q-F, Hou S, Hwang I, Huang L, Lai Z, et al.** (2023) Studying plant autophagy: challenges and recommended methodologies. *Adv Biotechnol* **1**: 1–20
- Ramadugu C, Keremane ML, Halbert SE, Duan YP, Roose ML, Stover E, Lee RF** (2016) Long-term field evaluation reveals huanglongbing resistance in Citrus relatives. *Plant Dis* **100**: 1858–1869
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM** (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* **339**: 62–66
- Rambaut A** (2014) FigTree v1.4.2.
- Ramírez-Zavaleta CY, García-Barrera LJ, Rodríguez-Verástegui LL, Arrieta-Flores D, Gregorio-Jorge J** (2022) An Overview of PRR- and NLR-Mediated Immunities: Conserved Signaling Components across the Plant Kingdom That Communicate Both Pathways. *Rev. Int.*
- Ramos RN, Martin GB, Pombo MA, Rosli HG** (2021) WRKY22 and WRKY25 transcription factors are positive regulators of defense responses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol Biol* **105**: 65–82
- Ranawaka B, An J, Lorenc MT, Jung H, Sulli M, Aprea G, Roden S, Llaca V, Hayashi S, Asadyar L, et al.** (2023) A multi-omic *Nicotiana benthamiana* resource for fundamental research and biotechnology. *Nat Plants* **9**: 1558–1571
- Raveh E, Goldenberg L, Porat R, Carmi N, Gentile A, La Malfa S** (2020) Conventional breeding of cultivated

citrus varieties. The citrus genome 33–48

- Rentel MC, Leonelli L, Dahlbeck D, Zhao B, Staskawicz BJ** (2008) Recognition of the *Hyaloperonospora parasitica* effector ATR13 triggers resistance against oomycete, bacterial, and viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 1091–1096
- Rivero M, Furman N, Mencacci N, Picca P, Toum L, Lentz E, Bravo-Almonacid F, Mentaberry A** (2012) Stacking of antimicrobial genes in potato transgenic plants confers increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *J Biotechnol* **157**: 334–343
- Roberts R, Liu AE, Wan L, Geiger AM, Hind SR, Rosli HG, Martin GB** (2020) Molecular characterization of differences between the tomato immune receptors flagellin sensing 3 and flagellin sensing. *Plant Physiol* **183**: 1825–1837
- Rodríguez-Decuadro S, Barraco-Vega M, Dans PD, Pandolfi V, Benko-Iseppon AM, Cecchetto G** (2018) Antimicrobial and structural insights of a new snakine-like peptide isolated from *Peltophorum dubium* (Fabaceae). *Amino Acids* **50**: 1245–1259
- Rodríguez-Quibrera CG, Santillán-Mendoza R, Flores-de la Rosa FR** (2021) Phylogeny of ATP/ADP translocase gene from *Candidatus Liberibacter* spp., causal agents of HLB. *Rev Mex Fitopatol* **39**: 219–227
- Rose A, Hildebrand P** (2015) NGL Viewer: a web application for molecular visualization. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkv402
- Rosli HG, Zheng Y, Pombo MA, Zhong S, Bombarely A, Fei Z, Collmer A, Martin GB** (2013) Transcriptomics-based screen for genes induced by flagellin and repressed by pathogen effectors identifies a cell wall-associated kinase involved in plant immunity. *Genome Biol* **14**: 1–15
- Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL** (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* **15**: 741–750
- Sacco MA, Koropacka K, Grenier E, Jaubert MJ, Blanchard A, Goverse A, Smant G, Moffett P** (2009) The cyst nematode SPRYSEC protein RBP-1 elicits Gpa2- and RanGAP2-dependent plant cell death. *PLoS Pathog.* doi: 10.1371/journal.ppat.1000564
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406–425
- Santillán Martínez MI, Bracuto V, Koseoglou E, Appiano M, Jacobsen E, Visser RGF, Wolters AMA, Bai Y** (2020) CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the tomato susceptibility gene PMR4 for resistance against powdery mildew. *BMC Plant Biol* **20**: 1–13
- Saur IML, Conlan BF, Rathjen JP** (2015) The N-terminal domain of the tomato immune protein prf contains multiple homotypic and pto kinase interaction sites. *J Biol Chem* **290**: 11258–11267
- Saurabh S, Prasad D** (2021) Role of CRISPR/Cas system in altering phenolic and carotenoid biosynthesis in plants defense activation. *Cris. RNAi Syst. Elsevier*, pp 319–331
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE, Stromberg VK, Vidaver AK** (2006) Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus (DOI:10.1016/j.syapm.2005.03.017). *Syst Appl Microbiol* **29**: 690–695
- Schandry N** (2017) A practical guide to visualization and statistical analysis of *R. Solanacearum* infection data using R. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2017.00623
- Schiavinato M, Marcet-Houben M, Dohm JC, Gabaldón T, Himmelbauer H** (2020) Parental origin of the

allotetraploid tobacco *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **102**: 541–554

Seay M, Patel S (2006) Microreview Autophagy and plant innate immunity. **8**: 899–906

Secretaría de Agricultura G y P (2023) Economía Regional – Tomate Industria Autoridades. 1–15

Secretaria de Agricultura Ganadería y Pesca (2023) Producción de tomate en Argentina Evolución del cultivo. Minist. Econ.

Segura A, Moreno M, Madueño F, Molina A, García-Olmedo F (1999) Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**: 16–23

SENASA Programa de certificación de fruta fresca cítrica para exportación a la UE y mercados con similares restricciones cuarentenarias.

Senthil-Kumar M, Hema R, Anand A, Kang L, Udayakumar M, Mysore KS (2007) A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. *New Phytol* **176**: 782–791

Senthil-Kumar M, Mysore KS (2014) Tobacco rattle virus-based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Nat Protoc* **9**: 1549–1562

Senthil-Kumar M, Wang M, Chang J, Ramegowda V, del Pozo O, Liu Y, Doraiswamy V, Lee HK, Ryu CM, Wang K, et al. (2018) Virus-induced gene silencing database for phenomics and functional genomics in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Direct*. doi: 10.1002/pld3.55

Sessa G, Martin GB (2000) Signal recognition and transduction mediated by the tomato Pto kinase: A paradigm of innate immunity in plants. *Microbes Infect* **2**: 1591–1597

Shafikova TN, Omelichkina Y V. (2020) Evolution of views on plant immunity: from Flor's "gene-for-gene" theory to the "zig-zag model" developed by Jones and Dangl. *Proc Univ Appl Chem Biotechnol* **10**: 424–438

Shamrai SN (2014) Plant immune system: Basal immunity. *Cytol Genet* **48**: 258–271

Shaner G (1977) The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. *Phytopathology* **77**: 1051

Shang C, Ye T, Zhou Q, Chen P, Li X, Li W, Chen S, Hu Z, Zhang W (2023) Genome-Wide Identification and Bioinformatics Analyses of Host Defense Peptides Snakin/GASA in Mangrove Plants. *Genes (Basel)*. doi: 10.3390/genes14040923

Sheikh AH, Zacharia I, Pardal AJ, Dominguez-Ferreras A, Sueldo DJ, Kim JG, Balmuth A, Gutierrez JR, Conlan BF, Ullah N, et al. (2023) Dynamic changes of the Prf/Pto tomato resistance complex following effector recognition. *Nat Commun* **14**: 1–11

Sievers F, Higgins DG (2018) Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci* **27**: 135–145

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, et al. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. doi: 10.1038/msb.2011.75

Sigee D (2005) Bacterial plant pathology: cell and molecular aspects. Cambridge University Press

SINAVIMO Estatus fitosanitario de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

SINAVIMO Estatus fitosanitario Candidatus *Liberibacter americanus*.

SINAVIMO Estatus fitosanitario Candidatus *Liberibacter asiaticus*.

SINAVIMO Statuts D. citri.

Singh A, Singh IK (2018) Molecular aspects of plant-pathogen interaction. Springer

Singh PB, Saini HS, Kahlon RS (2016) Pseudomonas: the versatile and adaptive metabolic network. *Pseudomonas Mol Appl Biol* **1**: 81–126

Sticklen M (2015) Transgenic, Cisgenic, Intragenic and Subgenic Crops. *Adv Crop Sci Technol* **03**: 2–3

Stjepanovic G, Davies CW, Stanley RE, Ragusa MJ, Kim DJ, Hurley JH (2014) Assembly and dynamics of the autophagy-initiating Atg1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 12793–12798

Su T, Han M, Cao D, Xu M (2020) Molecular and biological properties of snakins: The foremost cysteine-rich plant host Defense peptides. *J Fungi* **6**: 1–17

Suttangkakul A, Li F, Chung T, Vierstra RD (2011) The ATG1 / ATG13 Protein Kinase Complex Is Both a Regulator and a Target of Autophagic Recycling in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 3761–3779

Talbot NJ, Kershaw MJ (2009) The emerging role of autophagy in plant pathogen attack and host defence. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 444–450

Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* **38**: 3022–3027

Tang J, Bassham DC (2018) Autophagy in crop plants: What's new beyond Arabidopsis? *Open Biol.* doi: 10.1098/rsob.180162

Tang X, Frederick RD, Zhou J, Halterman DA, Jia Y, Martin GB (1996) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrTto and Pto kinase. *Science* (80-) **274**: 2060–2062

Tariq S, Saleem K (2018) Mini-review 2018 | Volume 1 | Issue 1 | 1 7-22 Plant Defenses vs Pathogen Weapons : A Continuation of Battlefield : A Mini-review.

Tavares LS, Santos M de O, Viccini LF, Moreira JS, Miller RNG, Franco OL (2008) Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides* **29**: 1842–1851

Thilmony RL, Chen Z, Bressan RA, Martin GB, Chen Zutang, Bressan RA, Martin GB, Chen Z, Bressan RA, Martin GB (1995) Expression of the Tomato Pto Gene in Tobacco Enhances Resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* Expressing *avrPto*. *Plant Cell* **7**: 1529–1536

Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHAJ (2011) Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* **23**: 4–15

Tiku AR (2018) Antimicrobial compounds and their role in plant defense. *Mol Asp plant-pathogen Interact* 283–307

Tiwari JK, Singh AK, Behera TK (2023) CRISPR/Cas genome editing in tomato improvement: Advances and applications. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2023.1121209

Torggler R, Papinski D, Brach T, Bas L, Schuschnig M, Pfaffenwimmer T, Rohringer S, Matzhold T, Schweida D, Brezovich A, et al. (2016) Two Independent Pathways within Selective Autophagy Converge to Activate Atg1 Kinase at the Vacuole. *Mol Cell* **64**: 221–235

Tyagi S, Kumar R, Kumar V, Won SY, Shukla P (2021) Engineering disease resistant plants through CRISPR-Cas9 technology. *GM Crop Food* **12**: 125–144

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**: e115

USDA (2015) USDA National Agricultural Statistics Service. 2015. October forecast: Maturity test results and

fruit size. United States Department of Agriculture, Washington, D.C.

- Üstün S, Hafrén A, Hofius D** (2017) Autophagy as a mediator of life and death in plants. *Curr Opin Plant Biol* **40**: 122–130
- Üstün S, Hafrén A, Liu Q, Marshall RS, Minina EA, Bozhkov P V., Vierstra RD, Hofius D** (2018) Bacteria exploit autophagy for proteasome degradation and enhanced virulence in plants. *Plant Cell* **30**: 668–685
- Vasilchenko AS, Yuryev M, Ryazantsev DY, Zavriev SK, Feofanov A V., Grishin E V., Rogozhin EA** (2016) Studying of cellular interaction of hairpin-like peptide EcAMP1 from barnyard grass (*Echinochloa crusgalli* L.) seeds with plant pathogenic fungus *Fusarium solani* using microscopy techniques. *Scanning* **38**: 591–598
- Velásquez AC, Chakravarthy S, Martin GB** (2009) Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *J Vis Exp*. doi: 10.3791/1292
- Verma R, Dev M** (2022) *Advanced Research in Crop Diseases and their Management*.
- Villasanti C, Pantoja A** (2013) *El Cultivo de Tomate con Buenas Prácticas Agrícolas en la Agricultura Urbana y Periurbana*. Minist. Agric. y Ganad. Paraguay; Gob. del Dep. Cent. FAO
- Voorrips RE** (2002) MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *J Hered* **93**: 77–78
- Waddell PJ, Steel MA** (1997) General time-reversible distances with unequal rates across sites: mixing Γ and inverse Gaussian distributions with invariant sites. *Mol Phylogenet Evol* **8**: 398–414
- Wang H, Schippers JHM** (2019) The role and regulation of autophagy and the proteasome during aging and senescence in plants. *Genes (Basel)*. doi: 10.3390/genes10040267
- Wang J, Zhang Q, Tung J, Zhang X, Liu D, Deng Y, Tian Z, Chen H, Wang T, Yin W, et al.** (2024a) High-quality assembled and annotated genomes of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana benthamiana* reveal chromosome evolution and changes in defense arsenals. *Mol Plant* **17**: 423–437
- Wang N, Sundin GW, De La Fuente L, Cubero J, Tatineni S, Brewer MT, Zeng Q, Bock CH, Cuniffe NJ, Wang C, et al.** (2024b) Key Challenges in Plant Pathology in the Next Decade. *Phytopathology* **114**: 837–842
- Wang Q, Hou S** (2022) The emerging roles of ATG1/ATG13 kinase complex in plants. *J Plant Physiol* **271**: 153653
- Wang S-H, Kebede S, Abate E, Amir A, Calderon E, Hoet AE, Ikram A, LeJeune JT, Mekuria Z, Suzuki S** (2024c) Emergence and dissemination of antimicrobial resistance at the interface of humans, animals, and the environment. *Mod. Glob. Heal. Secur. to Prev. Detect. Respond*. Elsevier, pp 113–136
- Wang W, Liu N, Gao C, Rui L, Tang D** (2019) The *Pseudomonas Syringae* Effector AvrPtoB Associates With and Ubiquitinates Arabidopsis Exocyst Subunit EXO70B1. *Front Plant Sci* **10**: 1–16
- Wang X, Gao Y, Yan Q, Chen W, Senescence NPRÁ** (2016) Salicylic acid promotes autophagy via NPR3 and NPR4 in Arabidopsis senescence and innate immune response. 1–12
- Wang Y, Cai S, Yin L, Shi K, Xia X, Zhou Y, Wang Y, Cai S, Yin L, Shi K, et al.** (2015) Tomato HsfA1a plays a critical role in plant drought tolerance by activating ATG genes and inducing autophagy. doi: 10.1080/15548627.2015.1098798
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ** (2009) Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**: 1189–1191

- Weber KC, Mahmoud LM, Stanton D, Welker S, Qiu W, Grosser JW, Levy A, Dutt M** (2022) Insights into the mechanism of Huanglongbing tolerance in the Australian finger lime (*Citrus australasica*). *Front Plant Sci* **13**: 1–23
- Wei C, Chen J, Kuang H** (2016) Dramatic number variation of *r* genes in solanaceae species accounted for by a few *r* gene subfamilies. *PLoS One* **11**: 1–15
- Wei CF, Kvitko BH, Shimizu R, Crabill E, Alfano JR, Lin NC, Martin GB, Huang HC, Collmer A** (2007) A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **51**: 32–46
- Whalen MC, Innes RW, Bent AF, Staskawicz BJ** (1991) Identification of *Pseudomonas syringae* Pathogens of *Arabidopsis* and a Bacterial Locus Determining Avirulence on Both *Arabidopsis* and Soybean. *Plant Cell* **3**: 49–59
- Wu GA, Terol J, Ibanez V, López-García A, Pérez-Román E, Borredá C, Domingo C, Tadeo FR, Carbonell-Caballero J, Alonso R, et al.** (2018) Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature* **554**: 311–316
- Wu T, Cheng C, Zhong Y, Lv Y, Ma Y, Zhong G** (2020) Molecular characterization of the gibberellin-stimulated transcript of GASA4 in Citrus. *Plant Growth Regul* **91**: 89–99
- Wu T, Zhong Y, Chen M, Wu B, Wang T, Jiang B, Zhong G** (2021) Analysis of CcGASA family members in *Citrus clementina* (Hort. ex Tan.) by a genome-wide approach. *BMC Plant Biol* **21**: 1–18
- Xie J, Chen Y, Cai G, Cai R, Hu Z, Wang H** (2023) Tree Visualization by One Table (tvBOT): A web application for visualizing, modifying and annotating phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res* **51**: W587–W592
- Xin X-F, He SY** (2013a) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annu Rev Phytopathol* **51**: 473–498
- Xin X-F, He SY** (2013b) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annu Rev Phytopathol* **51**: 473–498
- Xin XF, Kvitko B, He SY** (2018) *Pseudomonas syringae*: What it takes to be a pathogen. *Nat Rev Microbiol* **16**: 316–328
- Xu Q, Chen LL, Ruan X, Chen D, Zhu A, Chen C, Bertrand D, Jiao WB, Hao BH, Lyon MP, et al.** (2013) The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat Genet* **45**: 59–66
- Xu Q, Roose ML** (2020) Citrus genomes: from sequence variations to epigenetic modifications. *The Citrus genome* 141–165
- Xu YP, Zheng LP, Xu QF, Wang CC, Zhou XP, Wu ZJ, Cai XZ** (2007) Efficiency for gene silencing induction in nicotiana species by a viral satellite DNA vector. *J Integr Plant Biol* **49**: 1726–1733
- Yahya RT** (2022) Describe of *Arabidopsis thaliana* Plant as a Model Plant in Biotechnology. *NTU J Pure Sci* **1**: 10–17
- Yeam I, Nguyen HP, Martin GB** (2010) Phosphorylation of the *Pseudomonas syringae* effector AvrPto is required for FLS2/BAK1-independent virulence activity and recognition by tobacco. *Plant J* **61**: 16–24
- Yeung H, Squire CJ, Yosaatmadja Y, Panjekar S, López G, Molina A, Baker EN, Harris PWR, Brimble MA** (2016) Radiation Damage and Racemic Protein Crystallography Reveal the Unique Structure of the GASA/Snakin Protein Superfamily. *Angew Chemie* **128**: 8062–8065
- Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, Kato T, Tabata S** (2004) Processing of ATG8s, Ubiquitin-Like Proteins, and Their Deconjugation by ATG4s Are Essential for Plant Autophagy Published by: American Society of Plant Biologists (ASPB) Linked references are available on JSTOR for this article: *Plant Cell* **16**: 2967–

- Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, Kusano M, Consonni C, Panstruga R, Ohsumi Y, Shirasu K** (2009) Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 2914–2927
- Yoshimoto K, Takano Y, Sakai Y** (2010) Autophagy in plants and phytopathogens. *FEBS Lett* **584**: 1350–1358
- Yuan M, Ngou BPM, Ding P, Xin XF** (2021) PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* **62**: 102030
- Zarate S, Cimadori I, Jones MS, Roca MM, Barnhill-Dilling SK** (2023) Assessing agricultural gene editing regulation in Latin America: an analysis of how policy windows and policy entrepreneurs shape agricultural gene editing regulatory regimes. *Front Bioeng Biotechnol* **11**: 1–14
- Zdrzałek R, Xi Y, Langner T, Bentham AR, Petit-Houdenot Y, De la Concepcion JC, Harant A, Shimizu M, Were V, Talbot NJ, et al.** (2024) Bioengineering a plant NLR immune receptor with a robust binding interface toward a conserved fungal pathogen effector. *Proc Natl Acad Sci* **121**: e2402872121
- Zhang B, Huang S, Guo Z, Meng Y, Li X, Tian Y, Chen W** (2023) Salicylic acid accelerates carbon starvation-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by inhibiting autophagy through Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1. *Plant Sci* **336**: 111859
- Zhang B, Liu M, Wang Y, Yuan W, Zhang H** (2022) Plant NLRs: Evolving with pathogen effectors and engineerable to improve resistance. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2022.1018504
- Zhang C, Xie Y, He P, Shan L** (2024a) Unlocking Nature's Defense: Plant Pattern Recognition Receptors as Guardians Against Pathogenic Threats. *Mol Plant-Microbe Interact* **37**: 73–83
- Zhang J, Yang W, Yue J, Liu Y, Pei D, Wang H** (2020) The Responses of Wheat Autophagy and ATG8 Family Genes to Biotic and Abiotic Stresses. *J Plant Growth Regul* **39**: 867–876
- Zhang M, Powell CA, Guo Y, Doud MS, Duan Y** (2012) A graft-based chemotherapy method for screening effective molecules and rescuing huanglongbing-affected citrus plants. *Phytopathology* **102**: 567–574
- Zhang N, Gan J, Carneal L, González-Tobón J, Filiatrault M, Martin GB** (2024b) Helper NLRs Nrc2 and Nrc3 act codependently with Prf/Pto and activate MAPK signaling to induce immunity in tomato. *Plant J* **117**: 7–22
- Zhang S, Hama Y, Mizushima N** (2021) The evolution of autophagy proteins – Diversification in eukaryotes and potential ancestors in prokaryotes. *J Cell Sci*. doi: 10.1242/jcs.233742
- Zheng Y, Jiao C, Sun H, Rosli HG, Pombo MA, Zhang P, Banf M, Dai X, Martin GB, Giovannoni JJ, et al.** (2016) iTAK: A Program for Genome-wide Prediction and Classification of Plant Transcription Factors, Transcriptional Regulators, and Protein Kinases. *Mol Plant* **9**: 1667–1670
- Zheng Z, Chen J, Deng X** (2018) Historical perspectives, management, and current research of citrus HLB in guangdong province of China, where the disease has been endemic for over a hundred years. *Phytopathology* **108**: 1224–1236
- Zhou X, Zhao P, Wang W, Zou J, Cheng T, Peng X, Sun M** (2015) A comprehensive , genome-wide analysis of autophagy-related genes identi fi ed in tobacco suggests a central role of autophagy in plant response to various environmental cues. **22**: 245–257
- Zipfel C** (2014) Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol* **35**: 345–351
- Zou X, Jiang X, Xu L, Lei T, Peng A, He Y, Yao L, Chen S** (2017) Transgenic citrus expressing synthesized cecropin B genes in the phloem exhibits decreased susceptibility to Huanglongbing. *Plant Mol Biol* **93**:

341–353

Zoveda F, Garcia S, Pandey S, Thomas G, Soto D, Bianchi G, Faures JM, Griffin J, Lipper L, Vahanen T (2014)
Building a common vision for sustainable food and agriculture. FAO