

# Informe final publicable de proyecto

## Efecto del receptor EFR en germoplasma avanzado de papa para la resistencia a la marchitez bacteriana.

Código de proyecto ANII: FMV\_1\_2017\_1\_136506

27/09/2021

**DALLA RIZZA VILARÓ , Marco** (Responsable Técnico - Científico)

**FERREIRA OLIVERA, María Virginia** (Investigador)

**GALVÁN VIVERO, Guillermo Alesio** (Investigador)

**PIANZZOLA ALVAREZ, María Julia** (Investigador)

**SCHVARTZMAN DI SEGNI, Claudia Rosina** (Investigador)

**SETUBAL, João Carlos** (Investigador)

**SIRI TOMÁS, María Inés** (Investigador)

**VILARÓ PAREJA, Francisco** (Investigador)

---

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA. INIA LAS BRUJAS (Institución Proponente) \\  
MARC GHISLAIN SENIOR BIOTECHNOLOGIST INTERNATIONAL POTATO CENTER – OLD NAIVASHA ROAD P.O. BOX 25171,  
NAIROBI 00603, KENYA

\\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE AGRONOMÍA \\  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA

## Resumen del proyecto

La producción de papa es afectada por la marchitez bacteriana (BW), causada por *Ralstonia solanacearum*. La resistencia del hospedero es la estrategia más sustentable y efectiva, pero actualmente no existen cultivares de papa resistentes. Nuestro grupo incorporó el receptor EFR de *Arabidopsis thaliana* (AtEFR), que reconoce el factor de elongación Tu, conservado en bacterias, desencadenando una respuesta inmune. AtEFR fue evaluado en dos contextos genéticos: un cultivar de papa comercial susceptible (INIA Iporá) y un clon avanzado de mejoramiento con resistencia parcial introgresada de *Solanum commersonii* (Clon 09509.6).

Se evaluó por primera vez el efecto de AtEFR sobre la resistencia a BW bajo condiciones semejantes a la infección natural a campo. Además, se compararon los patrones de colonización de las líneas salvajes y transgénicas mediante inoculación con cepas reporteras de luminiscentes y fluorescentes. Ambos enfoques evidenciaron un retraso y una disminución de la severidad de síntomas de marchitamiento en los genotipos transformados AtEFR. Se observaron patrones de colonización diferencial con un mayor desarrollo bacteriano en las plantas no transformadas. Este efecto del receptor AtEFR parece ser más pronunciado en la línea de mejoramiento interespecífica, llevando a una activación más efectiva del sistema inmune de la planta. En ensayos de evaluación de características agronómicas a campo libre del patógeno, los resultados mostraron que el gen EFR no afecta el crecimiento de las plantas ni la producción de papas respecto a los genotipos sin transformar. Finalmente, se realizó un análisis transcriptómico de genotipos de papa transformados con el receptor AtEFR en respuesta a la infección. Se observó una proporción mayor de genes inducidos en las muestras de papa AtEFR, que pueden ser correlacionados con el efecto del gen *efr* en las mismas. En conclusión, los genotipos caracterizados en este proyecto constituyen germoplasma de alto valor potencial para empleo por programas de mejoramiento.

**Ciencias Agrícolas / Biotecnología Agropecuaria / Biotecnología Agrícola y Biotecnología Alimentaria / Mejoramiento genético y biotecnología**

**Palabras clave: *Ralstonia solanacearum*, / *Solanum tuberosum* / receptores de reconocimiento de patrones, /**

## Introducción

La marchitez bacteriana o bacterial wilt (BW) causada por *Ralstonia solanacearum* es una de las enfermedades bacterianas más devastadoras de plantas (Mansfield et al., 2012). La enfermedad está presente en todo el mundo, amenazando la producción de alimentos en áreas tropicales, subtropicales así como templadas, donde cepas resistentes al frío han sido introducidas (Martin and French, 1985). persiste en suelo, desechos de plantas, rizósfera y puede asimismo alternar entre huéspedes. Más aún puede propagarse a través de herramientas de laboreo y del agua de riego, haciendo compleja la erradicación de la bacteria (Hayward 1991). Asimismo, puede persistir en suelo como organismo de vida libre móvil, localizando al huésped tanto por quimiotaxis como aerotaxis (Yao and Allen, 2006, 2007). generalmente invade heridas en las raíces o aberturas naturales y coloniza el espacio intercelular de la corteza de la raíz y parénquima. Puede también entrar al xilema y esparcirse por tallo y hojas, donde la densidad del patógeno puede superar 109 ufc.g<sup>-1</sup> de tejido del huésped (Yao and Allen, 2006; Álvarez et al., 2010). En esta fase, se da una conversión dependiente de la densidad celular (quórum sensing), de un fenotipo móvil a uno virulento productor de exopolisacáridos (EPS), y factores de virulencia. Es la producción de EPS la que causa la marchitez, restringiendo el flujo de agua a través de los vasos del xilema (Yadeta and J Thomma, 2013). Este patógeno tiene un amplio rango de huéspedes, causando BW en más de 200 especies de plantas incluyendo importantes cultivos comerciales como papa, tomate y banana (Hayward, 1991). Es la segunda enfermedad vascular bacteriana de plantas más importante por las pérdidas que ocasiona a nivel de cultivos (Yuliar et al., 2015). A la fecha no hay control eficiente de esta enfermedad a nivel de planta ni resistencia a nivel de tubérculo, principal factor de dispersión de la enfermedad. El uso de semillas sanas provenientes de programas de certificación de semillas, suelo y agua libre de patógeno así como la rotación de cultivos son las principales formas de control (Álvarez et al., 2010). En regiones donde el patógeno es endémico, el uso de variedades parcialmente resistentes es otra estrategia de control. Loci con resistencia cuantitativa han sido identificados tanto en tomate (Mangin et al., 1999; Wang et al., 2000; Carmeille et al., 2006), tabaco (Qian et al., 2013) y berenjena (Lebeau et al., 2013). A pesar de ello, aún no se ha logrado resistencia efectiva contra (Hong et al., 2005).

La papa (*Solanum tuberosum*) cultivada en todo el mundo, es el cuarto cultivo más importante y uno de los más significativos del grupo solanácea. Tiene una producción de aproximadamente de 370 millones de toneladas por año (Food

and Agriculture Organization of the United Nations, 2015) en 150 países situados entre las latitudes 65 N y 50 S y hasta altitudes de 4000 metros sobre el nivel del mar (Bradshaw et al., 2006). En Uruguay se plantan alrededor de 5000 ha por año de papa, principalmente en dos ciclos de cultivos (otoño y primavera) produciéndose 42000 toneladas por año (DIEA, 2016). El 95 % de la semilla utilizada para la producción pertenece a cultivares desarrollados por programas de mejoramiento genético del extranjero y presentan ciertas restricciones sanitarias.

Para la papa, la marchitez bacteriana es uno de los principales problemas productivos, siendo la segunda patología en importancia luego del tizón tardío (late blight) causada *Phytophthora infestans* (Priou et al., 1999). El uso de cultivos resistentes es un método de control de bajo costo y amigable con el medio ambiente. Sin embargo, hay hasta el momento pocas fuentes de resistencia disponibles en el germoplasma de papa. Programas de mejoramiento clásico para la resistencia a BW han utilizado especies relacionadas a *S. tuberosum*. En el caso de *S. commersonii* (cmm), una especie salvaje diploide nativa de Uruguay, Este de Argentina y Sur de Brasil presenta una gran variabilidad genética (Pianzola et al., 2005; Siri et al., 2009) y contiene muchos caracteres deseables como tolerancia a baja temperatura y resistencia a varios patógenos incluyendo *R. solanacearum* (Carputo et al., 2009; Kim-Lee et al., 2005; Laferriere et al., 1999; Narancio et al., 2013; Siri et al., 2009). El uso de *S. comersonii* en el mejoramiento genético de la papa ha sido escaso, entre otros factores, por barreras a la hibridación post-cigótica con *S. tuberosum* que involucran el balance del endosperma (cmm ( $2n=2x=24$ , 1 EBN) y *S. tuberosum* ( $2n=4x=48$ , 4EBN)). No obstante, se han reportado experiencias exitosas de introgresión utilizando diferentes mecanismos para evadir las barreras de incompatibilidad que posibilitan la utilización de *S. commersonii* en el mejoramiento de papa (Carputo et al., 1997; Laferriere et al., 1999; Gonzalez, 2010). Particularmente, para realizar cruzamientos entre cmm y *S. tuberosum* se realizó un cruzamiento puente con *Solanum phureja* que presenta 2EBN y puede cruzarse con cmm y a su vez con *S. tuberosum*. De esta forma, los genes relacionados a la resistencia a BW de cmm fueron transferidos en el cruzamiento con *S. phureja*. Posteriormente este híbrido fue cruzado con *S. tuberosum* para introducirlos en la especie (González et al., 2013). A partir de estos cruzamientos, se obtuvieron clones de mejoramiento promisorios con resistencia parcial a *R. solanacearum*.

Por otro lado, el desarrollo de técnicas de ingeniería genética ha abierto la posibilidad de generar resistencia potenciando la respuesta inmune del hospedero. Las plantas pueden reconocer a los patógenos mediante dos vías de percepción. Una detecta moléculas conservadas en microbios denominados patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs o MAMPs por sus siglas en inglés) a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de membrana. Los PAMPs por definición son motivos conservados en un amplio rango de microbios que pueden o no ser patogénicos. Dado que estas moléculas son esenciales para la viabilidad o el modo de vida, es poco probable que los microorganismos puedan evadir el sistema inmune mediante mutación o delección de los mismos. En la mayoría de los casos, la inmunidad mediada por PAMPs (PTI por sus siglas en inglés) es suficiente para evitar la replicación bacteriana y el desarrollo de enfermedades, constituyendo una parte importante de la resistencia no huésped (Lee et al., 2016).

Como se mencionó anteriormente, el Receptor EFR de *A. thaliana* (At) perteneciente al sistema de reconocimiento PTI reconoce el factor de elongación Tu (Elongation Factor Tu, EF-Tu) descrito en la familia Brassicaceae, (Kunze et al., 2004). Los factores de elongación participan en la síntesis proteica, siendo motivos conservados de difícil modificación para la evasión de la respuesta inmune. De hecho, esta proteína presenta un alto grado de conservación en bacteria (Kunze, 2004). El motivo reconocido por AtEFR es el péptido elf18 que corresponde con la zona acetilada N-terminal. De hecho alineamientos entre bacterias de diferentes géneros mostró que las secuencias de elf18 pueden ser separadas en siete grupos, con un máximo de 5 residuos de diferencia entre la secuencia de elf18 procedente de *E. coli* (Lacombe et al., 2010). Dado que algunos receptores PRR en planta son expresados únicamente en algunas familias, en los últimos años, se ha evaluado la expresión heteróloga de los mismos como una estrategia interesante para generar resistencia a un amplio rango de patógenos. La expresión de AtEFR confiere reconocimiento a elf18 en cultivos de especies monocotiledóneas como arroz y trigo (Schoonbeek et al., 2015; Schwessinger et al., 2015). Estos trabajos muestran que las vías de señalización inmunes “downstream” de los receptores PRR están conservados entre familias de plantas y que la transferencia de los mismos a otras familias ofrece una estrategia con potencial biotecnológico de generar cultivos resistentes a un amplio rango de patógenos.

El objetivo general de este proyecto buscó contribuir a incrementar mecanismos de resistencia al marchitamiento bacteriano en el cultivo de papa ante un agente patogénico de relevancia a nivel mundial (es considerada como agente de bioterrorismo en USA por la amenaza potencial que representa) y mediante una estrategia ambientalmente amigable como es el mejoramiento genético.

Por un lado el modelo de estudio de interacción planta-patógeno, que incorpora resistencia cuantitativa mediante mejoramiento clásico y resistencia por ingeniería genética, sobre dos genotipos distintos, es una estrategia original. Se pone de relieve que se ha combinado dos estrategias que resultaron complementarias y sinérgicas en tanto el receptor

EFR despierta el sistema inmune de la planta y la respuesta —particularmente en el clon de mejoramiento— de alguna manera mejoró no solo la respuesta a nivel vegetativo sino también a nivel de estructuras de propagación como es el tubérculo (Boschi et al., 2017).

Entre los resultados esperados del proyecto, se encuentran el estudio de las interacciones planta patógeno permitirá generar conocimiento básico de las características del patógeno y la enfermedad así como los mecanismos de resistencia introgresados. Por otra parte, se podrán generar estrategias de diagnóstico y detección rápida de infecciones sintomáticas y asintomáticas.

Se plantea un estudio transcriptómico comparativo para determinar los genes implicados en la resistencia observada en ensayos preliminares. Este análisis desde un punto básico contribuirá a complementar la información disponible de genes de resistencia provenientes de *S. commersonii* y el efecto de la interacción con el receptor AtEFR. Asimismo, develará los genes regulados por AtEFR y su implicancia en la respuesta a *R. solanacearum*. Desde un punto de vista aplicado, esta información podrá ser utilizada en estrategias de mejoramiento por ingeniería genética de otras variedades, acortando los tiempos del mejoramiento clásico.

La evaluación a campo permitirá brindar información sobre el efecto del receptor AtEFR en los eventos de transformación respecto a las variedades sin transformar. En plantas modificadas genéticamente para incrementar resistencia a patógenos se ha observado muchas veces que afecta otras características en la planta que no son deseables (afectando p.ej. la arquitectura de la planta y el rendimiento). En este sentido, se verificará las características agronómicas de los genotipos y las características fenotípicas determinando si el comportamiento a campo es similar al observado en condiciones controladas en cuanto a la respuesta a la inoculación a *R. solanacearum*. Estos ensayos permitirán avanzar en la selección de eventos para el desarrollo de líneas con posible destino comercial (INIA Iporá-EFR) y/o para la introgresión de los caracteres deseados en los programas de mejoramiento de INIA (clon 09509.6-AtEFR).

En ambos casos se deberá tener en cuenta que los cultivos transgénicos que sean utilizados para consumo humano deben ser exhaustivamente examinados en relación a los posibles impactos en el ambiente, la salud alimenticia, entre otros aspectos. El proceso de evaluación incluye la transferencia génica, el impacto en organismos no blanco y salud humana, análisis bioquímicos y fenotípicos, alergenicidad y toxicidad.

Los resultados obtenidos en este proyecto y en caso de resultar promisorios componen el punto de partida hacia la evaluación de eventos transgénicos con el fin de su aprobación para consumo. En este sentido, este proyecto permitirá continuar contribuyendo en la generación de experiencia en normativa en relación a cultivos OGM, desde los protocolos de bioseguridad a nivel de ensayos en laboratorio como a campo, así como las vías de reglamentación y registro de los eventos caracterizados. Para este tipo de reglamentación, INIA ha sido referencia en cumplir con las normativas y auditorías correspondientes.

Si bien la generación de variedades con resistencia a enfermedades bacterianas es un proceso lento, este proyecto —que considera un sistema de percepción temprana del patógeno (PTI) y resistencia proveniente de *S. commersonii* en el clon 09509.6— propone avanzar en este sentido como alternativa a problemáticas de interés productivo local e internacional.

## **Metodología/diseño del estudio**

Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Se realizaron evaluaciones sobre 4 líneas At-EFR seleccionadas en base a trabajos previos del grupo (dos líneas Iporá-AtEFR -3 y 12- y dos líneas clon 09509.6-AtEFR -34 y 37). También se incluyeron controles sin transformar de cada genotipo. Las plantas fueron micropropagadas in vitro.

Cepas de *R. solanacearum*

Se utilizó la cepa UY031 de *R. solanacearum* y dos cepas reporteras desarrolladas y validadas por nuestro grupo. Por un lado, la cepa reportera UY031 Pps-lux generada por integración del operón luxCDABE, capaz de emitir luminiscencia in vivo. Adicionalmente, se utilizó la cepa reportera UY031 Pps-GFP, que expresa de forma constitutiva una variante de la proteína verde fluorescente (GFPuv).

OE1. Evaluar la resistencia a marchitez bacteriana de genotipos de papa seleccionados en ensayos que reproduzcan las condiciones de infección natural y bajo condiciones de bioseguridad.

Ensayo de enfermedades en macrotúnel

Para la evaluación de la enfermedad en condiciones parecidas a la infección natural en el campo, se construyó un macrotúnel de plástico que cumplía la normativa de bioseguridad de nivel II para plantas OGM, con malla antiinsectos. Se registraron las condiciones de temperatura y humedad relativa. La temperatura media varió entre 16,93 y 34,51 °C, y la HR media entre 45,88 y 87,66%.

Las plantas fueron micropropagadas in vitro y se cultivaron durante cinco semanas en invernadero antes de trasplantarlas en el macrotúnel. Las parcelas experimentales consistieron en 10 plantas por genotipo por parcela con una

distancia de 30 cm entre plantas. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con 3 parcelas repetidas por tratamiento. Se realizaron dos ensayos de campo durante la temporada de verano de 2019 y el otoño de 2020.

La inoculación del suelo se adaptó de protocolo CIP. Se prepararon suspensiones bacterianas a partir de cultivos líquidos de una noche de *R. solanacearum* UY031 incubados a 28 °C, y se ajustaron espectrofotométricamente a una concentración de 108 ufc-ml<sup>-1</sup> (DO600 de 0,1). Se inocularon placas de Petri (9 cm) que contenían medio TTC Kelman con 100 µL de esta suspensión empleando la técnica de la placa extendida, con el objetivo de lograr un crecimiento confluyente en toda la placa. Tras 48 h de incubación, se enterró un trozo (1/8) de la placa de agar cultivada a 5 cm de distancia de cada planta y a 20 cm de profundidad. La progresión de la enfermedad se registró regularmente utilizando una escala ordinal que iba de 0 (planta asintomática) a 4 (todas las hojas marchitas). Se realizaron evaluaciones semanales hasta que todas las plantas del cultivar susceptible INIA Iporá murieron, a los 60 días después de la inoculación (DPI). Los tubérculos de todas las plantas se cosecharon y se inspeccionaron visualmente en busca de síntomas externos o internos de infección por marchitez bacteriana. El nivel de resistencia se calculó mediante el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) basada en la puntuación media de marchitez de cada planta. Se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) para identificar los efectos significativos del transgén AtEFR, el fondo genético y la interacción entre los efectos principales sobre la resistencia al BW. Las medias se compararon mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Los análisis estadísticos se realizaron con R.

OE2. Evaluar el efecto del receptor AtEFR sobre las características agronómicas de los genotipos de papa transformados en condiciones de campo.

Se seleccionaron para esta evaluación dos eventos que mostraron alta resistencia a *R. solanacearum*, INIA Iporá EFR 3 e INIA Iporá EFR 12. El estudio se realizó en una parcela de la estación experimental INIA Las Brujas (latitud 34°40' S, /longitud 56° 20' W, Altitud 32 m.s.n.m.), bajo la normativa vigente para la evaluación de material genéticamente modificado según comisión para la gestión del riesgo del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Las condiciones del ensayo fueron las mismas (tanto de suelo como ambientales) para los tres genotipos analizados: INIA Iporá sin transformar (S/T), eventos INIA Iporá EFR 3 e INIA Iporá EFR 12. Se realizaron dos ensayos a campo, en las zafras de otoño 2020 y primavera 2020/21. El ensayo de otoño 2020, tuvo una duración de 140 días (siembra 4/12/2019, cosecha 22/4/2020). El ensayo de primavera 2020/21 tuvo una duración de 148 días (siembra 1/9/2020, cosecha 27/01/2021). No se realizaron aplicaciones de insecticidas ni de fungicidas para el control de plagas. Ambos ensayos fueron realizados con riego por goteros (una cinta por cantero con emisores distanciados 30 cm y un caudal por emisor de 1 l hora<sup>-1</sup>).

Ambos ensayos se realizaron en bloques completos al azar con tres repeticiones. En el ensayo de otoño 2020 la parcela fue en surcos distanciados 0,8 m y de 5 m de largo, la densidad de plantas objetivo fue de 40.000 plantas ha<sup>-1</sup>. En el ensayo de primavera 2020/21 el diseño y la conformación de las parcelas fueron las mismas al ensayo de otoño 2020, pero el análisis se realizó sobre 5 plantas de cada parcela. En el estudio de la caracterización fenotípica se siguieron las directrices de la Unión para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV). Las características estudiadas fueron: porcentaje de emergencia medido a los 30 días de cultivo, vigor evaluado a los 57 y 70 días en la cosecha de primavera y a los 47 y 54 días en otoño, altura de planta medido en primavera a los 75 días y en otoño a los 54 días desde la plantación. En el ciclo de otoño, a los 54 días se realizaron las observaciones de morfología de hoja, número de tallos y arquitectura de planta. Se cuantificó el número de días a iniciación floral, definido cuando el 50% de las plantas tenía la primera flor abierta. El vigor de las plantas se describió según escala de 1 al 9, siendo 1 muy poco vigorosa y 9 muy vigorosa.

En el análisis de rendimiento se siguió el procedimiento de la Evaluación Nacional de Cultivares de papa requisito obligatorio para el Registro Nacional de Cultivares (INASE, 2021). Para medir rendimiento total se cosecharon todos los tubérculos de la parcela, se contaron y pesaron. El momento de cosecha se definió de acuerdo al momento de senescencia. Se clasificaron los tubérculos cosechados según tamaño considerando las siguientes categorías: comercial (mayores a 80 g), semilla (entre 40 y 80 g) y descarte (menores de 40 g).

Se realizó análisis de varianza para estudiar las diferencias entre los genotipos y se realizó el test de Tukey para separar medias ( $p < 0.05$ ). El estudio estadístico fue realizado en el programa Infostat y RStat. plantas de cada parcela.

OE3. Evaluar el efecto del receptor AtEFR y de genes de resistencia introgresados a partir de *S. commersonii*, sobre el proceso de colonización y las respuestas de defensa inducidas por la infección con *R. solanacearum*.

Para la evaluación del patrón de colonización, las plantas cultivadas en invernadero durante dos semanas se trasplantaron a macetas individuales y se colocaron en una cámara de crecimiento a 24 °C, con un 60% de humedad relativa diaria/100% nocturna y un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad durante una semana adicional antes de los ensayos de inoculación.

Las suspensiones bacterianas se prepararon a partir de cultivos líquidos nocturnos de cepas reporteras de *R. solanacearum* y se ajustaron espectrofotométricamente a una concentración de 107 ufc-ml<sup>-1</sup>. Las plantas se inocularon en

el suelo empapando 40 ml de la suspensión bacteriana en cada maceta hasta alcanzar una densidad final de 10<sup>6</sup> ufc-g<sup>-1</sup> con herida radicular previa. Las plantas de control inoculadas únicamente con solución salina se consideraron como tratamiento de control negativo.

Para la detección de luminiscencia, 12 plantas de cada genotipo: Iporá tipo salvaje, Iporá AtEFR 3, Iporá AtEFR 12, clon 09509.6 tipo salvaje, clon 09509.6 AtEFR 34 y clon 09509.6 AtEFR 37 fueron inoculadas en el suelo con la cepa reportera UY031 PPS-lux. Las plantas se analizaron con un sistema In vivo MSFX PRO Bruker, tomando imágenes de luminiscencia con un tiempo de exposición de 5 minutos e imágenes de rayos X, evaluando la colonización bacteriana a los 3, 4, 5, 6 y 10 DPI.

Para la detección de fluorescencia, las plantas se inocularon en el suelo con la cepa reportera UY031 PPS-GFP. A continuación, se analizó la colonización bacteriana en los tejidos de las raíces y los tallos a los 2, 7 y 14 DPI. Las raíces y las secciones transversales del tallo inferior se prepararon y fijaron según lo descrito y se observaron en un microscopio confocal (Leica, TCS-SP5). Se evaluaron tres réplicas para cada tiempo y genotipo. Los experimentos se repitieron dos veces.

OE4. Análisis transcriptómico masivo de genotipos de papa transformados con el receptor AtEFR en respuesta a la infección con *R. solanacearum*.

El objetivo del análisis fue comparar los perfiles de expresión de los genotipos transformados con el receptor EFR respecto a los genotipos sin transformar analizando diferentes tiempos post inoculación con *Ralstonia solanacearum* (Rs). Se emplearon plantines multiplicados in vitro que luego fueron pasados a una bandeja plástica conteniendo solución hidropónica. Mediante esta metodología se buscó: i) facilitar la inoculación minimizando daños mecánicos a nivel de raíces, ii) uniformizar las condiciones de inoculación y el tiempo de toma de muestra dentro de cada unidad experimental. De esta forma se logró evaluar de la forma más directa y uniforme posible la respuesta de cada genotipo frente a la inoculación por el patógeno.

Se utilizaron 100 plantines de cada uno de los siguientes genotipos: clon 09509.6-AtEFR 34 y 09509.6 sin transformar, Iporá-AtEFR 3 e Iporá sin transformar.

Las plantas fueron inoculados al sexto día de su pasaje a hidroponia. Para esto, se sumergió cada planchuela durante 10 minutos en una bandeja que contenía una suspensión de *Ralstonia solanacearum* de concentración 10<sup>7</sup> ufc/mL. Finalmente se colocaron los plantines nuevamente en solución hidropónica.

Se procesaron las plantas a las 0, 12 y 24 horas post inoculación, con la finalidad de abarcar una ventana de tiempo suficientemente amplia para visualizar la expresión de los genes involucrados en la respuesta PTI en las plantas. En cada tiempo, se hizo un pool de 6 plantas de cada condición, y se utilizaron cuatro de estos pools como réplicas biológicas. Se cortó y pulverizó con nitrógeno líquido la zona de tallo basal de las mismas, y el tejido vegetal molido fue alicuotado en tubos eppendorf y almacenados a -70°C.

Se extrajo el ARN del tejido vegetal con un kit de extracción de ARN para plantas (Qiagen, RNeasy Plant Mini Kit (50)). Se contrató el Servicio de Secuenciación del IIBCE para realizar el Análisis de Integridad del ARN (RIN) extraído. Se decidió continuar con aquellas muestras que presentaron un RIN mayor o igual a 7. Estas muestras fueron tratadas con RNA stable (Biomatrix, RNA stable), para conservar la integridad del ARN. Se envió el ARN protegido a la empresa Admera Health (Genohub INC), Estados Unidos, para la construcción de librerías y posterior secuenciación del ADNc con los siguientes requisitos: reads paired-end de 150 pb de longitud y cobertura de 30 millones de reads por muestra. Al llegar a esta empresa, las muestras fueron sometidas a una nueva evaluación del RIN. En esta oportunidad, la mayoría de las muestras correspondientes a plantas Iporá presentaron una calidad muy pobre, por lo que se decidió continuar trabajando sólo con el clon 09509.6.

El análisis de los datos generados en este ensayo fue realizado en el marco de una pasantía en el Laboratorio de Bioinformática de la Universidad de San Pablo (USP), Brasil, bajo la tutela del Dr. João Setubal y el Msc. Jhonatas Sirino.

## Resultados, análisis y discusión

OE1. La evaluación de la enfermedad en el campo es un desafío debido a la desigual concentración del patógeno en los suelos naturalmente infectados. Además, como *R. solanacearum* es capaz de persistir en el suelo durante mucho tiempo, la inoculación artificial en el campo no es posible debido al alto riesgo de diseminación. Para superar estas limitaciones, se construyó un macrotúnel que permite condiciones experimentales uniformes y que imitase el entorno natural del campo cumpliendo con las medidas de bioseguridad. Además, el uso del macrotúnel minimiza el riesgo de heladas y plagas, y permite alcanzar temperaturas más elevadas, favoreciendo la evaluación de resistencia a enfermedades. En estas condiciones experimentales se verificó un efecto significativo del gen AtEFR ( $p < 0,0001$ ) y del fondo genético ( $p = 0,0002$ ) sobre la resistencia al BW, mientras que no se observó ninguna interacción significativa entre ambos factores principales ( $p = 0,2511$ ). Según este resultado, las dos fuentes de resistencia actúan de forma aditiva, lo que permite analizar estos

efectos principales de forma independiente. El efecto directo del gen AtEFR sobre la resistencia al BW se verificó en los dos fondos genéticos evaluados. Según el cálculo de AUDPC, las líneas transgénicas Iporá y 09509.6 AtEFR fueron significativamente más resistentes que sus análogos silvestres. En cuanto a las plantas de Iporá, Iporá AtEFR 12 fue el genotipo más resistente, mostrando una mayor resistencia incluso en comparación con Iporá AtEFR 3 ( $p < 0,0001$ ). No se observaron diferencias entre las líneas transgénicas 09509.6 AtEFR 34 y 37, mostrando ambas una resistencia significativamente mayor al BW en comparación con el clon no transformado 09509.6 ( $p < 0,0001$ ).

Las líneas transgénicas Iporá AtEFR 3 y 12 mostraron un 33% y un 50% de supervivencia de las plantas, respectivamente. El efecto más relevante se observó en las plantas derivadas del clon 09509.6. En este caso, se observó una reducción de los síntomas de la enfermedad y una tasa de supervivencia cuatro veces mayor para ambas líneas 09509.6 AtEFR en comparación con el clon 09509.6 no transformado. Estos resultados fueron publicados en *Agrociencia Uruguay* (Fort et al., 2020).

A finales de 2019 se inició contacto con el Dr. Marc Ghislain (Biotecnólogo senior- Centro Internacional de la Papa- CIP coordinado con 2BF y TSL) con sede en Nairobi, Kenia, a efectos de realizar un ensayo comparativo internacional en campos infestados con la enfermedad. Sha.198, Ipora-EFR-3 y sus controles no transgénicos se sometieron a pruebas de estimación de enfermedad por *Ralstonia solanacearum*. El bioensayo se realizó en invernáculo con plantas inoculadas, 3 plantas y 10 repeticiones, reveló que Ipora-EFR-3 fue la que menos se marchitó y, junto con Sha.198, tuvo una baja infección latente.

Los resultados confirmaron las observaciones anteriores de que tanto Sha.198 como Ipora-EFR-3 tienen tolerancia al BW. También sugiere que Ipora-EFR-3 tiene un mayor nivel de tolerancia a BW. Este resultado podría abrir el camino para desarrollar un producto basado en los genes *pflp* y/o EFR.

OE2. Si bien el ensayo se realizó con los ambos genotipos, genotipos del clon 09509.6, solo se detalla los resultados obtenidos con INIA Iporá y sus eventos de transformación.

Las principales diferencias observadas entre los genotipos fueron en el largo del segundo tallo resultando en INIA Iporá EFR 12 más corta que INIA Iporá EFR 3 e Iporá S/T y en los días a floración, en las demás características no hubo consistencia entre los valores de los genotipos. Asimismo, se observó cierta diferencia en la apreciación visual de la apertura de hoja.

Caracterización de rendimiento. En cada ciclo productivo (otoño y primavera) se cuantificó para cada genotipo el rendimiento total por superficie y los principales componentes del rendimiento, número promedio de tubérculos por planta y peso medio de los tubérculos producidos.

Todos los genotipos alcanzaron mayor rendimiento total en el ensayo de otoño (rendimiento promedio: 34.8 t ha<sup>-1</sup>) en comparación con el ensayo de primavera (rendimiento promedio: 18.8 t ha<sup>-1</sup>). En ambos ciclos, el genotipo Iporá EFR3 obtuvo rendimiento significativamente inferior al Iporá S/T. Sin embargo, Iporá EFR12 presentó un rendimiento más bajo que Iporá S/T en otoño, pero en primavera superó al testigo sin transformar. Este genotipo mostró una productividad similar en los dos períodos evaluados.

OE3. Las plantas transgénicas Iporá AtEFR 3 y el clon 09509.6 AtEFR 34 fueron seleccionadas para los ensayos de colonización bacteriana. Las plantas inoculadas con el PPS-lux UY031 fueron evaluadas 3, 4, 5, 6 y 10 días después de la inoculación. El patógeno se observó por primera vez a los 5 DPI en 7 de 12 plantas de Iporá tipo salvaje, y en 6 de 12 plantas de Iporá AtEFR 3. Sólo 6 días después de la inoculación, las bacterias patógenas aparecieron por primera vez en 1 de las 12 plantas del clon 09509.6 no transformado. La infección de la planta avanzó rápidamente y, a los 10 días de la inoculación, las bacterias ya habían colonizado 9 de estas plantas, con un patrón de colonización medio extendido. En los ensayos de inoculación con la cepa reportera fluorescente UY031 PPS-GFP, no se observó infección a los 2 DPI, por evaluación microscópica ni en tallos ni en raíces. A los 7 DPI, las raíces de todos los genotipos ya estaban colonizadas, pero en este punto se observaron diferencias en la colonización de los tallos entre las plantas de Iporá y del clon 09509.6. Ninguna de las plantas derivadas del clon 09506.9, ni las de tipo salvaje ni las de AtEFR 34, mostraron bacterias fluorescentes a los 7 DPI. En conjunto, las plantas transgénicas AtEFR muestran más resistencia, en parte porque son más eficaces a la hora de impedir la multiplicación del patógeno en la base del tallo, dificultando así su propagación a la parte aérea, lo que explica el retraso en la aparición de los síntomas de marchitamiento en nuestro ensayo.

OE4. La cuantificación de la expresión génica fue realizada con el programa RSEM y se cuantificaron los reads de en cada transcrito.

Utilizando el paquete EdgeR en R, se realizó el análisis de expresión diferencial. Se consideraron como genes diferencialmente expresados (DEGs) a aquellos transcritos con Logaritmo de Foldchange (LogFC)  $\geq 1$  (up-regulated) y LogFC  $\leq -1$  (down-regulated), y FDR (p-valor ajustado)  $\leq 0,05$ .

Se observó un patrón de comportamiento similar tanto en el clon sin transformar como en el clon AtEFR 34: luego de la

inoculación con Rs se observa una disminución de la transcripción a nivel general y la cantidad de genes reprimidos siempre es mayor a las 12 que a las 24 hpi. Otra observación es que el clon sin transformar presenta en general, mayor número de DEGs que su análogo EFR.

Análisis de lo que ocurre en el clon sin transformar post-inoculación. Si observamos el total de genes diferencialmente expresados en cada uno de los tiempos, con el transcurso de las horas se da una disminución del 37% de genes diferencialmente expresados. A su vez, analizando la proporción de genes inducidos/reprimidos en cada tiempo, se observa en el tiempo más tardío un incremento del 8% en la proporción de genes reprimidos y una disminución de 12% de genes inducidos. Esto podría significar que con el paso del tiempo hay una disminución en la actividad de los genes totales de la planta atendiendo a la presencia del patógeno, con una tendencia mayor a reprimir la expresión.

Análisis de lo que ocurre en el transformado post-inoculación. De igual forma que en el sin transformar, observamos con el transcurso de las horas una reducción de 18% en el número de genes expresados diferencialmente, pero sustancialmente menor, menos de la mitad. Esta gran diferencia podría estar a indicar que la presencia del patógeno en el transformado altera/afecta de una manera menor la actividad celular general de la planta. Una observación interesante es que los valores de genes diferencialmente expresados a las 12 h corresponde exactamente a los valores observados tardíamente en el sin transformar, dando a entender que las plantas transformadas anticiparon una respuesta más tempranamente y que puede definir su condición final con el avance del tiempo. Esto abre la expectativa para el análisis de los componentes de los DEGs en el comparativo sin transformar y el clon 34.

Análisis del comparativo entre sin transformar y transformado post-inoculación. En el comparativo se puede observar claramente que el número total de genes expresados diferencialmente en T1 y T2 es menor a los contrastes anteriores y donde es esperable encontrar diferencias específicas debidas a la presencia del gen AtEFR. Si comparamos en los tiempos la proporción de genes inducidos/reprimidos, en T1 sigue la tendencia de los comparativos anteriores pero en T2 se da una reversión de esta tendencia. Efectivamente, en T2 se observa claramente una proporción mayor de genes inducidos que es novedoso para el experimento y abre la expectativa de análisis de lo que allí se encuentre esté relacionado con el efecto AtEFR. A su vez, se encontraron diferencias a nivel transcriptómico en las respuestas tempranas frente a la inoculación con *R. solanacearum* del genotipo AtEFR respecto al genotipo sin transformar. Estas diferencias nos permiten sugerir que la incorporación del receptor EFR refuerza la respuesta PTI y ETI que se dan en forma complementaria, lo que podría correlacionarse con los mayores niveles de resistencia de estas plantas observados a nivel experimental. Es necesario tener en cuenta que estamos observando diferencias que en algunos casos son sutiles, ya que el clon 09509.9 sin transformar ya es parcialmente resistente a *R. solanacearum* por la presencia de genes de *S. commersonii*, y con la incorporación del gen AtEFR, esta resistencia aumenta. Creemos que distinta sería la situación donde se comparara a en un cultivar susceptible como Iporá, respecto a Iporá-AtEFR, donde el efecto del transgén ayuda muchísimo en el retraso de la enfermedad (Fort et al. 2020). En este sentido, pareciera que la presencia del gen AtEFR en el clon anticiparía claramente la respuesta de la planta respecto del genotipo sin transformar. Este anticipo de respuesta altera/afecta los procesos metabólicos y fisiológicos que derivan en un balance favorable a procesos de crecimiento, habiendo superado la fase de programación de la defensa. Esta sería principalmente la explicación de la mayor resistencia observada en trabajos anteriores de nuestro grupo (Boschi et al. 2017; Fort et al., 2020). Preliminarmente, dos genes de gran relevancia en la interacción AtEFR y el fondo genético del clon 09509.6 ameritan estudios posteriores. Parece importante el rol del gen PP1 que tiene efecto en unidades regulatorias de señalización de auxinas y brasinoesteroides y del gen que codifica para la enzima prenaspirodione oxygenase-like que pertenece a la superfamilia Citocromo P450 que se observó altamente inducida en el transformado. Una última observación que se desprende de este estudio es que el receptor de membrana AtEFR podría tener una función destacable en el tiempo más allá de la bien caracterizada respuesta inicial en la planta. Su presencia activa en la planta de alguna manera sofocaría nuevos impulsos del patógeno que pudieran existir por condiciones predisponentes favorables, de una manera que deberá ser caracterizada en este nuevo escenario tardío y probablemente diferente fenológicamente. Manuscrito en elaboración a ser enviado a publicación en revista arbitrada.

## Conclusiones y recomendaciones

OE1. En este estudio, demostramos que las líneas de papa transformadas con AtEFR presentan mayores niveles de resistencia al BW en comparación con los genotipos no transformados. El efecto de AtEFR se verificó por primera vez en condiciones similares a las del campo. Estos resultados ponen de manifiesto el potencial de las plantas de patata AtEFR como método alternativo de cultivo comercial prometedor. Además, la combinación de un receptor de PAMP que refuerza la PTI, con la resistencia cuantitativa introgresada, resultó ser una estrategia valiosa, mostrando mejores resultados que utilizando cada enfoque por separado. Las plantas AtEFR mostraron una menor proporción de tubérculos sintomáticos en comparación con los controles de tipo salvaje, aunque esta diferencia sólo fue significativa para los genotipos 09509.6.



Este enfoque podría ser una alternativa prometedora para minimizar las infecciones de marchitez bacteriana en el cultivo de la papa. Publicado en Agrociencia Uruguay, (Fort et al., 2020).

OE2. El genotipo Iporá EFR 12 en ausencia de *R. solanacearum*, presentó un rendimiento productivo anual similar a Iporá S/T. Es de esperar que Iporá EFR 12 mantenga la estabilidad productiva cuando la marchitez bacteriana esté presente en las parcelas de siembra. Este genotipo, podría ser una variedad interesante para la producción donde la enfermedad de la Marchitez Bacteriana está presente de forma endémica. Igualmente, Iporá EFR 12 puede ser una alternativa para la base genética de futuros cultivares.

En la actualidad la papa-EFR con resistencia a MB pone de relieve la importancia de un sistema regulador que pueda realizar la evaluación de riesgo ambiental en países donde la enfermedad es endémica y la papa es un alimento básico. Los obtentores de este germoplasma comparten este avance para su uso en regiones que sufren este problema cultural previo acuerdo de uso.

Se enfatiza la conveniencia de hacer mejoramiento de precisión con el receptor EFR que eviten en el genoma de la planta huésped otras expresiones más allá de la esperada, facilitando así aspectos regulatorios. Manuscrito casi pronto, a ser enviado a publicación en revista arbitrada.

OE3. Al comparar los patrones de colonización del patógeno entre los genotipos, concluimos que la mejora de la resistencia de los genotipos AtEFR puede atribuirse a una restricción más efectiva del patógeno en la base del tallo, dificultando su propagación a la parte aérea de la planta, lo que explica la reducción y el retraso en la aparición de los síntomas de marchitamiento. La prevención total de la propagación de la bacteria a través de los tubérculos sigue siendo un objetivo a mejorar. Publicado en Agrociencia Uruguay, Fort et al., 2020.

OE4. Se logró optimizar las condiciones necesarias para crecer las plantas de papa en un sistema hidropónico, y para realizar un análisis transcriptómico masivo en patosistema papa-*R. solanacearum*. Se obtuvieron datos de buena calidad que permitieron identificar varios DEGs candidatos a participar en la resistencia a la murchera en los genotipos evaluados. Muchos de los DEGs identificados se correlacionan con hallazgos reportados en estudios similares de nuestro grupo de investigación en este patosistema (Narancio et al., 2013) y otros donde interaccionan planta y microorganismo patógeno. Esto sustenta la relevancia biológica de los hallazgos en el experimento y la validez del abordaje utilizado.

#### Conclusión general del proyecto

La integración de mejoramiento genético convencional y biotecnologías son partes de un mismo proceso potenciando el alcance de objetivos.

Se desarrollaron actividades de laboratorio e invernáculo en INIA, el centro regional sur (CRS, FAgro), FQuímica, bajo protocolos acorde a los requerimientos de Bioseguridad y autorizados por la comisión para la gestión del riesgo (CGR, MGAP).

El incremento en la resistencia observado primariamente en cámara de crecimiento (Boschi et al. 2017) fue confirmada en condiciones similares a campo (Fort et al. 2020) y en colaboración con el CIP-TSL-2BF (Kenia) en comparativo internacional.

En condiciones de campo y ausencia del patógeno, no se observa un efecto del gen efr sobre características productivas. Se recomienda como altamente conveniente el empleo del gen efr empleando tecnologías de edición de genomas (mejoramiento de precisión) con el objetivo de dirigir la inserción en puertos seguros genómicos. Es una observación que requiere estudios posteriores y podría tener efectos positivos al momento de la evaluación por un sistema regulador.

El análisis de expresión de genes permite explorar puntualmente lo que está ocurriendo en la planta en un momento dado. Se confirma la importancia de los cambios bioquímicos que afectan el balance defensa – crecimiento y donde el cloroplasto juega una función importante.

Los genotipos caracterizados en este proyecto constituyen un germoplasma de alto valor potencial para empleo por programas de MMGG nacional y donde la incidencia de la enfermedad es alta (África-Asia).

Durante el desarrollo del proyecto, se financió un cargo de investigador, se construyó un invernáculo en CRS (FAgro) con condiciones de bioseguridad para la contención de eventos OGM y del agente patógeno, se desarrolló una tesis de Maestría con beca ANII, se publicó un artículo en revista arbitrada y se cuenta con el manuscrito de un segundo artículo.

## Referencias bibliográficas

- Álvarez, B., Biosca, E. G., and López, M. M. (2010). On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.*, 267–279. Available at: [https://pdfs.semanticscholar.org/aa85/77e213e2977a0e4eb739795e3fea51187181.pdf?\\_ga=2.156465595.1055873898.1504096691-1311319012.1504096691](https://pdfs.semanticscholar.org/aa85/77e213e2977a0e4eb739795e3fea51187181.pdf?_ga=2.156465595.1055873898.1504096691-1311319012.1504096691).
- Boschi, F., Schwartzman, C., Murchio, S., Ferreira, V., Siri, M. I., Galvan, G. A., et al. (2017). Enhanced Bacterial Wilt Resistance in Potato Through Expression of Arabidopsis EFR and Introgression of Quantitative Resistance from *Solanum commersonii*. *Front. Plant Sci.* 8, 1642. doi:10.3389/fpls.2017.01642.
- Bradshaw, J. E., Bryan, G. J., and Ramsay, G. (2006). Genetic Resources (Including Wild and Cultivated *Solanum* Species) and Progress in their Utilisation in Potato Breeding. *Potato Res.* 49, 49–65. doi:10.1007/s11540-006-9002-5.
- Carmeille, A., Caranta, C., Dintinger, J., Prior, P., Luisetti, J., and Besse, P. (2006). Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo-type II resistance in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 113, 110–121. doi:10.1007/s00122-006-0277-3.
- Carputo, D., Aversano, R., Barone, A., Di Matteo, A., Iorizzo, M., Sigillo, L., et al. (2009). Resistance to *ralstonia solanacearum* of sexual hybrids between *solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *Am. J. Potato Res.* 86, 196–202. doi:10.1007/s12230-009-9072-4.
- Carputo, D., Barone, A., Cardi, T., Sebastiano, A., Frusciant, L., and Peloquin, S. J. (1997). Endosperm balance number manipulation for direct in vivo germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12013–7. doi:VL - 94.
- DIEA (2016). Anuario estadístico agropecuario.
- ELPHINSTONE, J. G., HENNESSY, J., WILSON, J. K., and STEAD, D. E. (1996). Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPPO Bull.* 26, 663–678. doi:10.1111/j.1365-2338.1996.tb01511.x.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015). *FAO Statistical Pocketbook 2015*. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i4691e.pdf>.
- Fort, S., Ferreira, V., Murchio, S., Schwartzman, C., Galván, G., Vilaró, F., et al. (2020). Potato plants transformed with the Arabidopsis EF-Tu receptor (EFR) show restricted pathogen colonization and enhanced bacterial wilt resistance under conditions resembling natural field infections. *Agrociencia Uruguay* 24. doi:10.31285/agro.24.413.
- Gonzalez, M. (2010). La resistencia a la marchitez bacteriana de *Solanum commersonii* Dun. y su utilización en el mejoramiento genético de papa. Available at: <http://biblioteca.fagro.edu.uy/iah/tesisposgrado/textostesis/2010/0096gon.pdf>.
- González, M., Galván, G., Siri, M. I., Borges, A., and Vilaró, F. (2013). Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii*. *Agrociencia Uruguay* 7, 45–54. Available at: <http://www.fagro.edu.uy/agrociencia/index.php/directorio/article/view/755/604>.
- Hayward, A. C. (1991). Bacterial Wilt Caused by *pseudomonas solanacearum*. *Annu rev Phytopathol* 29, 65–87. doi:10.1146/annurev.py.29.090191.000433.
- Hong, J., Ji, P., Momol, M. T., Jones, J. B., Olson, S. M., Pradhanang, P., et al. (2005). *Ralstonia solanacearum* detection in tomato irrigation ponds and weeds. *Acta Hort.* 695, 309–311.
- Kim-Lee, H., Moon, J. S., Hong, Y. J., Kim, M. S., and Cho, H. M. (2005). Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. *Am. J. Potato Res.* 82, 129–137. doi:10.1007/BF02853650.
- Kunze, G. (2004). The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *Plant Cell Online* 16, 3496–3507. doi:10.1105/tpc.104.026765.
- Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H. P., et al. (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat. Biotechnol.* 28, 365–369. doi:10.1038/nbt.1613.
- Laferriere, T. L., Helgeson, P. J., and Allen, C. (1999). Fertile *Solanum tuberosum*+*S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theor. Appl. Genet.* 98, 1272–1278. doi:10.1007/s001220051193.
- Lebeau, A., Gouy, M., Daunay, M. C., Wicker, E., Chiroleu, F., Prior, P., et al. (2013). Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theor. Appl. Genet.* 126, 143–158. doi:10.1007/s00122-012-1969-5.
- Lee, H.-A., Lee, H.-Y., Seo, E., Lee, J., Kim, S.-B., Oh, S., et al. (2016). Current Understandings on Plant Nonhost Resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 30, MPMI-10-16-0213-CR. doi:10.1094/MPMI-10-16-0213-CR.
- Mangin, B., Thoquet, P., Olivier, J., and Grimsley, N. H. (1999). Temporal and Multiple Quantitative Trait Loci Analyses of

Resistance to Bacterial Wilt in Tomato Permit the Resolution of Linked Loci. *Genetics* 151, 1165 LP – 1172. Available at: <http://www.genetics.org/content/151/3/1165.abstract>.

Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., et al. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 614–629. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.

Martin, C., and French, E. (1985). *Bacterial Wilt of Potato: Pseudomonas solanacearum*. Lima Available at: <https://betuco.be/Potato/Bacterial Wilt of Potato - Ralstonia Solanacearum.pdf>.

Muthoni, J., Shimelis, H., and Melis, R. (2012). Management of Bacterial Wilt [*Ralstonia solanacearum* Yabuuchi et al., 1995] of Potatoes: Opportunity for Host Resistance in Kenya. *J. Agric. Sci.* 4, 64–78. doi:10.5539/jas.v4n9p64.

Narancio, R., Zorrilla, P., Robello, C., Gonzalez, M., Vilaró, F., Pritsch, C., et al. (2013). Insights on gene expression response of a characterized resistant genotype of *Solanum commersonii* Dun. against *Ralstonia solanacearum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 136, 823–835. doi:10.1007/s10658-013-0210-y.

Olsson, K. (1976). Experience of Brown Rot Caused by *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in Sweden. *EPPO Bull.* 6, 199–207. doi:10.1111/j.1365-2338.1976.tb01546.x.

Peeters, N., Carrère, S., Anisimova, M., Plener, L., and Cazalé, A. (2013). Répertoire , unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex Répertoire , unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex.

Pianzola, M. J., Zarantonelli, L., González, G., Franco Fraguas, L., and Vázquez, A. (2005). Genetic, phytochemical and biochemical analyses as tools for biodiversity evaluation of wild accessions of *Solanum commersonii*. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 67–78. doi:10.1016/j.bse.2004.05.012.

Priou, S., Aley, P., Chujoy, E., Lemaga, B., and French, E. R. (1999). Integrated Control of Bacterial Wilt of Potato. CIP Series IV-III. Lima Available at: <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/10/guiaing.pdf>.

Qian, Y., Wang, X., Wang, D., Zhang, L., Zu, C., Gao, Z., et al. (2013). The detection of QTLs controlling bacterial wilt resistance in tobacco (*N. tabacum* L.). *Euphytica* 192, 259–266. doi:10.1007/s10681-012-0846-2.

Schoonbeek, H. jan, Wang, H. H., Stefanato, F. L., Craze, M., Bowden, S., Wallington, E., et al. (2015). Arabidopsis EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. *New Phytol.* 206, 606–613. doi:10.1111/nph.13356.

Schwessinger, B., Bahar, O., Thomas, N., Holton, N., Nekrasov, V., Ruan, D., et al. (2015). Transgenic Expression of the Dicotyledonous Pattern Recognition Receptor EFR in Rice Leads to Ligand-Dependent Activation of Defense Responses. *PLoS Pathog.* 11, 1–34. doi:10.1371/journal.ppat.1004809.

Siri, M. I., Galván, G. A., Quirici, L., Silvera, E., Villanueva, P., Ferreira, F., et al. (2009). Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. *Euphytica* 165, 371–382. doi:10.1007/s10681-008-9800-8.

Wang, J.-F., Olivier, J., Thoquet, P., Mangin, B., Sauviac, L., and Grimsley, N. H. (2000). Resistance of Tomato Line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan Is Controlled Mainly by a Major Strain-Specific Locus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 6–13. doi:10.1094/MPMI.2000.13.1.6.

Yadeta, K. A., and J Thomma, B. P. H. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front. Plant Sci.* 4, 97. doi:10.3389/fpls.2013.00097.

Yao, J., and Allen, C. (2006). Chemotaxis Is Required for Virulence and Competitive Fitness of the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum* Chemotaxis Is Required for Virulence and Competitive Fitness of the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum*. 188, 3697–3708. doi:10.1128/JB.188.10.3697.

Yao, J., and Allen, C. (2007). The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *J. Bacteriol.* 189, 6415–6424. doi:10.1128/JB.00398-07.

Yuliar, Nion, Y. A., and Toyota, K. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes Environ.* 30, 1–11. doi:10.1264/jsme2.ME14144.

## Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)